



# **Étude des effets de contraintes dynamiques sur l'organisation d'échafaudage collagène-cellules**

**Mémoire**

**Lucie Lévesque**

**Maitrise en génie des matériaux et de la métallurgie**  
Maitre ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Lucie Lévesque, 2017

# **Étude des effets de contraintes dynamiques sur l'organisation microstructurale du collagène et d'échafaudage collagène-cellules**

**Mémoire**

**Lucie Lévesque**

Sous la direction de :

Diego Mantovani, directeur de recherche

## Résumé

Au cours des trente dernières années, l'ingénierie du tissu vasculaire a connu un essor considérable dû à un besoin clinique important de greffons vasculaires adéquats pour le remplacement d'artères de faible diamètre. En effet, les greffes autologues ou synthétiques actuels de faible diamètre s'accompagnent souvent d'une défaillance à l'intérieur de 5 à 10 ans. Malgré les efforts injectés dans les dernières années, la translation vers la clinique d'artères régénérées ne connaît pas les résultats escomptés. L'un des défis majeur dans l'ingénierie tissulaire est le contrôle des fonctions cellulaires qui dicte la maturation des constructions. De nombreuses études ont été menées sur la réponse des cellules musculaires lisses (abréviation en anglais : SMC désignant «smooth muscle cell») en 2D sous contrainte cyclique, mais peu ont examiné l'effet de la contrainte cyclique sur les SMC en 3D afin d'optimiser les stratégies de contrôle de bioréacteurs pour la maturation et régénération des tissus. Ainsi, ce projet de recherche vise à faire l'étude des effets de stimuli mécaniques cycliques sur des échafaudages cellularisés de collagène. Le collagène a été utilisé comme échafaudage dû à ses excellentes propriétés biologiques et aussi car il est présent dans la paroi des artères physiologiques. Un système permettant d'imposer des stimuli mécaniques cycliques en 2D aux constructions 3D de collagène cellularisées a donc été développé. Les contraintes cycliques ont révélé une orientation préférentielle des cellules dans le sens de la contrainte, ainsi qu'une orientation des fibrilles de collagène dans ce même sens par les cellules. De plus, le remodelage effectué par les cellules a permis d'augmenter les propriétés viscoélastiques de la construction et d'obtenir un comportement mécanique à la relaxation de contrainte semblable aux veines saphènes. Les cellules ont également démontré une désensibilisation face aux contraintes cycliques. Cette recherche a ainsi permis de répondre à certaines questions liées aux comportements cellulaires dans un environnement 3D sous condition de stimulation mécanique. L'approfondissement des connaissances des comportements cellulaires en environnement 3D sous contrainte cyclique demeurent un défi clé dans l'obtention d'artères régénérées ayant des propriétés physiologiques similaires à celles d'artères natives.

## **Abstract**

In the last thirty years, vascular tissue engineering has emerged as an important field in tissue engineering due to a significant clinical need for adequate vascular graft for replacement of small diameter artery. Indeed, the current autologous or synthetic grafts of small diameter present a high failure rate within 5 to 10 years. Despite the efforts injected in the recent years, the clinical translation of engineered artery constructs is far from being successful. One of the challenges encountered in tissue engineering is the control of cellular functions that dictates the maturation of tissue engineering constructs. Furthermore, numerous studies have been conducted on the response of smooth muscle cells (SMC) in 2D under cyclic strain, but a few have examined the effect of cyclic strain on SMCs in 3D to optimize the control strategies of bioreactors for tissue maturation and generation. Thus, this research project aims to study the effects of cyclic mechanical stimuli on cellularised collagen scaffolds. Collagen has been used as a scaffold due to its excellent biological properties and since it is found in the wall of physiological arteries. A system for imposing cyclic mechanical stimuli in 2D to 3D cellularised collagen constructs was therefore developed. The cyclic stresses revealed a preferential orientation of the cells in the direction of the strain, as well as an orientation by the cells of the collagen fibrils in the same direction. Moreover, the remodeling performed by the cells led to an improvement of the viscoelastic properties of the construct and to a mechanical behavior similar to the saphenous vein under stress-relaxation. The cells also shown a desensitization to cyclic mechanical stimuli. Thus, this research allowed to answer some of the questions related to cellular behavior in a 3D environment under mechanical stimulation. Deepening our knowledge of cell behavior in 3D environment under cyclic mechanical stimuli remains a key challenge in obtaining regenerated artery with similar physiological properties than native arteries.

# Table des matières

RÉSUMÉ .....	III
ABSTRACT .....	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES FIGURES .....	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES .....	X
REMERCIEMENTS .....	XII
AVANT-PROPOS .....	XIV
1. MISE EN CONTEXTE ET REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	1
1.1 INTRODUCTION.....	1
1.2 LE SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE.....	4
1.2.1 <i>Le cœur</i> .....	5
1.2.2 <i>Les vaisseaux sanguins</i> .....	7
1.2.3 <i>Le réseau artériel</i> .....	7
1.2.4 <i>Les capillaires</i> .....	8
1.2.5 <i>Le réseau veineux</i> .....	8
1.2.6 <i>La paroi des vaisseaux sanguins</i> .....	9
1.2.6.1 Les cellules endothéliales.....	11
1.2.6.2 Les cellules musculaires lisses .....	11
1.2.6.3 Les fibroblastes.....	12
1.2.6.3.1 Réponses cellulaires aux stimuli environnants .....	12
1.2.6.4 Le collagène .....	14
1.2.6.5 L'élastine .....	16
1.3 L'INGÉNIERIE DU TISSU VASCULAIRE.....	17
1.3.1 <i>L'auto-assemblage</i> .....	18
1.3.2 <i>Matrice décellularisée</i> .....	20
1.3.3 <i>Substitut vasculaire par échafaudage</i> .....	22
1.3.3.1 Échafaudage synthétique .....	22
1.3.3.2 Échafaudage naturel.....	24
1.3.4 <i>Stratégie d'amélioration des propriétés mécaniques</i> .....	26
1.3.4.1 Techniques de stimulation mécanique.....	27
1.3.4.1.1 Cisaillement .....	28
1.3.4.1.2 Déformation .....	29
2. OBJECTIFS.....	31
2.1 APPROCHE DU LABORATOIRE .....	31
2.2 OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE .....	33

3.	THE EFFECT OF DYNAMICAL STRAIN ON THE MATURATION OF COLLAGEN-BASED CELL-CONTAINING SCAFFOLDS FOR VASCULAR TISSUE ENGINEERING .....	34
3.1	RÉSUMÉ .....	35
3.2	ABSTRACT .....	36
3.3	INTRODUCTION.....	37
3.4	MATERIALS AND METHODS .....	38
3.4.1	<i>Mechanical stimulation system</i> .....	38
3.4.2	<i>Construct preparation</i> .....	39
3.4.3	<i>Scanning electron microscopy</i> .....	40
3.4.4	<i>Image analysis</i> .....	40
3.5	RESULTS AND DISCUSSION .....	40
3.5.1	<i>Mechanical stimulation system</i> .....	40
3.5.2	<i>Images analyses of collagen and porcine smooth muscle cells</i> .....	41
3.6	CONCLUSION .....	43
3.7	ACKNOWLEDGEMENTS.....	44
4.	INCREMENTING THE FREQUENCY OF DYNAMICALLY STRAINED SMC-CELLULARISED COLLAGEN-BASED SCAFFOLDS AFFECTS THE MATRIX REMODELING AND THE MECHANICAL PROPERTIES .....	45
4.1	RÉSUMÉ .....	46
4.2	ABSTRACT .....	47
4.3	INTRODUCTION.....	48
4.4	MATERIEL AND METHODS .....	50
4.4.1	<i>Cellularised scaffold preparation</i> .....	50
4.4.2	<i>Stimulation system</i> .....	50
4.4.3	<i>Confocal microscopy</i> .....	51
4.4.4	<i>Histology</i> .....	51
4.4.5	<i>Total RNA extraction, cDNA synthesis and real-time qRT-PCR Taqman analysis</i> 52	52
4.4.6	<i>Stress-relaxation testing</i> .....	52
4.5	RESULTS .....	54
4.5.1	<i>Confocal microscopy and histology</i> .....	54
4.5.2	<i>qRT-PCR</i> .....	56
4.5.3	<i>Mechanical analyses</i> .....	57
4.6	DISCUSSION .....	59
4.7	CONCLUSION .....	62
4.8	ACKNOWLEDGMENTS.....	63
5.	CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE .....	64
5.1	CONCEPTION DE LA PLATEFORME DE STIMULATION .....	64
5.2	MODIFICATION DE LA PLAQUE DE SIX PUIITS .....	67
5.2.1	<i>Calibration de la plaque de six puits suite aux modifications</i> .....	69
5.2.2	<i>Choix de la colle</i> .....	70
5.3	CARACTÉRISATION DES CONSTRUCTIONS DE GEL DE COLLAGÈNE CELLULARISÉES ET NON CELLULARISÉES.....	71
5.3.1	<i>Microscopie électronique à balayage</i> .....	71
5.3.2	<i>Production de protéines de la matrice extracellulaire et de la MMP-2</i> .....	72

5.3.3	<i>Microscopie confocale</i> .....	73
5.3.4	<i>Caractérisation mécanique</i> .....	74
5.4	LIMITES ET PERSPECTIVES .....	75
5.4.1	<i>Limites du système de stimulation</i> .....	75
5.4.2	<i>Limites des essais mécaniques</i> .....	76
5.4.3	<i>Perspectives du projet de recherche</i> .....	76
6.	CONCLUSION.....	78
7.	BIBLIOGRAPHIE .....	79
8.	ANNEXE.....	88
8.1	SCHÉMA DU MONTAGE DU SYSTÈME DE STIMULI MÉCANIQUE CYCLIQUE .....	88
8.2	ANALYSE MATLAB.....	88

# Liste des figures

FIGURE 1: L'ÉVOLUTION DE L'ATHÉROSCLÉROSE.....	2
FIGURE 2: LES TRAITEMENTS INVASIFS DE L'ATHÉROSCLÉROSE. TRAITEMENT PAR ANGIOPLASTIE AVEC OU SANS STENT (B) ET TRAITEMENT PAR GREFFE AUTOLOGUE OU SYNTHÉTIQUE (C) [18-22]. .....	3
FIGURE 3: LE SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE [7]. .....	5
FIGURE 4: LE COEUR ET SA CIRCULATION SANGUINE [25]. .....	6
FIGURE 5: STRUCTURE DES ARTÈRES, VEINES ET CAPILLAIRES [24]. .....	9
FIGURE 6: COMPOSITION RELATIVE, DIAMÈTRE ET ÉPAISSEUR DES PAROIS DES DIFFÉRENTS TYPES DE VAISSEAUX SANGUINS [24]. .....	10
FIGURE 7: LA MÉCANOTRANSDUCTION : ACTIVATION DES VOIES DE SIGNALISATION BIOCHIMIQUES SUITE À DES FORCES MÉCANIQUES ET DÉFORMATIONS SUBIES PAR LES CELLULES [42]. .....	14
FIGURE 8: STRUCTURE DU COLLAGÈNE. CHAQUE MOLÉCULE DE COLLAGÈNE EST UNE PROTÉINE ENTIÈREMENT CONSTITUÉE DE TROIS CHAINES DE TROPOCOLLAGÈNE QUI FORME L'HÉLICE ALPHA (A, B ET C). LES GROUPES DE TROIS SONT RELIÉS ENTRE EUX POUR FORMER DE GROSSES FIBRES (D) VISIBLES AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE (E, F) [57]. .....	16
FIGURE 9: SCHÉMA DE FIBRES D'ÉLASTINE SOUS RELAXATION ET SOUS ÉTIREMENT [61, 62]. .....	17
FIGURE 10: L'AUTO-ASSEMBLAGE DE L'INGÉNIERIE DU TISSU VASCULAIRE [66]. .....	19
FIGURE 11: TROIS MÉTHODES COURANTES D'IMPOSITION DE CONTRAINTES DE CISAILLEMENT [43]. EN HAUT À GAUCHE MÉTHODE D'APPLICATION DE CISAILLEMENT À SYSTÈME DE CÔNE ET PLAQUE, EN HAUT À DROIT SYSTÈME D'AGITATION ORBITALE ET AU BAS DE L'IMAGE UN SYSTÈME DE CHAMBRE D'ÉCOULEMENT À FLUX. ....	28
FIGURE 12: MODE D'ACTION DES DÉFORMATIONS SUR MEMBRANE FLEXIBLE [43]. EN HAUT, SYSTÈME DE DÉFORMATION À L'AIDE D'UN PLATEAU, AU CENTRE SYSTÈME DE DÉFORMATION À L'AIDE D'UN VIDE ET AU BAS SYSTÈME DE DÉFORMATION À L'AIDE D'UNE POINTE ARRONDIE. ....	29
FIGURE 13: MACRO-PHOTOGRAPHS OF THE CUSTOM MADE MECHANICAL STIMULATION SYSTEM. A) TEFLON SUPPORT (102MM X 146MM X 35MM, ELEVATION 23.25 MM X 34.25 MM X 9.60 MM) WITH A FITTING AND A GREY SILICONE JOINT; B) 6-WELL (35MM DIAMETER) PLATE MADE WITH SILICONE MEMBRANE (FLEXCELL INTERNATIONAL CORPORATION) SEATED ON THE TEFLON SUPPORT WITH JOINT (DIRECTION OF THE MECHANICAL STIMULATION IS INDICATED BY THE ARROW); C) SIDE OF THE TEFLON SUPPORT WITH JOINT. ....	39
FIGURE 14: PERCENTAGE OF DEFORMATION OF THE TISSUE TRAIN-AMINO CULTURE PLATE'S SILICONE MEMBRANE AT DIFFERENT VACUUM AMPLITUDE .....	41
FIGURE 15: SEM IMAGES OF COLLAGEN, PSMCs WITH AND WITHOUT DYNAMICAL STRAIN VIEW AT 200X, 1800X, 4800X.....	42
FIGURE 16: SEM IMAGES OF A PSMC PSEUDOPOD INFILTRATING THE COLLAGEN MATRIX WITHOUT STRAIN. ....	43

FIGURE 17: VISCOELASTIC MODEL CONSTITUTED OF A SPRING ASSOCIATED IN PARALLEL WITH THREE MAXWELL ELEMENTS AND RESIDUAL STRESS (A) AND REPRESENTATIVE STRESS-RELAXATION CURVE AND SLOPE OF ELASTIC EQUILIBRIUM MODULUS (B). .....	53
FIGURE 18: CONFOCAL IMAGES OF STATIC (A), 1Hz (B) AND GRADUAL (C) STRAIN FREQUENCY 3D CELLULARISED COLLAGEN-BASED SCAFFOLD STAINED WITH DAPI FOR THE NUCLEUS IN BLUE AND RHODAMINE-PHALLOIDIN FOR ACTIN FILAMENT IN RED, SCALE BAR 10 $\mu$ M. ....	55
FIGURE 19: PHASE CONTRAST IMAGES OF STATIC (A), 1Hz (B) AND GRADUAL (C) STRAIN FREQUENCY 3D CELLULARISED COLLAGEN-BASED SCAFFOLD STAINED WITH MASSON'S TRICHROME STAINING (COLLAGEN IN GREEN, NUCLEI IN BLACK) AFTER 24 HRS OF STATIC CULTURE FOLLOWED BY 7 DAYS OF RESPECTIVE STRAIN FREQUENCY BASED CULTURE. MAGNIFICATION: 10X AND SCALE BAR: 100 $\mu$ M. ....	56
FIGURE 20: COMPARATIVE RT-QPCR ANALYSIS OF COLLAGEN (A, B), ELASTIN (C, D) AND MMP-2 (E, F) EXPRESSION TO THE STATIC SAMPLES (LEFT COLUMN) AND TO HUASMC (RIGHT COLUMN) CULTURED IN A FLASK. ASTERIKS REPRESENTS STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCES ( $n \geq 3$ , $P < 0,05$ ). .....	57
FIGURE 21: RELATIVE AMPLITUDE OF THE SHORT (WHITE), MEDIUM (GREY) AND LONG (BLACK) TIME CONSTANT OF COLLAGEN WITHOUT CELLS (COL), COLLAGEN EMBEDDED WITH HUASMC IN STATIC (STATIC), 1 Hz (1Hz), AND GRADUAL (GRADUAL) FREQUENCY APPLIED AND SAPHENOUS VEIN. ASTERIKS REPRESENTS STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCES ( $n \geq 3$ , $P < 0,05$ ). .....	58
FIGURE 22: ELASTIC EQUILIBRIUM MODULUS OF STATIC, 1 Hz AND GRADUAL FREQUENCY OF SAMPLES. ASTERIKS REPRESENTS STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCES ( $n \geq 3$ , $P < 0,05$ ). .....	59
FIGURE 23: VUE DU DESSUS DES DIMENSIONS EN MM DE LA PLATEFORME .....	65
FIGURE 24: VUE LATÉRALE DES DIMENSIONS EN MM DE LA PLATEFORME .....	66
FIGURE 25: MACROPHOTOGRAPHIE DE LA COMPACTION DES GELS DE COLLAGÈNE AVEC DES PSMC APRÈS 4 JOURS DE STIMULATION MÉCANIQUE DYNAMIQUE (INDIQUÉE PAR LA FLÈCHE). CHACUN DES PUIITS ONT UN DIAMÈTRE DE 35 MM. ....	67
FIGURE 26: MACROPHOTOGRAPHIE DE GELS DE COLLAGÈNE AVEC PSMCs ANCRÉS PAR UNE GAZE STÉRILE COLLÉE À LA MEMBRANE ET LA CONCENTRATION DE CONTRAINTE QUE LA COMPACTION CELLULAIRE EXERCE (INDIQUÉ PAR LA FLÈCHE). CHACUN DES PUIITS POSSÈDENT UN DIAMÈTRE DE 35 MM. ....	68
FIGURE 27: MACROPHOTOGRAPHIE D'UN PUIT D'UNE PLAQUE DE SIX PUIITS DE GEL DE COLLAGÈNE AVEC HUAMSCs LIÉ À LA MEMBRANE PAR DES GAZES STÉRILES ET DÉLIMITÉ PAR UNE COLLE DE SILICONE DE GRADE MÉDICAL. LE PUIT POSSÈDE UN DIAMÈTRE DE 35 MM. ....	69
FIGURE 28: POURCENTAGE DE DÉFORMATION DES MEMBRANES DE SILICONE DES PLAQUES «TISSUE TRAIN-AMINO» À DIFFÉRENTES AMPLITUDES DE VIDE.....	70
FIGURE 29: SCHÉMA DU MONTAGE DU SYSTÈME DE STIMULI MÉCANIQUE CYCLIQUE .....	88
FIGURE 30: GRAPHIQUE DE LA CHARGE (Pa) EN FONCTION DU TEMPS (s) DE TEST DE RELAXATION DE CONTRAINTE .....	89
FIGURE 31: GRAPHIQUE REPRÉSENTATIF DES FIT OBTENUS.....	90

## Liste des abréviations et des sigles

2D :	Bidimensionnelle / <i>Two-dimensional</i>
2D-FFT :	Transformation de Fourier rapide bidimensionnelle / <i>Two-dimensional fast Fourier-transform</i>
3D :	Tridimensionnelle / <i>Three-dimensional</i>
aa :	Acide aminé / <i>Amino acid</i>
BSA:	Albumine de sérum bovin / <i>Albumin from bovine serum</i>
cDNA :	Acide désoxyribonucléique complémentaire / <i>Complimentary deoxyribonucleic acid</i>
CO <sub>2</sub> :	Dioxyde de carbone / <i>Carbon dioxide</i>
Dacron :	Poly(éthylène téréphtalate) / <i>Poly(ethylene terephtalate)</i>
DAPI :	4',6-diamidino-2-phénylindole / <i>4', 6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM :	Milieu d'Eagle modifié de Dulbecco / <i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
ECM :	Matrice extracellulaire / <i>Extracellular matrix</i>
EGF:	Facteur recombinant de croissance épidermique humain / <i>Recombinant Human Epidermal Growth Factor</i>
ePTFE :	Polytétrafluoroéthylène expansé / <i>Expanded polytetrafluoroethylene</i>
FBS :	Sérum foetal bovin / <i>Fetal bovine serum</i>
FGF:	Facteur recombinant de croissance des fibroblastes humain / <i>Recombinant Human Fibroblast Growth Factor</i>
GAPDH :	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase / <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Gly :	Glycine
HASMC :	Cellule humaine musculaire lisse aortique / <i>Human aortic Smooth muscle cell</i>
HDFC :	Cellule fibroblaste dermique humain / <i>Human dermal fibroblast cell</i>
HEPES:	Acide 4-(2-hydroxyéthyl-1-pipérazineéthane sulfonate) / <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HSVC :	Cellule de veine saphène humaine / <i>Human saphenous vein cell</i>
HSVSMC :	Cellule musculaire lisse de veine saphène humaine / <i>Human saphenous vein smooth muscle cell</i>
HUASMC:	Cellule musculaire lisse d'artère ombilicale humaine / <i>Human umbilical artery smooth muscle cell</i>
HUVEC:	Cellule endothéliale de veine ombilicale humaine / <i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
Hyp :	Hydroxyproline
MMP :	Métalloprotéinase matricielle / <i>Matrix metalloproteinase</i>
EC :	Cellule endothéliale / <i>Endothelial cell</i>
nHDFC :	Cellule fibroblaste dermique humaine néonatale / <i>neonatal Human dermal fibroblast cell</i>
PBS :	Solution saline tamponnée à base de phosphate / <i>Phosphate buffer saline</i>
PCL :	Poly(ε-caprolactone)
PDGF:	Facteur de croissance dérivé de plaquette / <i>Platelet-derived growth factor</i>
PEG :	Polyéthylène glycol / <i>Polyethylene glycol</i>
PENSTREP :	Pénicilline et Streptomycine / <i>Penicillin and Streptomycin</i>

PGA :	Acide polyglycolique / <i>Polyglycolic acid</i>
PLCL:	Poly(L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone)
PGS:	Poly(glycérol sébacate) / <i>Poly(glycerol sebacate)</i>
PLA :	Acide polylactique / <i>Poly(lactic acid)</i>
Pro :	Proline
PS :	Sérum porcin / <i>Porcine serum</i>
PSMC :	Cellule musculaire lisse porcine / <i>Porcine smooth muscle cell</i>
PVIC :	Cellule interstitielle de valve porcine / <i>Porcine valve interstitial cell</i>
qRT-PCR :	Réaction en chaîne par polymérase transcriptase inverse quantitative en temps réel / <i>Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RASMC :	Cellule musculaire lisses aortique de rat / <i>Rat aortic smooth muscle cell</i>
RNA :	Acide ribonucléique / <i>Ribonucleic acid</i>
SEM :	Microscopie électronique à balayage / <i>Scanning electron microscopy</i>
SMC :	Cellules musculaires lisses / <i>Smooth muscle cells</i>
SMemb	
/non-muscle	
MHC:	Forme embryonnaire de la chaîne lourde de la myosine du muscle lisse ou Chaîne lourde de la myosine du muscle non-lisse / <i>Embryonic form of Smooth Muscle Myosin Heavy Chain or Non-Smooth Muscle Myosin Heavy Chain</i>
SM-MHC:	Chaîne lourde de la myosine du muscle lisse / <i>Smooth Muscle Myosin Heavy Chain</i>
SmaA:	$\alpha$ -Actine du muscle lisse / <i>Smooth Muscle <math>\alpha</math>-Actin</i>
TIMP :	Inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase / <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
UVs:	Ultraviolets
VSMC :	Cellule musculaire lisse vasculaire / <i>Vascular smooth muscle cell</i>

# Remerciements

J'aimerais remercier mon directeur le professeur Diego Mantovani pour cette opportunité incroyable, d'apprendre et de développer un projet de recherche dans l'ingénierie du tissu vasculaire, qu'il m'a offerte. Je le remercie également de la grande patience et sagesse qu'il a su faire tout au long de mon projet. La liberté que j'ai reçue afin de développer mon projet a été précieuse. Je désire également le remercier pour toutes les opportunités d'enseignement et la confiance qu'il m'a prodiguées dans celles-ci. L'aventure qu'est la maîtrise et l'enseignement m'a permis un cheminement extraordinaire qui n'aurait pas été le même sans lui.

Un merci sincère et tout spécial aux professionnels de recherche Pascale Chevallier et Stéphane Turgeon qui ont su être à l'écoute et m'aider tout au long de mon projet. Ils m'ont épaulé et encouragé aux moments opportuns et m'ont permis d'obtenir des seconds souffles. Sans eux ce mémoire ne serait pas le même. Avec le temps ils sont devenus des amis irremplaçables et je leur serai toujours reconnaissante.

J'aimerais également remercier mes collègues du groupe de recherche. Ils sont ceux qui comprennent parfaitement par où j'ai cheminé afin de me rendre à la fin de ce projet de recherche. Je pense à Sébastien Meghezi avec qui j'ai discuté à maintes reprises du collagène. Il a aussi été celui qui m'a pris en charge lorsque je suis arrivée au laboratoire et je lui en suis très reconnaissante. À Caroline Loy qui a été une collaboratrice avec qui j'ai toujours très apprécié travailler. Également à Frédéric Couët qui m'a aidé dans le développement du système de stimulation mécanique. À Audrey Lainé aussi qui m'a donné quelques coups de main lors des tests mécaniques. À toute l'équipe qui était à l'écoute dont Daniele Pezzoli, Nina Bono, Ranna Tolouei et Carlo Paternoster, je vous remercie!

Un merci sincère aussi à Bernard Drouin pour sa disponibilité et son aide dans les tests mécaniques et leurs interprétations. Sa générosité de son temps est incontournable, ainsi que sa gentillesse.

Un grand merci aux professionnelles de recherche Marie-France Côté et Jacques Lacroix pour leur aide inconditionnelle et les nombreuses discussions que nous avons eu sur mon projet de recherche.

À mes amies d'enfance qui sont pour moi comme une deuxième famille qui ont su m'épauler et m'encourager durant tout ce processus, merci! Elles m'ont permis également de me changer les idées lorsqu'il en était temps et pour le bien de mon projet.

À mes amis qui sont à Québec avec moi et qui ont su me faire sentir comme chez moi avec eux, je vous remercie énormément.

Je ne peux, bien sûr, oublier ma famille. C'est grâce à eux aujourd'hui que je me suis rendue ici. Leur support a été inconditionnel et leur encouragement m'a permis de me rendre à la fin. L'amour qu'une famille se démontre est un puissant motivateur.

La dernière personne et non la moindre que je voudrais remercier est l'homme avec qui je partage ma vie, celui qui a la patience et l'amour de me comprendre et de m'encourager dans mon cheminement. Ton appui m'a été indispensable afin d'avancer dans ce mémoire. Tu as su être présent et me donner tout ce dont j'avais besoin pour faire face à l'adversité. Je sais que je peux compter sur toi dans toute situation et ce don est inestimable à mes yeux. Je te serai à jamais reconnaissante et je serai à jamais présente pour toi aussi.

## Avant-propos

Le présent projet de recherche présente l'étude des effets de contraintes dynamiques sur l'organisation d'échafaudage collagène-cellules. Des connaissances en biologie cellulaire tout comme en matériaux ont été nécessaires afin de mener à bien ce projet. La problématique reliée aux maladies cardiovasculaires ainsi que les actuelles stratégies pour palier à ce problème dans la littérature et au laboratoire de biomatériaux et bioingénierie est résumé dans les chapitres 1 et 2. Les recherches effectuées dans le cadre de ce projet ont mené à deux articles. Ainsi, ce mémoire est rédigé par insertion d'articles et les chapitres 3 et 4 font état de ces deux articles. Je suis première auteure de chacun des deux articles avec la collaboration de collègues.

Le premier article intitulé «**The Effect of Dynamical Strain on the Maturation of Collagen-based Cell-Containing Scaffolds for Vascular Tissue Engineering**» se retrouve au chapitre 3 de ce mémoire. Cet article a été publié dans «*Advanced Materials Research Vol. 409 (2012) pp 152-157*». Il a été soumis en mars 2011 et publié pour la première fois en novembre 2011. Les auteurs sont moi-même, Lucie Lévesque, et le professeur Diego Mantovani. J'ai effectué la rédaction entière de l'article et également tout le travail expérimental. Mon co-auteur, le professeur Diego Mantovani, a révisé et apporté sa contribution par des modifications ou commentaires.

Le deuxième article intitulé «**Incrementing the frequency of dynamically strained SMC-cellularised collagen-based scaffolds affect the matrix remodeling and the mechanical properties**» se retrouve au chapitre 4 de ce mémoire. Cet article sera soumis au journal «*ACS Biomaterials Science & Engineering*». Les co-auteurs sont Caroline Loy, Audrey Lainé, Bernard Drouin, Pascale Chevallier et Diego Mantovani. J'ai effectué la rédaction entière de l'article, ainsi que tout le travail expérimental. Caroline Loy a contribué à la culture cellulaire et Audrey Lainé a participé aux tests mécaniques de relaxation de contrainte. Bernard Drouin a aidé à concevoir les tests mécaniques et a guidé l'analyse de ceux-ci. Pascale Chevallier ainsi que Diego Mantovani ont révisé et apporté leurs contributions par des modifications ou commentaires de la rédaction.

Finalement, les chapitres 5 et 6 présentent la discussion générale et les défis qui se sont rattachés au projet de recherche ainsi que la conclusion. Le chapitre 7 présente les références et le chapitre 8 fait état d'informations supplémentaires (annexe).

# 1. Mise en contexte et revue de la littérature

## 1.1 Introduction

Les maladies cardiovasculaires sont un problème autant clinique qu'un fardeau économique. Elles sont responsables de 31% de tous les décès mondiaux et représentent l'une des trois principales causes de décès au Canada [1, 2]. Les répercussions économiques au pays sont estimées à plus de 20,9 milliards de dollars par année. L'athérosclérose est la pathologie cardiovasculaire la plus commune. Elle se caractérise par une accumulation de corps gras tel que le cholestérol, le calcium et les déchets cellulaires aux parois internes des vaisseaux sanguins entraînant également l'épaississement de ces parois (figure 1). Ces dépôts adipeux appelés plaques obstruent graduellement le passage du sang et entraînent une perte d'élasticité des vaisseaux sanguins [3-5]. Plusieurs facteurs de risque amorcent la maladie comme l'obésité, le tabagisme et l'hypertension. Ainsi le contrôle de l'athérosclérose commence par une alimentation saine et de l'activité physique, font suite les médicaments. Lorsque l'obstruction se fait trop grande, l'angioplastie avec ou sans pose d'endoprothèse ou de dispositif endovasculaire («stent») est pratiquée (figure 2A) [3]. Elle consiste à introduire par l'artère fémorale ou subclavière, un ballonnet. Le chirurgien dirige par la suite le ballonnet jusqu'à l'occlusion puis déploie le ballonnet qui compresse la plaque d'athérome. Lorsque la maladie a trop progressé, l'option restante est soit la greffe autologue ou la greffe synthétique. La greffe autologue consiste au remplacement du bout d'artère malade par la veine saphène ou l'artère mammaire du patient (figure 2B). Cependant, bien souvent ces remplacements ne sont pas disponibles dus à une atteinte générale du système cardiovasculaire par l'athérosclérose ou par une utilisation antérieure de veine ou d'artère. La greffe synthétique reste donc la seule option (figure 2B). Les matériaux synthétiques, utilisés dans ce cas, sont le poly(éthylène téréphtalate) (Dacron), le polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE, Gortex) ou le polyurethane [6]. La greffe de prothèse synthétique de Dacron ou de Téflon comporte un taux de succès de 95% à l'intérieur de 5 ans lors du remplacement d'artère de diamètre supérieur à 6mm [7, 8]. Cependant, lors du remplacement d'artère de diamètre inférieur à 6 mm, la grande majorité des implants subissent une défaillance à l'intérieur de 5 ans [6, 8-15]. Le taux de succès des pontages par prothèse

synthétique de faible diamètre dans les membres inférieurs est de 40 à 50% à l'intérieur de cinq ans [16, 17]. Ce taux diminue même à 20% à l'intérieur de trois ans lors des pontages infra-poplitée avec ePTFE [16, 17]. L'hyperplasie intimale, l'athérosclérose à l'intérieur et autour de l'anastomose de l'implant et du vaisseau naturel, la thrombose et la sténose sont les causes de ces faibles taux de succès [6, 8, 11, 15-17].

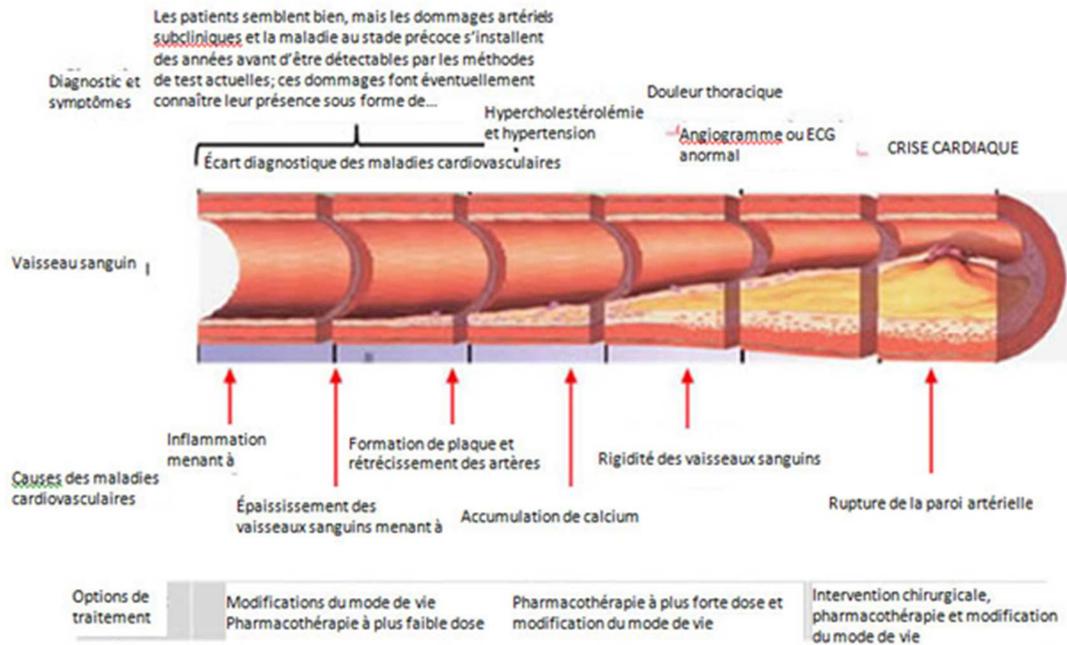


Figure 1: L'évolution de l'athérosclérose

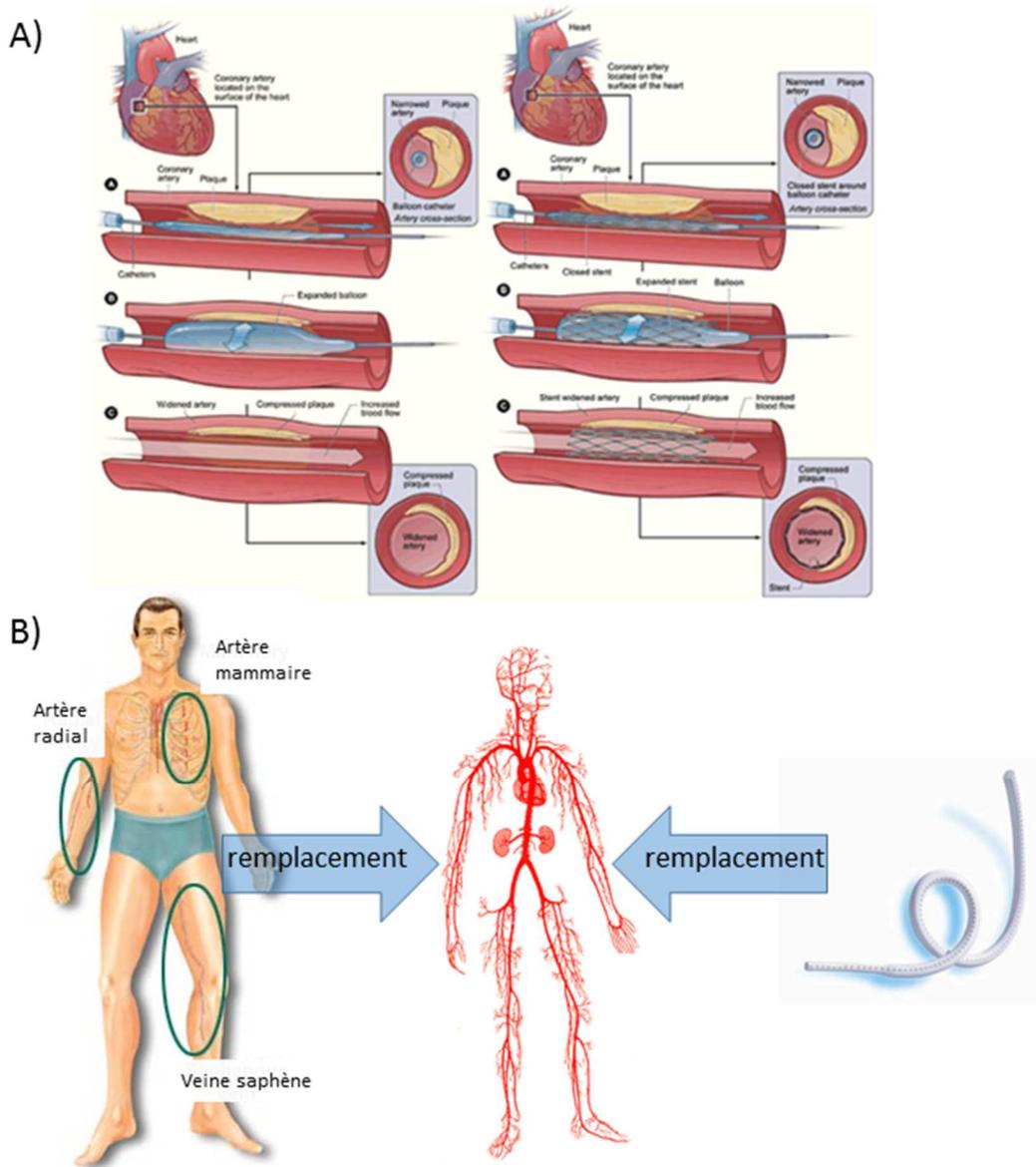


Figure 2: Les traitements invasifs de l'athérosclérose. Traitement par angioplastie avec ou sans stent (B) et traitement par greffe autologue ou synthétique (C) [18-22].

L'ingénierie du tissu vasculaire est un domaine cherchant, entre autre, à pallier à ces problématiques en utilisant trois grandes avenues soit l'auto-assemblage de cellules, la décellularisation de matrice extracellulaire (abréviation en anglais : ECM désignant «extracellular matrix») et l'utilisation d'échafaudage servant à guider la croissance cellulaire. Le présent chapitre permettra d'exposer les bases du système cardiovasculaire (sa circulation, les artères

et les veines le composant) ainsi que les techniques utilisées par l'ingénierie du tissu vasculaire afin d'obtenir un substitut vasculaire adéquat aux remplacements de vaisseaux sanguins.

## 1.2 Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est composé du cœur, des vaisseaux sanguins et du sang (figure 3). Le cœur fait office de pompe et permet de faire circuler le sang dans les vaisseaux sanguins à travers le corps. La circulation systémique correspond à la circulation du sang du cœur aux organes du corps puis le retour du sang des organes au cœur. Un deuxième type de circulation existe et permet l'oxygénation du sang appauvri en oxygène et riche en dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ): la circulation pulmonaire. Elle induit le déplacement du sang appauvri en oxygène et riche en dioxyde de carbone du cœur aux poumons afin que le  $\text{CO}_2$  soit expulsé et le sang ré-oxygéné, puis le retour du sang oxygéné des poumons au cœur. Le sang a un rôle de transport et permet de transporter rapidement différentes substances d'une partie du corps à une autre. Il permet l'apport d'oxygène des poumons aux tissus et l'expulsion du  $\text{CO}_2$  provenant des tissus par les poumons. Le transport de nutriments (eau, minéraux, sucre, vitamine, etc) du système digestif (intestins) vers le foie et les tissus et l'expulsion de produits nuisibles des tissus, comme par exemple l'urée qui est extraite des tissus, conduite aux reins et expulsée dans l'urine. Le sang achemine des hormones qui sont produites par des cellules sécrétrices aux tissus et qui changeront la fonction de ces tissus selon la présence du produit sécrété. Il transporte également les cellules de l'immunité qui permet au corps humain de se défendre contre les infections, ainsi que les facteurs de coagulation qui servent à arrêter une hémorragie suite à une brèche dans un vaisseau sanguin. De plus, le sang joue un rôle dans le contrôle de la température du corps. Le système cardiovasculaire détient trois types principaux de vaisseaux sanguins, soit les artères, les capillaires et les veines.

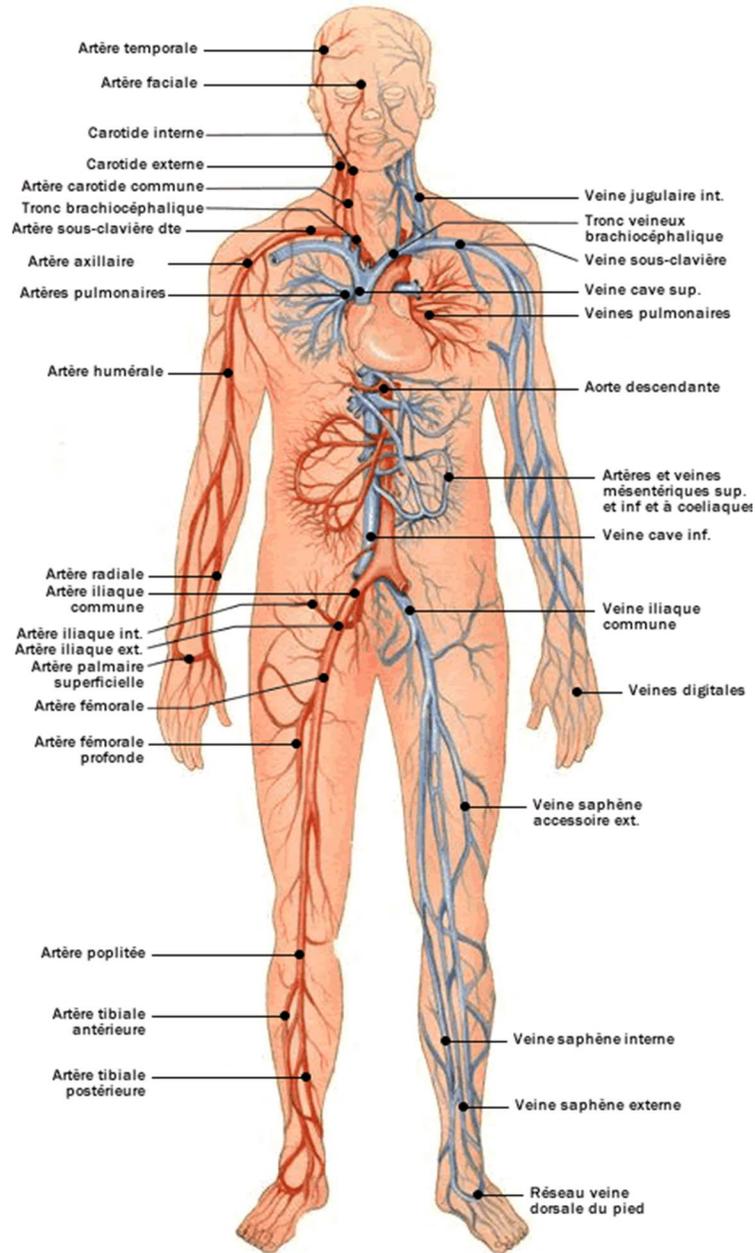


Figure 3: Le système cardiovasculaire [7].

### 1.2.1 Le cœur

Le cœur est situé au centre gauche de la cage thoracique, entre les poumons. Il est composé de 4 cavités, soit deux oreillettes et deux ventricules. Les oreillettes sont situées dans la partie

supérieure et les ventricules dans la partie inférieure du cœur (figure 4). L'oreillette droite reçoit le sang appauvri en oxygène provenant de la circulation systémique et l'oreillette gauche le sang oxygéné de la circulation pulmonaire. Les ventricules, quant à eux, propulsent le sang dans le corps. Le ventricule droit expulse le sang pauvre en oxygène dans le tronc pulmonaire pour la circulation pulmonaire et le ventricule gauche le sang oxygéné dans l'aorte pour la circulation systémique. Ainsi, la partie droite du cœur reçoit et propulse le sang pauvre en oxygène et la partie gauche reçoit et propulse le sang oxygéné. Les muscles du cœur, soit le myocarde, permettent à ce dernier de se contracter par intervalles réguliers et de remplir son rôle de pompe du sang. En fait, c'est un rôle de double pompe que le cœur remplit [23]. Lors de la diastole, les ventricules se relâchent et les oreillettes déversent le sang dans les ventricules en se contractant. Puis la systole termine le cycle par la contraction des ventricules qui expulse le sang dans l'aorte et le tronc pulmonaire. Des valves séparent et empêchent le retour sanguin des oreillettes aux ventricules, ainsi que de l'aorte et du tronc pulmonaire aux ventricules. En plus du myocarde qui est la tunique intermédiaire, le cœur possède une mince couche interne formée d'un endothélium et de tissu sous-endothélial et d'une tunique externe nommée le péricarde qui le protège et l'amarre au diaphragme, au sternum et aux gros vaisseaux [23, 24].

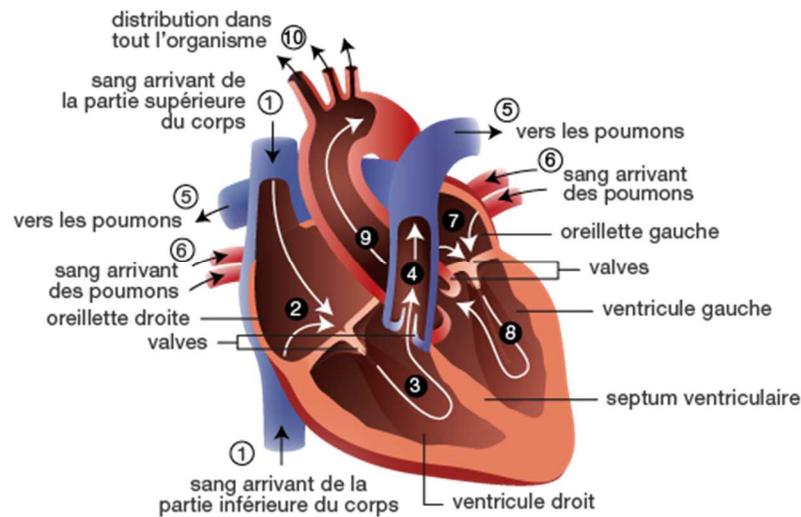


Figure 4: Le cœur et sa circulation sanguine [25].

## 1.2.2 Les vaisseaux sanguins

Le sang partant du cœur circule des artères vers les artérioles puis se dirige dans les capillaires pour ensuite terminer son trajet des veinules aux veines. Ces cinq constituants composent le réseau des vaisseaux sanguins. Ce réseau permet de distribuer les nutriments, l'oxygène, les hormones, les cellules de l'immunité et les facteurs de coagulation par le sang aux organes et tissus du corps humain puis à retirer les déchets produits par les tissus comme le dioxyde de carbone et l'urée. Les artères et artérioles permettent de distribuer le sang à tous les organes. Les capillaires permettent les échanges gazeux et de nutriments du sang aux cellules des organes. Le retour du sang pauvre en oxygène au cœur s'effectue par l'entremise des veinules et des veines.

## 1.2.3 Le réseau artériel

Les artères sont de trois types : les artères élastiques, musculaires et les artérioles. Les artères élastiques sont des artères de diamètre important (entre 1 à 2,5 cm), les plus grosses du système artériel, à paroi épaisse, situées près du cœur qui se dilatent passivement lorsqu'elles reçoivent le sang expulsé par le cœur et qui se resserrent entre les contractions cardiaques. Cette vasorégulation passive permet un contrôle de la pression du sang et son écoulement de façon continue dans le réseau vasculaire [26]. Les artères élastiques sont à l'origine des artères musculaires qui elles distribuent le sang aux diverses parties du corps. Plus petites que leurs prédécesseurs, leur diamètre interne varie entre 1 cm à 0,3 mm. Ces dernières sont moins extensibles que les artères élastiques puisqu'elles possèdent moins de tissus élastiques (élastine) et fibreux (collagène); par contre, elles contiennent une plus grande quantité de muscle lisse. Ainsi, elles jouent un rôle plus actif dans la vasoconstriction et contrôlent le flux sanguin vers différentes parties du corps en fonction des besoins locaux [23]. Les plus petites artères sont les artérioles ayant un diamètre entre 0,3 mm et 10  $\mu\text{m}$ . Celles-ci apportent des variations à leurs diamètres suite à des stimuli chimiques, hormonaux ou nerveux contrôlant ainsi l'apport sanguin aux organes. Par le tonus de leurs musculatures lisses des parois, les artérioles contrôlent également le niveau de pression artérielle [23].

#### 1.2.4 Les capillaires

Les capillaires sont les plus petits vaisseaux sanguins mesurant en moyenne 1 mm de long et de 8 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ils ont une paroi extrêmement mince qui permet les échanges gazeux et nutritionnels. Ils sont la connexion entre le réseau artériel et veineux [23]. Trois types de capillaires se distinguant par leurs structures sont présents dans les organes, soit les capillaires continus, fenestrés et sinusoides. Les capillaires ont tendance à se regrouper en réseau nommé lit capillaire.

#### 1.2.5 Le réseau veineux

Le réseau veineux est composé des veinules, de plexus veineux et des veines. Les veinules sont à la suite des capillaires et sont plus petites que les veines. Elles ont un diamètre qui varient entre 8 et 100  $\mu\text{m}$ . Elles se regroupent pour former les plexus veineux. Les veines, quant à elles, rapportent le sang pauvre en oxygène au cœur. Les veines de moyens et gros calibres sont munies de valvules qui empêchent le reflux sanguin lors du retour du sang vers le cœur.

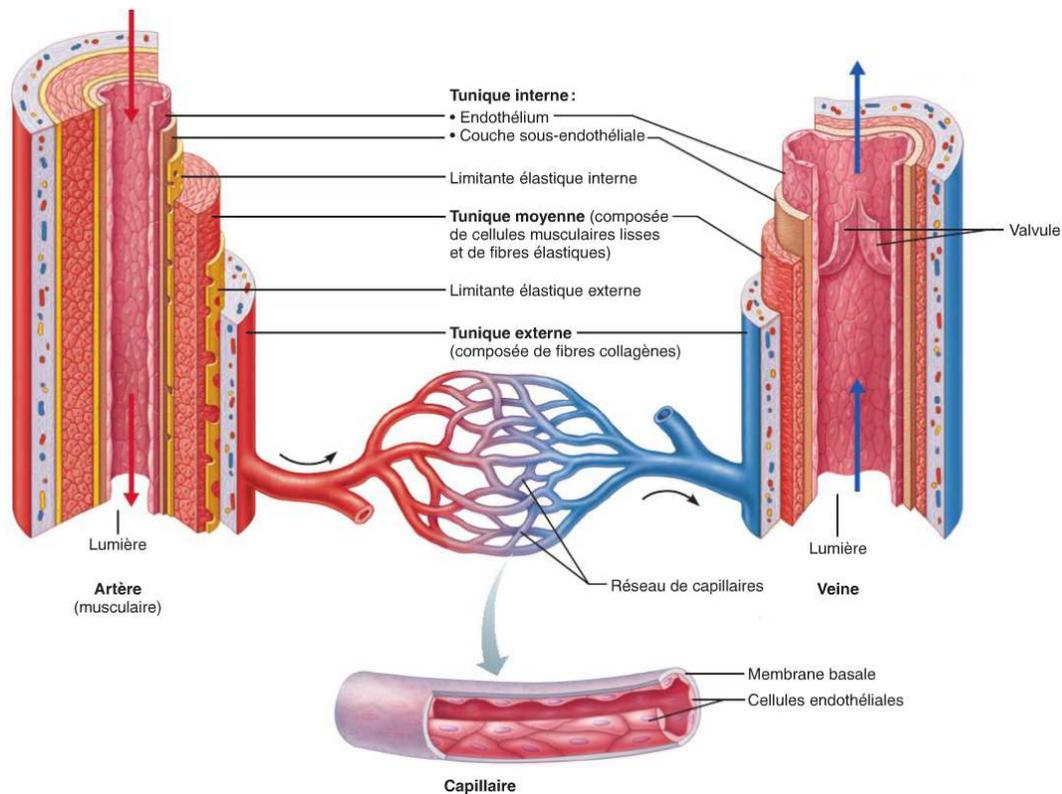


Figure 5: Structure des artères, veines et capillaires [24].

### 1.2.6 La paroi des vaisseaux sanguins

La paroi des artères et des veines, sauf celles des plus petites, détient la même structure organisationnelle qui est composée de trois couches ou tuniques détenant une variance proportionnelle dans les composants des tuniques (figure 5 et 6). La paroi des veines est cependant plus mince que celles des artères homologues due à une pression sanguine plus basse dans le réseau veineux [23, 24, 27]. Ces tuniques permettent le fonctionnement et l'ancrage approprié des artères et des veines. La tunique interne, ou *intima*, en contact avec le sang est composée d'une monocouche de cellules endothéliales (abréviation en anglais : EC désignant «endothelial cell») étroitement liées entre elles par des jonctions intercellulaires. Cette tunique permet de contrôler la coagulation; elle inhibe l'agrégation des plaquettes et la formation de thrombose en condition normale. Lors d'une atteinte à l'endothélium, les EC sécrèteront, plutôt, des facteurs à action coagulante. Ces cellules ont également un contrôle sur la vasodilatation et la vasoconstriction des vaisseaux sanguins par l'intermédiaire des effets des

sécrétions sur les SMC [28, 29]. Les SMC qui se retrouvent dans la tunique moyenne, ou *média*, permettent, ainsi, de contrôler le débit du sang et la pression sanguine qui se retrouve dans les vaisseaux. Elles sont disposées de façon circouférentielle. La *média* contient également une ECM de tissu élastique et de tissu fibreux comme les protéines d'élastine et de collagène respectivement qui lui confèrent les propriétés mécaniques adéquates pour soutenir la pression sanguine. Elle est également la couche la plus épaisse. La tunique externe, ou *adventitia*, est principalement composée de collagène lâche qui renforce, protège et ancre les vaisseaux sanguins aux tissus avoisinants. Elle renferme un réseau de petits vaisseaux sanguins qui permet de nourrir et d'oxygéner les cellules de la paroi vasculaire [26]. Elle contient également des cellules fibroblastes qui participent à la formation de la ECM.

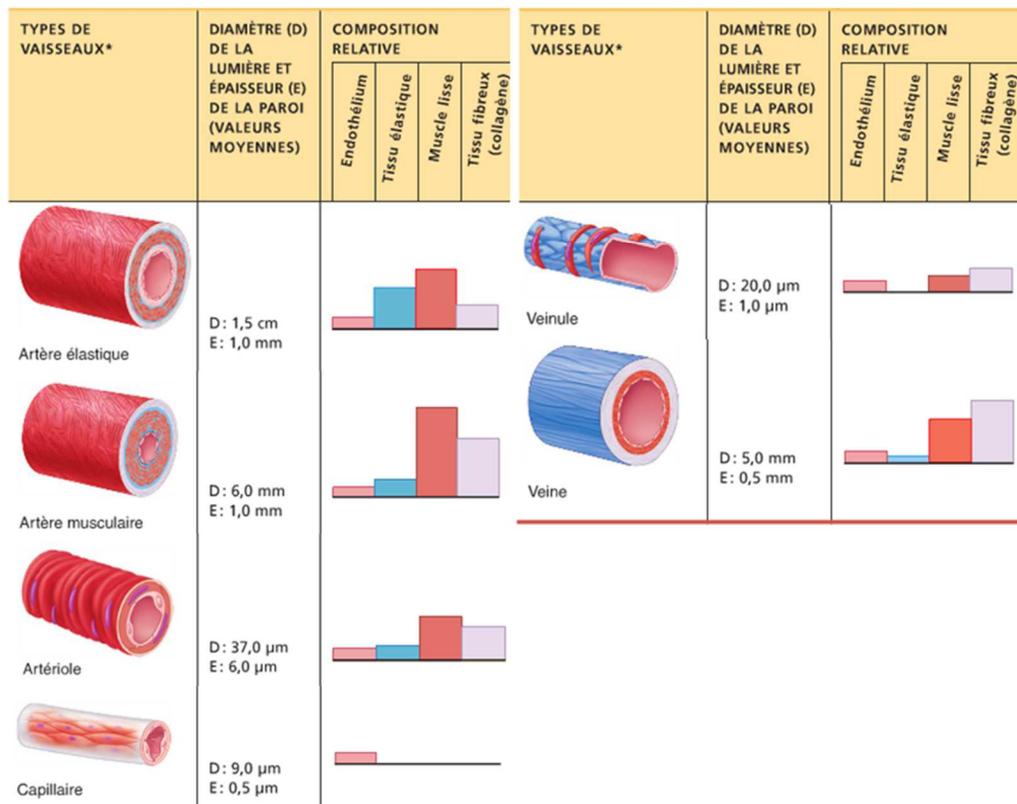


Figure 6: Composition relative, diamètre et épaisseur des parois des différents types de vaisseaux sanguins [24].

### 1.2.6.1 Les cellules endothéliales

Les EC tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins. Elles ont une fonction de barrière perméable entre le sang et les tissus environnants et également de mécanosenseurs pour les tissus subjacents [30, 31]. Elles forment un épithélium simple squameux (endothélium) qui permet le contrôle de la thrombose et le passage de substance par diffusion et filtration. Elles sont en contact constant avec le sang et réagissent aux stimuli chimiques, physiques et biologiques leurs permettant de participer au contrôle de l'hémostase, de l'inflammation, de la croissance cellulaire et du tonus vasculaire par la sécrétion, la diffusion et la filtration de molécules ou cellules [27, 32, 33].

### 1.2.6.2 Les cellules musculaires lisses

Ce sont des cellules fusiformes de diamètre entre 2 à 5  $\mu\text{m}$  et de longueur de 100 à 400  $\mu\text{m}$  qui se contractent et se relâchent afin de permettre la circulation sanguine. Elles possèdent quatre fonctions particulières : l'excitabilité, la contractilité, l'extensibilité et l'élasticité [24]. Tout comme les EC, les SMC répondent aux stimuli environnant qui sont plus souvent de nature chimique ou physique. La réponse est caractérisée par une contraction musculaire suite à la production et la propagation d'une impulsion électrique le long de la membrane plasmique des SMC nommée sarcolemme. En plus de se contracter, les SMC ont la capacité de s'étirer au-delà de leur longueur de repos. Une fois étirées, ces dernières peuvent se rétracter et reprendre leur longueur initial ce qui caractérise leur élasticité. Ces particularités leurs permettent de participer au contrôle de la pression sanguine via le tonus vasculaire. Les SMC présentent également une variété de phénotypes allant de complètement contractile à entièrement synthétique. Le phénotype synthétique leur permettant de proliférer et de synthétiser de la ECM. Ainsi, ces cellules peuvent prendre un phénotype contractile lorsqu'en présence de contrainte mécanique ou un phénotype synthétique lors de la réparation ou du remodelage d'une artère ou d'une veine [34, 35]. Elles peuvent également à différents pourcentages présenter les deux phénotypes. Par exemples, les SMC possèdent à 60-70% un phénotype contractile dans les artères élastiques, tandis qu'un pourcentage de 80-90% se retrouvent dans les petites artères musculaires [36]. Le

phénotype contractile permet aux SMC de répondre à leurs fonctions de contractilité, d'extensibilité et d'élasticité. Le phénotype synthétique permet également à ces dernières de sécréter de la ECM telle le collagène et l'élastine. Les phénotypes adoptés sont caractérisés par la morphologie de la cellule, sa prolifération et migration et également par l'expression de marqueurs génétiques. La morphologie d'une SMC à phénotype contractile est en forme de fuseau et allongée [34, 36]. Celle de la synthétique est de forme rhomboïde [34, 36]. Il existe quelques marqueurs génétiques fréquemment utilisés afin de déterminer les phénotypes contractile et synthétique. Les marqueurs «Smooth Muscle Myosin Heavy Chain» (SM-MHC), «Smooth Muscle  $\alpha$ -Actin» (SM $\alpha$ A), calponine, «smoothelin» et «h-caldesmon» indiquent le phénotype contractile, tandis que les marqueurs «l-caldesmon», «Non-Smooth Muscle Myosin Heavy Chain» (Smemb) et les isoformes de métalloprotéinase matricielle (abréviation en anglais : MMP désignant «matrix metalloproteinase») indiquent le phénotype synthétique. À l'intérieur de même vaisseau sanguin et de vaisseaux sanguins distincts, les SMC lisses présentent différents phénotypes [34, 37]. Les SMC peuvent également changer de phénotype selon les signaux environnementaux perçus. Dès lors, elles maintiennent l'homéostasie, permettent la croissance, le remodelage et la réparation des tissus.

### 1.2.6.3 Les fibroblastes

Les fibroblastes sont les cellules retrouvées dans l'adventice des vaisseaux sanguins et sont fusiformes. Elles participent à la formation et au remodelage de la ECM [38-40]. Elles peuvent donc sécréter par exemple le collagène et l'élastine [24].

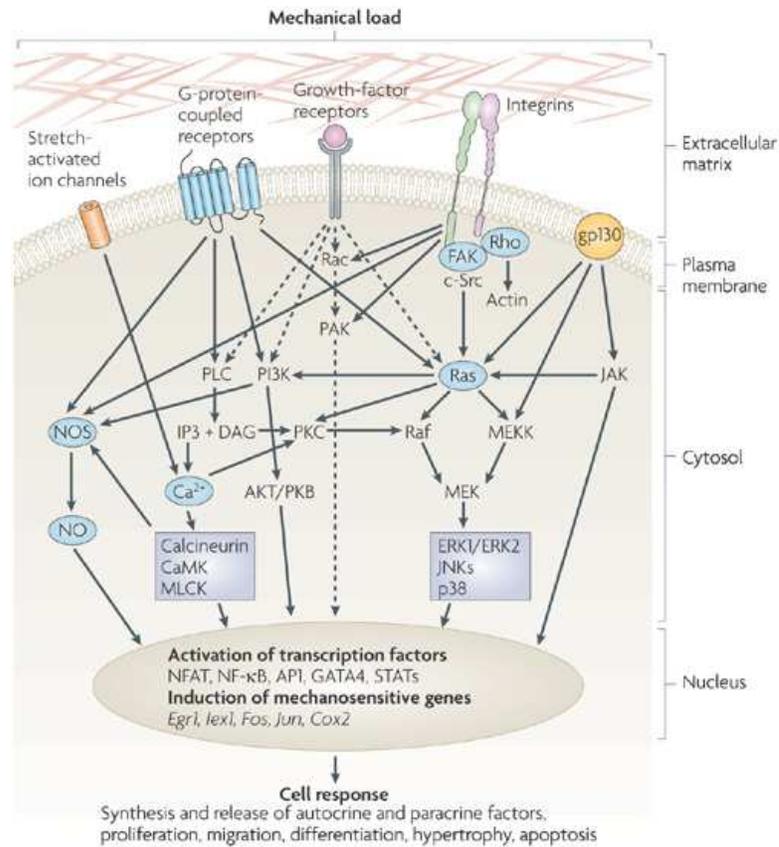
#### 1.2.6.3.1 Réponses cellulaires aux stimuli environnants

Les cellules ont la capacité de percevoir leur environnement grâce à des récepteurs situés sur leurs membranes plasmiques qui sont biochimiquement ou mécaniquement sensibles (figure 7). Ces signaux environnementaux influencent le comportement cellulaire comprenant la gouvernance de leurs activités de bases et la coordination de leurs actions. Par exemple, l'ascorbate permet d'augmenter la production de collagène par les cellules musculaires lisses

vasculaires (abréviation en anglais : VSMC désignant «vascular smooth muscle cell»), mais diminue la production d'élastine [41]. Il existe différents types de signalisation cellulaire, mais l'une qui influence le plus le système cardiovasculaire est la mécanotransduction. La cellule ressent les stimuli par ses récepteurs nommés intégrines via la ECM et traduit les forces mécaniques et les déformations en des signaux biochimiques en activant différentes voies de signalisation (figure 7) qui change l'expression génique et affecte la prolifération, la migration, l'apoptose, la perméabilité et le remodelage cellulaire [42-44]. C'est ce phénomène de mécanotransduction qui permet aux cellules de s'adapter aux changements environnementaux. En effet, *in vivo* les contraintes et déformations mécaniques sont des régulateurs clés qui guident la morphogenèse et affecte la maintenance des tissus sains [8, 45].

De plus, la culture en 2D ou 3D sur différents supports influence le phénotype de la SMC. En 2D, des substrats de fibronectine et de collagène de type I induisent une modification phénotypique vers le synthétique. Au contraire, la laminine induit un phénotype contractile. Cependant, l'utilisation de différents facteurs de croissance avec ces mêmes substrats apportent des changements de comportement cellulaire. Avec un substrat de fibronectine, le facteur de croissance d'hépatocyte apporte une migration des VSMC, cependant le facteur de croissance dérivé de plaquette (PDGF) empêche l'adhésion cellulaire [35]. Le PDGF avec le collagène introduisent une migration des cellules, tandis qu'avec la laminine une augmentation de la migration et une diminution de l'adhésion des cellules sont observées. Par contre, la culture en 3D avec le collagène va plutôt stimuler un phénotype contractile chez les VSMC. Et l'utilisation de PDFG avec des gels de collagène en 3D va induire un phénotype synthétique par la production de collagène cellulaire [34, 35].

Ainsi, la ECM qui entoure les cellules joue un rôle autant biochimique que biomécanique puisque les cellules y adhèrent permettant ainsi de ressentir les changements mécaniques de leur environnement [35, 37] et que les facteurs de croissance qui affectent également la fonction cellulaire y sont liés et accumulés [26]. Par conséquent, la ECM influence les phénotypes des VSMC [46].



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 7: La mécanotransduction : activation des voies de signalisation biochimiques suite à des forces mécaniques et déformations subies par les cellules [42].

#### 1.2.6.4 Le collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante chez les mammifères. Chez l'humain, il représente le tiers de la quantité de protéine, les trois quarts du poids sec de la peau, et est l'un des composants principaux de la ECM [47, 48]. Il est produit, dans ce cas, par les SMC et les fibroblastes. Lorsqu'excrété, le collagène se trouve sous forme de chaînes individuelles nommées tropocollagène. Trois chaînes polypeptidiques enroulées en hélice sont ensuite assemblées par liaisons covalentes [49-51] (figure 8). Chaque chaîne est composée d'une répétition de trois acides aminés (aa) dont le troisième est toujours la glycine (Gly). Tout collagène est donc fait d'une répétition comme suit XaaYaaGly. Les aa dans les positions Xaa

et Yaa sont souvent la (2S)-proline (Pro, 28%) et (2S, 4R)-4-hydroxyproline (Hyp, 38%) respectivement. Le S et le R se retrouvant dans le nom des molécules indiquent la présence d'un carbone asymétrique sur la chaîne de la molécule. Ce carbone a la capacité de se lier à 4 groupes ou substituants et ces groupes peuvent être pareils ou différents. Lorsque les groupes sont différents, les lettres S et R sont utilisés afin d'indiquer la configuration de la liaison. R indique que les groupes ont une configuration *rectus* (les substituants sont dans un ordre décroissant dans le sens des aiguilles d'une montre) et S indique que les groupes ont une configuration *sinister* (les substituants sont dans un ordre décroissant dans le sens inverse des aiguilles d'une montre). ProHypGLY est le triplet le plus commun dans le collagène (10,5%) [48, 49, 52, 53]. Des liaisons hydrogène relient également les hélices entre elles pour chaque séquence des trois aa. Ces liaisons rendent les fibres de collagène très robustes et résistantes à la traction. Il existe plusieurs types de collagène qui se différencient dans leurs structures et les organes dans lesquels ils se retrouvent. Ils sont codés par des chiffres romains en ordre dans lesquels ils ont été découverts. Il existe aujourd'hui 28 types de collagène différents [53]. Les vaisseaux sanguins possèdent du collagène de type I et III [54, 55]. Les fibres de collagène possèdent une rigidité de 1 GPa et sont donc engagées à haute pression dans les vaisseaux sanguins [55, 56]. Cependant, non seulement leur rigidité est importante pour résister aux pressions sanguines, mais également leur disposition. Il existe trois dispositions des fibres de collagène à l'intérieur des vaisseaux sanguins : circonférentielle, axiale et hélicoïdale [8, 55]. Le collagène est principalement orienté de façon circonférentielle parallèle aux SMC dans la média, mais également de façon hélicoïdale. La partie hélicoïdale se réoriente vers une disposition circonférentielle afin d'aider à résister aux contraintes élevées qui sont également circonférentielles (en ne tenant pas compte du flux qui entraîne des contraintes de cisaillement) [8]. Dans l'adventice, les fibres de collagène sont quant à elles orientés de façon axiale, ce qui permet encore une fois de résister à la force de la pression en empêchant la rupture des vaisseaux [26, 55] et également d'ancrer les vaisseaux sanguins [8].

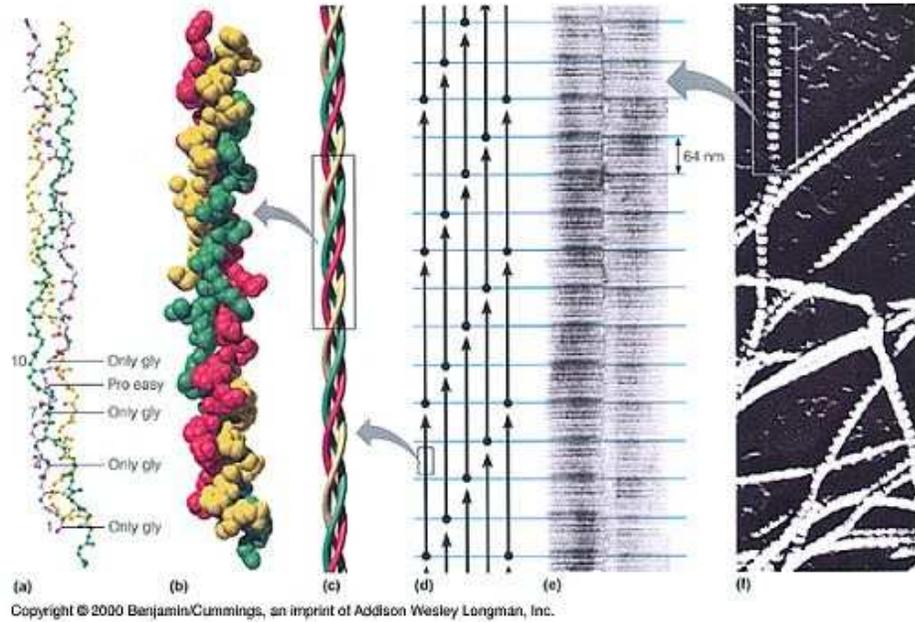


Figure 8: Structure du collagène. Chaque molécule de collagène est une protéine entièrement constituée de trois chaînes de tropocollagène qui forme l'hélice alpha (a, b et c). Les groupes de trois sont reliés entre eux pour former de grosses fibres (d) visibles au microscope électronique (e, f) [57].

### 1.2.6.5 L'élastine

L'élastine est l'une des protéines les plus abondantes de la ECM des vaisseaux sanguins et est retrouvée dans les fibres élastiques. Tout comme le collagène, elle est formée par un précurseur nommé tropoélastine. L'élastine est une protéine insoluble une fois les molécules de tropoélastine assemblées puisqu'elle est composée à 75% de résidus hydrophobes. L'élastine possède également comme aa la Gly à un tiers en quantité et une grande quantité de proline. L'élastine compose avec le collagène 50% du poids sec des grandes artères [58-60]. Les fibres sont organisées dans la media de façon concentrique autour de l'intima et sont repliées sur elles-mêmes (voir figure 5 et 9). Cette disposition et ce repliement confère l'élasticité aux vaisseaux sanguins en s'étirant sous la pression du sang et en reprenant leur configuration initiale lorsque la pression cesse [61, 62]. L'élastine possède un module élastique entre 0,5 à 1 MPa, elle permet donc de soutenir les vaisseaux à basse pression [8, 55, 56]. Sa disposition

dans les vaisseaux lui permet aussi de distribuer uniformément les forces ressenties à travers la paroi des vaisseaux et son entrelacement avec le collagène lui permet de transférer la pression aux fibres de collagène [55, 63].

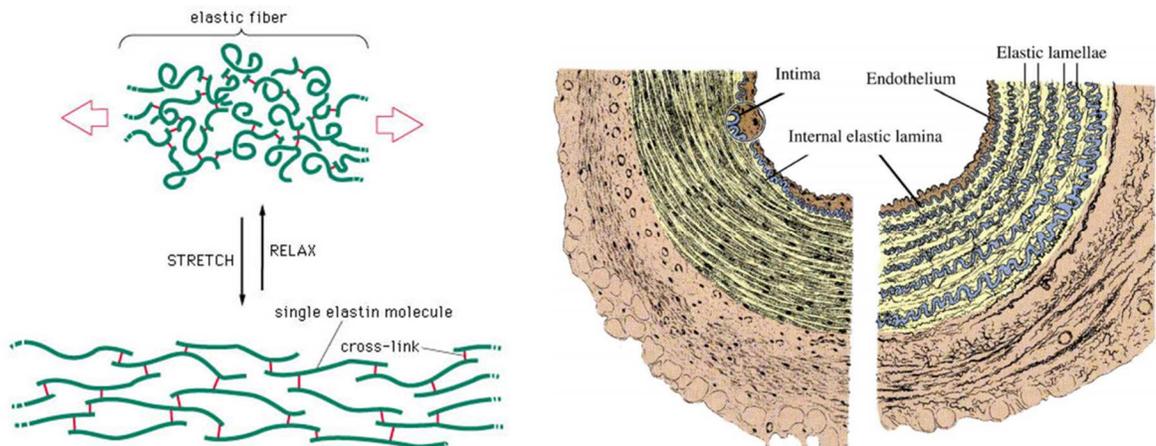


Figure 9: Schéma de fibres d'élastine sous relaxation et sous étirement [61, 62].

### 1.3 L'ingénierie du tissu vasculaire

Chacune des composantes des vaisseaux sanguins contribue à sa fonctionnalité. Lorsque la maladie artérielle atteint les vaisseaux sanguins, l'élasticité de ces derniers en est grandement affectée. En effet, les dépôts lipidiques et de calcium augmentent la rigidité des vaisseaux sanguins [56], de plus leur vieillissement s'accompagne de clivage de l'élastine et d'une augmentation de dépôt de collagène [64]. Lorsqu'une artère affectée de faible diamètre (<6 mm) est remplacée par une prothèse synthétique, un faible taux de réussite y est rattaché dû au développement d'hyperplasie anastomotique intimale, de la coagulation et de la thrombogénèse [8]. Afin d'obtenir un substitut vasculaire approprié, ce dernier devra démontrer des propriétés biologiques et mécaniques se rapprochant de celles des vaisseaux natifs. Pour le remplacement de vaisseaux sanguins, les propriétés suivantes devront être obtenues [11, 13, 65, 66] :

- non thrombogénique;

- absence d'immunogénicité, et ce, par le substitut en lui-même ou par ces produits de dégradation;
- une pression de rupture semblable à celle de la veine saphène, c'est-à-dire >1700 mmHg;
- viscoélasticité;
- réponses de remodelage appropriées;
- vasoactivités;
- force de rétention à la suture;
- résistance à la fatigue;
- et éventuellement la fabrication et la production devraient être rapides et modulables aux patients.

L'avenue la plus probable qui permettrait d'obtenir ce cahier de charge complet est l'ingénierie du tissu vasculaire qui consiste en l'utilisation de cellules avec ou sans échafaudage afin de produire un vaisseau sanguin ayant les propriétés biologiques et mécaniques semblables à celles des vaisseaux natifs. Quatre grandes avenues subsistent à l'intérieur de l'ingénierie du tissu vasculaire, soit l'auto-assemblage, la matrice décellularisée et l'utilisation d'échafaudage synthétique ou naturel.

### 1.3.1 L'auto-assemblage

L'auto-assemblage consiste à la croissance de cellules vasculaires *in vitro* qui formeront un feuillet qui sera par la suite roulé sur lui-même pour former un cylindre (figure 10). Les SMC et fibroblastes sont cultivés pendant 3 semaines afin d'obtenir la production de protéine extracellulaire comme le collagène et l'élastine [67]. Lorsqu'un feuillet est obtenu, ce dernier est enroulé autour d'un mandrin pour obtenir un cylindre et un processus de maturation s'ensuit. Le produit d'assemblage est ensuite endothélialisé [66, 68-70]. Ainsi, la production de ce type de substitut est longue et comprend plusieurs étapes ce qui limite son utilisation clinique.

Cette méthode permet tout de même d'obtenir une construction vasculaire ayant une rupture à la pression plus grande que 2000 mmHg [68, 71]. Toutefois, la pression plus élevée pourrait mener aux mêmes problématiques observées aux anastomose pour les prothèses synthétiques qui elles aussi ont des propriétés mécaniques plus grandes que les vaisseaux natifs. De plus, les propriétés mécaniques sont dépendantes du type cellulaire utilisé.

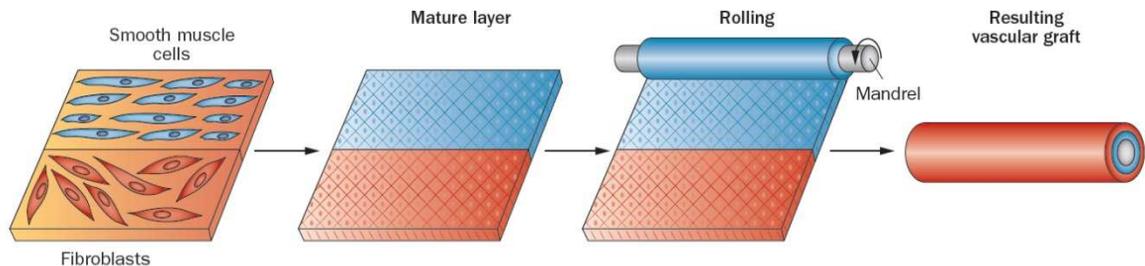


Figure 10: L'auto-assemblage de l'ingénierie du tissu vasculaire [66].

Néanmoins, une première étude clinique sur des humains avec des tissus issus de l'auto-assemblage a été effectuée en 2007 [72]. Les greffons vasculaires ont été implantés comme pontage vasculaire artério-veineux pour l'accès lors d'hémodialyse. Les patients atteints de maladies rénales en phase terminale doivent faire filtrer leur sang trois fois par semaine à l'hôpital. À chaque visite, les greffons des patients étaient perforés par deux aiguilles de grand diamètre afin de les relier à l'appareil de dialyse. Un total de 13 greffons a été implanté sur 9 patients. Quatre des greffons ont eu une défaillance à l'intérieur de 90 jours chacun dû à une cause différente : une thrombose, un anévrisme, la mort du patient qui était non-relié à l'implant et une réponse immunitaire aigüe. Le patient ayant eu une réponse immunitaire aigüe a réagi vraisemblablement à un niveau élevé d'immunoglobuline G, protéine du système immunitaire qui est un anticorps, présent dans le sérum bovin utilisé pour la culture du greffon. L'utilisation d'un milieu sans immunoglobuline G pour la culture du greffon de remplacement a permis d'éviter cette complication lors de l'implantation subséquente. Les greffons ont par la suite reçu des interventions à une fréquence de 0,7 fois par patients par année afin de maintenir leurs fonctionnalités. Ce ratio est semblable à ce qui est observé dans la population générale de patients dialysés ayant des prothèses synthétiques ou des veines autologues pour l'accès à

l'hémodialyse. Cette première étude démontre la faisabilité d'utiliser ce type d'ingénierie du tissu vasculaire pour la création de prothèse vasculaire biologique.

Cependant, comme toutes autres techniques, plusieurs stratégies doivent être élaborés afin d'améliorer le processus de fabrication et le design des greffons vasculaires synthétisés par l'auto-assemblage. Présentement, le temps de fabrication est d'un minimum de 6 mois et ces prothèses vasculaires sont des vaisseaux sanguins vivants qui doivent être entreposés.

### 1.3.2 Matrice décellularisée

La matrice décellularisée est l'utilisation de tissus allogéniques ou xénogéniques dépourvus de ses cellules comme échafaudage pour l'ingénierie du tissu vasculaire. Les tissus sont recueillis puis décellularisés par une combinaison de différents traitements physiques, chimiques ou enzymatiques. Le choix des agents utilisés pour la décellularisation d'un tissu est dépendant de différents facteurs dont la cellularité, la densité, la teneur en lipide et l'épaisseur du tissu [73]. Les traitements sont suivis soigneusement afin de seulement retirer les cellules et leurs vestiges et d'atteindre en moindre mesure l'intégrité de la ECM [66, 73, 74]. La matrice est par la suite utilisée pour le guidage de la croissance de nouvelles cellules tant *in vitro* que *in vivo*. Cependant, lors d'implantation *in vivo* la ECM elle-même peut être immunogène. Dans les vaisseaux sanguins, l'exposition du collagène à la circulation sanguine enclenche la cascade de coagulation [75, 76]. Il faut donc recellulariser la matrice avec, du moins, un endothélium permettant de limiter l'activation d'une réaction immunitaire qui pourrait mener à une thrombose lors d'implantation. De plus, il a été démontré dans les greffes xénogéniques une réaction inflammatoire due à la présence d'antigène sur les matrices décellularisées qui ont été implantées [75, 77]. Un risque de transfert de pathogène est également présent. Les techniques de stérilisation ne sont pas adaptées pour les ECM puisqu'un risque de perturbation de la structure est présent pour chacune des techniques actuellement utilisées. Toutefois, ce type de substitut permet d'obtenir des pressions de rupture près de celle de la veine saphène. Cependant, la rétention de la suture est quelque peu affectée par la décellularisation [78]. En effet, les différents traitements utilisés permettent de retirer en très grande partie les cellules présentes dans la matrice, les composantes de la ECM comme le collagène et le

glycoaminoglycane sont néanmoins atteints [79, 80]. Un changement structural est perçu dans la matrice décellularisée qui porte atteinte à ses propriétés mécaniques. De plus, la capacité des cellules d'adhérer à la matrice peut également être altérée [74]. Ainsi, l'absence d'immunogénicité grâce au détachement cellulaire est possible, mais une recellularisation avant l'implantation est de mise et peut être problématique. Une réaction inflammatoire face à la matrice est également possible. De plus, le risque de transfert de pathogène reste présent tout comme l'atteinte possible de l'intégrité de la ECM.

Néanmoins, plusieurs tissus décellularisés non –vasculaires sont aujourd'hui commercialisés et utilisés afin de traiter, entre autres, les tissus mous, les tendons et le remplacement de valve cardiaque [73]. Les principales sources tissulaires de ces produits sont le derme humain, porcine ou bovine, l'intestin grêle porcine, la vessie urinaire porcine, le péricarde humain, bovine ou chevalin, la valve cardiaque porcine et sont donc des tissus allogéniques ou xénogéniques [73]. Ces produits sont également implantés sans ensemencement préalable de cellules, l'ensemencement n'étant pas nécessaire immédiatement à l'implantation pour la fonctionnalité du produit. Cependant, plusieurs de ces produits seront colonisés par les cellules du patient suite à l'implantation.

En 2008, il fut reporté par Macchiarini et al. [81] qu'une trachée décellularisée provenant d'un donneur humain a été implantée avec succès chez une patiente de 30 ans. L'équipe a utilisé 25 cycles de décellularisation de la trachée sur 6 semaines afin d'obtenir un matériau exempt de constituants immunogènes. Elle a ensuite recellularisé la trachée avec des cellules épithéliales et chondrocytes de la patiente et l'implanta chez cette dernière. Les suivis ont démontrés une bonne intégration de la trachée et aucun rejet.

Malgré le succès des produits commercialisés, plusieurs avantages pour le maintien des fonctions et des phénotypes cellulaires quant à la spécificité tissulaire furent suggérés par des études sur les cellules et la ECM isolées à partir du foie, des voies respiratoires, des nerfs, du tissu adipeux et des glandes mammaires [73]. De plus, une diminution du temps nécessaire à la décellularisation et recellularisation est de mise afin d'obtenir un processus viable pour la transplantation chez l'humain d'organes nécessitant immédiatement un remplacement.

### 1.3.3 Substitut vasculaire par échafaudage

Les échafaudages sont des matériaux synthétiques ou biologiques utilisés pour guider la croissance et la prolifération des cellules vasculaires. Ils permettent d'imposer un développement structural précis, mais également de contrôler l'adhésion, la différenciation, la migration, la prolifération et la sécrétion de ECM [8, 10, 66]. Ils peuvent être modulés sous différents formats en deux dimensions (2D) ou en trois dimensions (3D). Dans l'ingénierie des tissus vasculaires, la 3D est privilégiée. Ainsi, des formes circulaires, rectangulaires ou cylindriques sont fréquemment produites par moulage avec des matériaux synthétiques ou biologiques. D'autres techniques ont aussi été développées comme l'électrofilage. L'électrofilage consiste en l'utilisation d'un polymère liquide et/ou fondu chargé afin de créer des micro- ou nano-fibres qui peuvent être simultanément enroulés autour d'un mandrin pour créer une forme cylindrique.

#### 1.3.3.1 Échafaudage synthétique

Les échafaudages synthétiques sont, pour la plupart, des matériaux polymériques biodégradables où le temps de dégradation est contrôlé pour permettre la prolifération et la sécrétion par les cellules d'une ECM naturelle qui remplacera par la suite l'échafaudage. Les polymères biodégradables les plus couramment utilisés sont l'acide polyglycolique (PGA), l'acide polylactique (PLA), le poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), le poly(glycérol sébacate) (PGS) et le polyéthylène glycol (PEG)[6]. Ces produits peuvent également être combinés pour former des copolymères comme le poly(l-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) (PLCL) permettant ainsi un meilleur contrôle des propriétés mécaniques et de dégradation [6, 10].

Par exemple, Pullens et al. [82] ont démontré en condition statique la production de collagène, mais également de glycoaminoglycane par des myofibroblastes lorsqu'ensemencés sur des échafaudages de PGA poly-4-hydroxybutyrate.

Niklason et al. [83, 84] ont démontré, quant à eux, la production de collagène par des SMC vasculaires porcines lorsqu'ensemencés et stimulés mécaniquement sur une matrice de PGA. Une plus grande proportion de collagène se retrouvait chez les échantillons ayant reçus une stimulation dynamique en comparative à une stimulation statique. Les VSMC ont également démontré une activité de remodelage due à l'activation de la métalloprotéinase matricielle de type I (MMP-I), enzyme scindant le collagène de type I et III. Cependant, la pression de rupture des constructions n'atteint pas celle de la veine saphène.

Sous condition dynamique, Rubbens et al. [85] ont également démontré la présence de collagène sécrété par des myofibroblastes ensemencés sur des matrices de PGA avec une couche de poly-4-hydroxybutyrate. Néanmoins et contrairement à précédemment, une moins grande proportion de collagène se retrouvait dans les échantillons sous conditions dynamiques que ceux en statique. Ils ont également remarqué une augmentation de la MMP-I et des glycoaminoglycanes chez les échantillons sous dynamique.

L'électrofilage d'échafaudage d'oxyde de polyuréthane-graphène de Jing et al. [86] démontre une adhésion, prolifération et viabilité de cellules fibroblastes et de EC de veine de cordon ombilical humain (abréviation en anglais : HUVEC désignant «human umbilical vein endothelial cell»). L'échafaudage démontre également une pression de rupture supérieure à l'artère mammaire et la veine saphène. Cependant, ceci indique des propriétés mécaniques supérieures à celle des vaisseaux sanguins et pourrait entraîner de l'hyperplasie intimale, de la thrombose et de l'anévrisme [87].

En plus de la recherche fait sur ces types de polymère, certains d'entre eux comme le PLA, le PCL et le PGA sont déjà approuvés par la «Food and Drug Administration» (FDA) qui est l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux [87]. Certains sont également présentement utilisés comme sutures ou sutures pour des plaques et des systèmes de fixation de fracture [87]. Puisque ces polyesters sont déjà approuvés pour utilisation médicale, leurs utilisations dans des essais cliniques sont plus probables.

Par exemple, une étude clinique chez l'humain est en cours depuis 2001 pour l'implantation d'une prothèse vasculaire synthétique fait d'un copolymère de PLCL renforcé d'un treillis de PGA [88]. La prothèse a été implantée comme un conduit cavopulmonaire extracardiaque chez des patients ayant un seul ventricule au cœur. L'âge médian des patients était de 5,5 ans et les prothèses synthétiques avaient tous un diamètre de 8 cm et plus. Des cellules mononucléaires provenant de moelle osseuse autologue ont étéensemencées sur la prothèse avant l'implantation. Après 5,8 années, aucune mortalité reliée à l'implant n'a été déclarée. De plus, il n'y avait aucune évidence de formation d'anévrisme, de rupture ou d'infection de la prothèse et de calcification ectopique. Un patient a eu une thrombose partielle qui a été traité avec succès grâce à la prise de warfarine. Quatre patients ont subi des sténoses de leurs greffes, mais une angioplastie percutanée a permis de rétablir le flux sanguin avec succès.

Ainsi, les échafaudages biodégradables synthétiques peuvent être modulés afin d'obtenir des pores appropriés pour la croissance, la migration et la prolifération cellulaire. Ils permettent également la production de ECM. Toutefois, les propriétés mécaniques appropriées n'ont toujours pas été obtenues pour des applications vasculaires de faible diamètre [8]. De plus, une inquiétude est soulevée face à la possibilité de la présence de résidus de polymère pouvant entraîner une réponse inflammatoire [13].

### 1.3.3.2 Échafaudage naturel

Les échafaudages biologiques/naturels consistent en l'utilisation de polymères, souvent composés de protéines et provenant de la nature, ce qu'on appelle biopolymères. Les cellules peuvent reconnaître des sites d'adhésion sur les biomatériaux naturels notamment lorsque ceux-ci font partie de la ECM. Les échafaudages naturels comprennent, entre autres, le collagène, l'élastine, la fibrine, la soie, l'acide hyaluronique et le chitosane [13, 89-100].

Le premier échafaudage naturel avec cellules a été produit par Weinberg et al [101]. Il était composé de collagèneensemencé de VSMC, de fibroblastes et de EC. L'échafaudage a été renforcé par un tissu méché de Dacron; cependant la pression de rupture n'a pas été atteinte

tout comme la résistance à la fatigue. La quantité de cellulesensemencées a également été variée et une différence de remodelage a été aperçue.

Par la suite, d'autres se sont penchés sur le remodelage que les cellules effectuaient sur le collagène. Pang et al. [102] ont démontré l'alignement des fibres de collagène dans la direction des SMC, mais également de leurs filaments d' $\alpha$ -actine à l'intérieur de 24h. Ils ont également démontré la migration de ces mêmes cellules à l'intérieur du gel de fibres en fibres. Les fibres où les cellules ont adhéré reviennent partiellement à leur position initial suite à un remodelage qui quant à lui permanent.

Berglund et al. [103] ont combiné l'utilisation d'un support de collagène déshydraté avec un échafaudage de collagène hydraté qui a étéensemencé par des cellules vasculaires. Le remodelage est toujours présent dans ce type d'échafaudage; plus lents dans les premiers jours des échafaudages avec support de collagène déshydraté réticulé, mais la compaction est la même pour un support réticulé ou non à la fin de la culture. La résistance à la traction et le module élastique ont tous deux été augmentés par la présence d'un support déshydraté. De plus, la réticulation des supports permet d'obtenir de meilleures propriétés mécaniques. Berglund et al. [104] ont également introduit de l'élastine dans des échafaudages de collagène afin d'augmenter les propriétés mécaniques de ces derniers. La résistance à la traction et la rigidité des échafaudages ont augmenté de 11 fois avec l'élastine versus 4 fois sans. L'élastine a permis d'améliorer les propriétés élastiques de l'échafaudage; cependant elle ne permet pas d'améliorer les propriétés suffisamment pour résister aux conditions physiologiques.

La fibrine a aussi été utilisée seule ou en mélange avec le collagène afin de former des échafaudages. La fibrine seule permet tout autant le remodelage par les cellules vasculaires que le collagène. Tout comme avec le collagène, les échafaudagesensemencés par des cellules améliorent les propriétés mécaniques. L'utilisation de stimuli mécaniques permet également d'améliorer les propriétés mécaniques. Néanmoins, les propriétés adéquates pour l'implantation ne sont pas atteintes [89, 90, 97, 105].

Les avantages des échafaudages naturels sont leur biocompatibilité et la possibilité de les former ou couler sous toutes les formes. Ils permettent également d'incorporer les cellules à l'intérieur des gels avant gélification permettant ainsi aux cellules d'avoir un environnement 3D, qu'elles préfèrent [14]. Toutefois, les propriétés mécaniques adéquates restent difficiles à atteindre avec ce type d'échafaudage.

### 1.3.4 Stratégie d'amélioration des propriétés mécaniques

Plusieurs techniques sont utilisées afin d'améliorer les propriétés mécaniques des substituts vasculaires créés par ingénierie tissulaire, telles que des techniques physiques, biochimiques et mécaniques qui peuvent s'appliquer autant aux échafaudages qu'aux cellules vasculaires. En effet, ces stimulations extérieures permettent d'influencer et de contrôler les propriétés mécaniques des échafaudages, mais également d'influencer le comportement cellulaire. De nombreux exemples sont décrits dans la littérature.

Par exemple, Orban et al. [106] ont démontré l'augmentation significative de la pression de rupture de gels de collagène grâce à la transglutaminase qui a un effet de réticulation. La pression de rupture est passée de  $46 \pm 3$  mmHg à  $71 \pm 4$  mmHg pour un échafaudage sans réticulation et avec réticulation, respectivement. Girton et al. [107, 108] quant à eux ont utilisé la glycation pour la réticulation de gels. La glycation est une technique de réticulation des groupes amines qui est induite via des polysaccharides (sucre) tels que le glucose ou le ribose. Cette réticulation a permis d'atteindre un module élastique circonférentiel à 1025 kPa alors qu'il était seulement de 63 kPa initialement.

Seliktar et al. [109] ont défini une augmentation des propriétés mécaniques par l'utilisation d'une stimulation mécanique de 10% de déformation. Les substituts après 4 et 8 jours de culture dynamique ont augmenté leur limite d'élasticité, contrainte maximale, module d'élasticité et déformation maximale en comparaison avec leur contrôle en condition statique. À 8 jours, une augmentation de la limite d'élasticité de 250% a été démontrée ainsi qu'une augmentation du

module d'élasticité de 108%. Ils ont également démontré un meilleur remodelage des cellules de la construction vasculaire à 8 jours de stimulation mécanique.

Solan et al. [83, 84] ont utilisé une stimulation mécaniquement sur une période de 7 jours sur des échafaudages de PGA contenant des cellules. Ils ont utilisé des fréquences de stimuli de 0 battement par minute (bpm), de 90 bpm et 165 bpm. Les substituts sous des fréquences de 90 et 165 bpm ont démontré avoir des quantités plus élevées de collagène dans leur matrice. De plus, les fréquences de stimuli ont permis d'augmenter aussi l'activation des métalloprotéinases de type 1 (MMP1) et des inhibiteurs tissulaires de MMP1 (TIMP1), démontrant ainsi une meilleure activité de remodelage. L'augmentation de la pression de rupture pour les constructions sous fréquences a été également démontrée, mais n'a pas néanmoins permis d'atteindre celle des veines saphènes.

Diverses études ont mis en évidence que les propriétés mécaniques des échafaudages synthétiques et naturels sont grandement améliorées lorsque soumis à une stimulation dynamique par déformation [83, 105, 110-112]. Cette augmentation des propriétés mécaniques est due aux cellules qui se retrouvent à l'intérieur des constructions. En effet, la déformation est ressentie par les cellules et permet à ces dernières de remodeler la matrice par adhésion des cellules, une activité catalytique des cellules de la matrice et production de ECM. Les cellules adhèrent à la matrice puis densifient cette dernière lors de leur orientation [102, 109]. L'activation des métalloprotéinases indiquent une activité catalytique des cellules et donc également le remodelage de l'échafaudage [103]. Cette activité est aussi augmentée lors de stimulation mécanique dynamique [84, 113]. La cellule produit également du collagène et de l'élastine en plus grande quantité sous stimulation dynamique [89, 105, 111, 114, 115]. Tous ces paramètres font que par stimulation dynamique, la vitesse de remodelage est grandement amplifiée.

#### 1.3.4.1 Techniques de stimulation mécanique

Les artères sont continuellement assaillies de stimulations mécaniques comme la pression, le flux sanguin (cisaillement) et la déformation. Afin de simuler un ou plusieurs de ces stimuli

physiologiques, différentes techniques de stimulation mécanique des cellules et des tissus ont donc été développés.

#### 1.3.4.1.1 Cisaillement

Afin d'imposer un cisaillement à une construction vasculaire, un flux de milieu de culture est appliqué selon trois méthodes principales: chambres d'écoulement à flux, systèmes de cône et plaque et systèmes d'agitation orbitale (figure 11).

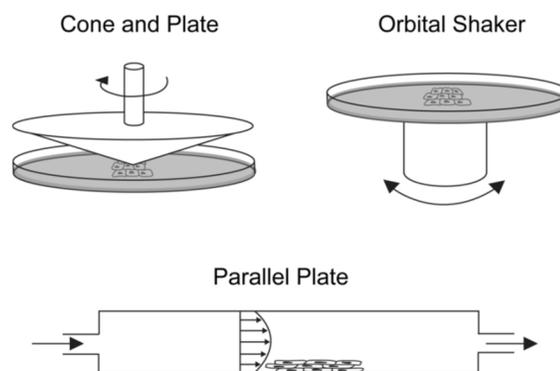


Figure 11: Trois méthodes courantes d'imposition de contraintes de cisaillement [43]. En haut à gauche méthode d'application de cisaillement à système de cône et plaque, en haut à droite système d'agitation orbitale et au bas de l'image un système de chambre d'écoulement à flux.

La chambre d'écoulement de flux impose des contraintes de cisaillement en écoulant un fluide dans un conduit. L'écoulement du fluide, habituellement un milieu de culture, se fait sous pression et passe dans le conduit où se trouvent les cellules ou la construction vasculaire en culture [43]. Dans ce cas l'échafaudage et/ou les cellules subissent le flux. Le deuxième type de système utilise une plaque de culture dans laquelle des cellules et un milieu de culture se retrouvent. À l'aide de la rotation d'un cône, un flux est alors appliqué aux cellules dans la plaque de culture. La dernière variante de cisaillement imposé par un flux est similaire au précédent. Le flux de cisaillement rotationnel, dans ce cas, est appliqué grâce à un agitateur orbital [43]. Ainsi et contrairement à la rotation en présence d'un cône, aucun autre matériel n'est en contact avec le milieu de culture, et c'est seulement la force rotationnelle qui permet d'obtenir cette contrainte de cisaillement.

### 1.3.4.1.2 Déformation

Une autre méthode de méchanostimulation est la déformation de membrane flexible sur laquelle se retrouve une culture cellulaire ou de tissus d'ingénierie. Les déformations appliquées au substrat sont soit uni-, bi- ou équi-axiale. Ces déformations peuvent être appliquées par différents modes d'action : déformation par tension, déformation à l'aide d'un plateau (figure 12), déformation à l'aide d'un vide (figure 12) et déformation à l'aide d'une pointe arrondie (figure 12). Ces déformations imitent la déformation des parois des vaisseaux sanguins par la pression du pouls.

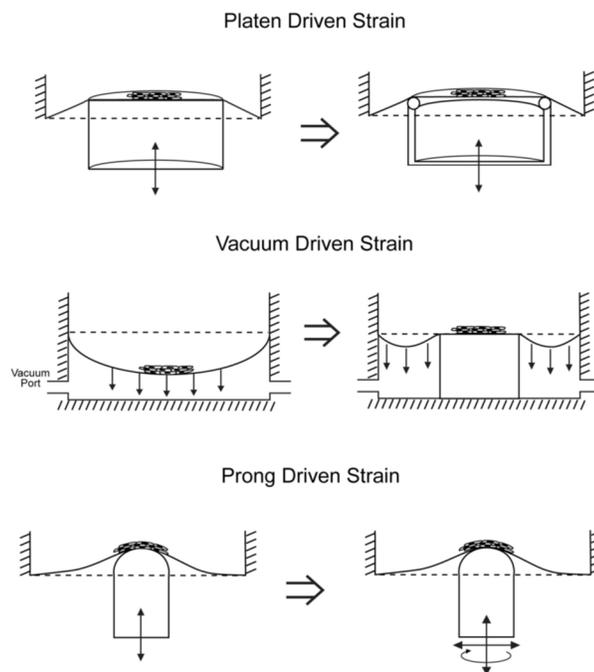


Figure 12: Mode d'action des déformations sur membrane flexible [43]. En haut, système de déformation à l'aide d'un plateau, au centre système de déformation à l'aide d'un vide et au bas système de déformation à l'aide d'une pointe arrondie.

La déformation par tension consiste à déformer dans le même plan une membrane flexible. Lorsqu'une force unilatérale est appliquée, la membrane flexible est allongée dans la direction longitudinale et si la partie latérale de la membrane n'est pas fixée en place, celle-ci se rétrécira. Lors de l'application d'une force bi-axiale, le substrat est déformé dans deux directions

perpendiculaires sur le même plan. Une déformation équi-axiale implique la déformation de la membrane flexible dans toutes les directions d'un même plan. La déformation à l'aide d'un plateau plein ou creux permet de déformer une membrane flexible en déplaçant verticalement sous la membrane le plateau. Le type de déformation appliqué dépend de la forme du plateau. La déformation à l'aide d'un vide consiste à l'application d'un vide dans la chambre sous la membrane flexible. La membrane sera alors aspirée et déformée. L'utilisation d'un pilier fixe sous la membrane permet également de modifier le type de déformation appliquée et de garder la déformation dans le plan. La déformation par pointe arrondie permet de déformer le substrat en déplaçant verticalement, longitudinalement ou par rotation la pointe arrondie sous le substrat pouvant ainsi appliquer différents types de déformations.

Il est également possible d'imposer des déformations à des échantillons tubulaires cellularisés par l'imposition d'une pression à l'intérieur du tube qui amène une distension de l'échantillon tubulaire.

La dernière façon d'appliquer des stimulations mécaniques est en combinant l'application d'un flux aux déformations mécaniques. Ce type de stimulation ne permet pas de distinguer si la déformation ou le flux est le plus affluant. Cependant, il se rapproche le plus de la réalité du système circulatoire. Par exemple, des échantillons tubulaires seront perfusés par un liquide permettant l'application d'un cisaillement et d'une pression sur les parois des échantillons.

Bien sûr, que l'application de la stimulation soit par cisaillement, déformation ou les deux, les forces appliquées seront calculées afin d'établir la relation entre la stimulation et la réponse cellulaire.

## 2. Objectifs

### 2.1 Approche du laboratoire

Le laboratoire de biomatériaux et bioingénierie de l'université Laval se spécialise en recherche cardiovasculaire. L'équipe travaille sur la régénération tissulaire vasculaire à base d'échafaudage de collagène qui a été extrait à partir de tendon de queue de rat. Un protocole d'extraction de collagène à partir de tendon de queue de rats a été développé par l'équipe permettant d'obtenir un matériau stockable et reproductible [116].

L'investigation du collagène a démontré qu'il n'augmentait pas la formation de caillot sanguin, ne modifiait pas les propriétés viscoélastique du sang, malgré une légère activation des plaquettes. Il permet également l'adhésion et la prolifération des cellules [98, 117]. Cependant, les propriétés mécaniques du collagène sont faibles et doivent donc être améliorées. Différentes techniques physiques, biochimiques et cellulaires ont donc été développées et utilisées à cette fin.

Par exemple, les UVs (Ultra-Violet) ont été utilisés sur ces gels de collagène et les propriétés mécaniques de ceux-ci ont été significativement augmentées grâce à cette technique qualifiée de physique [118-120]. L'adhésion et la prolifération cellulaire a légèrement diminué, mais permet tout de même un remodelage de l'échafaudage. Le pH, technique biochimique, a le même effet sur les propriétés mécaniques et biologiques des gels de collagène [120, 121]. En plus des UVs et du pH, la force ionique et la température influencent également les propriétés mécaniques. Une concentration en sel de 174 mM avec une température de 4 °C et un pH 10 permet d'obtenir des modules des compressions 4 fois plus élevés que le contrôle [121]. La morphologie des gels, diminution des pores, est également changée par la température, le pH et la force ionique. Ainsi, ces techniques physiques et biochimiques, seules ou combinées, permettent d'augmenter les propriétés mécaniques tout en gardant une adhésion et une prolifération cellulaire adéquate à l'intérieur (ou dans) des gels.

L'ajout d'autres types de polymères dans les gels de collagène permet également d'augmenter les propriétés mécaniques et même d'obtenir des performances biologiques augmentées. En effet, Couet et al. [96] ont ajouté de la soie au collagène afin de former un composite collagène-soie. Ce modèle a démontré qu'une concentration de 39% de soie permettait de soutenir des pressions biologiques. En gardant la même approche, Paternotte et al. [100] ont démontré la faisabilité et la biocompatibilité des gels de composite de collagène-fibroïne de soie, suivie d'une étude plus approfondie sur les propriétés mécaniques et biologiques de ce composite. De Moraes et al. [122] ont démontré qu'un maximum des propriétés mécaniques est atteint avec 50% de microfibres de soie, et que ces composites présentaient une perte de masse moindre comparée aux gels de collagène seuls. Les composites à 25 et 50% de soie démontrent également une augmentation de la prolifération des cellules de 20 et 40%. Weska et al. [123], par la suite, ont mis en évidence un module de compression 3 fois plus élevé, grâce à l'introduction de 0,2% de glucomannane de Konjac, dans les gels de collagène.

Boccafoschi et al. [99] quant à eux ont effectué un remodelage et maturation de l'échafaudage en introduisant des cellules dans le gel de collagène et en utilisant un bioréacteur rotatif. Cette technique permet d'obtenir des propriétés mécaniques adéquates pour la manipulation et une maturation continue dans un bioréacteur imposant un flux et une pression. Le développement, design, contrôle et optimisation d'un bioréacteur à perfusion ont ensuite suivi. En effet, Bilodeau et al. [124] ont développé un bioréacteur qui permet d'imposer un flux continu ou pulsatile (50 à 200 battements par minute) et perfusant la construction. Une force longitudinale et une contrainte axiale peuvent également être appliquées lors de la culture. Toujours dans l'objectif d'optimiser la maturation des gels à base de collagène, une étude de Couët et al. [125-128] a permis de démontrer que la maturation des constructions est influencée par différentes variables dynamiques comme le pH, le flux, la déformation mécanique, la température, les facteurs de croissance et la force ionique. Le suivi de ces variables lors de la croissance et la maturation permettrait une adaptation au fur et à mesure de l'environnement du bioréacteur et d'obtenir ainsi un environnement optimal à chaque étape de maturation. Les bioréacteurs permettent d'imposer des contraintes pseudo-physiologiques aux constructions faites de collagène et de cellules, et la mécanotransduction des cellules permet ensuite le remodelage de l'échafaudage et le développement d'une structure de régénération vasculaire.

## 2.2 Objectifs du projet de recherche

Ainsi, les objectifs de ce projet s'articulent autour de la stimulation des SMC pour la réorganisation, l'alignement, l'amélioration des propriétés mécaniques, et donc, le remodelage des structures d'échafaudage de gel de collagène. Ces objectifs permettront d'établir la stimulation mécanique optimale pour la croissance, le développement et le remodelage des constructions à base de collagène et de transférer ces données au contrôle de bioréacteur.

Le premier objectif spécifique est l'effet de la déformation mécanique sur les SMC. L'alignement des SMC et des fibrilles de collagène a été étudié ainsi que le remodelage induit par les cellules suite à une déformation de 25%. Le premier défi a été de développer un système de stimulation mécanique adapté à nos échantillons. Le chapitre 3 décrit le design et la caractérisation du système de stimulation et démontre le remodelage que les SMC ont effectué sous stimulation mécanique.

Le second objectif spécifique porte sur l'effet de la fréquence des déformations mécaniques sur les SMC à l'intérieur d'un gel de collagène. Le défi, dans cette partie, a été le design et le développement d'un système permettant la culture des gels de collagène avec SMC sans détachement de ces gels de la surface de stimulation. En effet, le remodelage intensif que subit la construction lors de stimulations mécaniques, contraint la forme des gels pouvant être utilisée, et du fait même, la déformation pouvant également être appliquée. Le chapitre 4 expose l'influence de la fréquence des stimulations mécaniques sur les SMC.

### **3. The Effect of Dynamical Strain on the Maturation of Collagen-Based Cell-Containing Scaffolds for Vascular Tissue Engineering**

Lucie Levesque<sup>a</sup>, D. Mantovani<sup>b</sup>

Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Department of Min-Met-Materials Engineering,  
Laval University & University Hospital Research Center, Quebec City, G1K 7P4, Canada

**Keywords:** 2D bioreactor, smooth muscle cells, alignment, orientation, collagen-cell based construct, collagen scaffold

Ce chapitre a été publié dans *Advanced Materials Research Vol. 409 (2012) pp 152-157*

## 3.1 Résumé

Les maladies vasculaires sont préférentiellement traitées en remplaçant le vaisseau atteint par une greffe autologue. Quand ce n'est pas possible, un greffon synthétique est alors utilisé. Ces prothèses synthétiques ont un faible taux de succès pour les vaisseaux de petit diamètre (<6 mm). L'ingénierie tissulaire vasculaire vise à améliorer les performances de ces substituts. Des bioréacteurs sont alors utilisés afin de simuler l'environnement mécanique et biochimique du vaisseau naturel. Pour cette étude, un bioréacteur 2D a été conçu afin d'imposer une déformation dynamique à une membrane de silicone sur laquelle est déposé l'échafaudage de collagène et de cellules. Ces échafaudages sont soumis à un régime de déformation dynamique uniaxiale de 1 Hz pendant 48 heures. Le pourcentage de déformation imposé à la membrane de silicone a été évalué par ImageJ. L'orientation des fibrilles de collagène et des SMC a été analysée par microscopie électronique à balayage (abréviation en anglais : SEM désignant «scanning electron microscopy»). Les résultats démontrent l'importance du conditionnement mécanique sur l'alignement des cellules et des fibrilles de collagène.

## 3.2 Abstract

Diseases occurring to blood vessel are preferentially solved by replacing the vessel by an autologous graft. When it is not available, a synthetic graft is used which has low patency rates for small diameter (<6 mm) vessels. Tissue engineering of blood vessel aims to improve the performance of vascular substitutes. Bioreactors are used in vascular tissue engineering to mimic the mechanical and biochemical environment of blood vessel. A 2D bioreactor was custom made in order to impose a dynamical strain to silicone membrane receiving the collagen cell-based construct. Collagen gels with vascular smooth muscle cells cultured inside were subdued to maturation under dynamical uniaxial stretch regimes at 1Hz for 48 hours. The percentage of deformation encountered by the silicone membrane was measured by ImageJ. Collagen fibrils and porcine smooth muscle cells (PSMC) orientations were assessed by scanning electron microscopy (SEM). Results show that the study of mechanical conditioning on cell activity is an important issue for enhancing the alignment of collagen fibrils.

### 3.3 Introduction

Atherosclerosis, thrombus occlusion or aneurysms are all pathological diseases of arteries. To solve this health problem, in last resort an autologous graft is considered, but when none is available, the replacement of the diseased artery consists of a synthetic graft made of Dacron or Teflon. Synthetic grafts have been associated with excellent long term results in treating the pathology of large diameter arteries where the flow is high and the resistance is low. Unfortunately, the patency rates have been disappointing when they are used to replace small diameter (<6 mm) arteries [7, 10, 129]. Vascular tissue engineering aims to improve the performance of small diameter vascular substitutes. One of the avenues is using dynamical strain on cell containing scaffolds which is known to induce remodelling of the microstructure by the cells [109, 112, 130]. A study showed using a microscope and Image-Pro Plus 4.5.1 software that smooth muscle cells (SMCs) have a faster 90° alignment to the radial direction at 1Hz within 12 hours than those at 0,5Hz, 1,5Hz and 2Hz when dynamically biaxially strain at 10% [131]. Moreover, fluorescent and reflection confocal microscopy with a Fast Fourier Transform to quantify the orientation showed that SMCs cultured statically inside collagen gel change the orientation of the collagen fibers from random to concordant with the SMCs [102]. Not only SMCs demonstrated to contract collagen gels, but also rat cardiac fibroblast. Rat cardiac fibroblasts cultured within a collagen gel with a statically biaxial load have, demonstrated by digital photographs, within 5 hours, significantly contracted the scaffold [132]. Other studies have opted to investigate the role of dynamical strain on cells like the effect of strain magnitude, 4% and 8% deformation, to human saphenous vein cells (HSVCS) [111] or the effect of 10% deformation at 1Hz on a collagen-based adult rat aortic SMCs using a 3D bioreactor [109]. The strain magnitude influences the orientation of the cells. Actually, the authors found by multiphoton images two different orientations, oblique (8%) and perpendicular (4%) or parallel (4 and 8%), whether it was the superficial layers or the deeper layers respectively [111]. The 10% deformation study in a 3D bioreactor showed by images from phase contrast microscopy that the SMCs were oriented circumferentially and were distributed homogeneously throughout the thickness of the vessel wall [109].

An optimised organisation of the extracellular matrix is of utmost importance to one day obtain viable engineered blood vessel. Bioreactors are used in vascular tissue engineering to mimic the physiological environment of blood vessel i.e. the mechanical and biochemical environment. Thereby, they are also used to induce dynamical strain on construct. This study has been focused on the dynamical strain effect on smooth muscle cells using flexcell plates. In order to optimise the alignment of the collagen fibers, PSMCs were cultured inside a collagen gel subdued to deformation under a 1Hz uniaxial strain for 48 hours. Image J and scanning electron microscopy allowed evaluating the performance of the mechanical stimulation system and the alignment of the collagen-cell construct respectively.

## 3.4 Materials and methods

### 3.4.1 Mechanical stimulation system

It consists of a custom made manufactured Teflon support (Usinage MCP inc., Quebec, QC, Canada) (Fig. 13, A) used to impose a uniaxial dynamical strain by vacuum. A "Tissue Train Amino Culture Plate" (Flexcell International Corporation, Hillsborough, NC, USA) (Fig. 13, B) was mounted on the Teflon support using silicone joint for sealing. A quick star push-in fitting (Fig. 13, A) with polyurethane tubing (Festo, Quebec, QC, Canada) joined the Teflon support to a proportional air control valve (Proportion-Air inc., McCordsville, IN, USA) which is coupled to the a medical vacuum outlet. A computer using Labview program (National Instruments, LabView 8.0) interfaced to the proportional air control valve allowed the dynamical control of strain by vacuum. The collagen-cell-based scaffolds were subdued to maturation under dynamical uniaxial strain regimes at 1Hz for 48 hours.

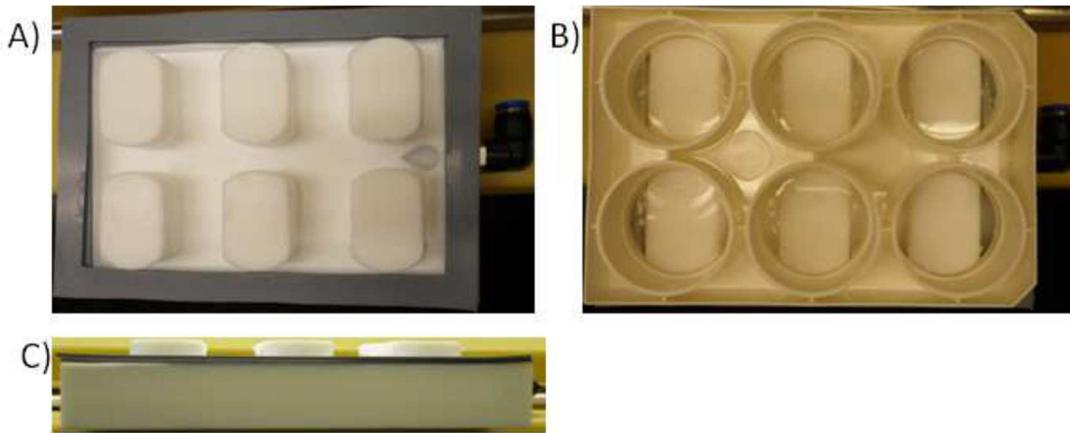


Figure 13: Macro-photographs of the custom made mechanical stimulation system. A) Teflon support (102mm X 146mm X 35mm, elevation 23.25 mm X 34.25 mm X 9.60 mm) with a fitting and a grey silicone joint; B) 6-well (35mm diameter) plate made with silicone membrane (Flexcell International Corporation) seated on the Teflon support with joint (direction of the mechanical stimulation is indicated by the arrow); C) Side of the Teflon support with joint.

### 3.4.2 Construct preparation

Collagen type I was extracted from rat tails and processed as previously described in details [116]. Briefly, rat tail tendons were dissolved in acetic acid for 48 h, then the gellike mass was mixed in a blender, frozen, and lyophilized. The resulting sponge was mixed again with 0.02 N acetic acid at a dry weight to solution ratio of 4 mg/mL. The resulting solution was centrifuged, degassed in vacuum and sterilized as follows. The collagen solution was placed in dialysis bags (Spectra/Por 1, MWCO: 6 000–8 000) and soaked in acetic acid 0.02 N for 1 h followed by 1 h in a mixture of chloroform and water (1:99, v/v). Dialysis was continued in sterile 0.02 N acetic acid for 4–5 days. This solution was changed daily. Collagen gels were obtained by adding to the collagen solution (1) NaOH 1 M; (2) Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) X5 (Gibco, Invitrogen Corporation, Burlington, ON, Canada); (3) 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 1M; (4) sterile water; (5) fetal bovine serum (FBS); (6) porcine serum (PS) and (7) Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) X1 containing (the medium contains cells when needed)  $1 \times 10^6$  Porcine Smooth Muscle Cells (PSMCs) per mL giving a  $1 \times 10^5$  cells/mL final concentration in the gel. PSMCs were cultured between third passage and 7th before being dispersed into a collagen-based cell suspension and cast into

gels. The construct is then incubated at 37°C for 1h to jellify, thereafter 2 mL of culture medium (DMEM X1 added with 10% FBS, 10% PS and 1% Penstrep) is added on top of the construct. The dynamical strain ones are placed on the mechanical stimulation system in an incubator at 37°C, 100% relative humidity and 5% CO<sub>2</sub> for 48 hours.

### 3.4.3 Scanning electron microscopy

Samples were washed once in 0.1 M cacodylate buffer and fixed for 2 hours at 4°C with a solution of glutaraldehyde/cacodylate/water. Afterwards, samples were treated for 30 minutes with a solution of cacodylate/1% osmium tetroxide/water, dehydrated through a graded ethanol series, dried with a critical point drier (CPD 7501 Fisons Instrument, Uckfield, England) and coated with gold-palladium. Observation were carried out with a Jeol JSM35CF scanning electron microscope (Soquelec, Montreal, Qc, Canada) under a 15 kV accelerating voltage.

### 3.4.4 Image analysis

Pictures of silicone membrane under deformation were analyzed using ImageJ freeware [133]. Basically, picture analyses consisted of measuring references lines traced on the silicone membrane.

## 3.5 Results and discussion

### 3.5.1 Mechanical stimulation system

Before studying the effect of dynamical strain on the construct preparation, the calibration of the mechanical stimulation system had to be done. References lines were drawn on the silicones membrane and macro photographs were taken at different amplitude. Image J was used in order to evaluate the deformation. The custom made 2D bioreactor allows a dynamical stretch of the

6-well plate silicone membrane up to 25% of deformation. Also, the deformation made by the vacuum follows a linear regression (Fig. 14).

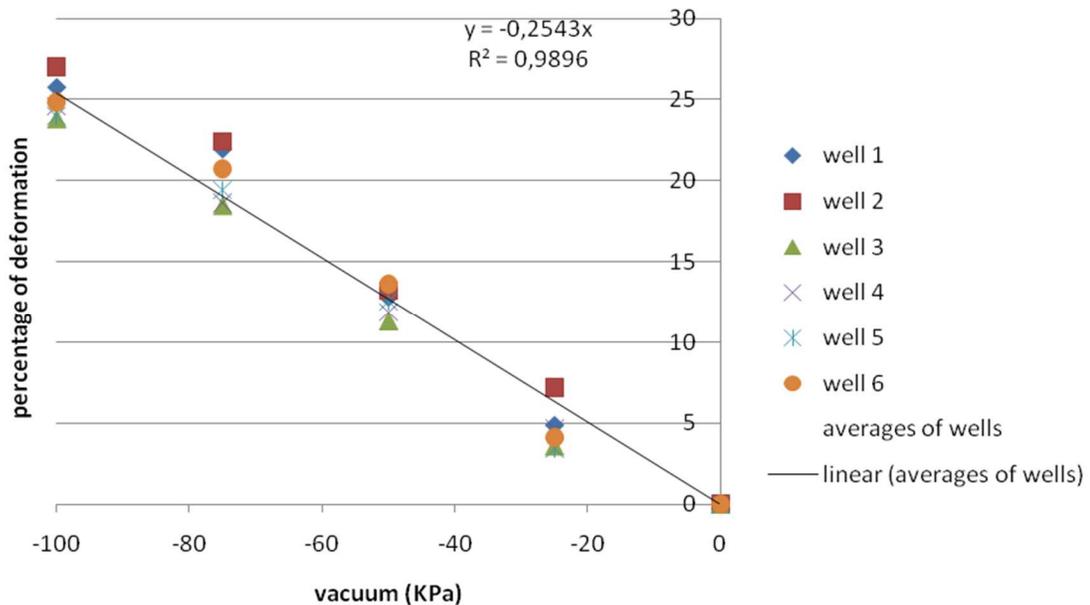
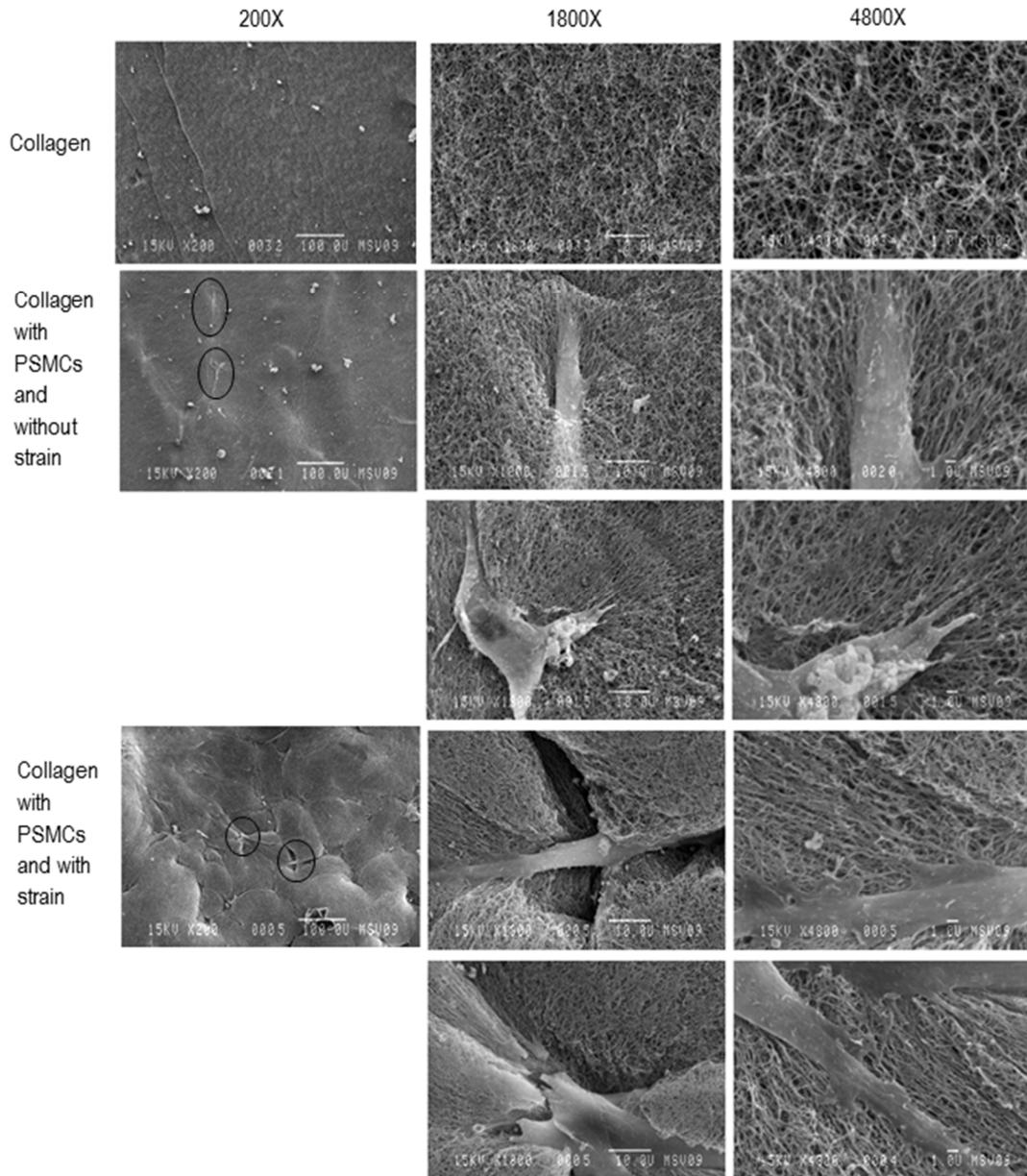


Figure 14: Percentage of deformation of the Tissue Train-Amino Culture Plate's silicone membrane at different vacuum amplitude

The blood vessel wall components like collagen and SMCs are normally under tension of about 40% when the vessel is isolated [134]. The 25% deformation of the silicone membrane is obviously less than the normal tension; however, other studies have employed 10% or less deformation [109, 111, 131], thereby, our deformation moves closer to reality.

### 3.5.2 Images analyses of collagen and porcine smooth muscle cells

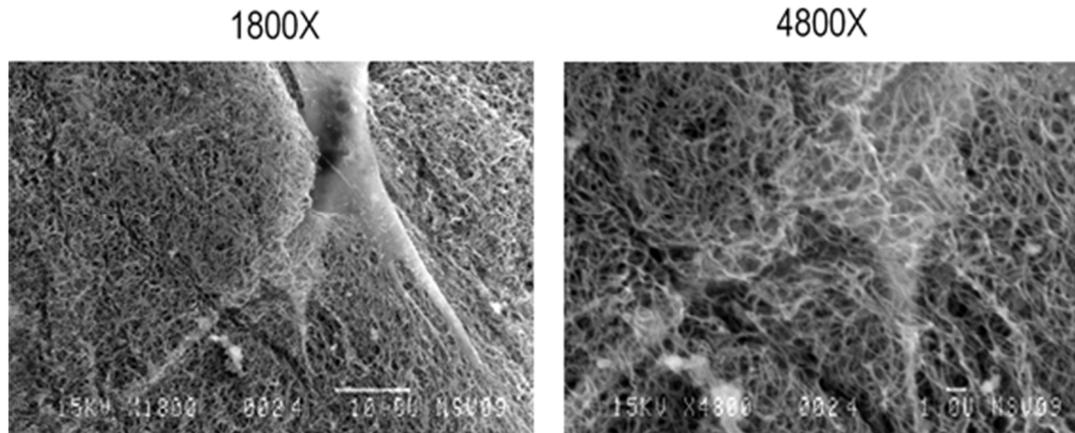
SEM images in Figure 15 show the influence of cells and dynamical strain on collagen based-scaffolds with and without cells. At 200X of collagen of figure 15, a mostly homogeneous collagen surface is shown by construct without PSMC. Also, at higher magnification, it is possible to observe the random orientation of the collagen fibrils in collagen gel construct without cells.



*Figure 15: SEM images of collagen, PSMCs with and without dynamical strain view at 200X, 1800X, 4800X*

Unlike collagen construct, a protuberance is made by the cells when inside the collagen which is seen as white shade similar to cells shape (Fig. 15 at 200X of collagen with PSMCs). Moreover, in figure 15 at 1800X and 4800X of collagen with PSMC, they bind by their pseudopodia to the collagen fibrils which induced an elongation and alignment of the fibrils in the direction of the cell. These results are in accordance with Pang et al. whom seen that type of interaction after 24 hours of canine carotid SMCs in contact with collagen by fluorescence and

reflection confocal microscopy acquiring images in multichannels [102]. Furthermore, the PSMC demonstrates an ability to infiltrate the collagen gel. Indeed, at 1800X of figure 16, two pseudopods are seen as one is above the collagen gel and the other one creep into the collagen. Unfortunately, without strains the cells are randomly aligned in the collagen gel.



*Figure 16: SEM images of a PSMC pseudopod infiltrating the collagen matrix without strain.*

The dynamical uniaxial strain triggers a series of metabolic cascade which, among other things, allows the cells to orientate, proliferate and have a more pronounced fusiform shape [42, 102, 135]. This is seen at 1800X of Figure 15 of collagen with PSMC and dynamical strain. Within 48 hours, the PSMC has been able to align to the dynamical uniaxial strain causing the alignment of the collagen fibrils as well. At 200X (Fig. 15 of collagen with PSMC and dynamical strain), the waviness appearance could be attributed to the impressive drawing done by the cells to the collagen fibrils and the uncrimping of some collagen fibrils. Boerboom et al. have also seen this waviness in their study of HSVCs with 6 days of no applied loading followed by 2 weeks of dynamic straining at a frequency of 1 Hz [111]. The collagen density around the PSCM increased when the construct was dynamically strain as seen in Figure 15 at 1800X and the drawing done by the cell show a fissure.

### 3.6 Conclusion

The objective of this study was to investigate the effect of dynamical strain on the alignment of PSMCs within a collagen scaffold with the use of a 2D bioreactor. The 2D bioreactor allows a

dynamical stretch of the construct up to 25% which is in the range of deformation found in natural blood vessel. This dynamical constraint might play a primordial role in the alignment of collagen fibrils by triggering a cell adaptation as demonstrated by SEM analyses. Since the cells binds to the collagen fibrils, an orientation is seen around them in the whole construct. Dynamical uniaxial strain plays a crucial role in enhancing the alignment of collagen fibrils. Future works will focus on the effect of dynamical strain rate change on the relation between the alignment of collagen fibrils by PSMC and the increase of mechanical properties of collagen-cell construct.

### 3.7 Acknowledgements

The authors are grateful to Matteo Achilli and Sébastien Meghezi for their assistance on collagen construct preparation. The authors also wish to thank Frédéric Couet and Dr. Stéphane Turgeon for their guidance and help in the design of the stimulation mechanical system, and Dr. Pascale Chevallier and Dr. Jean Lagueux for their help and guidance, including SEM analyses. This work was partially supported by Natural Sciences and Engineering Research Council, the Canadian Institutes of Health Research, the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## **4. Incrementing the frequency of dynamically strained SMC-cellularised collagen-based scaffolds affects the matrix remodeling and the mechanical properties**

Lévesque L., Loy C., Lainé A., Drouin B., Chevallier P., Mantovani D.

Lab. Biomaterials and Bioengineering, CRC-I, Dept Min-Met-Materials Eng & CHU de Québec  
Research Center, Laval University, Québec City, Canada

**Keywords:** 2D bioreactor, 3D construct, smooth muscle cells, desensitisation, incremental frequency, collagen-cell based construct

Ce chapitre sera soumis à *ACS Biomaterials Science and Engineering*

## 4.1 Résumé

Malgré les efforts injectés dans l'ingénierie des tissus vasculaires au cours des trente dernières années, la translation vers la clinique de constructions d'artère d'ingénierie est loin d'être un succès. Une approche commune dans le domaine, pour améliorer la régénération de l'artère, est l'utilisation de stimuli mécaniques cycliques pour guider le remodelage cellulaire. Cependant, il y a un manque d'information sur l'effet des déformations cycliques sur les cellules dans un environnement 3D. Ce travail s'inscrit dans cet objectif, et explore l'effet d'augmenter progressivement la fréquence sur des constructions de collagèneensemencées de HUASMCs. Les résultats démontrent que l'augmentation progressive de la fréquence d'une contrainte 5 % permet un plus grand remodelage des constructions par les HUASMCs par rapport aux échantillons soumis à des fréquences de 1 Hz. L'expression des gènes de collagène, d'élastine et de MMP-2 est conservée dans le temps lorsque les échafaudages sont soumis à une augmentation progressive de fréquence, alors qu'elle est plus faible avec une fréquence constante de 1 Hz. Les propriétés viscoélastiques des matériaux obtenus sont également améliorées. Pris ensemble, ces résultats démontrent une désensibilisation des HUASMCs dans le temps aux contraintes mécaniques cycliques. L'étude de l'effet de la contrainte cyclique sur les SMC dans un environnement 3D pourrait ainsi conduire à une optimisation des stratégies de contrôle de bioréacteurs pour la maturation et la régénération des tissus.

## 4.2 Abstract

Notwithstanding the efforts injected in vascular tissue engineering in the past thirty years, the clinical translation of engineered artery constructs is far from being successful. One common approach to improve artery regeneration is the use of cyclic mechanical stimuli to guide cellular remodeling. However, there is a lack of information on the effect of cyclic strain on cells within a 3D environment. To this end, this work explored the effect of gradual increase frequency on HUASMCs embedded in collagen. The results demonstrate that gradual increase frequency of 5 % strain allows a greater remodeling by HUASMCs compared to 1 Hz samples. The expression of collagen, elastin and MMP-2 gene is conserved overtime whereas 1 Hz samples show lower amounts. The viscoelastic properties are also enhanced by gradual increase frequency. Taken together, these results show a desensitisation of HUASMCs overtime to cyclic mechanical strain. Thereby, the investigation of the effect of cyclic strain on SMC in 3D environment could lead to optimise control strategies of bioreactors for tissue maturation and generation.

### 4.3 Introduction

Vascular tissue engineering aims to produce viable blood vessels in vitro able to ensure physiological functions in vivo. Technologies from both the engineering and biological fields have been applied to enable the generation of engineered blood vessels. Notwithstanding the efforts injected in vascular tissue engineering in the past thirty years, the clinical translation of engineered artery constructs is far from being successful. One of the key challenges toward the development of functional engineered vascular tissue is the ability to control cell function in 3D constructs and consequently tissue maturation. In literature, a common approach to face this issue consists in exploiting the ability of the cells to sense mechanical stimuli in their environment and to adapt their behavior by transforming mechanical cues into signaling pathways, a process defined as mechanotransduction. Since natural blood vessels and vascular smooth muscle cells (vSMCs), the main cell type in the vascular wall, are constantly subjected to cyclic mechanical strain corresponding to 2 % to 18 % deformation at 1 Hz [136], cyclic stretch has been regularly used to investigate the response of vSMCs to physiological mechanical stimuli. Those studies have shown that cyclic strains influence smooth muscle cells (SMCs) behavior like growth, alignment, phenotype, functionality, as well as the extracellular matrix remodeling and deposition [44, 137, 138]. However, conflicting results have been reported on the response of SMC to cyclic mechanical stimuli [45, 84, 109, 111]. Indeed, the use of different experimental setup and SMCs types complicates the analyses of the exact tendency of SMC response to specific cyclic strains. Further, models differ dimensionally from 2D to 3D, and responses of SMC to mechanical strain do not necessarily translate from 2D to 3D [46, 139]. For example, vSMCs exhibit an alignment in the direction of the strain when cultured within a scaffold matrix, however they aligned perpendicularly when cultured in 2D (classical culture) under cyclic strain higher than 2 % [109, 114, 131, 140-143]. In addition, many studies have been conducted on the response of SMC in 2D under cyclic strain, however only a few ones have examined the effect of cyclic strain on SMC in 3D in order to optimise control strategies of bioreactors for tissue maturation and generation [45].

Moreover, the vast majority of studies undergone in 3D have examined the effect of cyclic mechanical stimuli with constant parameters of strain amplitude and frequencies [105, 144]. The

common parameters are ranging from 0 to 25 % for strain and 0 to 3 Hz for frequencies [45, 105, 109, 145-147]. However, it has been highlighted that cells may adapt to constant mechanical conditioning, resulting in unwanted long-term decline in stretch effects [45, 105]. Thus, the introduction of rest period in the stretch regime appeared attractive, and have permitted to avoid this effect for bone and ligament tissue engineering [45, 148-150]. Furthermore, Syedain et al. [105, 144] have shown that incremental cyclic distension of fibrin gel embedded with porcine valve interstitial cells (PVICs) or neonatal human dermal fibroblast cells (nHDFCs) have increase mechanical properties and collagen deposition compared to constant cyclic distension and static control. To our knowledge, the adaptation of cardiovascular cells to cyclic distension has only been studied through incremental cyclic distension and the effects of incremental frequencies have not yet been explored.

Instead of rest period and incremental cyclic distension, the original approach of this study is to introduce strains of gradually increased frequencies to human umbilical artery smooth muscle cells (HUASMCs) within a collagen matrix, allowing HUASMCs to remain within remodeling conditions. This was based on the hypothesis that strain frequency increment on SMC–collagen construct would better represent natural remodeling processes than rest periods. Therefore, in order to sort out parameters influencing SMC behaviors, the constructs were submitted to static, 1 Hz and increasing frequency (from 0.1 to 1 Hz with gradual increase of 0.3 Hz every two days) and the matrices remodeling were assessed by optical and confocal microscopies, as well as qRT-PCR. This accurate technique allowed to evaluate gene expression of collagen and elastin as extracellular matrix proteins, and MMP2 for remodeling activities. Furthermore, stress-relaxation tests permitted to assess the viscoelastic properties of the constructs when submitted to various mechanical strains.

## 4.4 Materiel and methods

### 4.4.1 Cellularised scaffold preparation

Collagen type I was extracted from rat tail tendons and processed as previously described to obtain a 4 mg/mL concentration [116]. The collagen was then mixed to a final concentration of 2 mg/mL with 17 % of Dulbecco's modified eagle's medium 5X (DMEM 5X) (Gibco, Grand Island, NY, USA), 1.5 % of NaOH 1 M (Sigma, St Louis, MO, USA), 2 % of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 1M (Sigma), 4.5 % of sterile water, and 25 % of DMEM 1X (Gibco) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 1 % penicillin-streptomycin (PENSTREP) (Gibco), recombinant Human Fibroblast Growth Factor–basic (FGF) (2 ng/mL) (Gibco), Recombinant Human Epidermal Growth Factor (EGF) (0.5 ng/mL) (Gibco), ascorbic acid (1 µg/mL) (Sigma), insulin (5 µg/mL) (Santa Cruz Biotechnology, inc, Dallas, Texas, USA), hydrocortisone (1 µg/mL) (Sigma) and heparin (90 µg/mL) (Sigma). Cellularized constructs were obtained by suspending  $2 \times 10^6$  human umbilical artery smooth muscle cells (HUASMCs) (Lonza, Walkersville, MD, USA) per mL in the DMEM 1X with supplements to obtain a final concentration of  $5 \times 10^5$  HUAMSCs/mL in the construct. The collagen solution, cellularized or not, was then poured inside an adapted 6 wells Tissue Train-Amino Culture (Flexcell International Corporation, Hillsborough, NC, USA) plate to jellify for 1 hour. Supplemented DMEM was then added and the construct was left to further jellify for 23 hours in an incubator at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>.

### 4.4.2 Stimulation system

Cyclic uniaxial mechanical strain was applied to the construct after 24 hours jellification by a vacuum custom made system. A machined Teflon support comprising 6 protuberant loading stations was used to apply deformation by vacuum to a 6 well silicone membrane Tissue Train-Amino Culture plate. A medical vacuum outlet regulated by a proportional air control valve (Proportion-Air inc., McCordsville, IN, USA) joined to the Teflon support by a quick push-in fitting with polyurethane tubing (Festo, Quebec, QC, Canada) allows deformation of the silicone

membrane. A LabVIEW program (National Instruments, LabVIEW 9.0) developed in our laboratory interfaced to the proportional air control valve allows to control the deformation applied. The 6 well Tissue Train-Amino Culture plate was modified in order to obtain a rectangular molding in the wells by using a Silastic medical adhesive silicone, type A (Dow Corning, Auburn, MI, USA) for the delimitation. An anchoring system comprised of sterile gauze glued to the silicone membrane by the Silastic medical adhesive silicone, type A enabled collagen construct attachment and ensured deformation. A cyclic uniaxial mechanical 5.5 % strain was applied to the cell-based collagen construct for 7 days in an incubator at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. Two different frequencies of deformation were used, one was fixed at 1 Hz and the other one was gradually increased from 0.1 Hz to 1 Hz with an increase of 0.3 Hz every two days. A static control with no deformation was used in this experiment.

#### 4.4.3 Confocal microscopy

After 7 days of dynamic or static culture, samples were rinsed three times with Phosphate Buffer Serum (PBS) (Fisher Scientific, Ottawa, On, Canada) and fixed in 3.7 % paraformaldehyde (Sigma) in PBS for 20 minutes. The samples were then permeabilized with 3 % BSA (albumin from bovine serum) (Sigma) and 0.1 % saponin (Sigma) in PBS for 10 minutes. BSA and saponin were removed and the samples were rinsed once with PBS. DAPI (Sigma) and rhodamine-phalloidin (Sigma) in 3 % BSA and 0.1 % saponin in PBS were poured on the samples and incubated for an hour. Samples were then rinsed three times with 0.05 % tween-20 (Sigma) in PBS and mounted for analyses with a FV1000 confocal microscope (Olympus, Richmond Hill, On, Canada).

#### 4.4.4 Histology

After 7 days of dynamic or static culture, samples were rinsed three times with PBS and fixed in 3.7 % paraformaldehyde in PBS for 20 minutes. Samples were then embedded in paraffin and sections of 5 µm were cut. Sections were deparaffinized with toluene and rehydrated with graded alcohol, refixed in Bouin solution overnight and then stained by a modified Masson's trichrome

procedure. Three different dyes were used in order to differentiate between cells and ECM: Weigert's iron hematoxylin solution was used for nuclei staining (dark); acid fuchsin and Xylidine ponceau solution was used for cells cytoplasm (red); and Light green SF yellowish solution for collagen (green).

#### 4.4.5 Total RNA extraction, cDNA synthesis and real-time qRT-PCR Taqman analysis

After 7 days of dynamic and static culture, samples were rinsed three times with PBS, flash freeze in liquid nitrogen and kept at -80 °C. Samples were kept frozen for disruption to obtain a powder which was then homogenize and total RNA was isolated using RNeasy plus mini Kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA) following manufacturer protocol. RNA concentration was obtained with a nanodrop spectrometer. An amount of 180 ng of RNA was used to perform the reverse transcription with the QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) following manufacturer protocol. qRT-PCR was performed using 50 ng of cDNA previously obtained by reverse transcription, TaqMan gene expression assay targeting the HUASMCs markers collagen (col1a1, Hs00164004\_m1), elastin (Hs00355783\_m1) and matrix metalloproteinase-2 (MMP2, Hs00234422\_m1) and TAQMAN universal Master mix II, with UNG all purchased from Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific. The TaqMan Gene Expression Assays protocol was followed and the gene transcript were measured by a 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All results were normalized to GAPDH (Hs03929097\_g1, Applied Biosystems) and then a comparative study was made with static condition and HUASMC cultures on a flask.

#### 4.4.6 Stress-relaxation testing

Samples were tested under unconfined compression with a Mach-1 V500CST mechanical testing system (Biomomentum, Laval, Qc, Canada). A strain of 10 % at a rate of 0.002 mm/s was imposed on the samples and maintained for 1500 s. The stress-relaxation cycle was repeated up to 50 % strain with 10% stepwise increase. The data were collected at a sampling

rate of 20 Hz. The analyses of the data is based on the approach of the combination of “bodies” made from two series-connected basic elements that behave like a spring and a damper [151-153]. Such paired elements are called Maxwell bodies. The spring reacts without delay to strain or load solicitations. On the other hand, the viscous damper is sensitive only to strain speed. In this work, a model made of three Maxwell bodies in parallel as illustrated in the following figure was used.

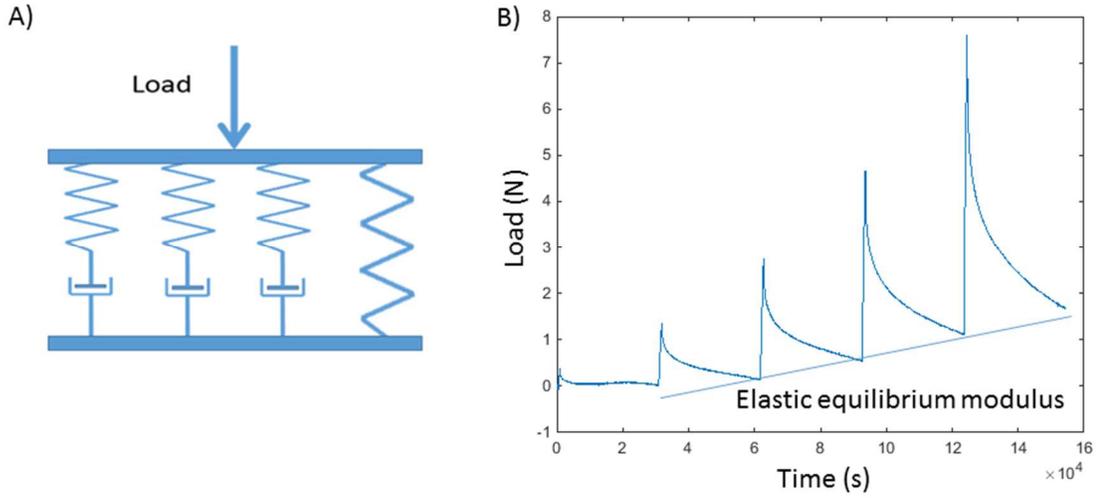


Figure 17: Viscoelastic model constituted of a spring associated in parallel with three Maxwell elements and residual stress (A) and representative stress-relaxation curve and slope of elastic equilibrium modulus (B).

This configuration implies that both the damper and the spring are submitted to the same load. When such a body is submitted to a step strain, the load achieves a maximum followed by a relaxation described by a multiple exponential. The form of this equation is the following:

$$Load = A_{water} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{water}}\right) + A_{visco} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{visco}}\right) + A_{poro} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{poro}}\right) + L_{residual}$$

$$where \tau = \frac{\eta}{G}$$

where  $\tau$  is called the time constant,  $G$  is related to the spring constant and  $\eta$  is related to the viscous damper. This equation includes 7 parameters. The water time constant is associated

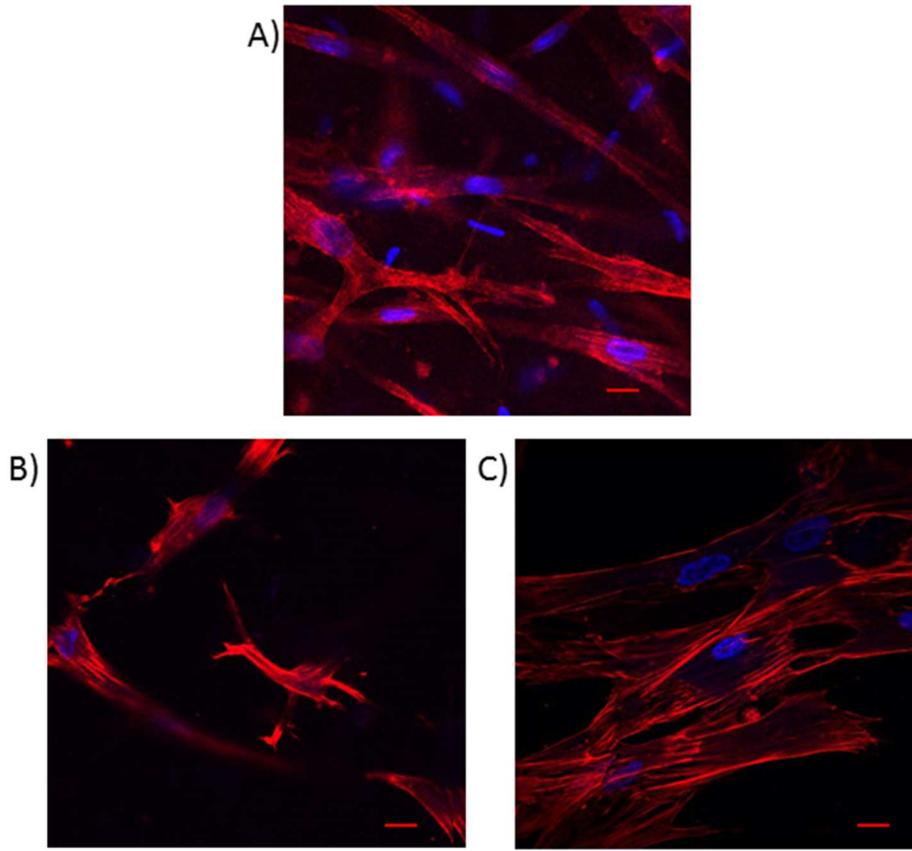
with liquid behavior, the viscoelastic time constant is associated with chain rearrangements in the gel and the poroelastic time constant is associated with the migration of the liquid between pores. The correlation coefficients between the model and the experimental data are all above 0.985. The residual stresses of each stepwise stress-relaxation were used to calculate the elastic equilibrium modulus.

## 4.5 Results

### 4.5.1 Confocal microscopy and histology

Cellular morphologies were examined through confocal images of the three conditions. Samples of the static and 1 Hz conditions had a more compact actin filament network, closer to the nucleus of the cell, thus showing a more spindle shape, whereas the gradual sample showed an uncondensed filament network (figure 18). Moreover, gradual samples revealed a cell structure more aligned to the mechanical stimulus (figure 18, C) while static samples showed no particular orientation (figure 18, A) which is also seen in histology results through the orientation of collagen bundles.

Results of histology showed remodeling within the collagen-based construct (figure 19) and a distinct remodeling process seems to have taken place within static samples. Indeed, a smoother surface of the collagen was reached, as seen in figure 19A, compared to constructs obtained with gradual and 1 Hz frequency strains where a greater surface roughness, a wavy like arrangement (figure 19, B, C) were obtained. Further, for these last conditions, both samples showed oriented bundles of collagen. Moreover, the 1 Hz sample also evidenced a less dense and compact structure than the gradual construct.



*Figure 18: Confocal images of static (A), 1Hz (B) and gradual (C) strain frequency 3D cellularised collagen-based scaffold stained with DAPI for the nucleus in blue and rhodamine-phalloidin for actin filament in red, scale bar 10  $\mu\text{m}$ .*

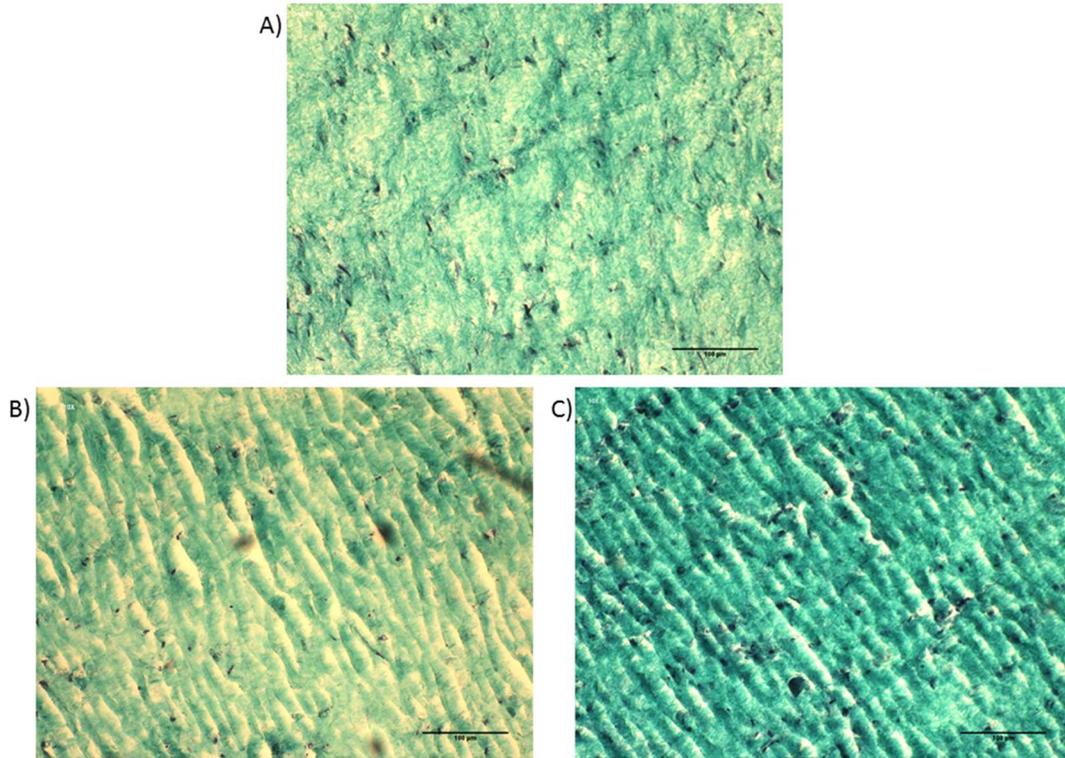


Figure 19: Phase contrast images of static (A), 1Hz (B) and gradual (C) strain frequency 3D cellularised collagen-based scaffold stained with Masson's trichrome staining (collagen in green, nuclei in black) after 24 hrs of static culture followed by 7 days of respective strain frequency based culture. Magnification: 10X and scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5.2 qRT-PCR

The expression of collagen, elastin and MMP-2 genes in the different constructs were therefore evaluated by qRT-PCR, and results were compared to the static condition and to HUASMCs cultured in a T175 cm<sup>2</sup> flask (figure 20). For the collagen comparative expression, 1 Hz samples showed a lower expression than the static and gradual constructs as well as the HUASMCs (figure 20, A, B). The same tendency could be observed for elastin expression for all constructs when compared to static samples (figure 20, C). However, a significant difference in elastin expression between HUASMCs cultured in a flask and static and gradual constructs was shown: a 105 and a 61 fold increase of elastin expression in static and gradual samples, respectively, compared to HUASMCs (figure 20, D). Even though no significant differences could be seen between the different constructs for other comparison, there was a tendency of lower expression levels for collagen, elastin and MMP-2 for constructs strained at a 1 Hz frequency.

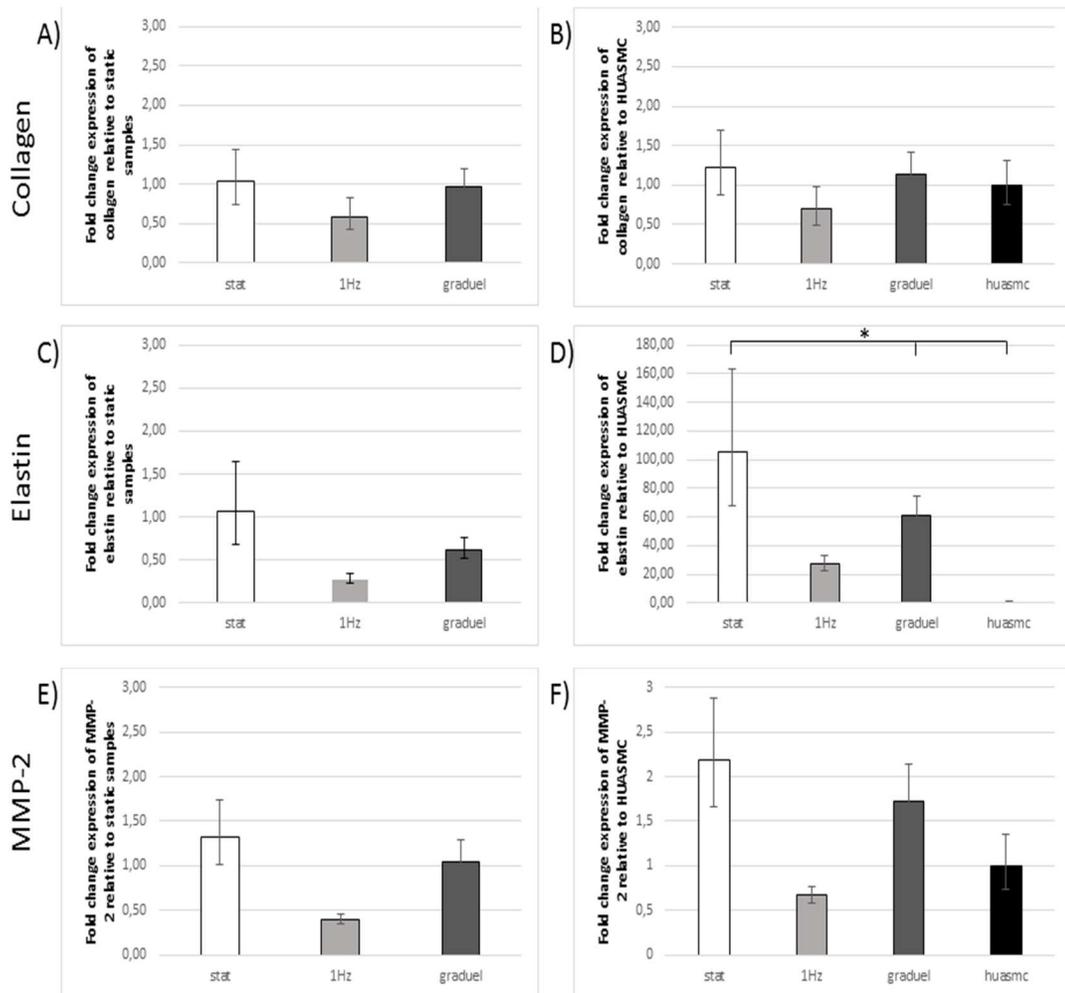


Figure 20: Comparative RT-qPCR analysis of collagen (A, B), elastin (C, D) and MMP-2 (E, F) expression to the static samples (left column) and to HUASMC (right column) cultured in a flask. Asterisks represents statistically significant differences ( $n \geq 3$ ,  $p < 0,05$ ).

#### 4.5.3 Mechanical analyses

The results of stress-relaxation methods showed that every time constants associated with the liquid behavior are significantly different from each other (figure 21). The native collagen which is highly hydrated exhibited a large amplitude of the short time constant and a small amplitude of the long-time poroelastic constant. Only the 1 Hz sample exhibited a trend similar to the native collagen gel which could be explained by the construct morphology. The static sample exhibited an increase in long-time poroelastic constant compared to collagen and 1Hz samples, however

lower than for the gradual construct and the saphenous vein which showed the highest long-time poroelastic constant.

The elastic equilibrium modulus of static and gradual samples were similar, 427 Pa and 428 Pa respectively, whereas the 1 Hz samples have shown no residual elasticity meaning that the remodeling was not as efficient for this condition.

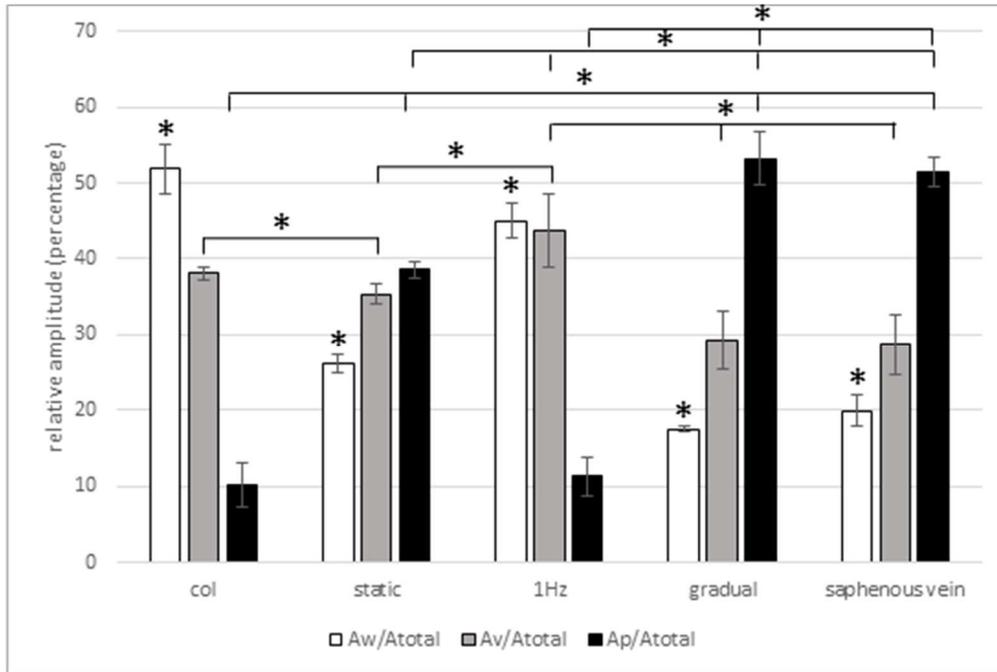


Figure 21: Relative amplitude of the short (white), medium (grey) and long (black) time constant of collagen without cells (col), collagen embedded with HUASMC in static (static), 1 Hz (1Hz), and gradual (gradual) frequency applied and saphenous vein. Asteriks represents statistically significant differences ( $n \geq 3$ ,  $p < 0,05$ ).

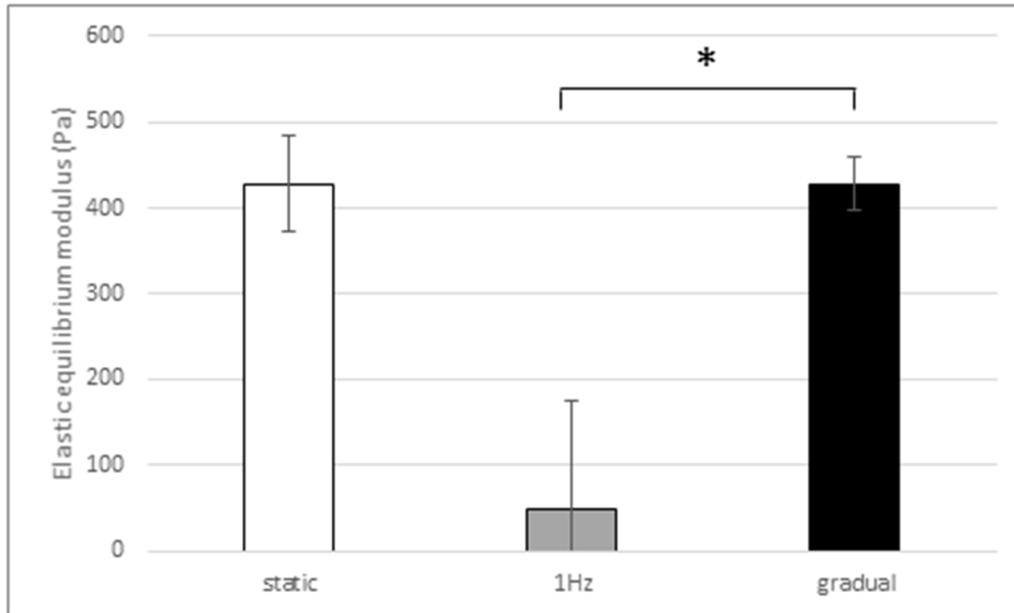


Figure 22: Elastic equilibrium modulus of static, 1 Hz and gradual frequency of samples. Asteriks represents statistically significant differences ( $n \geq 3$ ,  $p < 0,05$ ).

## 4.6 Discussion

One of the major challenges in vascular tissue engineering is finding the appropriate remodeling of the scaffold by the cells. To obtain that, strategies include biochemical and biomechanical conditioning of the cells. Biomechanical conditioning like cyclic mechanical stretch in 2D has well known effect on cells. However, cells adhere to substrate and translate differently mechanical cues when in 3D environment. Moreover, only minimal investigation on cyclic mechanical stretch effect on cells in 3D construct compared to 2D has been done. In order to obtain optimal control strategies for appropriate remodeling, investigation into the parameters of cyclic stretching is of utmost importance.

Remodeling under increasing frequency of cyclic mechanical stretch was investigated here and has shown a greater orientation of the cells in the direction of the strain. It has also shown an orientation of the collagen bundles formed by the remodeling action of the cells which is seen in both 1 Hz and gradually increased frequency samples. Thus, an orientation in the direction of

the strain in 3D construct under cyclic mechanical strain implies that proper orientation cues be transmitted to the cells.

The remodeling action by the cells involves the reorganisation of the matrix by the secretion of new extracellular matrix (ECM) and matrix metalloproteinases (MMPs) for the degradation of the existing matrix [146]. Samples that were cyclically strained at 1Hz exhibited a downregulation in collagen, elastin and MMP-2 expression. This would explain the less compacted aspect of those samples as characterized by histology. A stabilisation of the collagen and elastin expression after eight days of 10 % strained at 1 Hz frequency compared to static control that continues to upregulate have been observed by Seliktar et al. for constructs with human aortic smooth muscle cells (HASMCs) embedded in collagen [112]. This trend was also noticed for collagen synthesis in constructs seeded with human saphenous vein cells (HSVCs) strained at 4 % and 8 % at 1 Hz frequency during 2 weeks (6 days of static culture followed by 2 weeks of dynamic culture) [111], whereas Syedain et al. [105] have demonstrated no differences in collagen production for porcine valve interstitial cells (PVICs) seeded-construct at 0.5 Hz frequency strained at 2.5, 5 and 10 % for 3 weeks of dynamic culture (3 weeks of static culture followed by 3 weeks of dynamic culture). However, the same group [105] have shown an increase in collagen deposition at 15 % distension and even higher collagen deposition with incremental cyclic distension compared to static control. As previously described in literature, the range of beneficial strain and stress varies with cell types [45, 109, 112], however our results of incremental frequencies suggest a sustain and beneficial activity of cyclic stimuli even though low strain was used. Other works have shown an increase in collagen expression or production when neonatal human dermal fibroblast cells (nHDFCs) within a construct where strained at 10 % and 1 Hz frequency for 24 hours (5 days of static culture and 24 hrs of dynamic culture) [110, 154]. However, only the last 24 hours of culture included dynamic culture which would suggest that cells were not yet desensitise to dynamic culture. Syedain et al. [105] have demonstrated that the adaptation time to constant mechanical stimuli would be smaller then 3-4 days. Furthermore, regarding MMP-2 expression, published results seem also to exhibit the same tendency as collagen and elastin gene expression. For example, no difference has been seen for collagen constructs embedded with HASMCs submitted to 2.5 % strain and frequencies of 0.5 and 1.5 Hz compared to static control (72 hrs of static and 21 days of dynamic culture) [155]. Moreover, Asanuma et al. [156]

have shown no variation of MMP-2 between non stretch and 10 % cyclically stretch at 1 Hz samples for 24, 48 and 72 hrs, whereas a 50 fold increase was shown for stationary strained at 5 % of human saphenous vein smooth muscle cells (HSVSMCs) seeded on collagen and chitosan gel. Those examples of downregulation or similarity between samples could indicate a desensitisation of the cells over time to the cyclic mechanical stimulus as seen in ligament and bone tissue engineering [45, 105]. This would be logic since no remodeling is seen in the human vasculature unless changes in mechanical cues or injuries are sensed [35, 112, 154, 156]. Thereby, gradual increase of frequency, as used in this work, could insure mechanosensitivity of the cells throughout tissue engineering process allowing more organized remodeling.

This increase in remodeling activity of the cells by applying a gradual incremental frequency is also highlighted by the mechanical results, as seen in figure 21. Indeed, the various relaxation time constants clearly exhibited different tendencies depending on the mechanical strain imposed on the scaffolds. The time constant parameters are associated to liquid, chain rearrangements and migration of liquid between pores of the construct. The collagen scaffold being constituted of 99.8 % of liquid will therefore behave in part like water under compression. As the cells densify the collagen network, water is expelled from the scaffold and the chain rearrangements and the migration of liquid from pores to pores (poroelasticity) take more importance in the overall mechanical behavior. Indeed, as previously highlighted in figure 19, the 1 Hz sample is less densified than the gradual sample. Therefore its remodeling by the cells left greater zones between the collagen bundles where liquid can easily move. For the gradual sample the trend is reversed, due to the densification of the construct, thus restricting water movement. In those samples, the liquid is forced to pass through smaller pores within the construct which implement poroelastic behavior. As can be seen on figure 21, gradual samples exhibit similar chain rearrangements and poroelastic behavior as saphenous vein.

The remodeling process of the scaffold produced residual stress in static and gradual frequency samples implying that there is an elastic behavior within those samples. However, collagen without cells (data not shown here) and 1 Hz samples show no residual stress, therefore they show no elastic equilibrium modulus. These results also evidence an incomplete and inappropriate remodeling process when constructs are submitted to 1 Hz cyclic mechanical

strains. Moreover, some studies of mechanical properties of static vs dynamic strain solicitation of constructs have shown no significant differences in elastic modulus [83, 145] and others have even shown lower elastic modulus for dynamic strain samples compared to static [111, 155]. Seliktar et al. [112] have demonstrated differences between rat aortic smooth muscle cells (RASMCs), human aortic smooth muscle cells (HASMCs) and human dermal fibroblast cells (HDFCs) embedded in collagen to static and 10 % dynamic strain at 1 Hz condition. RASMCs showed an increase in the modulus as well as HDFCs compared to static condition after 8 days, whereas HASMCs showed no significant differences, thus evidencing the differences in cells response to cyclic mechanical conditioning. It is also interesting to notice that even though remodeling processes have taken place in dynamic conditioning, it cannot necessarily be correlated with higher mechanical properties [112].

The present research suggests that these published results are related to a desensitisation phenomenon of human vascular smooth muscle cells to cyclic mechanical stimuli. However, a gradual increase of stimuli allows the cells to remain responsive leading to a more adequate remodeling process that in turn allows a mechanical behavior closest to the saphenous vein behavior. It also densifies the collagen structure and allows ECM proteins and MMP-2 expression, suggesting a remodeling process that is beneficial both biologically and mechanically.

## 4.7 Conclusion

In this study, we have demonstrated that an incremental cyclic frequency have a positive effect on the remodeling process of vascular constructs. Even though no significant differences were seen in collagen, elastin and MMP-2 expression, a clear lower expression is seen in 1 Hz samples, whereas gradual increase of frequency have produced expression similar to static control. The application of increasing frequency brought similar time constants to saphenous vein and elastic equilibrium modulus similar to static. Together, these results show a less detrimental effect of increasing cyclic frequency on vascular cells within a collagen scaffold. Therefore, further studies gradually varying the strain and frequency would be needed to fully assess the influence of each on HUASMCs embedded in a collagen scaffold. Incremental strain

could be compared to incremental frequency to understand which imposes a more complete remodeling process as well as ECM synthesis leading to better mechanical properties, thus closer to the media artery behavior and histology.

## 4.8 Acknowledgments

This work was partially supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), CIHR-Canada, Canada Foundation for Innovation (CFI), Fond de Recherche Nature et Technologie Quebec (FRQNT), Quebec University Hospital Research (CHU), Center, Centre d'Etudes et de Recherche sur les Matériaux Avancés (CERMA-ULaval), and MRI-Quebec. The authors would like to express their gratitude to Stéphane Turgeon for his collaboration and guidance.

## 5. Chapitre 5 : Discussion générale

Ce travail s'est articulé autour de l'évaluation des paramètres de stimulation mécanique requis afin d'obtenir le remodelage adéquat pour une régénération tissulaire artérielle appropriée. Ce chapitre présente une discussion générale sur le travail effectué et sur les résultats obtenus tout au long de ce projet. Les méthodologies, techniques et défis rencontrés seront traitées, et les perspectives et travaux futurs seront énoncés.

### 5.1 Conception de la plateforme de stimulation

Afin d'imposer une déformation mécanique aux constructions de collagène avec SMC, une plateforme fut conçue. Cette plateforme s'incorpore sous une plaque de six puits comportant une membrane de silicone déformable (Tissue Train-Amino Culture Plate, Flexcell International Corporation, Hillsborough, NC, USA). Cette membrane flexible est par la suite déformée grâce à un vide imposé via la plateforme et contrôlé par un programme labview sur ordinateur (voir figure 29).

La plateforme a été développée afin d'obtenir une déformation uniaxiale des constructions de collagène. Les dimensions de la plaque de 6 puits furent prises et ont été la base pour la dimension des plateformes. Quatre plateformes furent usinées selon les plans ci-bas (figures 23 et 24). Le téflon a été déterminé comme matériel de choix pour le montage, dû à son faible coefficient de friction. Ainsi, la plateforme possède six protubérances qui s'insèrent au centre de chacun des six puits de la plaque. Les bouts arrondis des protubérances correspondent à la circonférence des puits (voir figure 23). Les arrêtes correspondent, quant à elles, à un vide sous la membrane de silicone de la plaque de six puits. Une fois machinée, les arrêtes de la plateforme furent arrondies quelque peu afin de diminuer la friction et les points de pression à ces endroits. La plateforme fut ensuite munie d'un raccord amovible relié aux tubes de polyuréthane, à une valve proportionnelle, contrôlée par ordinateur, afin d'imposer un vide dynamique sous la membrane de silicone de six puits de la plaque de culture et d'y imposer une déformation (voir figure 29).

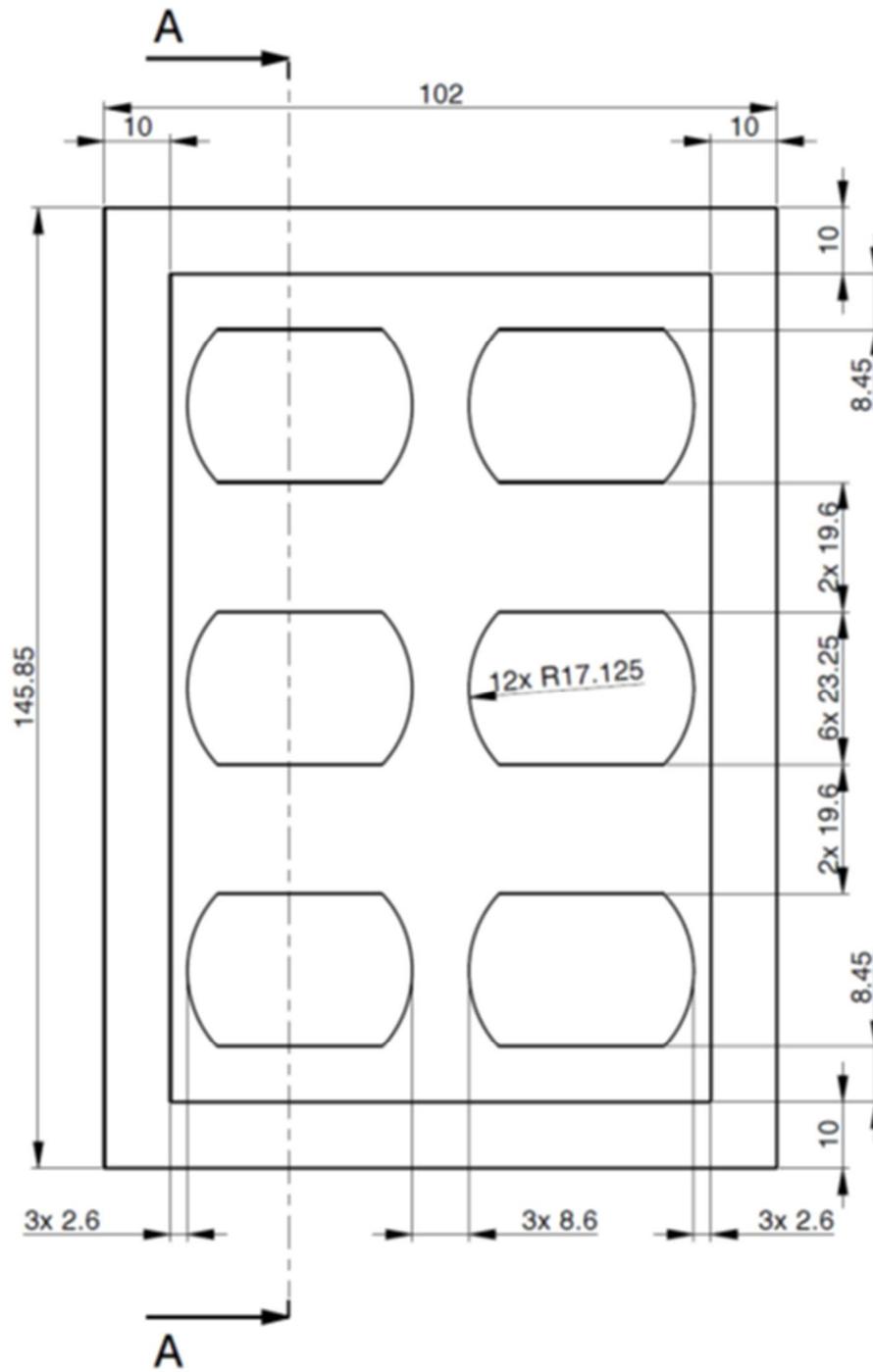


Figure 23: Vue du dessus des dimensions en mm de la plateforme

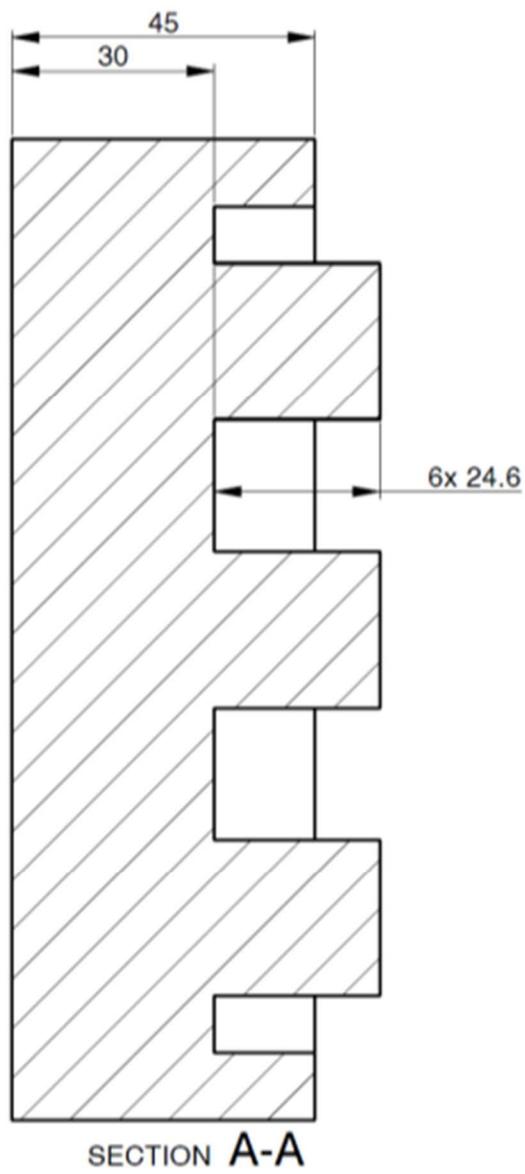


Figure 24: Vue latérale des dimensions en mm de la plateforme

## 5.2 Modification de la plaque de six puits

Lors des expériences du présenté au chapitre 3, il est devenu évident que les attaches natives incorporées aux membranes des plaques de six puits ne permettaient pas de retenir les constructions de gel de collagène avec SMC plus de 4 jours dû à la compaction exercée par les cellules (voir figure 25). La déformation dynamique imposée à la membrane de silicone de la plaque de six puits est transmise aux constructions lorsque celles-ci restent ancrées aux attaches. Une modification devait être apportée afin de permettre une culture en dynamique sur 7 jours.



*Figure 25: Macrophotographie de la compaction des gels de collagène avec des PSMC après 4 jours de stimulation mécanique dynamique (indiquée par la flèche). Chacun des puits ont un diamètre de 35 mm.*

La première modification apportée a été de coller des gazes stériles tout le long de la membrane où l'ancrage natif intégré à la membrane se retrouve (voir figure 26). Cependant, plusieurs gels de collagène avec cellules finissaient toujours par se déchirer avant d'atteindre les 7 jours de stimulation dynamique recherchés. En effet, une concentration de contraintes semble se créer

à la jonction du gel et de la gaze stérile, plus régulièrement aux coins de ceux-ci, entraînant une rupture des gels (voir figure 26).



*Figure 26: Macrophotographie de gels de collagène avec PSMCs ancrés par une gaze stérile collée à la membrane et la concentration de contrainte que la compaction cellulaire exerce (indiqué par la flèche). Chacun des puits possède un diamètre de 35 mm.*

Une deuxième modification a donc été effectuée, mais cette fois-ci en ajoutant une barrière de colle de silicone déformable (voir figure 27) permettant d'obtenir des gels de forme rectangulaire, de diminuer ainsi les concentrations de contrainte et donc les ruptures des gels.



*Figure 27: Macrophotographie d'un puit d'une plaque de six puits de gel de collagène avec HUAMSCs lié à la membrane par des gazes stériles et délimité par une colle de silicone de grade médical. Le puit possède un diamètre de 35 mm.*

### 5.2.1 Calibration de la plaque de six puits suite aux modifications

Une calibration du système de stimulation a été effectuée lors des premières expérimentations pour le premier article et est présentée au chapitre 3 (voir figure 14). Suite aux modifications effectuées, une deuxième calibration a dû être faite. Des lignes de références ont été apposées aux membranes de silicone afin de suivre les déformations imposées. Ensuite, des déformations à différentes amplitudes des membranes modifiées ont été effectuées et des images de ces déformations ont été prises. Les images ont ensuite été analysées par le programme imageJ. Les résultats de l'application d'un vide sous les membranes de silicone des plaques «Tissue Train» sont présentés à la figure 28.

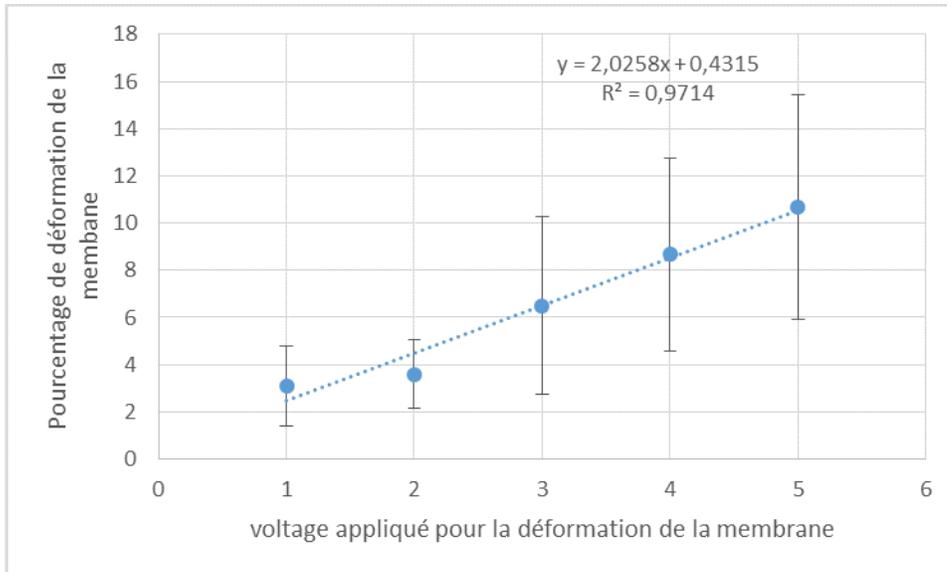


Figure 28: Pourcentage de déformation des membranes de silicone des plaques «Tissue Train-Amino» à différentes amplitudes de vide

### 5.2.2 Choix de la colle

Comme mentionné précédemment, des gazes stériles ont été apposées sur les ancrages déjà présents de la membrane de silicone déformable qui se retrouve à gauche et à droite des puits. L'adhérence des gazes stériles aux membranes de silicone a été faite par l'utilisation de colle. Deux choix de colle ont été retenus : une colle chirurgicale vétérinaire nommé 3M vetbond et une colle de grade médicale nommée silastic medical adhesive, type A.

La colle 3M vetbond est une colle liquide à la consistance de l'eau et qui polymérise en quelques secondes au contact de tissu animal. Cependant, elle peut provoquer une réaction exothermique lorsqu'en contact avec du coton, du savon ou autres substance de base de nettoyage et des applicateurs de mousse de polyuréthane. Plusieurs essais furent effectués avec la colle afin de déterminer la toxicité et la réactivité du produit lorsqu'en contact avec la gaze stérile et la membrane de silicone sur les cellules. Les essais ont démontré une toxicité des produits de la colle sur les SMC. En effet, malgré la stérilisation des plaques et de la colle à l'éthanol 70% et trois rinçages au «phosphate-buffered saline» (PBS), un produit relargué dans le milieu de culture suite à l'ajout de la construction de collagène et de milieu de culture fut remarqué. Ce

relargage entraîna une toxicité cellulaire à l'intérieur des constructions. Cette colle a donc été écartée des choix.

La colle silastic medical adhesive, type A est à base de silicone translucide sans solvant qui polymérise à température ambiante avec 50 à 60 % d'humidité. La résistance à la traction de cette colle est de 3,3 MPa et son élongation est de 450 %. Cependant, la polymérisation de cette colle prend 72 heures. Suite à des essais, la colle silastic medical adhesive, type A ne démontra pas de toxicité cellulaire. Elle fut également utilisée afin de former les barrières dans les puits pour obtenir des constructions rectangulaires. Grâce à son élongation de 450 %, la colle de silastic permet tout de même une déformation de la membrane des plaques de six puits «Tissue Train-Amino Culture».

## 5.3 Caractérisation des constructions de gel de collagène cellularisées et non cellularisées

### 5.3.1 Microscopie électronique à balayage

Le chapitre 3 présente l'effet de l'application d'un stimulus mécanique supérieur à celui imposé par la pression sanguine sur les SMC après 48 heures d'application. Afin d'analyser l'alignement des fibrilles de collagène par les SMC la SEM fut utilisée. Cependant, les constructions de collagène tridimensionnelles (3D) et le séchage à l'air suite à la déshydratation de ces types d'échantillons peuvent entraîner des déformations sévères et/ou l'affaissement de la structure. Ainsi, les techniques habituelles de fixation et de déshydratation des matériaux avec cellules ne peuvent être utilisées. Le point critique est un appareil permettant de conserver la structure intacte et de diminuer les effets de tension de surface de la construction. Après un passage dans des bains successifs d'éthanol afin de débiter la déshydratation, les échantillons continuent leurs déshydratations dans l'appareil de point critique. Cet appareil permet d'utiliser le dioxyde de carbone liquéfié qui a une surface de tension plus basse que l'éthanol utilisé dans la première partie du processus de déshydratation afin de remplacer le liquide se trouvant dans les échantillons. La température et la pression du compartiment accueillant les échantillons en

présence de dioxyde de carbone liquéfié sont ensuite augmentées graduellement jusqu'à l'atteinte du point critique qui se situe à 31,1°C et 1072 PSI. Ce qui permet d'atteindre la phase gazeuse du dioxyde de carbone et d'assécher les échantillons. La température et la pression sont par la suite graduellement diminuées afin d'atteindre la température et pression ambiantes ce qui permet de récupérer des échantillons avec des structures intactes, non affaissés qui peuvent ensuite être observés au SEM.

Une analyse par transformation de Fourier rapide bidimensionnelle (2D-FFT) a été effectuée sur les images SEM obtenues au chapitre 3. Cependant, ce type d'analyse nécessite des images où il y a absence d'entrecroisement des fibrilles de collagène, absence également d'inoccupation (par exemple vide créé par les entrecroisements des fibrilles de collagène et donc des pores), ainsi qu'un alignement uniforme des fibrilles de collagène, sans quoi un échec à la détermination de l'orientation des fibrilles de collagène s'ensuit [157]. Malheureusement, les images SEM de collagène et cellules ne répondaient pas aux critères susmentionnés, et la quantification de l'alignement des fibrilles n'a pu être effectuée. Seule une analyse qualitative s'en est suivie.

### 5.3.2 Production de protéines de la matrice extracellulaire et de la MMP-2

Lors des expérimentations, la production de collagène et d'élastine par les HUASMCs, ainsi que celle de la MMP-2 a été caractérisée par les techniques de Western Blot et de qRT-PCR. Les résultats de qRT-PCR ont été présentés au chapitre 4. Cependant, les résultats de Western Blot ont représenté des défis dus à la matrice de collagène. Puisque la production de collagène par les SMC devait être analysée et qu'une matrice de collagène de rat était déjà présente, des anticorps n'ayant pas de réaction croisée avec le collagène de rat ont été utilisés. Toutefois, cette matrice a causé un décalage des tailles de bandes de collagène, d'élastine et des protéines de phénotype des SMC. L'analyse par Western Blot devenait donc difficile à évaluer. De plus, la stimulation sur 7 jours ne permettait pas d'obtenir des quantités assez élevées d'élastine et des protéines de phénotypes pour être détectés par la technique de Western Blot. La technique de qPCR a donc remplacé celle de Western Blot puisqu'elle permettait d'observer les gènes

exprimés par les SMC. L'ARN des cellules est extrait par la lyse des cellules, puis des lavages appropriés par colonne sont effectués. L'ARN est ensuite transformé en ADN complémentaire puis analysé par qRT-PCR. Ceci permet de s'assurer que ce qui était observé provenait réellement des SMC.

### 5.3.3 Microscopie confocale

Afin d'observer les SMC et les fibrilles de collagène, les constructions de collagène furent visualisées par microscopie confocale comme présenté au chapitre 3. Lors du marquage, les anticorps primaires sont incubés avec les constructions de collagène et SMC suivi d'une deuxième incubation avec des anticorps secondaires. Chacune des étapes du marquage est suivie de trois rinçages de PBS avec 0,05% de tween (solution détergente utilisé comme un agent de blocage des sites) qui permet de retirer le surplus de solution d'anticorps afin de diminuer les bruits de fond lors de la visualisation au microscope confocale. Cependant, lors du marquage des fibrilles de collagène, le gel de collagène absorbe une grande quantité des solutions de marquage utilisées et dès lors les images prises étaient floues et ne permettait donc pas de voir la construction dans son intégralité. Un ajustement du protocole de rinçage par la suite été effectué afin d'améliorer les images prises par microscopie confocale. Le rinçage des constructions suite aux marquages est effectué comme suit :

- les constructions de collagène et SMC sont rincés trois fois au PBS avec 0,05 % de tween
- les constructions de collagène et SMC sont ensuite déposées dans un bac de 14 L remplis de PBS avec une solution de tween à 0,05 % afin d'optimiser le rinçage,
- Le temps de rinçage dans le bac de 14 L est d'une nuit.

Cette modification a permis d'obtenir des images mieux définies des fibrilles de collagène dans les constructions n'ayant pas de cellules. Cependant, celles ayant des cellules sont apparues encore un peu flou. Ceci est expliqué par l'épaisseur du gel de collagène qui est d'environ 1 mm, et est aussi dû à la compaction exercée par les cellules qui engendre une densité du gel plus importante. Cette épaisseur et compaction du gel avec le marquage crée alors un « bruit

de fond » sur les images prises par microscopie confocale. L'approche pour la visualisation des constructions suite aux marquages a donc été adaptée en conséquence. Ainsi, la stratégie retenue a été de ne pas marquer les fibrilles de collagène dans les constructions de collagène, avec ou sans SMC, et aussi en augmentant le nombre de rinçage au PBS contenant du tween à 0,05 %, de 3 à 5 lavages. Ces modifications ont permis de visualiser clairement les SMC se retrouvant à l'intérieur des constructions et d'établir également leurs orientations.

### 5.3.4 Caractérisation mécanique

L'un des défis de l'utilisation de collagène en génie tissulaire est lié à ses faibles propriétés mécaniques. En effet, lors de l'extraction et la solubilisation du collagène, ce dernier perd sa réticulation naturelle et par le fait même également ces propriétés mécaniques si importantes pour son rôle de soutien dans le corps humain. L'introduction de SMC dans le collagène permet d'augmenter les propriétés mécaniques par mécanotransduction. Comme mentionné au chapitre 4, les SMC exercent un remodelage de la matrice de collagène qui entraîne une densification du réseau de collagène et donc des propriétés mécaniques modifiées. Ainsi, une caractérisation mécanique des constructions de collagène et SMC est de mise. Cependant, malgré la densification du réseau de collagène, les constructions de collagène et SMC restent difficilement manipulables et délicates. Les essais de traction s'avèrent difficile à effectuer avec ce type d'échantillon rectangulaire 3D. Premièrement, les pinces afin d'agripper les constructions ne sont pas assez délicates et déchirent le gel. De plus, afin que les tests en tension soient fiables, les constructions doivent se déchirer vers le centre de l'échantillon, ce qui n'était pas le cas des constructions de collagène avec SMC. Celles-ci se déchiraient à la jonction des pinces et du gel. L'approche a donc été d'effectuer des tests de relaxation de contraintes qui permettent d'obtenir des informations sur les propriétés viscoélastiques des matériaux, qui sont importantes dans le cas des artères. En effet, ce sont ces propriétés viscoélastiques de l'artère qui permettent à celle-ci d'ajuster l'épaisseur de la paroi et de maintenir la pression de perfusion [158]. Ainsi, des tests de relaxation de contrainte par compression non confinée a permis d'obtenir des informations importantes sur le comportement mécanique des constructions de collagène.

## 5.4 Limites et perspectives

### 5.4.1 Limites du système de stimulation

Lors des expériences, la déformation induite par vide sur la membrane de silicone est transmise aux constructions de collagène. Les stimuli appliqués sont ensuite ressentis par les HUASMCs qui effectueront un remodelage de la matrice de collagène. Un remodelage est également effectué par les cellules sous condition statique. Ce remodelage entraîne une densification du réseau de collagène par compaction par les HUASMCs et donc une diminution du volume de la construction. Puisque les gels sont adhérents à la surface de la membrane, au fur et à mesure que les HUASMCs contractent le gel, une tension à l'intérieur de la construction se crée. De plus, environ 57 % [159] de la compaction de la construction se fait à l'intérieur de 24 heures. Le protocole utilisé au chapitre 3 a laissé 24 heures en condition statique tous les échantillons, avant l'application d'une condition soit de stimuli mécaniques cycliques soit statiques. Cependant, la compaction se poursuit et peut atteindre jusqu'à 86 % à l'intérieur de 7 jours [159]. Ainsi, la contrainte cyclique ressentie par la construction cellularisée peut être augmentée de jour en jour par la tension à l'intérieur du gel. Il serait donc intéressant de mesurer la déformation mécanique appliquée au gel à tous les jours permettant ainsi d'ajuster la contrainte cyclique et de s'assurer de maintenir une contrainte constante tout au long de la stimulation. Par le fait même, il serait également intéressant d'analyser la tension exercée par les cellules sur le gel en condition statique tout au long de l'expérience.

Finalement, ce système permet d'obtenir des constructions rectangulaires en trois dimensions; cependant celles-ci ne sont pas représentatives de la réalité dimensionnelle des artères. Un système permettant de stimuler mécaniquement des gels de collagène cylindrique serait plus approprié sachant que les cellules n'ont pas le même comportement selon l'environnement dans lequel elles se trouvent.

### 5.4.2 Limites des essais mécaniques

Lors de la caractérisation des constructions de collagène, des tests de relaxation de contrainte ont été effectués. Ces tests ont permis d'évaluer le comportement viscoélastique des gels qui est une fonction essentielle au maintien de la pression adéquate dans les artères. Cependant, une autre information essentielle sur le remodelage de constructions est la pression à la rupture. Cette information permet de déterminer si la construction serait capable de résister à la pression artérielle et donc d'identifier si un remodelage adéquat a été effectué par les cellules suite à des stimuli mécaniques cycliques. Ainsi, comme mentionné précédemment, des gels de dimension cylindrique seraient également plus appropriés afin d'obtenir la pression à la rupture.

### 5.4.3 Perspectives du projet de recherche

Ce projet de recherche a permis de comprendre les effets des stimuli mécaniques cycliques sur les HUASMC et également sur d'autres cellules lorsqu'en environnement 3D. Comme démontré dans le chapitre 4, les HUASMC indiquent une diminution de la mécanosensibilité; il serait donc intéressant d'étudier le temps que cela prend aux HUASMC pour se désensibiliser. Ainsi, une étude pendant 7 jours où des échantillons seraient récoltés à tous les jours serait de mise. Ceci permettrait d'établir le remodelage et l'expression des gènes par les cellules et indiquerait le moment de désensibilisation. Conséquemment, il serait possible de savoir quand effectuer un changement des paramètres de fréquence afin d'optimiser le contrôle des fonctions cellulaires, et donc de la maturation du tissu régénéré.

Lors des prochaines expérimentations, l'analyse du phénotype cellulaire par des marqueurs d'expression génique du phénotype contractile, comme la SM-MHC et la «smoothelin» et du phénotype synthétique comme la SMemb/non-muscle MHC, permettrait d'indiquer si les cellules possèdent le phénotype adéquat (celui retrouvé dans les vaisseaux sanguins). De plus, des informations supplémentaires sur le remodelage pourraient être obtenues en effectuant un Western Blot ainsi qu'une analyse qRT-PCR de la MMP-2 et de son inhibiteur. L'accumulation

de la MMP-2 et de son inhibiteur dans la construction se ferait par Western Blot, tandis que la qRT-PCR indiquerait l'expression des gènes au moment même.

Finalement, comme mentionné précédemment, la translation du modèle rectangulaire vers un modèle cylindrique est une priorité. Une structure pour les cellules qui se rapproche de la réalité permettra d'établir de façon plus efficace les contrôles optimaux pour la maturation de tissu vasculaire régénéré.

## 6. Conclusion

Ce travail de recherche a permis de mettre en avant l'effet des stimuli mécaniques cycliques sur les SMC cultivées à l'intérieur d'une matrice de collagène. Pour ce faire, un bioréacteur à stimulation mécanique 2D fut développé. Grâce à une plateforme et une plaque de culture de six puits, une déformation mécanique cyclique a été appliquée aux gels de collagène avec et sans cellules. La première étude consistait à démontrer l'influence de la déformation sur la microstructure des constructions cellulaires à base de collagène. Les constructions avec et sans cellules ont été mis sous condition statique et dynamique. Les déformations étaient de 25 % et se produisaient à une fréquence de 1 Hz. Il a été démontré qu'en seulement deux jours une réorganisation de l'échafaudage de collagène est effectuée. En effet, les SMC ont adhéré aux fibrilles de collagène permettant un alignement de ceux-ci parallèle aux cellules. Le remodelage étant beaucoup plus marqué lorsque la stimulation dynamique était présente. La dernière partie de ce travail démontre l'influence de la fréquence sur les HUASMC à l'intérieur de constructions de collagène. Cette étude démontre la désensibilisation des cellules aux stimuli mécaniques sur 7 jours. L'augmentation graduelle de la fréquence (0,3 Hz à tous les deux jours) jusqu'à l'obtention d'une fréquence de 1Hz a, quant à elle, permis aux cellules de demeurer mécanosensibles.

En conclusion, cette recherche a permis de répondre à certaines questions quant aux effets des stimuli mécaniques sur les cellules en environnement 3D. Une connaissance approfondie de ces effets sur les cellules en environnement 3D permettrait d'établir des paramètres optimaux pour les bioréacteurs qui seront utilisés pour la maturation de tissu régénéré.

## 7. Bibliographie

1. Santé, O.m.d.l. *Maladies cardiovasculaires*. 2016 [cited 2016 2016-01-07]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/>.
2. l'AVC, F.d.m.d.c.e.d. *Les faits des maladies du coeur et de l'AVC*. 2016 [cited 2016 2016-01-07]; Available from: [http://www.fmcoeur.qc.ca/site/c.kplQKVOxFoG/b.3669825/k.A67F/Qui\\_sommesnous.htm](http://www.fmcoeur.qc.ca/site/c.kplQKVOxFoG/b.3669825/k.A67F/Qui_sommesnous.htm).
3. Holzapfel, G.A., G. Sommer, and P. Regitnig, *Anisotropic Mechanical Properties of Tissue Components in Human Atherosclerotic Plaques*. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2004. **126**(5): p. 657-665.
4. Cunnane, E.M., J.J.E. Mulvihill, H.E. Barrett, D.A. Healy, E.G. Kavanagh, S.R. Walsh, and M.T. Walsh, *Mechanical, biological and structural characterization of human atherosclerotic femoral plaque tissue*. *Acta Biomaterialia*, 2015. **11**: p. 295-303.
5. Dodson, R.B., P.J. Rozance, B.S. Fleenor, C.C. Petrash, L.G. Shoemaker, K.S. Hunter, and V.L. Ferguson, *Increased arterial stiffness and extracellular matrix reorganization in intrauterine growth-restricted fetal sheep*. *Pediatr Res*, 2013. **73**(2): p. 147-154.
6. Tara, S., K.A. Rocco, N. Hibino, T. Sugiura, H. Kurobe, C.K. Breuer, and T. Shinoka, *Vessel Bioengineering - Development of Small-Diameter Arterial Grafts -*. *Circulation Journal*, 2014. **78**(1): p. 12-19.
7. Greenwald, S. and C. Berry, *Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties*. *The Journal of Pathology*, 2000. **190**(3): p. 292-299.
8. Huang, A. and L. Niklason, *Engineering of arteries in vitro*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014. **71**(11): p. 2103-2118.
9. Heyligers, J.M.M., C.H.P. Arts, H.J.M. Verhagen, P.G. de Groot, and F.L. Moll, *Improving Small-Diameter Vascular Grafts: From the Application of an Endothelial Cell Lining to the Construction of a Tissue-Engineered Blood Vessel*. *Annals of Vascular Surgery*, 2005. **19**(3): p. 448-456.
10. Kakisis, J.D., C.D. Liapis, C. Breuer, and B.E. Sumpio, *Artificial blood vessel: The Holy Grail of peripheral vascular surgery*. *Journal of Vascular Surgery*, 2005. **41**(2): p. 349-354.
11. Li, S., D. Sengupta, and S. Chien, *Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2014. **6**(1): p. 61-76.
12. Ratcliffe, A., *Tissue engineering of vascular grafts*. *Matrix biology*, 2000. **19**(4): p. 353-357.
13. Nerem, R.M. and D. Seliktar, *Vascular Tissue Engineering*. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2001. **3**(1): p. 225-243.
14. Stegemann, J.P., S.N. Kaszuba, and S.L. Rowe, *Review: Advances in Vascular Tissue Engineering Using Protein-Based Biomaterials*. *Tissue engineering*, 2007. **13**(11): p. 2601-2613.
15. Vara, D.S., H.J. Salacinski, R.Y. Kannan, L. Bordenave, G. Hamilton, and A.M. Seifalian, *Cardiovascular tissue engineering: state of the art*. *Pathologie Biologie*, 2005. **53**(10): p. 599-612.
16. Catto, V., Far, S., G. Freddi, and M.C. Tanzi, *Vascular Tissue Engineering: Recent Advances in Small Diameter Blood Vessel Regeneration*. *ISRN Vascular Medicine*, 2014. **2014**: p. 27.
17. Kannan, R.Y., H.J. Salacinski, P.E. Butler, G. Hamilton, and A.M. Seifalian, *Current status of prosthetic bypass grafts: a review*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2005. **74**(1): p. 570-581.
18. d'Ottawa, l.d.c.d.l.u. *Éducation en santé cardiaque*. [cited 2015 2015-04-07]; Available from: <http://pwc.ottawaheart.ca/fr/sensibilisation/education-en-sante-cardiaque/reenseignements-generaux>.

19. Berke, A.D. *Cardiology procedures*. [cited 2015 2015-04-07]; Available from: <http://www.cardiology.md/procedures.htm>.
20. Surgery, P.C. *Vein and artery harvesting sites*. [cited 2015 2015-04-07]; Available from: [http://www.phoenixcardiacsurgery.com/vessel\\_harvesting.htm](http://www.phoenixcardiacsurgery.com/vessel_harvesting.htm).
21. excellence, A. *Arterial and venous system*. [cited 2015 2015-04-07]; Available from: [http://www.accessexcellence.org/AE/AEC/CC/images/art\\_vein.gif](http://www.accessexcellence.org/AE/AEC/CC/images/art_vein.gif).
22. TERUMO. *Vascutek® Taperflo™ Grafts*. [cited 2015 2015-04-07]; Available from: <http://www.terumo-cvs.com/products/ProductDetail.aspx?groupId=68&familyID=524&country=1>.
23. Moore, K.L. and A.F. Dalley, *Anatomie médicale: aspects fondamentaux et applications cliniques*. 2001: De Boeck Supérieur. p. 32-36, 120-163.
24. Marieb, E.N. and K. Hoehn, *Anatomie et physiologie humaines*. 4e éd ed. 2010, Saint-Laurent, Québec: Éditions du Renouveau pédagogique. xxvii, 1293, [118] p. 766-778, 801-811.
25. CHUV. *Le coeur et sa circulation sanguine*. [cited 2014 13/11/2014]; Available from: <http://www.chuv.ch/transplantation/cto-patients-familles-coeur-anatomie-et-physiologie.htm>.
26. Wagenseil, J.E. and R.P. Mecham, *Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics*. *Physiological reviews*, 2009. **89**(3): p. 957-989.
27. Ratner, B.D., *Biomaterials science an introduction to materials in medicine*. 2013, Academic Press: [S.I.]. p. p. 452-487, 758-784, 1488-1509.
28. Lavender, M.D., Z. Pang, C.S. Wallace, L.E. Niklason, and G.A. Truskey, *A system for the direct co-culture of endothelium on smooth muscle cells*. *Biomaterials*, 2005. **26**(22): p. 4642-4653.
29. Ziegler, T., R.W. Alexander, and R.M. Nerem, *An endothelial cell-smooth muscle cell co-culture model for use in the investigation of flow effects on vascular biology*. *Annals of Biomedical Engineering*, 1995. **23**(3): p. 216-225.
30. Sakamoto, N., T. Kiuchi, and M. Sato, *Development of an Endothelial-Smooth Muscle Cell Coculture Model Using Phenotype-Controlled Smooth Muscle Cells*. *Annals of Biomedical Engineering*, 2011. **39**(11): p. 2750-2758.
31. Williams, C. and T. Wick, *Endothelial Cell-Smooth Muscle Cell Co-Culture in a Perfusion Bioreactor System*. *Annals of Biomedical Engineering*, 2005. **33**(7): p. 920-928.
32. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, and e. al., *Blood Vessels and Endothelial Cells*, in *Molecular Biology of the Cell*, N.Y.G. Science, Editor. 2002.
33. Cines, D.B., E.S. Pollak, C.A. Buck, J. Loscalzo, G.A. Zimmerman, R.P. McEver, J.S. Pober, T.M. Wick, B.A. Konkle, B.S. Schwartz, E.S. Barnathan, K.R. McCrae, B.A. Hug, A.-M. Schmidt, and D.M. Stern, *Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders*. *Blood*, 1998. **91**(10): p. 3527-3561.
34. Rensen, S., P. Doevendans, and G. van Eys, *Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity*. *Netherlands Heart Journal*, 2007. **15**(3): p. 100-108.
35. Stegemann, J.P., H. Hong, and R.M. Nerem, *Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype*. *Journal of Applied Physiology*, 2005. **98**(6): p. 2321-2327.
36. Beamish, J.A., P. He, K. Kottke-Marchant, and R.E. Marchant, *Molecular Regulation of Contractile Smooth Muscle Cell Phenotype: Implications for Vascular Tissue Engineering*. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2010. **16**(5): p. 467-491.
37. Chiquet, M., L. Gelman, R. Lutz, and S. Maier, *From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2009. **1793**(5): p. 911-920.
38. Miller, F.J., *Adventitial Fibroblasts: Backstage Journeymen*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2001. **21**(5): p. 722-723.
39. Hui Di, W., M.T. Rätsep, A. Chapman, and R. Boyd, *Adventitial fibroblasts in vascular structure and function: the role of oxidative stress and beyond*. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology*, 2010. **88**(3): p. 177-186.

40. An, S.J., P. Liu, T.M. Shao, Z.J. Wang, H.G. Lu, Z. Jiao, X. Li, and J.Q. Fu, *Characterization and Functions of Vascular Adventitial Fibroblast Subpopulations*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2015. **35**(3): p. 1137-1150.
41. Davidson, J., P. LuValle, O. Zoia, D. Quaglino, and M. Giro, *Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(1): p. 345.
42. Jaalouk, D. and J. Lammerding, *Mechanotransduction gone awry*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009. **10**(1): p. 63-73.
43. Davis, C.A., S. Zambrano, P. Anumolu, A.C.B. Allen, L. Sonoqui, and M.R. Moreno, *Device-Based In Vitro Techniques for Mechanical Stimulation of Vascular Cells: A Review*. Journal of Biomechanical Engineering, 2015. **137**(4): p. 040801-040801.
44. Williams, B., *Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function*. Journal of hypertension, 1998. **16**(12): p. 1921-1929.
45. Riehl, B.D., J.-H. Park, I.K. Kwon, and J.Y. Lim, *Mechanical Stretching for Tissue Engineering: Two-Dimensional and Three-Dimensional Constructs*. Tissue Engineering. Part B, Reviews, 2012. **18**(4): p. 288-300.
46. Stegemann, J.P. and R.M. Nerem, *Altered response of vascular smooth muscle cells to exogenous biochemical stimulation in two- and three-dimensional culture*. Experimental Cell Research, 2003. **283**(2): p. 146-155.
47. Ricard-Blum, S., *The Collagen Family*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011. **3**(1): p. a004978.
48. Shoulders, M.D. and R.T. Raines, *Collagen Structure and Stability*. Annual review of biochemistry, 2009. **78**: p. 929-958.
49. Kühn, K., *Structure and biochemistry of collagen*. Aesthetic Plastic Surgery, 1985. **9**(2): p. 141-144.
50. Brodsky, B. and J.A.M. Ramshaw, *The collagen triple-helix structure*. Matrix Biology, 1997. **15**(8-9): p. 545-554.
51. Engel, J. and H. Bächinger, *Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix*, in *Collagen*, J. Brinckmann, H. Notbohm, and P.K. Müller, Editors. 2005, Springer Berlin Heidelberg. p. 7-33.
52. Ottani, V., M. Raspanti, and A. Ruggeri, *Collagen structure and functional implications*. Micron, 2001. **32**(3): p. 251-260.
53. Mienaltowski, M.J. and D.E. Birk, *Structure, Physiology, and Biochemistry of Collagens*, in *Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases*, J. Halper, Editor. 2014. p. 5-29.
54. Cameron, G., I. Alberts, J. Laing, and T. Wess, *Structure of type I and type III heterotypic collagen fibrils: an X-ray diffraction study*. Journal of structural biology, 2002. **137**(1-2): p. 15-22.
55. Chow, M.-J., R. Turcotte, Charles P. Lin, and Y. Zhang, *Arterial Extracellular Matrix: A Mechanobiological Study of the Contributions and Interactions of Elastin and Collagen*. Biophysical Journal, 2014. **106**(12): p. 2684-2692.
56. Akyildiz, A.C., L. Speelman, and F.J.H. Gijzen, *Mechanical properties of human atherosclerotic intima tissue*. Journal of Biomechanics, 2014. **47**(4): p. 773-783.
57. Chen, W., S. Oh, A.P. Ong, N. Oh, Y. Liu, H.S. Courtney, M. Appleford, and J.L. Ong, *Antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007. **82A**(4): p. 899-906.
58. Daamen, W.F., J.H. Veerkamp, J.C.M. van Hest, and T.H. van Kuppevelt, *Elastin as a biomaterial for tissue engineering*. Biomaterials, 2007. **28**(30): p. 4378-4398.
59. Debelle, L. and A.M. Tamburro, *Elastin: molecular description and function*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1999. **31**(2): p. 261-272.

60. Debelle, L. and A.J.P. Alix, *The structures of elastins and their function*. Biochimie, 1999. **81**(10): p. 981-994.
61. Patel, A., B. Fine, M. Sandig, and K. Mequanint, *Elastin biosynthesis: The missing link in tissue-engineered blood vessels*. Cardiovascular research, 2006. **71**(1): p. 40.
62. Zorlutuna, P., N. Hasirci, and V. Hasirci, *Nanopatterned collagen tubes for vascular tissue engineering*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2008. **2**(6): p. 373-377.
63. Kelleher, C.M., S.E. McLean, and R.P. Mecham, *Vascular Extracellular Matrix and Aortic Development*, in *Current Topics in Developmental Biology*, P.S. Gerald, Editor. 2004, Academic Press. p. 153-188.
64. Cecelja, M. and P. Chowienczyk, *Role of arterial stiffness in cardiovascular disease*. JRSM Cardiovascular Disease, 2012. **1**(4).
65. Chan-Park, M.B., J.Y. Shen, Y. Cao, Y. Xiong, Y. Liu, S. Rayatpisheh, G.C.-W. Kang, and H.P. Greisler, *Biomimetic control of vascular smooth muscle cell morphology and phenotype for functional tissue-engineered small-diameter blood vessels*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009. **88A**(4): p. 1104-1121.
66. Seifu, D.G., A. Purnama, K. Mequanint, and D. Mantovani, *Small-diameter vascular tissue engineering*. Nat Rev Cardiol, 2013. **10**(7): p. 410-421.
67. Gauvin, R., T. Ahsan, D. Larouche, P. Lévesque, J. Dubé, F.A. Auger, R.M. Nerem, and L. Germain, *A novel single-step self-assembly approach for the fabrication of tissue-engineered vascular constructs*. Tissue Engineering Part A, 2010. **16**(5): p. 1737-1747.
68. L'Heureux, N., N. Dusserre, G. Konig, B. Victor, P. Keire, T.N. Wight, N.A.F. Chronos, A.E. Kyles, C.R. Gregory, G. Hoyt, R.C. Robbins, and T.N. McAllister, *Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization*. Nat Med, 2006. **12**(3): p. 361-365.
69. L'Heureux, N., N. Dusserre, A. Marini, S. Garrido, L. de la Fuente, and T. McAllister, *Technology insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts—from research to clinical practice*. Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine, 2007. **4**(7): p. 389-395.
70. L'heureux, N., S. Pâquet, R. Labbé, L. Germain, and F.A. Auger, *A completely biological tissue-engineered human blood vessel*. The FASEB Journal, 1998. **12**(1): p. 47-56.
71. Gauvin, R., M. Guillemette, T. Galbraith, J.-M. Bourget, D. Larouche, H. Marcoux, D. Aubé, C. Hayward, F.A. Auger, and L. Germain, *Mechanical Properties of Tissue-Engineered Vascular Constructs Produced Using Arterial or Venous Cells*. Tissue Engineering Part A, 2011. **17**(15-16): p. 2049-2059.
72. Peck, M., D. Gebhart, N. Dusserre, T.N. McAllister, and N. L'Heureux, *The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art*. Cells Tissues Organs, 2011. **195**(1-2): p. 144-158.
73. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011. **32**(12): p. 3233-3243.
74. Song, J.J. and H.C. Ott, *Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds*. Trends in Molecular Medicine, 2011. **17**(8): p. 424-432.
75. Kasimir, M., E. Rieder, G. Seebacher, A. Nigisch, B. Dekan, E. Wolner, G. Weigel, and P. Simon, *Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves*. Journal of Heart Valve Disease, 2006. **15**(2): p. 278.
76. Gorbet, M.B. and M.V. Sefton, *Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes*. Biomaterials, 2004. **25**(26): p. 5681-5703.
77. Simon, P., M.T. Kasimir, G. Seebacher, G. Weigel, R. Ullrich, U. Salzer-Muhar, E. Rieder, and E. Wolner, *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT® in pediatric patients*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2003. **23**(6): p. 1002-1006.
78. Quint, C., Y. Kondo, R.J. Manson, J.H. Lawson, A. Dardik, and L.E. Niklason, *Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(22): p. 9214-9219.

79. Pellegata, A.F., M.A. Asnaghi, I. Stefani, A. Maestroni, S. Maestroni, T. Dominioni, S. Zonta, G. Zerbini, and S. Mantero, *Detergent-enzymatic decellularization of swine blood vessels: insight on mechanical properties for vascular tissue engineering*. Biomed Research International, 2013. **2013**: p. 918753-918753.
80. Williams, C., J. Liao, E.M. Joyce, B. Wang, J.B. Leach, M.S. Sacks, and J.Y. Wong, *Altered structural and mechanical properties in decellularized rabbit carotid arteries*. Acta Biomaterialia, 2009. **5**(4): p. 993-1005.
81. Macchiarini, P., P. Jungebluth, T. Go, M.A. Asnaghi, L.E. Rees, T.A. Cogan, A. Dodson, J. Martorell, S. Bellini, P.P. Parnigotto, S.C. Dickinson, A.P. Hollander, S. Mantero, M.T. Conconi, and M.A. Birchall, *Clinical transplantation of a tissue-engineered airway*. The Lancet, 2008. **372**(9655): p. 2023-2030.
82. Pullens, R., M. Stekelenburg, F. Baaijens, and M. Post, *The influence of endothelial cells on the ECM composition of 3D engineered cardiovascular constructs*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2009. **3**(1): p. 11-18.
83. Solan, A., S. Dahl, and L. Niklason, *Effects of Mechanical Stretch on Collagen and Cross-Linking in Engineered Blood Vessels*. Cell Transplantation, 2009. **18**(8): p. 915-921.
84. Solan, A., S. Mitchell, M. Moses, and L. Niklason, *Effect of pulse rate on collagen deposition in the tissue-engineered blood vessel*. Tissue engineering, 2003. **9**(4): p. 579-586.
85. Rubbens, M.P., A. Mol, M.H. van Marion, R. Hanemaaijer, R.A. Bank, F.P.T. Baaijens, and C.V.C. Bouten, *Straining Mode-Dependent Collagen Remodeling in Engineered Cardiovascular Tissue*. Tissue Engineering Part A, 2008. **15**(4): p. 841-849.
86. Jing, X., H.-Y. Mi, M.R. Salick, T.M. Cordie, X.-F. Peng, and L.-S. Turng, *Electrospinning thermoplastic polyurethane/graphene oxide scaffolds for small diameter vascular graft applications*. Materials Science and Engineering: C, 2015. **49**(0): p. 40-50.
87. Abruzzo, A., C. Fiorica, V.D. Palumbo, R. Altomare, G. Damiano, M.C. Gioviale, G. Tomasello, M. Licciardi, F.S. Palumbo, G. Giammona, and A.I. Lo Monte, *Using Polymeric Scaffolds for Vascular Tissue Engineering*. International Journal of Polymer Science, 2014. **2014**: p. 9.
88. Hibino, N., E. McGillicuddy, G. Matsumura, Y. Ichihara, Y. Naito, C. Breuer, and T. Shinoka, *Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2010. **139**(2): p. 431-436.e2.
89. Gui, L., M.J. Boyle, Y.M. Kamin, A.H. Huang, B.C. Starcher, C.A. Miller, M.J. Vishnevetsky, and L.E. Niklason, *Construction of Tissue-Engineered Small-Diameter Vascular Grafts in Fibrin Scaffolds in 30 Days*. Tissue Engineering Part A, 2013. **20**(9-10): p. 1499-1507.
90. Shaikh, F.M., A. Callanan, E.G. Kavanagh, P.E. Burke, P.A. Grace, and T.M. McGloughlin, *Fibrin: a natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering*. Cells, Tissues, Organs, 2008. **188**(4): p. 333-346.
91. Keeley, F.W., C.M. Bellingham, and K.A. Woodhouse, *Elastin as a self-organizing biomaterial: use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin*. Vol. 357. 2002. 185-189.
92. Buijtenhuijs, P., L. Buttafoco, A. Poot, W. Daamen, T. van Kuppevelt, P. Dijkstra, R. de Vos, L. Sterk, B. Geelkerken, and J. Feijen, *Tissue engineering of blood vessels: characterization of smooth-muscle cells for culturing on collagen-and-elastin-based scaffolds*. Biotechnology and applied biochemistry, 2004. **39**: p. 141-149.
93. Palumbo, V.D., A. Bruno, G. Tomasello, G. Damiano, and A.I. Lo Monte, *Bioengineered vascular scaffolds: the state of the art*. The International Journal Of Artificial Organs, 2014. **37**(7): p. 503-512.
94. Zhu, M., K. Wang, J. Mei, C. Li, J. Zhang, W. Zheng, D. An, N. Xiao, Q. Zhao, D. Kong, and L. Wang, *Fabrication of highly interconnected porous silk fibroin scaffolds for potential use as vascular grafts*. Acta Biomaterialia, 2014. **10**(5): p. 2014-2023.

95. Zhu, C., D. Fan, Z. Duan, W. Xue, L. Shang, F. Chen, and Y. Luo, *Initial investigation of novel human like collagen/chitosan scaffold for vascular tissue engineering*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009. **89**(3): p. 829-840.
96. Couet, F., N. Rajan, S. Vesentini, and D. Mantovani, *Design of a collagen/silk mechano-compatible composite scaffold for the vascular tissue engineering: focus on compliance*. Key Engineering Materials, 2007. **334**: p. 1169-1172.
97. Cummings, C.L., D. Gawlitta, R.M. Nerem, and J.P. Stegemann, *Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures*. Biomaterials, 2004. **25**(17): p. 3699-3706.
98. Boccafoschi, F., J. Habermehl, S. Vesentini, and D. Mantovani, *Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering*. Biomaterials, 2005. **26**(35): p. 7410-7417.
99. Boccafoschi, F., N. Rajan, J. Habermehl, and D. Mantovani, *Preparation and characterization of a scaffold for vascular tissue engineering by direct-assembling of collagen and cells in a cylindrical geometry*. Macromolecular bioscience, 2007. **7**(5): p. 719-726.
100. Paternotte, E., M. Agostini de Moraes, M.M. Beppu, and D. Mantovani. *Collagen-Silk Fibroin Fibers: A Promising Scaffold for Vascular Tissue Engineering*. in *Materials Science Forum*. 2012. Trans Tech Publ.
101. Weinberg, C. and E. Bell, *A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells*. Science, 1986. **231**(4736): p. 397.
102. Pang, Y., A. Ucuzian, A. Matsumura, E. Brey, A. Gassman, V. Husak, and H. Greisler, *The temporal and spatial dynamics of microscale collagen scaffold remodeling by smooth muscle cells*. Biomaterials, 2009. **30**(11): p. 2023-2031.
103. Berglund, J.D., M.M. Mohseni, R.M. Nerem, and A. Sambanis, *A biological hybrid model for collagen-based tissue engineered vascular constructs*. Biomaterials, 2003. **24**(7): p. 1241-1254.
104. Berglund, J., R. Nerem, and A. Sambanis, *Incorporation of intact elastin scaffolds in tissue-engineered collagen-based vascular grafts*. Tissue engineering, 2004. **10**(9-10): p. 1526-1535.
105. Syedain, Z.H., J.S. Weinberg, and R.T. Tranquillo, *Cyclic distension of fibrin-based tissue constructs: evidence of adaptation during growth of engineered connective tissue*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(18): p. 6537-6542.
106. Orban, J.M., L.B. Wilson, J.A. Kofroth, M.S. El-Kurdi, T.M. Maul, and D.A. Vorp, *Crosslinking of collagen gels by transglutaminase*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2004. **68A**(4): p. 756-762.
107. Girton, T.S., T.R. Oegema, and R.T. Tranquillo, *Exploiting glycation to stiffen and strengthen tissue equivalents for tissue engineering*. Journal of Biomedical Materials Research, 1999. **46**(1): p. 87-92.
108. Girton, T., T. Oegema, E. Grassl, B. Isenberg, and R. Tranquillo, *Mechanisms of stiffening and strengthening in media-equivalents fabricated using glycation*. Journal of biomechanical engineering, 2000. **122**(3): p. 216-223.
109. Seliktar, D., R. Black, R. Vito, and R. Nerem, *Dynamic Mechanical Conditioning of Collagen-Gel Blood Vessel Constructs Induces Remodeling In Vitro*. Annals of Biomedical Engineering, 2000. **28**(4): p. 351-362.
110. Berry, C.C., J.C. Shelton, D.L. Bader, and D.A. Lee, *Influence of external uniaxial cyclic strain on oriented fibroblast-seeded collagen gels*. Tissue engineering, 2003. **9**(4): p. 613-624.
111. Boerboom, R., M. Rubbens, N. Driessen, C. Bouten, and F. Baaijens, *Effect of strain magnitude on the tissue properties of engineered cardiovascular constructs*. Annals of Biomedical Engineering, 2008. **36**(2): p. 244-253.
112. Seliktar, D., R. Nerem, and Z. Galis, *Mechanical strain-stimulated remodeling of tissue-engineered blood vessel constructs*. Tissue engineering, 2003. **9**(4): p. 657-666.

113. von Offenberg Sweeney, N., P.M. Cummins, Y.A. Birney, J.P. Cullen, E.M. Redmond, and P.A. Cahill, *Cyclic strain-mediated regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 expression and activity*. Cardiovascular Research, 2004. **63**(4): p. 625-634.
114. Kim, B.-S. and D.J. Mooney, *Scaffolds for Engineering Smooth Muscle Under Cyclic Mechanical Strain Conditions*. Journal of biomechanical engineering, 2000. **122**(3): p. 210-215.
115. O'Callaghan, C. and B. Williams, *Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF- $\beta$  1*. Hypertension, 2000. **36**(3): p. 319.
116. Rajan, N., J. Habermehl, M.-F. Cote, C.J. Doillon, and D. Mantovani, *Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications*. Nat. Protocols, 2007. **1**(6): p. 2753-2758.
117. Habermehl, J., J. Skopinska, F. Boccafoschi, A. Sionkowska, H. Kaczmarek, G. Laroche, and D. Mantovani, *Preparation of ready-to-use, stockable and reconstituted collagen*. Macromolecular bioscience, 2005. **5**(9): p. 821-828.
118. Rajan, N., J. Lagueux, F. Couet, W. Pennock, D. Mantovani, and A. Sionkowska, *Low doses of ultraviolet radiation stimulate cell activity in collagen-based scaffolds*. Biotechnology progress, 2008. **24**(4): p. 884-889.
119. Achilli, M., S. Meghezi, J. Lagueux, and D. Mantovani. *Mechano-compatible collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering: low doses of UV affect the viscoelastic behaviour*. in *Tissue Engineering Part A*. 2008. Mary Ann Liebert Inc 140 Huguenot Street, 3rd Fl, New Rochelle, NY 10801 USA.
120. Achilli, M., J. Lagueux, and D. Mantovani, *On the Effects of UV-C and pH on the Mechanical Behavior, Molecular Conformation and Cell Viability of Collagen-Based Scaffold for Vascular Tissue Engineering*. Macromolecular Bioscience, 2010. **10**(3): p. 307-316.
121. Achilli, M. and D. Mantovani, *Tailoring mechanical properties of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering: the effects of pH, temperature and ionic strength on gelation*. Polymers, 2010. **2**(4): p. 664-680.
122. de Moraes, M.A., E. Paternotte, D. Mantovani, and M.M. Beppu, *Mechanical and Biological Performances of New Scaffolds Made of Collagen Hydrogels and Fibroin Microfibers for Vascular Tissue Engineering*. Macromolecular Bioscience, 2012. **12**(9): p. 1253-1264.
123. Weska, R.F., M. Achilli, M.M. Beppu, and D. Mantovani. *Improvement of collagen hydrogel scaffolds properties by the addition of konjac glucomannan*. in *Advanced Materials Research*. 2012. Trans Tech Publ.
124. Bilodeau, K., F. Couet, F. Boccafoschi, and D. Mantovani, *Design of a perfusion bioreactor specific to the regeneration of vascular tissues under mechanical stresses*. Artificial organs, 2005. **29**(11): p. 906-912.
125. Couet, F. and D. Mantovani, *How to Optimize Maturation in a Bioreactor for Vascular Tissue Engineering: Focus on a Decision Algorithm for Experimental Planning*. Annals of Biomedical Engineering, 2010. **38**(9): p. 2877-2884.
126. Couet, F. and D. Mantovani, *Perspectives on the advanced control of bioreactors for functional vascular tissue engineering in vitro*. Expert Review of Medical Devices, 2012. **9**(3): p. 233-239.
127. Couet, F. and D. Mantovani, *A New Bioreactor Adapts to Materials State and Builds a Growth Model for Vascular Tissue Engineering*. Artificial Organs, 2012. **36**(4): p. 438-445.
128. Couet, F. and D. Mantovani, *Optimization of Culture Conditions in a Bioreactor for Vascular Tissue Engineering Using a Mathematical Model of Vascular Growth and Remodeling*. Cardiovascular Engineering and Technology, 2012. **3**(2): p. 228-236.
129. Conte, M.S., *The ideal small arterial substitute: a search for the Holy Grail?* The FASEB Journal, 1998. **12**(1): p. 43.
130. Chien, S., S. Li, and J.Y.J. Shyy, *Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells*. Hypertension, 1998. **31**(1): p. 162.

131. Liu, B., M. Qu, K. Qin, H. Li, Z. Li, B. Shen, and Z. Jiang, *Role of cyclic strain frequency in regulating the alignment of vascular smooth muscle cells in vitro*. *Biophysical journal*, 2008. **94**(4): p. 1497-1507.
132. Knezevic, V., A. Sim, T. Borg, and J. Holmes, *Isotonic biaxial loading of fibroblast-populated collagen gels: a versatile, low-cost system for the study of mechanobiology*. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 2002. **1**(1): p. 59-67.
133. Rasband, W.S., *ImageJ*. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009.
134. Silver, F.H., P.B. Snowhill, and D.J. Foran, *Mechanical behavior of vessel wall: a comparative study of aorta, vena cava, and carotid artery*. *Annals of Biomedical Engineering*, 2003. **31**(7): p. 793-803.
135. Kanda, K., T. Matsuda, and T. Oka, *Mechanical stress induced cellular orientation and phenotypic modulation of 3-D cultured smooth muscle cells*. *ASAIO journal*, 1993. **39**(3): p. M691.
136. Conway, D.E., S.G. Eskin, and L.V. McIntire, *Chapter II.1.6 - Effects of Mechanical Forces on Cells and Tissues (The Liquid-Cell Interface)*, in *Biomaterials Science (Third Edition)*, B.D.R.S.H.J.S.E. Lemons, Editor. 2013, Academic Press. p. 474-487.
137. Steward, R., C. Cheng, D. Wang, and P. LeDuc, *Probing Cell Structure Responses Through a Shear and Stretching Mechanical Stimulation Technique*. *Cell Biochemistry and Biophysics*: p. 1-10.
138. Tan, W., D. Scott, D. Belchenko, H.J. Qi, and L. Xiao, *Development and evaluation of microdevices for studying anisotropic biaxial cyclic stretch on cells*. *Biomedical Microdevices*, 2008. **10**(6): p. 869-882.
139. Cukierman, E., R. Pankov, D.R. Stevens, and K.M. Yamada, *Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension*. *Science*, 2001. **294**(5547): p. 1708-1712.
140. Ritchie, A.C., S. Wijaya, W.F. Ong, S.P. Zhong, and K.S. Chian, *Dependence of alignment direction on magnitude of strain in esophageal smooth muscle cells*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009. **102**(6): p. 1703-1711.
141. Qu, M.-J., B. Liu, H.-Q. Wang, Z.-Q. Yan, B.-R. Shen, and Z.-L. Jiang, *Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain*. *Journal Of Vascular Research*, 2007. **44**(5): p. 345-353.
142. Pang, Y., X. Wang, D. Lee, and H.P. Greisler, *Dynamic quantitative visualization of single cell alignment and migration and matrix remodeling in 3-D collagen hydrogels under mechanical force*. *Biomaterials*, 2011. **32**(15): p. 3776-3783.
143. Bono, N., D. Pezzoli, L. Levesque, C. Loy, G. Candiani, G.B. Fiore, and D. Mantovani, *Unraveling the role of mechanical stimulation on smooth muscle cells: A comparative study between 2D and 3D models*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016. **113**(10): p. 2254-2263.
144. Syedain, Z.H. and R.T. Tranquillo, *Controlled cyclic stretch bioreactor for tissue-engineered heart valves*. *Biomaterials*, 2009. **30**(25): p. 4078-4084.
145. Isenberg, B.C. and R.T. Tranquillo, *Long-Term Cyclic Distention Enhances the Mechanical Properties of Collagen-Based Media-Equivalents*. *Annals of Biomedical Engineering*, 2003. **31**(8): p. 937-949.
146. Seliktar, D., R.M. Nerem, and Z.S. Galis, *The Role of Matrix Metalloproteinase-2 in the Remodeling of Cell-Seeded Vascular Constructs Subjected to Cyclic Strain*. *Annals of Biomedical Engineering*, 2001. **29**(11): p. 923-934.
147. Huang, H., R.D. Kamm, and R.T. Lee, *Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2004. **287**(1): p. C1.
148. Paxton, J.Z., P. Hagerty, J.J. Andrick, and K. Baar, *Optimizing an Intermittent Stretch Paradigm Using ERK1/2 Phosphorylation Results in Increased Collagen Synthesis in Engineered Ligaments*. *Tissue Engineering. Part A*, 2012. **18**(3-4): p. 277-284.

149. Plunkett, N.A., S. Partap, and F.J. O'Brien, *Osteoblast Response to Rest Periods During Bioreactor Culture of Collagen–Glycosaminoglycan Scaffolds*. *Tissue Engineering Part A*, 2009. **16**(3): p. 943-951.
150. Partap, S., N.A. Plunkett, D.J. Kelly, and F.J. O'Brien, *Stimulation of osteoblasts using rest periods during bioreactor culture on collagen-glycosaminoglycan scaffolds*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2010. **21**(8): p. 2325-2330.
151. Ong, K.L., S. Lovald, and J. Black, *Orthopaedic biomaterials in research and practice*. 2014: CRC Press.
152. Cross, R., *Elastic and viscous properties of Silly Putty*. *American Journal of Physics*, 2012. **80**(10): p. 870-875.
153. Findley, W.N. and F.A. Davis, *Creep and relaxation of nonlinear viscoelastic materials*. 2013: Courier Corporation.
154. Gupta, V. and K.J. Grande-Allen, *Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells*. *Cardiovascular Research*, 2006. **72**(3): p. 375-383.
155. Venkataraman, L., C.A. Bashur, and A. Ramamurthi, *Impact of Cyclic Stretch on Induced Elastogenesis Within Collagenous Conduits*. *Tissue Engineering Part A*, 2013. **20**(9-10): p. 1403-1415.
156. Asanuma, K., R. Magid, C. Johnson, R.M. Nerem, and Z.S. Galis, *Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells*. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2003. **284**(5): p. H1778-H1784.
157. Tan, H.-Y., Y.-L. Chang, W. Lo, C.-M. Hsueh, W.-L. Chen, A.A. Ghazaryan, P.-S. Hu, T.-H. Young, S.-J. Chen, and C.-Y. Dong, *Characterizing the morphologic changes in collagen crosslinked–treated corneas by Fourier transform–second harmonic generation imaging*. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 2013. **39**(5): p. 779-788.
158. Rosset, E., C. Brunet, R. Rieu, P. Rolland, J.F. Pellissier, P.E. Magnan, P. Foulon, A. Drizenko, M. Laude, A. Branchereau, and A. Friggi, *Viscoelastic properties of human arteries methodology and preliminary results*. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 1996. **18**(2): p. 89-96.
159. Meghezi, S., D.G. Seifu, N. Bono, L. Unsworth, K. Mequanint, and D. Mantovani, *Engineering 3D Cellularized Collagen Gels for Vascular Tissue Regeneration*. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2015(100): p. 52812.

## 8. Annexe

### 8.1 Schéma du montage du système de stimuli mécanique cyclique

Afin d'imposer une déformation mécanique aux constructions de collagène avec SMC, une plateforme fut conçue. Cette plateforme s'incorpore sous une plaque de six puits comportant une membrane de silicone déformable (Tissue Train-Amino Culture Plate, Flexcell International Corporation, Hillsborough, NC, USA). Cette membrane flexible est par la suite déformée grâce à un vide imposé via la plateforme et contrôlé par un programme labview sur ordinateur. L'image qui suit présente un schéma du système avec toutes ses composantes.

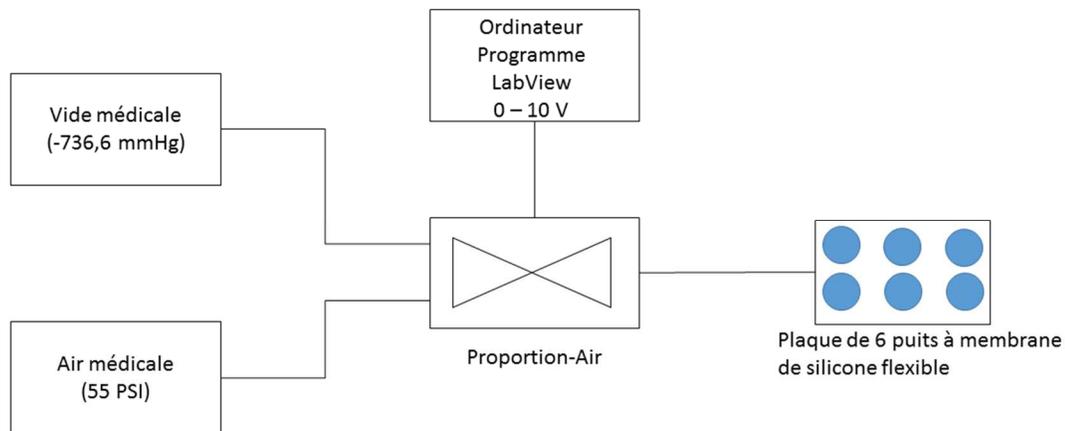


Figure 29: Schéma du montage du système de stimuli mécanique cyclique

### 8.2 Analyse MatLab

Afin de faire l'analyse des données des essais mécaniques de relaxation de contrainte, le programme MatLab fut utilisé. Chacun des codes «Fit» donne un graphique et les coefficients représentés dans l'équation d'analyse. Seulement un exemple a été placé ici. Voici un exemple du codage :

```
st1L=HzHUASMCcol4(:,5);  
st1T=HzHUASMCcol4(:,1);  
plot(st1L)
```

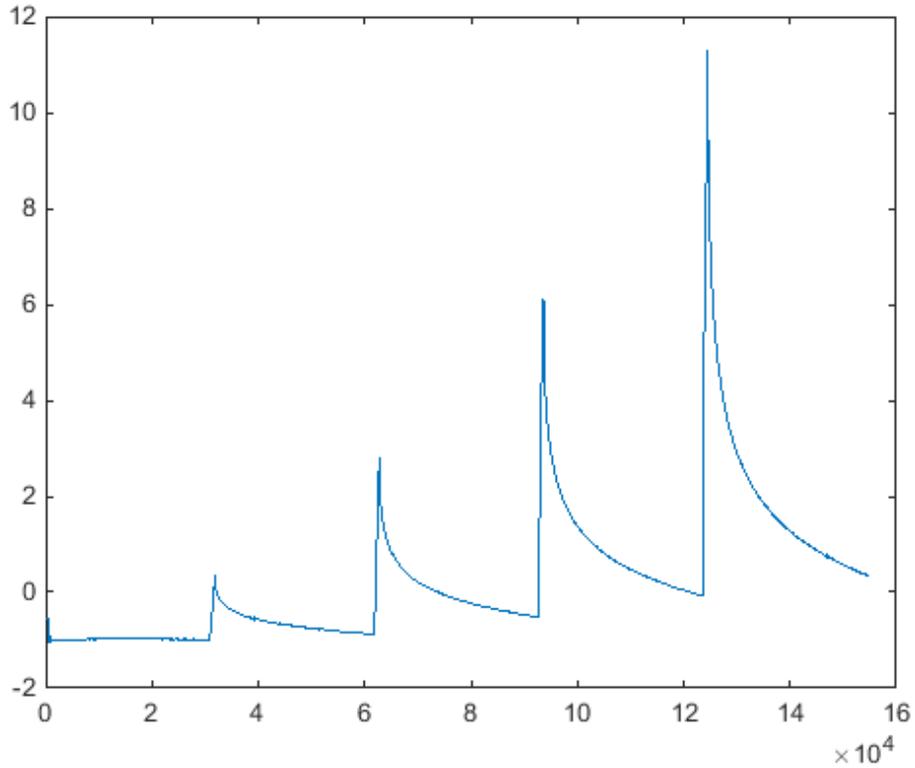


Figure 30: Graphique de la charge (Pa) en fonction du temps (s) de test de relaxation de contrainte

```

st1L10=st1L(913:30921)+27.3;
st1T10=st1T(913:30921)-st1T(913);
st1L20=st1L(31825:61835)+27.3;
st1T20=st1T(31825:61835)-st1T(31825);
st1L30=st1L(62736:92745)+27.3;
st1T30=st1T(62736:92745)-st1T(62736);
st1L40=st1L(93650:123650)+27.3;
st1T40=st1T(93650:123650)-st1T(93650);
st1L50=st1L(124600:154550)+27.3;
st1T50=st1T(124600:154550)-st1T(124600);
Fit3TCLucie(st1T10,st1L10);
Fit3TCLucie(st1T20,st1L20);

```

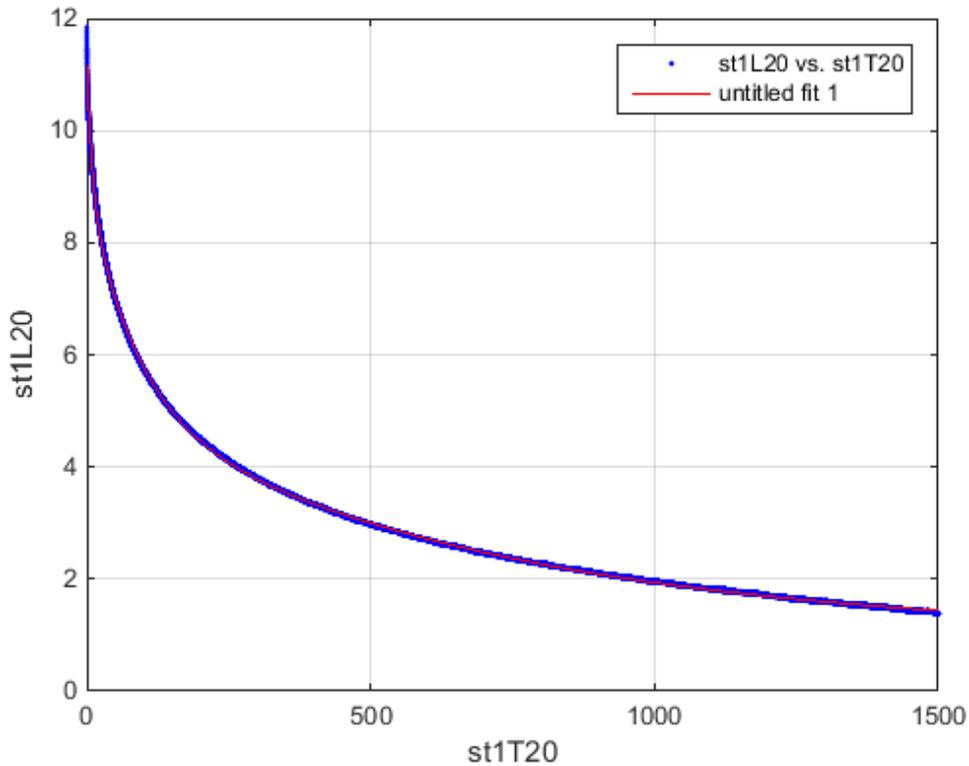


Figure 31: Graphique représentatif des Fit obtenus

General model:

fitresult(x) =  $a \cdot \exp(-x/b) + c \cdot \exp(-x/d) + e \cdot \exp(-x/f) + g$

Coefficients (with 95% confidence bounds):

a = 0,2685 (0,2671, 0,2698)  
 b = 14,88 (14,74, 15,02)  
 c = 0,3595 (0,3584, 0,3606)  
 d = 121,3 (120,4, 122,1)  
 e = 0,6789 (0,6779, 0,6799)  
 f = 1161 (1152, 1170)  
 g = -0,009817 (-0,01206, -0,007575)

gof =

sse: 0.5280  
 rsquare: 0.9996  
 dfe: 30008  
 adjrsquare: 0.9996  
 rmse: 0.0042

Fit3TCLucie(st1T30,st1L30);

Fit3TCLucie(st1T40,st1L40);

```
Fit3TCLucie(st1T50,st1L50);  
st1P=statiqueHUASMCcol4(:,2);  
st1P(1)  
    -1,0989  
st1P([30910 61830 92740 123650 154550])  
    -1,0089  
    -0,9189  
    -0,8289  
    -0,7387  
    -0,6489
```