

PHILIPPE LÉVESQUE

CONCEPTION D'UN MONTAGE DE CARACTÉRISATION  
DES PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES DE VAISSEAUX  
RECONSTRUITS PAR GÉNIE TISSULAIRE

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en Médecine expérimentale  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

MÉDECINE EXPÉRIMENTALE  
MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2010

© Philippe Lévesque, 2010

## **Résumé**

Le génie tissulaire vise à remplacer, réparer ou reproduire un organe ou un tissu pour des fins de chirurgie reconstructive ou de remplacement et pour servir de modèle d'étude et de recherche. Les substituts vasculaires produits par génie tissulaire peuvent être partiellement caractérisés en mesurant certaines de leurs propriétés mécaniques telles que la pression d'éclatement et la compliance et en les soumettant à des essais de fatigue et de fluage. La mesure de ces caractéristiques permet de vérifier que la méthode de fabrication produit des substituts vasculaires présentant des caractéristiques d'ordre physiologique.

Un système permettant la mesure de ces propriétés mécaniques de manière fiable, précise et répétitive a été conçu et fabriqué. Ce système contrôlé par ordinateur soumet les substituts à des pressions hydrodynamiques dont les valeurs sont enregistrées de façon synchronisée avec les mesures de diamètre du substitut. L'analyse des données produites permet de calculer les propriétés mécaniques d'intérêt.

## **Abstract**

Tissue engineering presents a promising approach for producing tissues to replace, repair or reproduce tissues and organs to be used for reconstructive surgery or as a research model. Tissue engineered vascular constructs can be partially characterized by measuring certain mechanical properties such as burst pressure and compliance and submitting them to creep and fatigue tests. Measuring these mechanical properties allows researchers to assess a method's capability of producing vascular constructs possessing mechanical properties similar to those of native vessels.

A system to measure these important mechanical properties in a reliable, precise and repeatable manner was designed and built. The computer controlled system exposed the vascular constructs to various hydrostatic pressures and simultaneously recorded the construct's internal pressure and external diameter. These values are then used to calculate the mechanical properties of interest.

## **Avant-propos**

Ce projet de maîtrise s'est déroulé au Laboratoire d'organogénèse expérimentale (LOEX) de l'Hôpital Saint-Sacrement de Québec. Il vise la mise au point d'un montage de caractérisation des propriétés mécaniques des vaisseaux reconstruits par génie tissulaire. Ce montage a servi comme outil pour comparer les propriétés mécaniques de substituts vasculaires lors de deux séries d'expériences. Les résultats recueillis lors de ces expériences ont amélioré les connaissances des propriétés mécaniques de chaque couche cellulaire qui forme les vaisseaux, à l'exception de l'endothélium qui ne contribue pas elle-même à la résistance et l'élasticité des vaisseaux. La conception du montage a nécessité une étude profonde de la littérature existante sur la structure des vaisseaux sanguins et leurs propriétés mécaniques. Les résultats des expériences ont confirmé que le montage est fonctionnel et précis et permet de soumettre les substituts vasculaires à des conditions expérimentales prévisibles et reproductibles. Le montage a également servi à l'étude des propriétés mécaniques d'urètres reconstruits par la méthode d'auto-assemblage, cette même méthode ayant été utilisée pour produire les substituts vasculaires. Cette troisième série d'expériences a démontré l'utilité et une certaine portabilité du système mis au point dans le cadre de ce projet de maîtrise.

J'ai ainsi pu participer et contribuer, par le travail effectué dans la conception et la mise au point du montage et une participation active dans les expériences mentionnées auparavant, à la rédaction de trois articles. Au moment de publier ce mémoire, un des articles a été publié et les deux autres seront soumis sous peu. De façon plus précise, j'ai contribué en effectuant la majorité de la conception du montage, en effectuant toute la conception et la mise au point des logiciels de contrôle, en effectuant le choix et l'intégration des composants du montage et en assurant sa fonctionnalité. De plus, j'ai participé de façon active aux expériences de mesure de pression d'éclatement et de mesure de compliance et en effectuant la totalité des expériences de fluage et de fatigue et l'analyse des résultats de ces expériences.

Évidemment, tout ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide et la collaboration de nombre de gens. J'aimerais remercier tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à la

conception du montage, à l'organisation des expériences, aux expériences elles-mêmes et à la rédaction des articles. Je remercie tout particulièrement le Dr. François Auger pour m'avoir fait confiance pour mener ce projet à bout, le Dr. Lucie Germain également pour sa confiance et toute son aide et Dan Lacroix pour toute son aide durant et après mes travaux. De plus, je tiens à remercier très spécialement Robert Gauvin qui m'a aidé durant toutes les étapes de ce projet. Ses commentaires, suggestions, son support et ses idées ont toujours été grandement appréciés et à la hauteur de ses talents et de l'estime que j'ai pour lui. Ce travail aurait sans doute été beaucoup plus difficile et moins agréable sans toi, merci Bob. Je remercie également mes parents, ma famille et ma femme Sara qui m'ont encouragé et supporté au fil des années.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-propos .....	iii
Table des matières .....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Chapitre I - Introduction .....	1
<i>Section 1 - Les vaisseaux sanguins</i> .....	1
1.1 Physiologie du vaisseau humain .....	1
1.1.1 Le rôle et l'importance de l'endothélium .....	3
1.1.2 La média .....	4
1.1.3 L'adventice .....	5
<i>Section 1.2 - Les maladies cardio-vasculaires</i> .....	5
1.2 Les maladies cardio-vasculaires .....	5
<i>Section 1.3 - Les substituts vasculaires</i> .....	7
1.3.1 Substituts vasculaires autologues.....	7
1.3.2 Substituts en Dacron et en ePTFE .....	8
1.3.3 Avantages et inconvénients .....	9
1.3.4 Substituts vasculaires endothélialisés .....	11
<i>Section 1.4 - Substituts vasculaires produits par génie tissulaire</i> .....	11
1.4.1 Bases et avantages du génie tissulaire .....	11
1.4.2 Propriétés du substitut vasculaire idéal.....	12
1.4.3 Matrices décellularisées.....	14
1.4.4 Substituts à base de gels de collagène et de fibrine .....	15
1.4.5 Substituts avec une matrice polymérique biodégradable.....	18
1.4.6 Substituts produits par la méthode d'auto-assemblage.....	19
1.4.7 Limitations du génie tissulaire.....	22
Chapitre II - Propriétés mécaniques des vaisseaux et leur caractérisation, conception du montage expérimental.....	25
<i>Section 2.1 - L'importance des propriétés mécaniques</i> .....	25
<i>Section 2.2 - Propriétés mécaniques et méthodes d'évaluation</i> .....	26
2.2.1 Pression d'éclatement .....	26
2.2.2 Compliance .....	27
2.2.3 Fluage.....	29
2.2.4 Fatigue .....	31
<i>Section 2.3 - Conception et description du montage</i> .....	33
2.3.1 Description du montage.....	34
2.3.2 Moteur.....	35
2.3.3 Système de pressurisation.....	35
2.3.4 Manomètre .....	36
2.3.5 Caméra CCD.....	36
2.3.6 Source d'alimentation.....	36

2.3.7 Chambre d'éclatement .....	36
<i>Section 2.4 - Logiciels de contrôle et d'analyse de résultat</i> .....	37
2.4.1 Choix de la plateforme de développement .....	37
2.4.2 Déroulement de l'essai d'éclatement .....	38
2.4.3. Résultats des essais d'éclatement .....	39
2.4.4 Logiciel pour les essais de fluage .....	42
2.4.6 Résultats des essais de fluage .....	45
Chapitre III - Article .....	50
<i>Section 3.1 - Résumé de l'article</i> .....	50
Chapitre IV - Discussion.....	68
<i>Section 4.1 - Considérations sur le système de mesure des propriétés mécaniques</i> .....	68
<i>Section 4.2 - Implication des résultats obtenus</i> .....	69
<i>Section 4.3 - Pertinence des travaux</i> .....	73
<i>Section 4.4 - Limites du système</i> .....	74
<i>Section 4.5 - Suite du projet</i> .....	76
Conclusion .....	78
Bibliographie .....	79

## Liste des tableaux

**Tableau 3.1:** Mechanical properties of TEVM, TEVA and TEVMA

## Liste des figures

		Page
Figure 1.1	Structure tri-couche des vaisseaux.....	11
Figure 2.1	Consigne de pression pour un essai d'éclatement.....	35
Figure 2.2	Exemple d'une déformation viscoélastique : courbe de variation de diamètre en fonction de la pression.....	37
Figure 2.3	(A) Tension exercée par un tissu sous tension en fonction du temps; (B) Déformation d'un tissu sous tension en fonction du temps.....	37
Figure 2.4	Courbe de pression pour un test de fluage.....	38
Figure 2.5	(A) Force de rupture en fonction du nombre de cycles; (B) Déformation en fonction du nombre de cycles.....	40
Figure 2.6	Variation de pression durant un essai de fatigue.....	40
Figure 2.7	Montage pour les essais d'éclatement.....	41
Figure 2.8	Schéma du système de pressurisation.....	43
Figure 2.9	Interface de contrôle du montage pour les essais d'éclatement .....	46
Figure 2.10	(A) Données de pression enregistrées lors d'un essai d'éclatement; (B) Mesures de diamètre du substitut enregistrées lors d'un essai d'éclatement.....	47
Figure 2.11	Traitement d'images pour la mesure de diamètre.....	48
Figure 2.12	Montage utilisé pour les essais de fluage et de fatigue.....	50
Figure 2.13	Interface de contrôle du montage pour les essais de compliance....	51
Figure 2.14	Exemple d'une courbe de déformation lors d'un essai de fluage ...	52
Figure 2.15	Interface de contrôle du montage pour les essais de fatigue .....	53
Figure 2.16	Exemple de graphique produit lors d'un essai de fatigue.....	55
Figure 3.1	Schematic diagram of the mechanical testing apparatus.....	60
Figure 3.2	Environmental chamber and camera setup for burst tests.....	62
Figure 3.3	Environmental chamber and camera setup for creep and fatigue tests.....	63
Figure 3.4	Internal pressure maintained in the vascular constructs for creep and fatigue tests.....	63
Figure 3.5	Image analysis of the diameter measurements.....	65
Figure 3.6	Example of burst test results.....	66
Figure 3.7	Diameter variations recorded during creep test.....	68
Figure 3.8	(A) Pressure variation during a fatigue test (B) Diameter variation during a fatigue test.....	69
Figure 4.1	Courbe de pressurisation d'un substitut avec un trou ou une déchirure .....	76
Figure 4.2	Courbe de pressurisation d'un substitut en présence d'air ou de forte compliance.....	77
Figure 4.3	Courbe de pressurisation d'un substitut qui subit une délamination .....	78
Figure 4.4	Courbe de déformation viscoélastique.....	79

# Chapitre I - Introduction

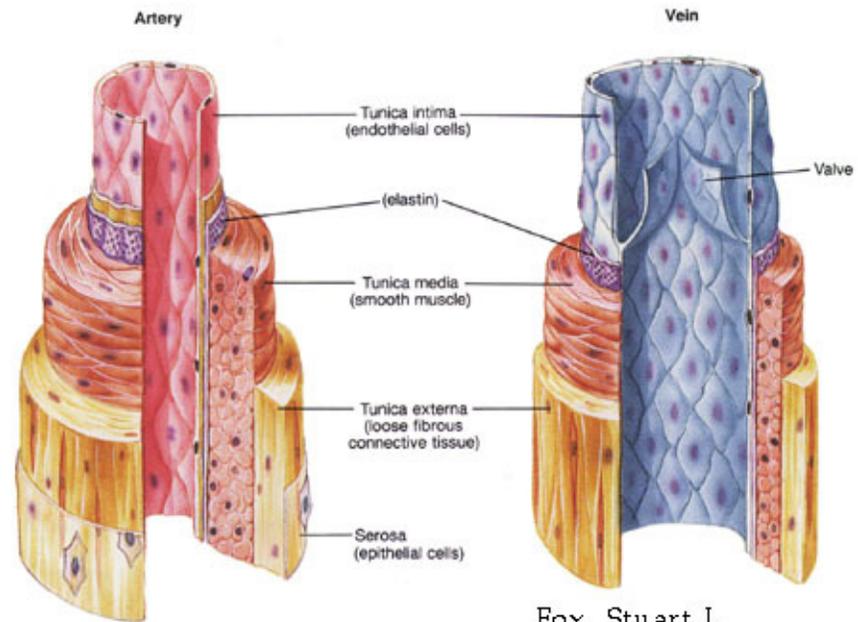
Ce premier chapitre se veut une étude de la physiologie des vaisseaux sanguins. D'abord, la structure des vaisseaux et ses différentes couches cellulaires sont décrites brièvement. Suit une description brève des maladies cardiovasculaires et de leurs causes, un aperçu des solutions actuelles au besoin de substituts vasculaires et finalement une section sur le génie tissulaire qui fournit davantage de solutions.

## *Section 1 - Les vaisseaux sanguins*

### **1.1 Physiologie du vaisseau humain**

Cette section se veut une revue de la structure et de la composition des vaisseaux sanguins humains et une étude du rôle et de l'importance de chaque type cellulaire qui s'y trouve.

L'ensemble des vaisseaux sanguins du corps humain se divise en deux catégories, soit les artères et les veines. Les artères peuvent être classées en deux catégories : les artères élastiques ou musculaires. Les grosses artères à large diamètre et dans lesquelles la média, la couche intermédiaire des vaisseaux, est composée à part égale de cellules musculaires et de fibres élastiques sont nommées élastiques. Les artères musculaires ont une média moins élastique composée essentiellement de cellules musculaires lisses. Leur diamètre diminue progressivement en allant vers les extrémités et elles deviennent éventuellement des artérioles. Les veines du corps ont une paroi moins épaisse, une plus grande section transversale et un alignement longitudinal des cellules musculaires lisses. À l'exception des capillaires, la paroi de tous les vaisseaux sanguins est composée de trois couches : l'intima, la média et l'adventice. Les capillaires ne sont formés que d'une intima et entouré de péricytes ou de rares cellules musculaires. Dans la majorité des vaisseaux, la média est formée de cellules musculaires lisses. Ces cellules peuvent aussi être présentes dans l'intima et l'adventice d'autres vaisseaux. L'adventice de la plupart des vaisseaux est composé d'un riche réseau de fibres de collagène.



Fox, Stuart I.  
Human Physiology 4th  
Brown Publishers

**Figure 1.1 : Structure tri-couche des vaisseaux**

L'intima forme la couche intérieure des vaisseaux sanguins. Elle est composée d'une monocouche de cellules endothéliales et d'une mince membrane basale d'environ 80 nm, composée entre autres de collagène. Les fibres de collagène forment la structure solide à laquelle s'accrochent les cellules musculaires lisses et les composantes élastiques. Elles préviennent également une sur-dilatation et un éclatement des vaisseaux. Elles jouent donc un rôle structural et fonctionnel en fournissant des points d'ancrage aux cellules ainsi qu'une élasticité et une contractilité qui favorise la circulation du sang. Les collagènes de type I, II, III, V et XI sont dits de type « structural ». Les collagènes de type IX, X et XII sont eux de type « liaisons ». L'intima des vaisseaux contient du collagène de type I, III, IV, V, VI et VIII (28).

Pour les besoins de cette étude, l'intima et l'endothélium seront considérés comme équivalents et dorénavant, on réfèra à l'intima comme l'endothélium. L'importance est accordée à la description de cette couche cellulaire, la couche basale de l'intima ne

contribuant pas aux propriétés mécaniques des vaisseaux. Par contre, l'endothélium joue un rôle important dans la mécanotransduction et dans le remodelage des substituts vasculaires.

Les cellules pavimenteuses de l'endothélium sont alignées de façon longitudinale au vaisseau et dans le sens de l'écoulement sanguin. Elles ont une forme aplatie, une épaisseur d'environ 0.2 à 0.5  $\mu\text{m}$  et présentent une protubérance vis-à-vis leur noyau. Elles sont reliées entre elles par des nombreuses jonctions serrées et communicantes qui servent de points d'ancrage et de ponts communicants pour l'échange d'ions et de métabolites (28).

### **1.1.1 Le rôle et l'importance de l'endothélium**

L'endothélium a un rôle actif et passif comme barrière anti-thrombogénique dans les vaisseaux. D'abord, il prévient la formation de caillots en séparant physiquement le sang des autres couches cellulaires. Ensuite, la thrombomoduline, récepteur exprimé à la surface des cellules endothéliales, catalyse l'activation de la protéine C en ségréguant la thrombine. Cette dernière molécule est le facteur de coagulation qui transforme la fibrinogène en fibrine, élément principal des caillots sanguins. Les cellules endothéliales produisent également la protéine S, un anticoagulant et cofacteur de la protéine C. Finalement, la forme active de la protéine C inactive les facteurs Va et VIIIa ce qui interrompt le phénomène de coagulation. La synthèse de certains protéoglycans neutralise et inhibe la thrombine. La production d'acide nitrique et de prostacycline par les cellules endothéliales quiescentes, ainsi que la présence sur leur membrane de protéoglycans chargés négativement, prévient la formation de plaquettes. Finalement, lorsqu'un caillot se forme, les cellules endothéliales sécrètent un activateur de plasminogène t-PA qui lyse les amas de fibrine (28).

En plus d'une action dirigée vers l'intérieur du vaisseau, les cellules endothéliales sont la source de plusieurs phénomènes de mécanotransduction. De nombreux récepteurs à la surface de ces cellules les rendent sensibles aux contraintes mécaniques engendrées par le flux sanguin telles que le cisaillement et la pression. Ces contraintes déclenchent des cascades d'événement biochimiques qui conduisent à des changements fonctionnels dans la cellule et une action sur les cellules environnantes du vaisseau sanguin (26). La matrice

extracellulaire ainsi que la membrane cellulaire participent de façon majeure à la mécanotransduction par l'action des intégrines et des canaux ioniques respectivement. Brièvement, les intégrines, couplées aux protéines du cytosquelette participent à l'attachement des cellules endothéliales à leur substrat ainsi qu'à la transmission intracellulaire des signaux mécaniques. D'autre part, une augmentation des contraintes de cisaillement entraîne une hyperpolarisation de la membrane cellulaire liée à l'activation de canaux potassiques et une modification des fonctions cellulaires. Finalement, les contraintes de cisaillement sont également responsables de l'activation des protéines G, d'une action encore peu connue sur les récepteurs de type tyrosine kinase et d'un effet sur les radicaux libres (26) qui participent tous aux phénomènes de mécanotransduction.

### **1.1.2 La média**

La média, ou tunique moyenne, forme la couche intermédiaire de la paroi vasculaire (Figure 1.1). La média des artères est plus épaisse que celle des veines et a une épaisseur d'environ 500µm dans l'aorte, de 20 à 50 µm dans les artères de calibre moyen et de seulement 1 à 3 cellules dans les artérioles et les veinules (28). Dans les artères, elle est composée de cellules musculaires lisses, d'une enveloppe élastique externe, de collagènes de type I, III, IV et V (68) et d'un réseau de fibrilles élastiques et de protéoglycans. La média des veines ne contient pas de limitante élastique externe (33). Les protéoglycans servent au maintien de la structure du tissu et jouent un rôle clé dans l'activité cellulaire (40).

Les cellules musculaires lisses sont les seules présentes dans la média et leur fonction principale est d'agir sur la contraction du vaisseau pour augmenter ou réduire la lumière. Elles sont également responsables de la production de fibres de collagène et d'élastine. L'élastine procure l'élasticité nécessaire au vaisseau, une propriété nécessaire pour qu'il retrouve sa forme initiale (28) et qui lui procure également sa force de pompage (38). L'orientation et l'interaction entre les fibrilles élastiques, les fibres de collagène et les cellules musculaires lisses procurent à la média sa plasticité, sa compliance et sa capacité de se déformer de façon tridimensionnelle sous l'action des forces auxquelles elle est soumise et une adaptation rapide aux variations de pression et d'écoulement. La structure et

le comportement de la média contribuent en majeure partie aux propriétés mécaniques et viscoélastiques des vaisseaux (38). L'orientation cellulaire assure également que la force de traction exercée sur la paroi vasculaire soit uniforme.

Des couches de cellules musculaires et de lamina élastiques se succèdent de façon concentrique autour de l'endothélium selon la nature élastique ou musculaire de l'artère. L'orientation cellulaire par rapport à l'axe longitudinale du vaisseau varie dans le même sens (28). Dans le cas de l'artère coronaire chez l'humain, les cellules musculaires lisses sont orientées de façon concentrique. La média des artères élastiques tels que l'aorte, le tronc brachio-céphalique et la carotide commune contient plus de fibres élastiques que de muscles lisses. La média des artères musculaires telles que les artères axillaires, brachiales, radiales et fémorales contient pour sa part plus de muscles lisses que de fibres élastiques. Ces artères ont donc une plus grande capacité de vasoconstriction et de vasodilatation pour la régulation du débit sanguin.

### **1.1.3 L'adventice**

La dernière composante vasculaire, la plus éloignée du centre du vaisseau, est l'adventice ou tunique externe. Elle est composée principalement de fibres élastiques, de fibres de collagènes (33) et de protéoglycans (38). Contrairement à la média, l'adventice ne contribue habituellement pas activement au comportement mécanique des vaisseaux (38).

## ***Section 1.2 - Les maladies cardio-vasculaires***

### **1.2 Les maladies cardio-vasculaires**

Des hausses constantes dans la prévalence des maladies cardiovasculaires ont été observées au cours des dernières années. Au Canada et aux États-Unis, les maladies cardio-vasculaires représentent la première cause de décès avec 75 000 et 871 000 cas respectivement. Plus de la moitié de ceux-ci étaient reliés à une maladie de l'artère coronaire (1). Les plus récentes statistiques dévoilent qu'en 2004, 72 000 000 d'Américains souffraient d'hypertension, 15 800 000 d'entre eux souffrait d'une forme de maladie de l'artère coronaire et 5 700 000 de personnes ont eu un infarctus. Parmi les facteurs de

risque des maladies cardio-vasculaires, on retrouve l'obésité, l'hyper-cholestérolémie, l'hypertension, le diabète, le tabagisme, la sédentarité, une prédisposition héréditaire ou le fait d'être de sexe masculin. Parmi les affectations les plus répandues, on retrouve l'artériosclérose, l'hypertension artérielle, les anévrismes, l'insuffisance coronarienne et la thrombose veineuse profonde.

Puisque l'athérosclérose est une des maladies cardio-vasculaires les plus sévères et les répandues, elle mérite une attention particulière dans le cadre de cette étude. Cette maladie affecte les artères du système sanguin et son effet général se traduit par une inflammation chronique de la paroi d'un ou de plusieurs vaisseaux sanguins. Cette inflammation est largement due à une accumulation ou un dépôt de lipoprotéines contenant entre autres du cholestérol et des triglycérides, du sang, des produits sanguins et des dépôts calcaires. L'épaississement des plaques entraîne inévitablement une altération de la dynamique fluide qui peut endommager l'endothélium des vaisseaux et entraîner davantage de complications. Par exemple, la formation de plaques entraîne habituellement une dilatation du vaisseau pour compenser l'augmentation de sa résistance à l'écoulement. Les anévrismes surviennent lorsque la dilatation du vaisseau est excessive. Dans le cas de l'artère coronaire, la sténose ou rétrécissement entraîne une réduction de l'apport sanguin, un affaiblissement du muscle cardiaque et mène ultimement à l'infarctus du myocarde. La progression de la maladie peut également mener à une calcification des tissus, une rupture de la plaque et un thrombus. C'est cette calcification qui affecte plus sérieusement les valves cardiaques, elles aussi affectées par l'athérosclérose (12). Le durcissement des tissus de valves cardiaques entraîne une régurgitation et une perte de l'efficacité de pompage du cœur.

Les maladies cardio-vasculaires n'affectent pas seulement la santé de la population mais ont aussi des effets socio-économiques considérables. En effet, les coûts directs et indirects des maladies cardio-vasculaires totalisent plus de 395 milliards de dollars US en 2005.

Malgré les baisses de 33% du nombre de personnes qui ont succombé à une maladie de l'artère coronaire entre 1994 et 2004, les recherches pour une solution optimale au manque

de substituts vasculaires se poursuivent. Pour plusieurs personnes souffrant d'une maladie cardio-vasculaire, un premier traitement pharmacologique permet la poursuite des activités normales et un contrôle adéquat de la maladie.

Une autre procédure, nommée angioplastie, est couramment effectuée dans le traitement d'artères coronaires. Brièvement, cette procédure permet de dilater une artère rétrécie à l'aide d'un ballon gonflé dans le vaisseau. Cette première étape aide à éliminer la source de blocage. Depuis plusieurs années, on insère ensuite un grillage, ou tuteur, qui se déploie à l'intérieur du vaisseau pour l'aider à retrouver sa forme normale. Le tuteur est un dispositif métallique maillé et tubulaire replié sur lui-même qui, une fois déployé, prend la forme du vaisseau et le dilate. En augmentant le diamètre interne du vaisseau, le tuteur favorise un meilleur apport sanguin aux muscles du cœur. De par sa construction purement métallique, les tuteurs ne causent pas d'allergies et leur petite taille ne cause aucun problème lors d'imagerie par résonance magnétique. L'inconvénient le plus commun de l'angioplastie, lorsque effectuée sans le déploiement de tuteurs, est le risque de resténose. Pour combattre la récurrence d'un rétrécissement du vaisseau et pour le traitement et la prévention d'autres maladies cardiovasculaires, certains types de tuteurs sont donc enduits d'agents anti-aggrégants qui seront progressivement relâchés dans la circulation sanguine.

Cependant, pour une autre portion des personnes atteintes d'une maladie cardio-vasculaire, une intervention chirurgicale visant à remplacer une section de vaisseau est nécessaire. En effet, le traitement de plus de

1 500 000 personnes implique l'implantation d'une prothèse artérielle (AHA et Santé Canada). L'artère coronaire est le vaisseau exigeant le plus grand nombre de pontages. La carotide, l'artère rénale, iliaque, fémorale et poplitée font également partie des vaisseaux les plus ciblés pour la greffe d'un substitut vasculaire.

### ***Section 1.3 - Les substituts vasculaires***

#### **1.3.1 Substituts vasculaires autologues**

La première méthode de remplacement de sections de vaisseaux consiste à utiliser une section de veine saphène ou de l'artère mammaire interne. Cette source autologue de

substitut vasculaire assure que l'implant sera non-immunogène puisqu'il provient du patient dans lequel il est implanté. De plus, la veine saphène présente une grande résistance à la traction et à l'éclatement (18). Elle présente également une structure tri-couche composée d'un endothélium, d'une média et d'une adventice comme celle des vaisseaux natifs les plus souvent remplacés (28). Par contre, la disponibilité réduite de ces vaisseaux, soit parce qu'ils sont eux-mêmes atteints d'une pathologie, soit parce qu'ils sont absents dû à leur utilisation lors d'une chirurgie antérieure ou suite à une amputation, réduit considérablement la portée de cette technique (3,23). Même s'ils sont disponibles, leur extraction implique une deuxième intervention chirurgicale et peut, dans un nombre réduit de cas, entraîner des conséquences pour le patient comme une circulation réduite des membres inférieurs dans le cas de la veine saphène (23). Également, les greffons provenant de veines saphènes ont une durée de vie limitée (70), due entre autres à une perméabilité réduite après 10 ans (71). Plusieurs études indiquent qu'une des raisons de cette réduction de la perméabilité serait la disruption de l'endothélium causée par la préparation d'un greffon d'origine veineuse destiné à remplacer une artère (72,73). Cependant, à défaut d'avoir accès à des substituts vasculaires ayant des qualités équivalentes à celles des petites artères autologues, le recours à l'utilisation des vaisseaux autologues tels que la veine saphène et l'artère mammaire interne demeure présentement le procédé standard (23).

Les autres sources de substituts vasculaires autologues sont l'artère radiale, les veines de cordon ombilical et les veines provenant d'une allogreffe cryopréservée. Les premières solutions présentent les mêmes désavantages que les autres vaisseaux autologues (deuxième chirurgie, extraction d'un vaisseau fonctionnel). Finalement, une allogreffe cryopréservée est sujette au rejet suite à une réaction immunitaire.

## **Substituts vasculaires synthétiques**

### **1.3.2 Substituts en Dacron et en ePTFE**

Certaines des premières tentatives de remplacement de vaisseaux sanguins consistaient à utiliser des substituts composés uniquement de matériaux synthétiques (13). Les plus utilisés sont le polyéthylène téréphtalate et le polytétrafluoroéthylène spongieux (ePTFE)

mieux connu sous leurs appellations commerciales de Dacron et de Téflon ou sous l'acronyme ePTFE. Ces solutions ont connu un certain succès dans le cas de remplacements de vaisseaux de gros calibre ayant un diamètre de 6 à 10 mm (23). Par contre, dès la première étude clinique effectuée en 1965, les chercheurs faisaient déjà état des problèmes que ces substituts peuvent entraîner lorsqu'ils sont utilisés dans le remplacement de vaisseaux de faible calibre de moins de 6 mm (13). Par exemple, la formation d'un caillot crée une bien plus grande obstruction dans un vaisseau qui possède une petite section transversale que dans un vaisseau de gros calibre.

### **1.3.3 Avantages et inconvénients**

Le PTFE démontre une bonne stabilité structurale *in vivo* (15). Le Dacron possède une excellente résistance à la traction, de plusieurs ordres de grandeur supérieure à celle du PTFE (77). De plus, la fabrication de matériaux synthétiques et des substituts qu'ils composent est plus facilement contrôlable, répétable, rapide et moins coûteuse. Elle élimine la variabilité intrinsèque à l'utilisation de matériaux et de procédés de fabrication biologiques.

Cependant, la grande rigidité de ces matériaux synthétiques limite fortement leur élasticité. Il en résulte une très faible compliance qui perturbe l'écoulement sanguin et cause des zones de turbulences qui peuvent endommager la paroi interne du vaisseau auquel l'implant est anastomosé (2, 11, 12, 20, 21). L'endothélium des vaisseaux natifs est particulièrement affecté par ce genre de perturbation. La présence d'une couche uniforme de cellules endothéliales confluentes et ayant bien adhéré à la paroi interne du vaisseau natif assure sa vasoactivité et sa non-thrombogénicité (14,15). Le faible degré d'adhérence qu'offrent ces matériaux synthétiques aux cellules endothéliales explique leur absence à plus de quelques millimètres de l'anastomose (16). L'endothélialisation des vaisseaux, reconnue comme étant une des propriétés clés dans l'implantation d'un substitut vasculaire idéal, est impossible ou très limitée dans le cas de ces matériaux synthétiques (11,16). S'en suit de graves complications telles une hyperplasie intimale ou une thrombose qui ferme la lumière du vaisseau (2,11). De par leurs dimensions, les substituts de faible calibre sont

particulièrement susceptibles au blocage (3). Outre la différence de compliance, le changement de direction de l'écoulement sanguin et une différence de diamètre de la lumière à l'anastomose, des dommages à la paroi du vaisseau natif ainsi que la technique de suture sont toutes des explications mécaniques possiblement responsables de l'hyperplasie intimale (2) lors de l'utilisation de veines saphènes comme greffon. Contrairement aux vaisseaux natifs, les implants synthétiques tels que le Dacron et l'ePTFE n'ont pas la capacité d'être remodelés ou intégrés par les cellules du vaisseau auquel ils sont greffés et n'ont aucun potentiel de croissance. Ceci limite leur adaptation et leur intégration biologique et prolonge la durée de vie d'un corps étranger dans l'organisme. Finalement, la faible porosité du PTFE a également été associée à une endothélialisation déficiente de la lumière (3).

La grande rigidité des implants de Dacron et de Téflon limite les endroits dans le corps où un tel implant peut être utilisé. Les zones très articulées exigent l'utilisation de matériaux souples qui ne forment pas de faux plis (13). Une mauvaise intégration du matériau a été reconnue comme étant la cause de nombreuses infections qui dégrade la structure microporeuse du vaisseau. D'autres complications telles la formation d'anévrismes, le plissage (gaufrage) de l'implant et une accumulation de lipides et de cholestérol sur la paroi interne de l'implant ont également été observées (16). Finalement, l'utilisation de matériaux synthétiques dans la fabrication de substituts vasculaires peut entraîner une infection de la greffe, intimement reliée au cas d'amputation ou de décès de patients (30).

Bref, le remodelage trop difficile, l'absence d'un endothélium dans les substituts, les réactions immunologiques et l'inflammation chronique expliquent le faible taux de succès du Dacron et de l'ePTFE dans le remplacement de vaisseaux de faible calibre (3). Ceci explique en partie pourquoi la Food and Drug Administration n'a jamais approuvé l'utilisation de l'ePTFE comme substitut vasculaire implantable lors d'un pontage coronaire (17).

### **1.3.4 Substituts vasculaires endothélialisés**

La suite logique dans la mise au point d'un substitut vasculaire non-thrombogène et qui ressemblerait davantage à un vaisseau natif était de développer des implants synthétiques ensemencés avec des cellules endothéliales pour former une paroi interne hémocompatible. Quoique cette approche fût prometteuse, peu ont connu le succès avec cette technique. L'utilisation du matériel synthétique mettait encore un frein à une intégration complète de l'implant (11).

## ***Section 1.4 - Substituts vasculaires produits par génie tissulaire***

### **1.4.1 Bases et avantages du génie tissulaire**

Le génie tissulaire est défini comme étant un « *ensemble de techniques qui font appel aux principes et aux méthodes de l'ingénierie et des sciences de la vie pour comprendre les relations entre structures et fonctions des tissus normaux et pathologiques de mammifères, et pour développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus* » (31). Cette nouvelle approche réunit les domaines de la culture cellulaire, des biopolymères et de l'ingénierie. Né à la fin des années 1980, le génie tissulaire vise à remplacer, réparer ou reproduire un organe ou pour des fins de chirurgie reconstructive ou de remplacement et pour servir de modèle d'étude et de recherche. Un des principes de base consiste à utiliser les cellules du patient pour assurer une immuno-compatibilité (25) qui pourrait éliminer les problèmes de compatibilité entre donneurs et receveurs d'organes (35). De plus, la notion de fonctionnalité biologique est centrale au domaine (12). Depuis la première réussite de production d'un vaisseau entièrement biologique (32), les chercheurs ont espoir de pouvoir mettre au point un vaisseau produit *in vitro* entièrement biologique, vivant et autologue pour fournir des « pièces de remplacement » qui ont le potentiel d'être greffés (4). D'autres tissus tels que la peau (34), les tendons, les ligaments (36), la cornée (37), les os et le cartilage sont également le sujet de travaux de recherche sur la reconstruction de tissus par génie tissulaire.

#### **1.4.2 Propriétés du substitut vasculaire idéal**

Le substitut vasculaire idéal devrait d'abord être biocompatible. Autrement dit, son implantation ne devrait pas causer de réaction immunologique et il devrait être non-thrombogène. Il devrait de plus être résistant aux infections (24). L'implant devrait également permettre un processus de guérison acceptable qui n'entraîne pas de fibrose, d'hyperplasie intimale ou d'inflammation (23). Toutes ces propriétés sont intimement liées à la présence d'un endothélium confluent. Cette caractéristique est donc essentielle à une intégration de l'implant et à son remodelage par les cellules environnantes. L'implant devrait, du moins, pouvoir être recellularisé une fois implanté. L'objectif ultime est d'assurer une intégration parfaite de l'implant de telle sorte qu'il devienne identique aux vaisseaux natifs (23). Une des caractéristiques que partagent toutes les techniques présentement étudiées consiste à éliminer toute utilisation de matériel synthétique permanent (24) qui ne peut être absorbé une fois implanté ou qui présente des sous-produits de dégradation potentiellement dangereux.

Le substitut devrait également posséder des propriétés mécaniques appropriées. La viscoélasticité, mesurée entre autre par la compliance du vaisseau, et la résistance à l'éclatement sont les deux plus importantes (23). La compliance d'un vaisseau se définit comme étant la mesure de sa souplesse et de ses possibilités de distension élastique. Dans le cas des vaisseaux reconstruits considérés dans cette étude la compliance correspond à une différence de diamètre normalisée et mesurée entre 80 et 120 mmHg, soit les pressions diastolique et systolique du système sanguin normal chez l'humain. Les cellules musculaires lisses et l'élastine de la média déterminent la compliance du vaisseau (39). Idéalement, le substitut posséderait donc ces cellules et cette composante de matrice extracellulaire avant son implantation ou permettrait une invasion cellulaire post-implantation qui permettrait leur production *in vivo*.

La résistance à l'éclatement représente la pression maximale que peut supporter un vaisseau avant sa rupture complète. Encore une fois, le substitut devrait posséder les éléments de la matrice extra cellulaire de vaisseaux natifs qui procurent une rigidité ou résistance et une contractilité fonctionnelles au vaisseau sanguin.

Le substitut idéal ne devrait pas présenter de fluage permanent. Cette dernière propriété est définie comme étant une variation du diamètre dans le temps sous l'action d'une contrainte constante. Le substitut doit pouvoir résister aux contraintes mécaniques auxquels il est initialement soumis et s'y adapter progressivement. On associe souvent la formation d'anévrismes à un excès de fluage au-delà d'une limite supérieure ou à une trop grande compliance (23,24). L'élasticité du vaisseau de remplacement est donc essentielle pour éviter qu'il ne présente de fluage permanent (24) et elle dépend en grande partie de l'organisation et de la présence d'élastine dans la matrice extracellulaire (39).

À long-terme, le vaisseau devrait être capable de résister à une contrainte hémodynamique (22). La présence d'un endothélium confluent est intimement liée à cette propriété.

Le substitut idéal devrait également présenter une certaine perméabilité permettant le transport et l'absorption de molécules et de cellules du sang. Il devrait de plus présenter certaines propriétés physiologiques essentielles telles que la vasoconstriction et la vasodilatation (24).

D'un point de vue plus pratique, le substitut idéal devrait être facilement reproductible. Pour les besoins de la chirurgie, il doit être manipulable et posséder une bonne suturabilité. Il doit également être transportable (24). La présence de collagène et de constituants structuraux du vaisseau est grandement responsable de la tolérance du vaisseau à être manipulé et de sa résistance à l'éclatement *in vivo* (39).

De par leur structure et leur composition, les implants doivent servir deux fonctions. D'abord, ils doivent être des substituts vasculaires fonctionnels. Deuxièmement, ils doivent servir de gabarit pour le remodelage du vaisseau par les cellules environnantes. Tout en jouant un rôle de vaisseau fonctionnel, le substitut vasculaire doit guider l'alignement cellulaire et permettre une organisation de la matrice extracellulaire lors du remodelage. La biocompatibilité du substitut est donc primordiale pour permettre une adhérence et une invasion cellulaire menant à une résorption complète du biomatériau. Cette dernière action doit être synchronisée avec le remodelage dont la qualité détermine les propriétés

mécaniques, biologiques et de transport à long terme (24). En effet, si la méthode consiste à utiliser un échafaudage biocompatible et dégradable, sa vitesse de dégradation doit être contrôlée et optimisée pour permettre une invasion cellulaire tout en assurant l'intégrité de l'implant (42).

### **1.4.3 Matrices décellularisées**

L'utilisation d'échafaudages ou de *scaffolds* dérivés de matrice extracellulaire est largement répandue en génie tissulaire. Des traitements ont été mis au point pour permettre le retrait des cellules d'un tissu tout en laissant un mélange complexe de protéines fonctionnelles et structurales qui constituent la base de la matrice extracellulaire du tissu. Les propriétés structurales, la composition et le rejet ou non d'une greffe dépendent de nombreux facteurs dont l'origine et l'espèce du tissu décellularisé et les méthodes de décellularisation et de stérilisation. Le principe de base derrière cette technique repose sur le fait que ce sont les antigènes cellulaires qui causent le rejet de tissus xéno- ou allogéniques. L'absence de cellules élimine ce problème et simplifie l'application de la méthode en éliminant le besoin d'isoler et de cultiver des cellules humaines autologues (12). Les composantes de la matrice extracellulaire de tissus correspondants diffèrent peu d'une espèce à l'autre. Divers tissus tels que les valves cardiaques, les vaisseaux sanguins, la peau, les nerfs, les tendons et les muscles squelettiques ont tous été considérés pour des applications en génie tissulaire. L'objectif ultime d'une méthode utilisant une matrice décellularisée est donc de retirer tout le matériel cellulaire et nucléaire tout en minimisant les effets sur la composition, l'activité biologique et l'intégrité structurale de la matrice extracellulaire. La plupart des méthodes de décellularisation combinent des traitements physiques et chimiques. L'agitation, la sonification, la pressurisation, les massages mécaniques et le gel et dégel font partie des diverses méthodes physiques pour briser les membranes des cellules et faciliter leur extraction des tissus. Un traitement chimique à l'aide de détergents ou de solutions ioniques ou un traitement enzymatique tel la trypsination est généralement nécessaire pour complètement retirer les cellules. Cependant, les traitements que subissent les tissus peuvent évidemment altérer la composition, les propriétés mécaniques et la réponse immunitaire du receveur. Le retrait des protéines adhérentes des cellules et de

glycosaminoglycans peut ralentir la migration des cellules environnantes et l'activité biologique de la matrice implantée. Une altération dans le réseau de fibres de collagène peut grandement influencer la résistance des tissus. De plus, les traitements chimiques peuvent possiblement rendre la matrice implantée plus susceptible à une dégradation enzymatique *in vivo*(41). Plusieurs produits à base de tissus décellularisés tels que la peau, le SIS (*small intestinal submucosa*) porcine, la vessie de porc ainsi que des valves cardiaques porcines sont disponibles commercialement. Des essais d'implantation de substituts vasculaires avec un modèle animal ont été rapportés. Le SIS, qu'il soit utilisé dans une autogreffe, une allogreffe ou une xélogreffe, démontre une excellente biocompatibilité, une endothélialisation complète de la paroi et une structure tri-couche possédant une média et une adventice (44) lorsqu'implanté dans un chien normal. Il faut toutefois noter que la réponse des cellules endothéliales, particulièrement leur degré d'adhérence à la paroi interne du vaisseau diffère sensiblement entre le chien et l'humain. Plusieurs expériences faites avec des modèles animaux ont eu pour résultat le maintien d'une perméabilité élevée après l'implantation pour plusieurs semaines (74-76). Cependant, il demeure difficile d'établir clairement si ces résultats sont vraiment attribuables à l'ensemencement initial de la lumière du greffon avec des cellules endothéliales ou plutôt à une endothélialisation spontanée provenant des cellules de l'hôte. La question se pose d'autant plus que chez l'humain la ré-endothélialisation des greffons vasculaires est inefficace, lente et presque jamais complétée (77,78). L'absence d'un endothélium sur les implants en SIS est donc possiblement un désavantage majeur de la méthode pour une application clinique, et la réponse immunitaire et la thrombogénicité lors de son implantation dans l'humain restent inconnues (12).

#### **1.4.4 Substituts à base de gels de collagène et de fibrine**

La première utilisation de gels de collagène pour la fabrication de substituts vasculaires remonte à 1986 (32). Il avait alors été démontré qu'il était possible de reconstruire une adventice à partir de fibroblastes et de collagène, une média à partir de cellules musculaires lisses et de collagène et un tube enduit d'une monocouche de cellules endothéliales (12). Brièvement, la méthode de fabrication de ces substituts tissulaires consiste d'abord à

suspendre les cellules dans une solution homogène de collagène solubilisé. Le collagène est ensuite neutralisé, initiant un réassemblage spontané de la protéine en un gel. Une réorganisation de la matrice par les cellules contracte la matrice de collagène modifiant ainsi sa densité et son intégrité structurale. Le procédé est le même dans le cas de la fibrine mais nécessite également l'ajout d'une solution de thrombine pour catalyser la formation de fibres à partir des monomères de fibrine (82,84).

Depuis, la fibrine s'est également avérée comme une matrice et un enduit intéressants, particulièrement pour le degré d'adhésion et le milieu de croissance favorable qu'elle offre aux cellules endothéliales (45). La possibilité de réticuler certaines molécules, telles que des facteurs d'adhésion ou de croissance comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) qui améliorent la maturation et la prolifération des cellules endothéliales, ajoute au potentiel d'utilisation de la fibrine (49, 50). De plus, le fibrinogène, molécule précurseur de fibrine polymérique, peut être extrait du sang humain et purifié, fournissant ainsi une source autologue de protéines pour le tissu et du même coup éviter une réaction immunologique (51). Les cellules musculaires lisses ont aussi une meilleure production de collagène lorsqu'elles sont ensemencées dans une matrice de fibrine que dans le collagène (56).

Le collagène constitue la majeure partie de la matrice extracellulaire de la plupart des tissus (23). Le collagène de type I reconstitué est utilisé pour générer plusieurs types de tissus par génie tissulaire tels que des tendons, des ligaments (36) et des substituts vasculaires (46). Ce type de vaisseau s'est révélé comme étant un modèle particulièrement utile pour l'étude des interactions entre les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales de la média (19). Tirant profit de la possibilité de modifier la composition, la géométrie et la microstructure des gels de collagène dans lesquels sont ensemencées des populations de fibroblastes, les interactions cellules-matrices, la mécanique des échanges entre les cellules et la matrice et la mécano-biologie peuvent être étudiées en profondeur (19).

Les caractéristiques finales des matrices de biopolymère et les substituts qu'elles produisent dépendent de nombreuses variables. Le type de biopolymère, sa densité, la porosité, le diamètre, l'organisation et la tension de ses fibres sont toutes des variables importantes. Le

type et la source cellulaires, l'espèce de laquelle elles proviennent, leur âge, passage, nombre et les conditions de culture sont aussi à considérer. L'accessibilité aux nutriments que le milieu offre aux cellules, les facteurs autocrines et la stimulation mécanique sont d'autres variables importantes (59). D'autres variantes de la méthode telles que l'enroulement de feuillets autour d'un mandrin pour favoriser la compaction du collagène (52), un pré-alignement magnétique des fibres de collagène pour augmenter la résistance à la traction (53), la glycation pour augmenter la tension des fibres des gels de collagène (27) et l'utilisation de bioréacteurs spécialisés ont été développées pour améliorer les propriétés mécaniques des substituts(79). L'ajout d'insuline et de facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$  augmente la production de collagène (59).

Cette méthode présente les avantages d'utiliser une matrice biologique qui permet le remodelage par les cellules, offre la possibilité d'une vasoactivité fonctionnelle et offre un bon environnement pour l'attachement ainsi que la signalisation cellulaire (12). De plus, l'implantation du collagène bovin de type I a déjà été approuvée par la FDA (*Food and Drug Administration*) et est utilisée dans la fabrication du substitut épidermique Apligraf (Organogenesis Inc.) (23). Cependant, les propriétés mécaniques que présentent les substituts produits à base de collagène et la fibrine sont inadéquates pour qu'ils soient implantés seuls (19). Une pression d'éclatement très basse par rapport à celles des substituts produits par d'autres méthodes implique que d'autres composantes doivent être ajoutées à la matrice (47) ou qu'elle doit être enveloppée d'un support (48), souvent en Dacron. Malgré cet ajout, les substituts ne possèdent pas une résistance à l'éclatement assez élevée pour permettre une implantation *in vivo* (4). De plus, l'ajout de cette matière synthétique annule l'avantage qu'avait la technique d'utiliser uniquement des composantes biologiques et biodégradables et empêche une intégration complète de l'implant parmi les tissus natifs (19).

À ce jour, aucun substitut autre que certains vaisseaux produits par génie tissulaire ne possède les caractéristiques mécaniques requises pour son implantation (4,19). Pour qu'une technique soit acceptée pour une application clinique, la reconstruction *in vitro* exigera une meilleure réorganisation de la matrice de collagène pour améliorer ses propriétés

mécaniques et sa suturabilité. La technique devra également démontrer que les substituts reconstruits présentent une vasoactivité in vitro (12).

#### **1.4.5 Substituts avec une matrice polymérique biodégradable**

L'utilisation d'un polymère biodégradable repose sur le principe d'ensemencer des cellules dans une matrice biodégradable qui pourra assurer la croissance du tissu et un remodelage adéquat. Idéalement, la résorption du polymère doit se faire lentement laissant derrière lui seulement le tissu généré par les cellules exposées aux contraintes du vaisseau. Les substituts sont ensemencés et cultivés dans des milieux de culture enrichis d'acide ascorbique, de proline, d'alanine et de glycine. Ces additifs favorisent le développement de matrice extracellulaire et une signalisation biochimique adéquate (61).

L'avantage de cette méthode réside principalement dans la possibilité de contrôler précisément les propriétés mécaniques, la microstructure et le taux de résorption de la matrice par sa composition chimique. De plus, son taux de reproductibilité est très élevé et le polymère peut fournir une première structure fonctionnelle jusqu'à ce qu'elle soit remplacée par la matrice extracellulaire des cellules avoisinantes du vaisseau. On rapporte également des pressions d'éclatement élevées et de bonnes caractéristiques histologiques (61).

L'acide polyglycolique (PGA) est le polymère le plus utilisé dans cette méthode. Sa grande porosité est favorable à l'infiltration et l'adhérence cellulaire et au dépôt d'une matrice extracellulaire (61,62). Cependant, son taux de résorption accéléré présente un certain risque associé à une dégradation prématurée et un affaiblissement des tissus avant que les cellules n'aient pu reconstituer une matrice complète. Sa dégradation incomplète a également un effet négatif sur les propriétés mécaniques des vaisseaux en introduisant de petites vésicules ou des inhomogénéités dans la matrice extracellulaire, ce qui peut réduire le degré de suturabilité des tissus (39). De plus, l'obtention de propriétés mécaniques intéressantes nécessite une période de maturation de plusieurs semaines (23, 60). La pression d'éclatement élevée des substituts est obtenue au détriment de leur élasticité (60).

De manière à optimiser ses propriétés et les interactions qu'elle présente avec les cellules, de nombreux autres polymères ont été co-polymérisés avec le PGA (23). La détermination des conditions de culture pose un défi de taille à l'application de cette méthode et elle est nécessaire à l'obtention de substituts fonctionnels. De plus, la méthode exige une période de maturation de 8 semaines *in vitro* avant de produire des substituts possédant des caractéristiques acceptables. Une diminution de délai de production ajouterait à l'attrait de cette méthode tout en réduisant le coût. Finalement, le degré d'adhérence des cellules endothéliales à la matrice et le degré de dégradation du polymère suite à une implantation sont encore peu connus (12).

#### **1.4.6 Substituts produits par la méthode d'auto-assemblage**

##### **1.4.6.1 Principe de la méthode**

La méthode d'auto-assemblage décrite par le LOEX permet de reconstruire des tissus en utilisant uniquement des cellules provenant d'une biopsie (34). Contrairement aux autres méthodes présentées jusqu'à maintenant, la méthode d'auto-assemblage permet d'obtenir des tissus tridimensionnels complètement autologues et exempts de matrice ou matériaux exogènes. Cette méthode exploite la capacité qu'ont les cellules mésenchymateuses à produire elles-mêmes leur matrice extracellulaire de manière endogène lorsque cultivées en présence de sérum et d'acide ascorbique. Cette méthode a été appliquée pour reconstruire des substituts vasculaires complètement autologues (4). Ces implants, composés exclusivement de matériaux biologiques et autologues présentent plusieurs avantages théoriques. Premièrement, un implant vivant répond aux stimuli extérieurs et présente un potentiel de renouvellement des cellules accru lors du processus de guérison. Deuxièmement, la matrice biologique implantée peut être reconstruite ou modifiée par les cellules du corps selon les besoins de l'environnement. Troisièmement, l'absence totale de matières synthétiques élimine le risque de réaction immunitaire, permet une intégration parfaite du tissu, limite les chances d'infections et la présence de l'endothélium autologue peut diminuer grandement les chances d'occlusion. D'un côté scientifique plus fondamental, l'utilisation de la méthode d'auto-assemblage permet d'étudier directement le comportement cellulaire et les propriétés des tissus entièrement endogènes, ce que ne permettent pas les autres méthodes qui utilisent des biomatériaux, ces derniers interfèrent

avec les mesures. Les substituts produits par auto-assemblage présentent une histologie, une composition de la matrice extracellulaire, une différenciation et une fonctionnalité cellulaires qui se rapproche de celles de vaisseaux natifs. De plus, leur potentiel d'implantation à court-terme a été démontré avec un modèle canin (4).

#### **1.4.6.2 Description de la méthode**

Les détails de la méthode d'auto-assemblage et d'isolement de cellules sont expliqués exhaustivement dans la littérature (4, 8, 9, 10, 11, 63). Néanmoins, voici une description sommaire de la méthode.

#### **1.4.6.3 Extraction, isolement et culture cellulaire**

La production de vaisseaux complets par la méthode d'auto-assemblage nécessite l'extraction et la culture de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses et de fibroblastes. Ces cellules forment respectivement l'endothélium, la média et l'adventice des vaisseaux reconstruits.

Les cellules endothéliales sont extraites de veines ou d'artères de cordons ombilicaux, ou de veines saphènes par digestion enzymatique, massages mécaniques et/ou perfusion ou par grattage avec un scalpel. Elles sont ensuite recueillies etensemencées dans le fond de flacons gélatinés et contenant un milieu de culture pour cellules endothéliales (M199) contenant du sérum de veau fœtal, un supplément de facteurs de croissance pour cellules endothéliales et des antibiotiques. Ces derniers sont ajoutés pour prévenir la contamination des cultures.

Les cellules musculaires lisses sont isolées par explantation suivant la méthode de Ross (64) et cultivées en flacons gélatinés dans du milieu contenant du sérum de veau fœtal et des antibiotiques.

Les fibroblastes sont extraits de peaux normales adultes humaines obtenues lors de réductions mammaires ou d'adventice de vaisseaux obtenus par biopsie comme dans le cas de la média. Dans ce deuxième cas, leur mise en culture suit le même protocole que pour

les cellules musculaires lisses. Lorsque les fibroblastes sont d'origine dermique, les morceaux de peau sont découpés en plus petits morceaux et suspendus dans une solution de thermolysine pour séparer le derme et l'épiderme. Le derme est recueilli, découpé en petits morceaux et incubé dans une solution de collagénase. Vingt heures plus tard, les cellules sont centrifugées etensemencées dans des flacons gélatinés contenant du milieu de culture.

#### **1.4.6.4 Production de TEBV**

De manière à induire la production d'une matrice extracellulaire par les cellules musculaires lisses et les fibroblastes, de l'acide ascorbique est ajoutée au milieu de culture à une concentration de 50 ug/ml. Le mécanisme d'action de l'acide ascorbique est largement décrit dans la littérature (65,66) et ne sera que très brièvement abordé ici. L'acide ascorbique contribue à plusieurs processus métaboliques tels que l'hydroxylation de la proline dans l'élastine, le collagène et les protéines contenant des domaines collagéniques. Alors qu'il augmente la production de collagène, il a un effet contraire sur la production d'élastine. Ce mécanisme s'opère principalement par un effet opposé sur la stabilité de l'ARN messager du collagène et de l'élastine, cette deuxième protéine étant affectée négativement.

Suivant une période de maturation de plusieurs semaines dans les flacons contenant du milieu de culture enrichi d'acide ascorbique, les cellules produisent suffisamment de matrice extracellulaire pour former des feuillets manipulables. Ils sont alors enroulés autour d'un mandrin auquel ils n'adhèrent pas. Suivant une deuxième période de maturation, les couches du feuillet roulé se fusionnent et forment un tube qui peut servir pour fins d'analyse des propriétés mécaniques et à la construction d'un substitut vasculaire.

La méthode initialement décrite pour la production de vaisseaux sanguins complets produits par auto-assemblage commence par la fabrication d'un feuillet de fibroblastes qui est ensuite enroulé autour d'un mandrin et déshydraté. La présence de cette première couche acellulaire procure une surface d'adhésion pour les cellules endothélialesensemencées plus tard dans le processus. Des feuillets de cellules musculaires lisses sont

produits et enroulés sur le mandrin perforé et la couche acellulaire pour former une média. Après une semaine de maturation dans un milieu de culture riche en nutriments, un feuillet de fibroblastes est enroulé sur la média pour former l'adventice. Après une période de maturation de 8 semaines, les vaisseaux sont retirés des bioréacteurs et canulés pour procéder à l'ensemencement de cellules endothéliales. On fait alors circuler une solution de cellules endothéliales en suspension qui adhèrent à la matrice déshydratée et qui formeront plus tard un endothélium (52). Durant toutes les étapes de maturation précédentes, les tissus sont cultivés dans du milieu de culture contenant de l'acide ascorbique. Pour cette dernière étape, un milieu de culture de cellules endothéliales est utilisé. En tout, la production de ces substituts vasculaires nécessite environ 3 mois, ce qui n'inclut pas le temps nécessaire à l'expansion cellulaire initiale pour produire les banques de cellules (4).

#### **1.4.7 Limitations du génie tissulaire**

Jusqu'à présent, l'obtention simultanée de plusieurs caractéristiques mécaniques d'ordre physiologique s'est révélée comme étant un des grands défis dans la mise au point de substituts vasculaires produits par génie tissulaire. Par exemple, une résistance élevée à l'éclatement implique souvent une faible compliance (27) et vice versa. L'obtention d'une média composée de cellules musculaires lisses, de fibres de collagène et d'élastine s'est également avérée être difficile. Ceci s'explique entre autres par les effets contraires qu'a l'acide ascorbique sur la production de collagène et d'élastine. Le degré élevé d'immunogénicité des cellules endothéliales pose un sérieux obstacle à l'utilisation de cellules non-autologues sans immunosuppression. Ceci limite le potentiel de la méthode à devenir une solution universelle et à faible coût habituellement associée aux méthodes de production de masse.

Son degré de reproductibilité, l'établissement de critères pour le contrôle de qualité, le faible coût, la fiabilité des bioréacteurs utilisés pour la stimulation mécanique et le degré d'efficacité des méthodes de cryoconservation pour le transport des implants sont également des limitations éventuelles à la fabrication de substituts vasculaires par génie tissulaire (24). Le défi que représente le passage de la production de substituts en laboratoire à une production de masse reste de grande taille, surtout en ce qui a trait aux

conditions nécessaires à la culture de grandes quantités de cellules. Le maintien de la stérilité des milieux de production pose d'autres défis, quoi que ce soit le cas pour toutes les méthodes présentées ici. Le temps qu'exigent certaines méthodes de reconstruction de tissus par génie tissulaire est relativement long. Ce facteur limitant réduit sa disponibilité immédiate et son attrait pour des applications cliniques et commerciales (42). Toute utilisation d'une matrice biologique exogène ou de biomatériaux dégradables exige un suivi de leur dégradation. Peu de détails sont connus au sujet de la vitesse et du degré final de dégradation de ces matrices. Les risques que ceci entraîne, lorsque la résistance maximale est près du seuil acceptable, exigent un suivi serré de ces paramètres et l'utilisation de méthodes relativement compliquées comme le marquage au carbone 14 (43).

À l'exception de la méthode d'auto-assemblage, toutes les méthodes de fabrication de substituts vasculaires présentées jusqu'à présent incorporent des matériaux synthétiques. Malgré les énormes progrès réalisés dans le domaine des biomatériaux, aucune méthode n'a réussi à produire un implant parfaitement biocompatible pour le remplacement, la réparation ou la reconstruction d'un vaisseau sanguin.

Le chapitre suivant décrit les propriétés mécaniques mesurées pour déterminer la capacité qu'a une méthode de fabrication de produire des substituts vasculaires possédant des caractéristiques semblables à celles des vaisseaux natifs. Il est important de pouvoir effectuer ces mesures de façon répétable et précise en recherche et cet aspect doit être considéré lors de la conception d'un nouvel appareil. Un tel système représente un outil important pour un laboratoire de recherche puisqu'il permet 1. de mesurer les propriétés mécaniques des vaisseaux produits par la méthode d'auto-assemblage, 2. d'évaluer la capacité de la méthode utilisée à produire des substituts possédant des caractéristiques intéressantes pour une application clinique ou pour servir comme modèle d'étude, 3. d'évaluer la contribution de chaque couche cellulaire d'un substitut vasculaire, 4. de mesurer les effets de, entre autres, la stimulation mécanique, les agents pharmacologiques et les interactions entre plusieurs types cellulaires sur les propriétés mécaniques d'un vaisseau reconstruit, 5. d'évaluer le degré d'intégration et le remodelage d'un vaisseau reconstruit implanté dans un animal, 6. de comparer les propriétés d'un substitut avant et

après son implantation, 7. de mesurer les propriétés mécaniques d'autres substituts de même géométrie (cylindrique) tel que l'urètre, 8. d'identifier d'autres indicateurs non-destructifs de la maturité d'un substitut vasculaire. Plus précisément, cette étude cherchait à développer un système capable de mesurer la pression d'éclatement, la compliance de substituts produits par différentes variantes de la méthode d'auto-assemblage et d'effectuer des essais de fluage et de fatigue sur ces mêmes substituts. Le système a été évalué dans le cadre d'une étude qui cherchait à mesurer les propriétés mécaniques de la média, de l'adventice et de substituts constitués des deux couches.

# **Chapitre II - Propriétés mécaniques des vaisseaux et leur caractérisation, conception du montage expérimental**

## ***Section 2.1 - L'importance des propriétés mécaniques***

L'évaluation des propriétés mécaniques de substituts vasculaires telles que l'élasticité et la résistance à l'éclatement est fondamentale pour la validation de modèles théoriques, la compréhension du comportement des vaisseaux et la mise au point de techniques de fabrication de substituts vasculaires (38). Dans le cadre de greffes expérimentales sur des modèles animaux, l'évaluation des propriétés mécaniques telles que la pression d'éclatement, la compliance et le module d'élasticité avant l'implantation permet également de quantifier le degré d'intégration et l'efficacité de remodelage que présentent les substituts en évaluant ces mêmes propriétés suite à leur extraction (5). Tel que décrit dans le chapitre précédent, le degré de ressemblance histologique et mécanique des substituts vasculaires aux vaisseaux natifs guide en grande partie leur degré de fonctionnalité et d'intégration suite à la greffe. Ce sont, entre autres, les incompatibilités entre les propriétés mécaniques des implants et celles des vaisseaux auxquels ils sont anastomosés qui perturbent le flux sanguin et empêchent la formation d'un bel endothélium, endommagent la paroi des vaisseaux natifs et mènent à des complications telle qu'une hyperplasie intimale ou un anévrisme. Ceci est particulièrement vrai dans le cas des implants faits de matériaux synthétiques tels que le Dacron et le ePTFE. Un des objectifs de la reconstruction de vaisseaux par génie tissulaire est donc de produire des substituts avec des propriétés mécaniques similaires à celles des vaisseaux natifs auxquels ils sont anastomosés. L'évaluation et l'étude des propriétés mécaniques des substituts est une étape essentielle à l'atteinte de cet objectif.

Au-delà du développement de tissus et d'organes dans le but d'une application clinique, le génie tissulaire a d'autres objectifs importants. Un de ceux-ci consiste à mettre au point des modèles d'études théoriques et physiques, non seulement pour étudier l'activité cellulaire

mais également pour fournir un outil d'évaluation systématique. En effet, l'évaluation des propriétés mécaniques permet de quantifier l'influence que peut avoir un traitement pharmacologique ou une stimulation mécanique lors de la culture *in vitro* de tissus et vaisseaux. L'optimisation des méthodes de fabrication passe d'abord par une évaluation en laboratoire qui permet de mieux prévoir les performances *in vivo* des implants.

## ***Section 2.2 - Propriétés mécaniques et méthodes d'évaluation***

### **2.2.1 Pression d'éclatement**

La pression d'éclatement est la pression interne à laquelle le vaisseau peut résister avant qu'une fuite n'apparaisse et que le conduit éclate (3). La force axiale maximale  $f$  ou tension à laquelle un conduit vasculaire à paroi mince peut être soumis est donnée par

$$f = \frac{Pd}{2t} \quad (1)$$

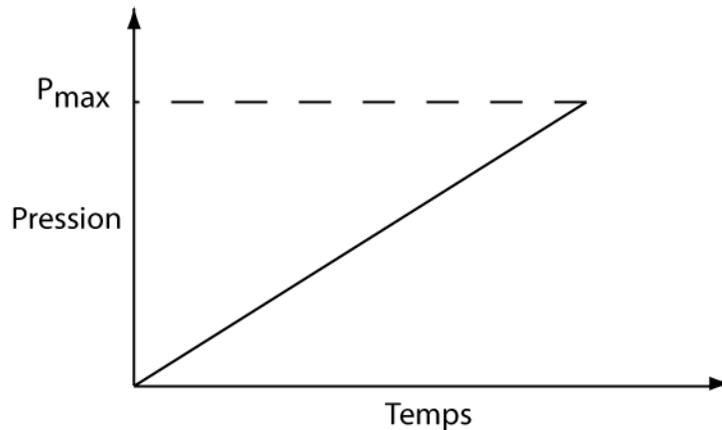
où  $P$ ,  $d$  et  $t$  sont respectivement la pression d'éclatement, le diamètre et l'épaisseur du vaisseau (3). L'équation (1) provient de la relation utilisée pour calculer la contrainte axiale exercée sur un conduit à paroi mince. La force  $f$  représente ici la limite ultime au-delà de laquelle il y a rupture du conduit. Présentée autrement, cette relation donne

$$P = \frac{f2t}{d} \quad (2)$$

L'étude de cette dernière relation nous permet de constater que pour une force constante, la pression d'éclatement est inversement proportionnelle au diamètre du vaisseau et proportionnelle à l'épaisseur de sa paroi(3). Par exemple, la carotide, qui possède une pression d'éclatement d'environ 5000 mmHg, a une paroi plus épaisse que celle de la veine saphène qui elle a une pression d'éclatement d'environ 2250 mmHg. Ceci est explicable par le fait que la carotide a un rôle beaucoup plus actif à jouer dans la circulation sanguine que la veine saphène, d'où une paroi plus épaisse et davantage de cellules musculaires lisses.

La pression d'éclatement est une des quatre propriétés mécaniques que mesure le montage de caractérisation mis au point dans le cadre de cette étude. Cette propriété est évaluée en pressurant le vaisseau en y injectant un fluide à un taux fixe jusqu'à ce qu'il éclate. La

pression maximale enregistrée à l'intérieur d'un vaisseau par un manomètre durant un essai correspond à sa pression d'éclatement ( $P_{max}$  sur la Figure 2.1).



**Figure 2.1 : Consigne de pression pour un essai d'éclatement**

En plus de fournir des données sur une propriété mécanique précise, les essais d'éclatement fournissent des données qualitatives. Ce genre d'essai peut effectivement servir à évaluer la capacité qu'a une méthode de fabrication à produire des vaisseaux présentant une bonne intégrité structurale. En effet, la réalisation d'un essai d'éclatement sur un substitut vasculaire exige qu'il soit parfaitement étanche, qu'il ne présente pas de défauts de fabrication, qu'il résiste à une manipulation lors de son installation dans le système de mesure et que les différentes couches cellulaires soient fusionnées les unes aux autres dans le cas de la méthode d'auto-assemblage. Tous ces renseignements sont de première importance lorsqu'on désire évaluer le potentiel d'application clinique d'un vaisseau reconstruit.

### **2.2.2 Compliance**

Lors de leur production *in vitro*, il importe de produire des substituts vasculaires possédant des propriétés mécaniques semblables à celles des vaisseaux natifs auxquels ils sont anastomosés. En plus de la résistance à l'éclatement, la viscoélasticité des vaisseaux est de première importance lors de leur implantation. Elle est essentielle au maintien d'un flot sanguin régulier dans le vaisseau. Un manque de compliance a entre autres été associé à une hypertrophie artérielle aux lieux d'anastomoses (67). La viscoélasticité des vaisseaux est habituellement exprimée en termes de compliance et elle est définie comme étant la

mesure de la souplesse et des possibilités de distension d'un réservoir élastique (31). Physiquement, la compliance se définit comme la variation de volume provoquée par une augmentation de la pression, telle qu'exprimée par la relation suivante

$$C = \Delta V / \Delta P \quad (3)$$

Dans le cadre de ces expériences, la longueur du substitut est considérée constante, de par un manque de moyen efficace de mesurer sa longueur durant l'essai. De plus, toutes les mesures de compliance sont effectuées entre 80 et 120 mmHg. Ceci nous permet d'éliminer le terme  $\Delta P$  puisque tous les calculs de compliance ont été normalisés pour un  $\Delta P$  de 40 mmHg.

Partant de la relation du module d'élasticité

$$E = \frac{\textit{tension}}{\textit{déformation}} = \frac{Pd/2t}{\Delta d/d} \quad (4)$$

on retrouve une expression pour la compliance, soit

$$\frac{\Delta d}{d} = \left( \frac{P}{E} \right) \left( \frac{d}{2t} \right). \quad (5)$$

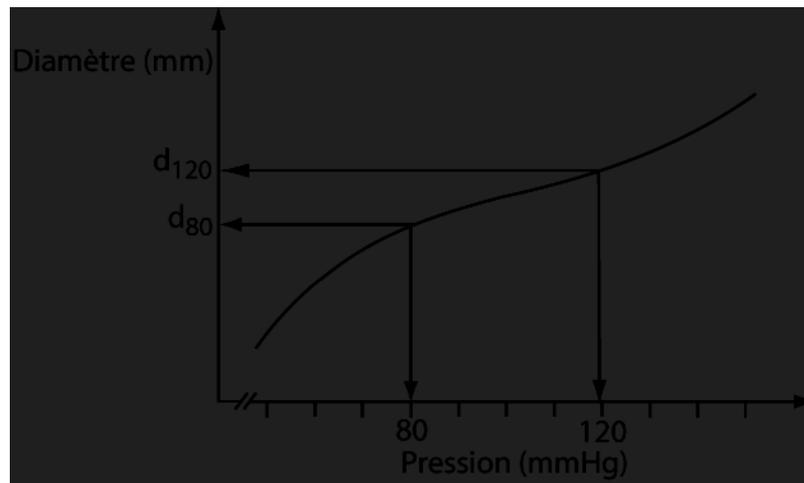
Exprimée de cette façon, la relation nous aide à comprendre que la compliance dépend non seulement du module d'élasticité du vaisseau, mais également du rapport entre son diamètre et l'épaisseur de sa paroi (5). Le module d'élasticité est pour des matériaux élastiques, comme son nom l'indique, le rapport entre la variation de contrainte et la variation de déformation, établi à l'intérieur d'une limite proportionnelle (31) à la suite de laquelle se produit une déformation plastique ou irréversible. Quoique cette propriété ne soit pas abordée ici, il importe de la mentionner comme un des paramètres clés dans la caractérisation des propriétés mécaniques. Cette relation nous renseigne donc sur les paramètres importants à considérer et qui peuvent faire varier la compliance des vaisseaux. Par exemple, la paroi d'un substitut artériel devrait être plus épaisse que celle d'un substitut veineux puisque ce dernier participe de manière moins active à la circulation sanguine.

Dans le cadre de cette étude, la mesure précise de la compliance du vaisseau est effectuée en analysant des images du vaisseau enregistrées par une caméra CCD. L'acquisition

synchronisée de données de pression et d'images permet de corréler les deux types de données et calculer la déformation radiale produite par une augmentation de pression. De manière à évaluer les performances du vaisseau dans des conditions physiologiques, le calcul de compliance s'effectue en utilisant les diamètres du vaisseau aux pressions diastolique et systolique de 80 et 120 mmHg telle qu'illustré sur la Figure 2.2. La compliance est donnée par la formule suivante :

$$C = \frac{\Delta d}{d_{initiale}} \times 100\% = \frac{d_{120} - d_{80}}{d_{80}} \times 100\% . \quad (6)$$

La compliance des vaisseaux est donc considérée comme étant le rapport entre la variation du diamètre d'un vaisseau pour une variation de pression donnée.

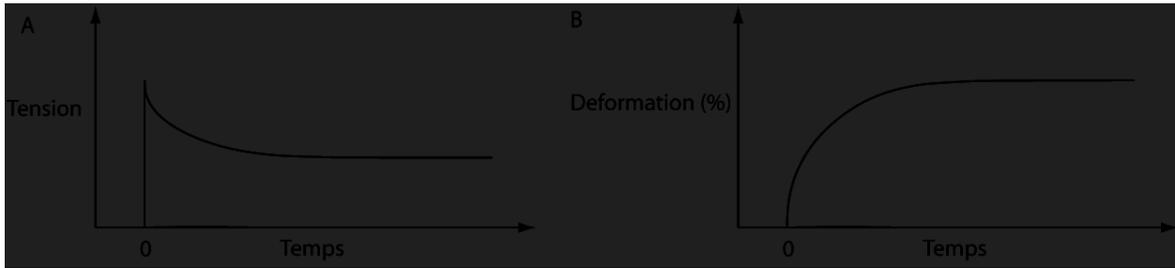


**Figure 2.2 : Exemple d'une déformation viscoélastique : courbe de variation de diamètre en fonction de la pression**

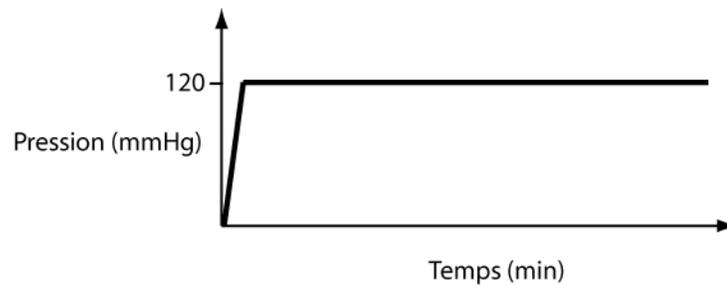
### 2.2.3 Fluage

Le fluage se définit comme étant la déformation progressive d'un corps sur lequel agit une contrainte constante. L'importance de mesurer le fluage d'un vaisseau reconstruit s'explique par la nécessité qu'il ne présente pas de déformation progressive ou constante une fois implanté. Le manque de rigidité que présentent certains types de vaisseaux est directement lié à la formation d'anévrisme ou même à leur rupture complète (18). La

réaction typique d'un tissu qui subit une force constante est d'exercer rapidement une tension qui, par la suite, décroît dans temps tel qu'indiqué sur la Figure 2.3A (69).



**Figure 2.3:(A) Tension exercée par un tissu sous tension en fonction du temps; (B) Déformation d'un tissu sous tension en fonction du temps**



**Figure 2.4 : Courbe de pression pour un test de fluage**

Cette chute progressive de tension manifestée par le tissu est appelée une relaxation de tension et est expliquée par le comportement viscoélastique que présente ce genre de matériau.

Le diamètre du vaisseau sert de paramètre pour mesurer la déformation causée par l'application d'une contrainte de pression interne constante telle que celle représentée dans la Figure 2.4. Plutôt que de mesurer la chute de tension que la paroi du vaisseau subit dans le temps, la variation de diamètre du vaisseau est enregistrée. La courbe théorique à laquelle on s'attend est donc l'inverse de celle de la tension, telle que montrée dans la Figure 2.3 B. Cette courbe permet de calculer une constante de temps qui détermine le délai nécessaire pour que le vaisseau cesse de se déformer. Une constante de temps plus courte est souhaitable puisque cela démontrerait une adaptation rapide du vaisseau suivant son implantation. Cependant, une augmentation trop rapide du diamètre du vaisseau pourrait

laisser supposer que son élasticité est trop élevée pour maintenir une pression sanguine constante lorsqu'implanté.

La variation de diamètre du vaisseau dans le temps est évaluée par l'analyse d'images prises à des intervalles réguliers pendant au moins une heure. Encore une fois, l'évaluation des propriétés mécaniques des substituts vasculaires exige qu'ils soient soumis à des conditions d'ordre physiologique. Les substituts ont donc été exposés à une pression physiologique normale de 120 mmHg ou celle mesurée chez certaines personnes souffrant d'hypertension, soit 200 mmHg (1). Ces valeurs représentent les maximums de leurs intervalles respectifs et ont été choisies pour caractériser le comportement viscoélastique des substituts dans les pires conditions possibles. Le fluage que présente un vaisseau est donné par

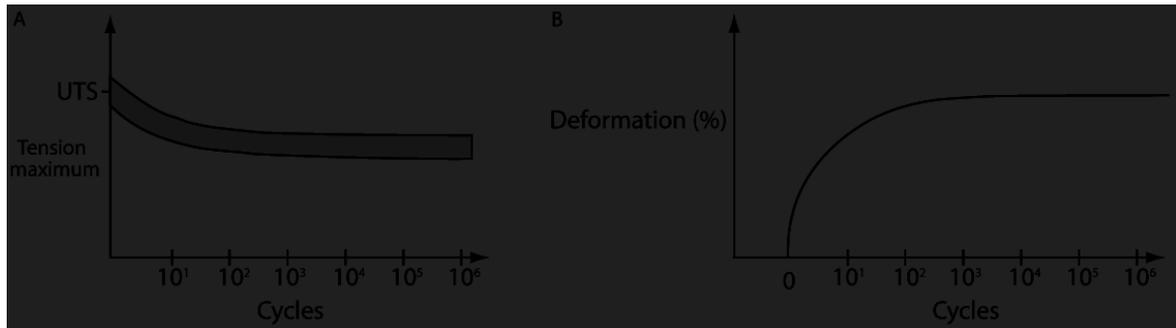
$$Fluage = \frac{d - d_0}{d_0} \times 100\% \quad (7)$$

où  $d$  est le diamètre tel que mesuré sur l'image et  $d_0$  est le diamètre de départ. Cette valeur est typiquement de 4.6 mm, soit le diamètre du mandrin sur lequel sont entourés les feuillets cellulaires.

#### **2.2.4 Fatigue**

La dernière propriété mécanique importante à mesurer est la fatigue. Le phénomène de fracturation par fatigue n'est pas nouveau en génie tissulaire. En effet, les valves cardiaques et les articulations prothétiques sont souvent la cible de fracture ou de rupture par fatigue. Ce genre d'événement se produit lorsqu'un matériau est soumis à une tension cyclique répétitive, même si cette tension est beaucoup plus faible que sa tension de rupture. Soumettre un matériau à un grand nombre de cycles peut produire des microfissures qui se propagent progressivement suite à l'effet cumulatif de minuscules changements qui apparaissent avec chaque cycle. Les tensions ressenties dans le matériau se concentrent aux extrémités des ces microfissures et leur amplitude dépasse les limites du matériau puisqu'elles sont concentrées sur de très petites régions. Ceci mène ultimement à une rupture complète.

Les vaisseaux sanguins étant eux aussi continuellement soumis à des cycles de pression dans le corps, l'évaluation de la résistance à la fatigue des substituts vasculaires est une donnée essentielle dans l'analyse de leurs propriétés mécaniques. Dans des conditions normales, l'action de pompage répétitif du cœur fait continuellement varier la pression sanguine entre les valeurs systolique et diastolique de 80 et 120 mmHg. Ces pressions sont plus élevées chez les personnes souffrantes d'hypertension. La résistance d'un matériau à la fatigue est habituellement déterminée en soumettant un nombre d'échantillons à un grand nombre de cycles de tension ou de pression jusqu'à leur rupture. On peut alors obtenir une courbe comme celle de la Figure 2.5A. Cependant, dans le cas de substituts vasculaires, il est intéressant d'évaluer leur comportement lorsque soumis à des contraintes d'ordre physiologique.



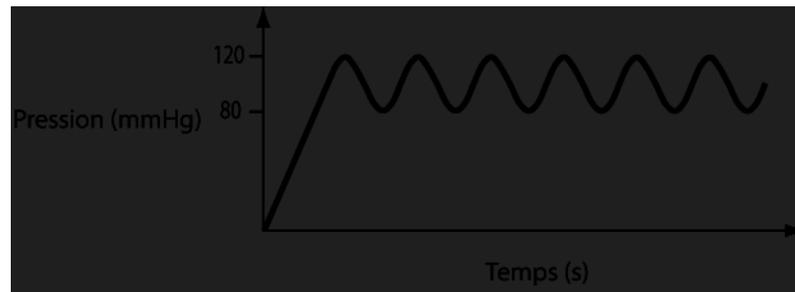
**Figure 2.5 : (A) Force de rupture en fonction du nombre de cycles; (B) Déformation en fonction du nombre de cycles**

La fréquence de variation de la pression interne des substituts soumis aux essais de fatigue est fixée à 1 cycle par seconde pour la faire correspondre à une condition physiologique de 60 battements cardiaques par minute. La pression théorique à laquelle les substituts sont exposés correspond donc à une onde sinusoïdale d'une amplitude de 20 mmHg autour d'une valeur moyenne de 100 mmHg et ayant une fréquence de 1 hertz. La Figure 2.6 donne un exemple de ce type d'onde, qui est décrite par la relation

$$P(t) = 100 + 20 \sin(2\pi t) \quad (8)$$

et dont les valeurs sont exprimées en mmHg. Une rampe de pression augmente la pression interne du substitut jusqu'à la valeur de stimulation minimale avant que ne commence la

stimulation sinusoïdale. La déformation des vaisseaux est évaluée pour des périodes d'une, deux ou trois heures.



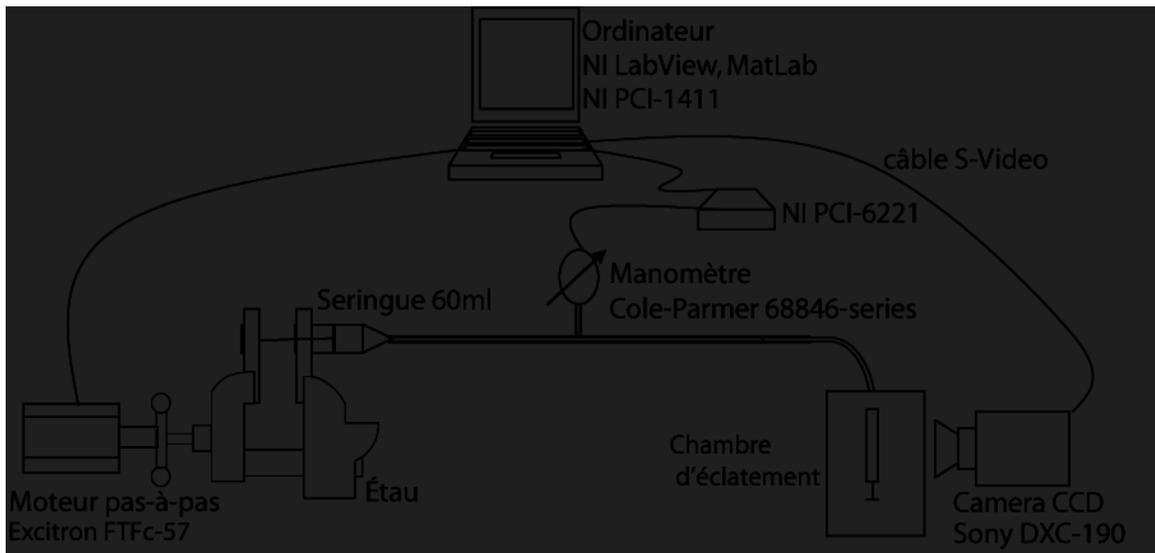
**Figure 2.6 : Variation de pression durant un essai de fatigue**

### ***Section 2.3 - Conception et description du montage***

C'est en gardant à l'esprit l'évaluation des propriétés mécaniques des substituts vasculaires produits par la méthode d'auto-assemblage que s'est effectuée la conception du montage expérimental de la présente étude. Un système capable de mesurer la pression d'éclatement ainsi que la compliance de substituts vasculaires, et pouvant les soumettre à des essais de fluage ainsi que de fatigue a donc été conçu.

Pour effectuer la mesure de pression d'éclatement, l'instrument doit donc être capable d'augmenter la pression interne du vaisseau à un taux constant, d'enregistrer les variations de pression et de sauvegarder les données à analyser. Pour la mesure de la compliance, l'instrument doit pouvoir suivre avec suffisamment de précision les variations de diamètre du vaisseau et sauvegarder les données à analyser. Les essais de fatigue et de fluage impliquent également un contrôle constant de la pression interne du vaisseau et l'enregistrement de son diamètre. La section suivante décrit chaque composante du montage de la Figure 2.7 et leur rôle dans la production de données d'intérêt dans la caractérisation des propriétés mécaniques des substituts vasculaires produits par la méthode d'auto-assemblage. Le chapitre suivant consiste en un article qui traite des détails du montage, des composantes et qui contient les schémas associés.

### 2.3.1 Description du montage



**Figure 2.7 : Montage pour les essais d'éclatement**

Un ordinateur est utilisé pour le contrôle de l'ensemble du montage et l'acquisition de données. Il est équipé d'un processeur Pentium IV cadencé à 2.0Ghz et possède 768 Mb de mémoire vive. L'ordinateur est équipé d'un moniteur, d'un clavier et d'une souris.

Deux cartes d'acquisition ont été ajoutées à l'ordinateur de base. Pour faire l'acquisition de données de tension électrique, de courant ou de température, une carte d'acquisition NI-6220 est utilisée. Cette carte effectue une conversion analogique-numérique du signal à la sortie du manomètre et permet d'enregistrer les données sur ordinateur. La carte détecte également les signaux déclencheurs en provenance de la caméra. Les conversions analogique-numérique s'effectue sur 16 bits et la plage de mesure de tension est de +/-10 VDC, ce qui lui procure une résolution de +/-0.3mV ou +/-0.095 mmHg. La vitesse maximale d'acquisition de données est de 250 000 échantillons par seconde, mais une vitesse bien inférieure est utilisée dans le système présenté ici.

Une carte d'acquisition vidéo NI-1411 est utilisée pour faire la capture d'images en provenance de la caméra CCD qui filme le vaisseau. Elle permet également de synchroniser

le déclenchement et la lecture des données de pression avec l'entrée d'images. Chaque image envoyée par la caméra produit un signal de déclenchement (trigger) qui actionne la lecture d'une donnée de pression. Ceci permet de faire une corrélation rapprochée entre la mesure du diamètre mesuré à partir des images et les données de pression correspondantes. Une sous-routine du programme de contrôle du montage contrôle le processus d'acquisition d'images et produit un fichier vidéo .avi contenant l'ensemble des images numériques.

### 2.3.2 Moteur

Un moteur pas-à-pas, de type NEMA 23 de la compagnie Excitron Corp. est utilisé dans le montage. Ce moteur possède son propre contrôleur intégré, ce qui simplifie son utilisation. Le moteur a été choisi en fonction du couple de 280 lb-in qu'il peut produire. Son axe de rotation est couplé à un étau par un axe de couplage fait sur mesure pour les deux composantes. Le contrôle du moteur s'effectue par l'envoi de commandes textes via le port série de l'ordinateur. Il est donc nécessaire de relier ce dernier au moteur à l'aide d'un câble série.

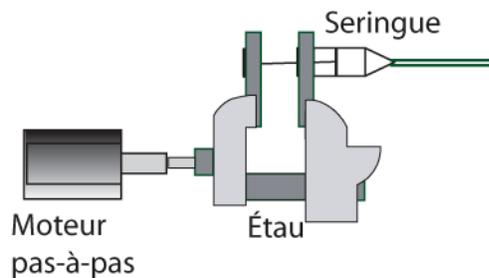


Figure 2.8 : Schéma du système de pressurisation

### 2.3.3 Système de pressurisation

Le montage est conçu pour mesurer la variation de diamètre des prothèses vasculaires et leur pression d'éclatement lorsqu'elles sont soumises à une variation temporelle de la pression. Celle-ci provient d'un système de pressurisation composé d'un étau, d'une seringue de 60 ml et d'un système de tubulure en circuit fermé. La seringue est remplie de milieu de culture ou d'un autre tampon physiologique. Sous l'action de rotation de l'axe du moteur couplé à l'étau, ce dernier se referme, la seringue est comprimée et elle injecte le milieu dans la tubulure rigide (Figure 2.8). Une première jonction en T relie le manomètre qui enregistre les variations de pression à la tubulure. L'autre extrémité du tube est

branchée au port d'accès sur le dessus de la chambre d'éclatement de vaisseaux. Ces derniers sont maintenus en place par une canule à chacune de ses extrémités. Finalement, une deuxième jonction en T complète le circuit.

#### **2.3.4 Manomètre**

Un manomètre analogique relié au système enregistre la pression interne de la prothèse. Il s'agit d'un manomètre de la série 68846 de la compagnie Cole-Parmer. Ce modèle a été choisi pour son faible coût, sa simplicité d'utilisation, sa sortie en tension et sa plage d'utilisation (0-60 psi, 0-3000 mmHg). Une source d'alimentation entre 10 et 30V est nécessaire et l'enregistrement du signal de pression est effectué directement sur la carte d'acquisition analogique. La lecture des données de pression est effectuée à une vitesse de 30 lectures par secondes et elle est synchronisée avec l'enregistrement des images par la caméra CCD.

#### **2.3.5 Caméra CCD**

Une caméra CCD Sony DXC-190 est utilisée pour enregistrer les variations de diamètre du vaisseau durant les essais. La caméra capture des images du vaisseau à une fréquence de 30 images par seconde. Un câble S-video la relie à la carte d'acquisition vidéo NI-1405 installée dans l'ordinateur. Ce protocole de transfert d'images a été préféré pour sa capacité à transmettre une image d'une meilleure qualité que ne le permet le raccordement par câble coaxiale et connecteurs BNC. La camera exige une source d'alimentation de +12VDC.

#### **2.3.6 Source d'alimentation**

Une source d'alimentation d'ordinateur de 145 Watts est utilisée pour alimenter le manomètre et la caméra CCD. Cette source d'alimentation est une source fiable de tension 12VDC et assure une certaine protection aux composantes qu'elle alimente en cas de surcharge.

#### **2.3.7 Chambre d'éclatement**

La chambre d'éclatement des vaisseaux est une boîte en acrylique. Ce matériel est utilisé puisqu'il est solide, résistant, facilement manipulable et peut être stérilisé de plusieurs manières. De plus, sa transparence n'affecte en rien la qualité de transmission des images

du vaisseau. Au contraire, elle contribue à améliorer la qualité de l'image en permettant à la lumière ambiante d'atteindre le vaisseau. Des écrans ont été installés derrière la caméra et derrière la chambre d'éclatement pour 1. éviter que la caméra ne capte des réflexions, 2. limiter son champ de vue au plan du vaisseau et 3. permettre une meilleure détection des contours du vaisseau. Les côtés du cube sont droits et n'introduisent pas de distorsion dans l'image.

## ***Section 2.4 - Logiciels de contrôle et d'analyse de résultat***

### **2.4.1 Choix de la plateforme de développement**

Trois applications servent au contrôle du montage de caractérisation : le premier pour les essais d'éclatement et la mesure de compliance, le deuxième pour les essais de fluage et le dernier pour les essais de fatigue. Ces applications ont été développées sous la plateforme LabView de la compagnie National Instruments. Cette plateforme est reconnue pour faciliter le développement de logiciels de contrôle et la création de liens virtuels entre de multiples composants de natures diverses telles que les ordinateurs, senseurs, cartes d'acquisition, contrôleurs et actionneurs de divers types. Elle permet également de créer des applications de divers degrés de complexité et produit une interface graphique consistant de boutons, menus, écrans et différents indicateurs. Un des objectifs dans l'adoption d'une plateforme de contrôle qui utilise une interface graphique est de permettre à un usager non expérimenté de contrôler un système complexe avec une grande précision, faire l'acquisition d'une quantité importante de données et visualiser en temps réel la variation des mesures.

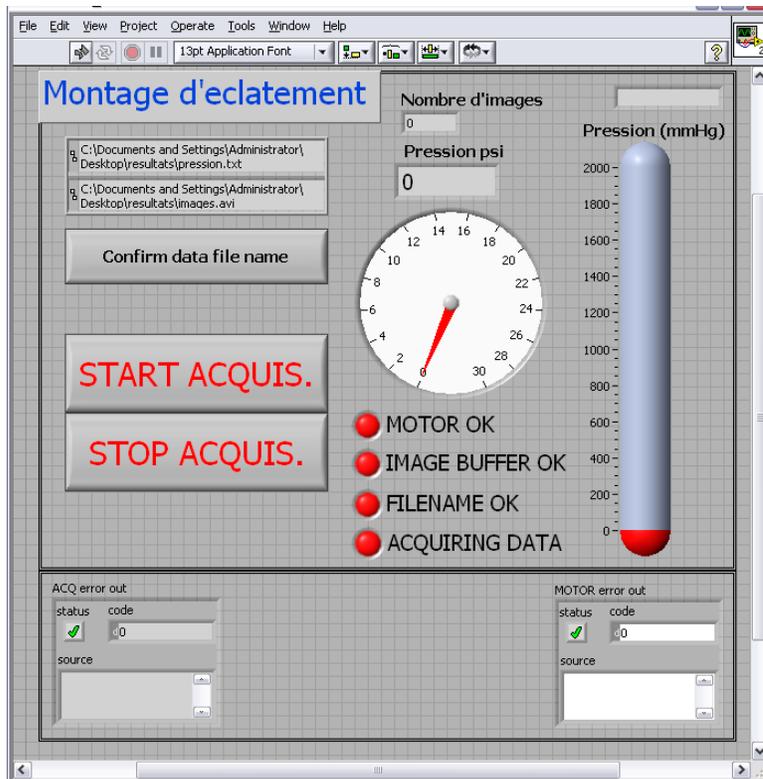
Les systèmes contrôlés par ordinateur permettent, entre autres, une grande reproductibilité des conditions expérimentales en termes de contraintes mécaniques, des taux d'acquisition élevés et la précision de données. Ils éliminent la variabilité des opérations manuelles et celles dues aux aptitudes de l'utilisateur.

La Figure 2.9 montre l'interface de contrôle du montage pour les essais d'éclatement et la mesure de compliance. L'interface graphique simple permet à un usager de démarrer et arrêter l'essai à tout moment, de sauvegarder les données de pression et les images du

vaisseau dans des répertoires de son choix ainsi que de suivre la variation de pression en temps réel. Plusieurs indicateurs permettent également de vérifier l'état du système pour assurer son bon fonctionnement.

#### **2.4.2 Déroulement de l'essai d'éclatement**

L'application de contrôle vérifie l'état des communications entre l'ordinateur et le contrôleur du moteur et confirme qu'un espace mémoire suffisant a été réservé pour enregistrer les images du vaisseau. L'utilisateur confirme que le répertoire de sauvegarde des données est valide. Finalement, l'utilisateur démarre l'essai. Le logiciel de contrôle déclenche l'acquisition de données et envoie les commandes nécessaires au contrôleur du moteur pour démarrer la pressurisation du vaisseau. Les indicateurs de pression affichent la pression en temps réel. Un bouton permet également à un usager d'interrompre l'essai à tout moment si un problème survient, comme par exemple une fuite dans le vaisseau qui empêcherait une hausse de pression suffisante pour faire éclater le vaisseau. En conditions idéales, le vaisseau est pressurisé jusqu'à son éclatement qui est détecté automatiquement par une baisse subite en pression. Lorsque l'éclatement survient, le logiciel envoie les commandes d'arrêt du moteur au contrôleur, enregistre les données accumulées et ferme les fichiers de données.



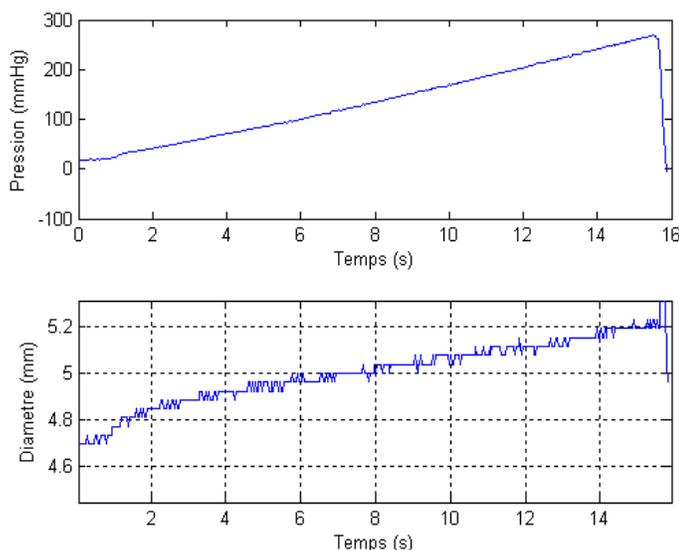
**Figure 2.9 : Interface de contrôle du montage pour les essais d'éclatement**

### 2.4.3. Résultats des essais d'éclatement

Un programme MatLab permet l'analyse d'images et la lecture des fichiers de données enregistrées dans LabView. Le programme produit trois graphiques qui présentent la variation du diamètre et de la pression en fonction du temps ainsi que la variation de diamètre en fonction de la pression. Sur ces graphiques, on peut faire la lecture de la pression d'éclatement de la prothèse ainsi que le calcul de la compliance du vaisseau.

Trois fichiers sont produits lors de chaque essai d'éclatement. Le premier fichier contient une photo qui sert à obtenir la conversion de pixels en mm. Le deuxième contient les données de pression et le dernier contient le fichier .avi. Les données de pression et les images sont enregistrées à une fréquence de 30 par seconde. Les deux derniers fichiers servent pour le calcul de compliance. Seul le fichier des données de pression sert pour la mesure de la pression d'éclatement.

Le nombre de données de pression dépend de la durée de l'essai. La routine ouvre le fichier et trouve la donnée de pression maximum enregistrée. Cette donnée correspond à la pression d'éclatement du substitut. La routine d'analyse de données produit un graphique qui contient les données de pression en fonction du temps, tel celui de la Figure 2.10A.



**Figure 2.10 : (A) Données de pression enregistrées lors d'un essai d'éclatement; (B) Mesures de diamètre du substitut enregistrées lors d'un essai d'éclatement.**

La durée du film qui contient les images du substitut est déterminée au début de l'essai. Ceci découle du fait qu'un espace mémoire doit être réservé à l'avance pour le stockage des images. Puisque la durée de chaque essai est inconnue au départ, un espace suffisamment grand doit être réservé pour éviter tout débordement. Les fichiers peuvent par contre être comprimés après leur analyse pour réduire l'espace disque occupé. Ceci est possible en évaluant le nombre de données de pression et en ne conservant que le même nombre d'images du substitut. L'acquisition synchronisée des données de pression et des images rend cette réduction possible.

Le diamètre initial du vaisseau est connu est considéré comme étant celui du mandrin autour duquel il a été roulé. La routine MatLab qui sert à l'analyse d'images tient compte

de cette donnée et de la photo du substitut pour convertir son diamètre en pixels en une mesure en mm.

Comme elle le fait avec la première image du vaisseau, la routine d'analyse transforme le fichier vidéo *avi* en une série d'images individuelles. Chaque image (Figure 2.11A) est ensuite transformée en son équivalent noir et blanc (Figure 11B). Ceci augmente le contraste et permet de facilement détecter les bordures du vaisseau. Une fonction spécialisée permet de détecter ces bordures et produit une image binaire (Figure 2.11C) où tous les pixels sont noirs, ou nuls, sauf ceux qui suivent les bordures du vaisseau. Chacun des pixels est transformé en un élément de matrice binaire de même dimension que celle de l'image de départ. En comparant les indices des éléments non nuls sur une même ligne de la matrice, on obtient la différence en pixels, entre les deux côtés du vaisseau. Il suffit alors de multiplier ce nombre de pixels par un facteur de conversion pour obtenir une distance en mm et déterminer le diamètre du vaisseau en mm. Les mesures de diamètre sont utilisées pour produire des graphiques montrant la variation du diamètre en fonction du temps tel qu'illustré dans la Figure 2.10B.



**Figure 2.11: Traitement d'images pour la mesure de diamètre**

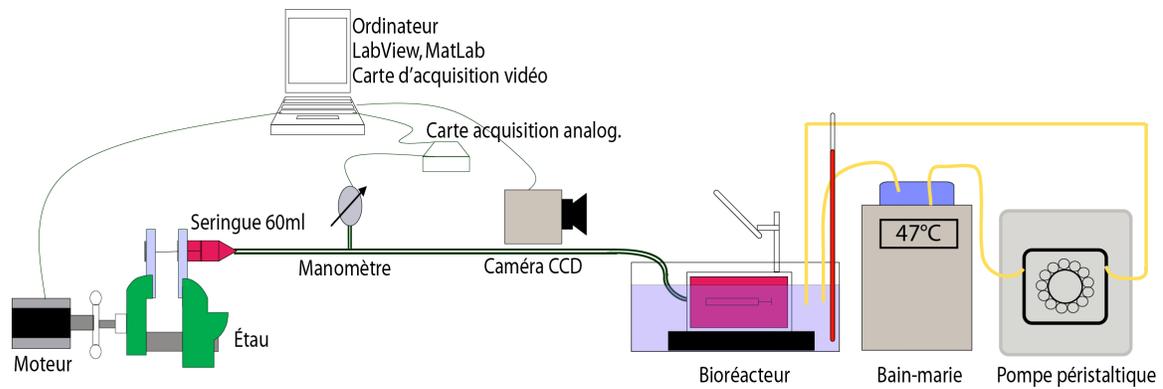
Les mesures de diamètre du vaisseau sont sauvegardées dans un fichier une fois l'analyse image-par-image terminée. Le nombre de mesures est égal au nombre de données de pression puisque le signal d'acquisition des données de pression provient de la caméra. Une sous-routine transforme les données des essais d'éclatement en une matrice à deux colonnes, la première contenant les données de pression et la deuxième contenant les mesures de diamètre. La routine est programmée pour détecter les indices des données de

pression d'intérêt (habituellement 80 et 120 mmHg) et rechercher les données de diamètre de mêmes indices. Le calcul de compliance est ensuite facile à exécuter puisqu'il s'agit de calculer la différence de diamètre observée pour la variation de pression mesurée selon la relation suivante :

$$Compliance = \frac{d_2 - d_1}{d_1} \times 100\% \quad (9)$$

#### 2.4.4 Logiciel pour les essais de fluage

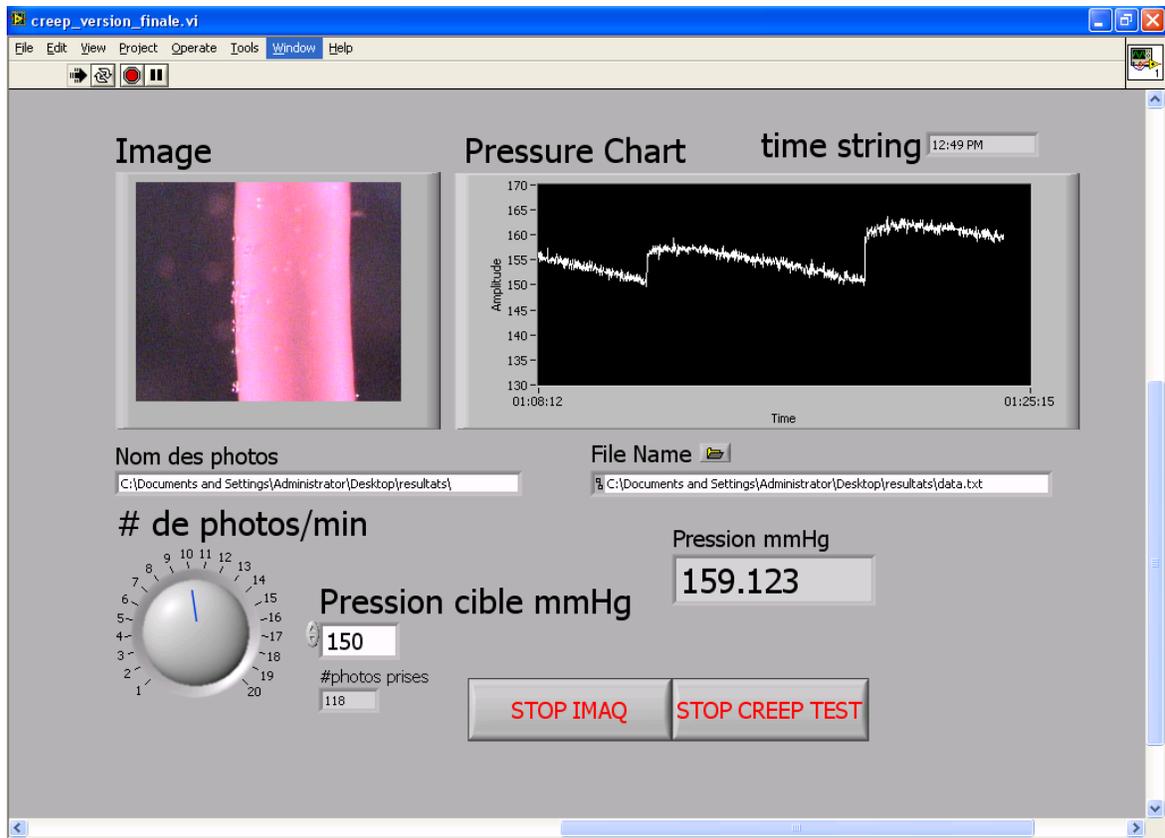
La Figure 2.12 montre un schéma du montage utilisé pour les essais de fluage et de fatigue. La Figure 2.13 montre le logiciel de contrôle du montage utilisé pour les essais de compliance. Ce montage diffère quelque peu de celui utilisé pour les essais d'éclatement. Le vaisseau est positionné de façon horizontale, plutôt que verticale. La chambre d'éclatement est scellée, remplie de milieu de culture et plongée dans un réservoir d'eau chauffée à 37°C. Cette configuration est nécessaire de par la durée des essais de fluage et de fatigue. En effet, ces essais durent une, deux ou trois heures alors que les essais d'éclatement durent généralement moins de 60 secondes. Il est donc nécessaire de fournir un environnement propice au vaisseau et aux cellules qui le forment. Le fait de positionner le substitut vasculaire horizontalement empêche le vaisseau de s'étirer graduellement sous le poids des canules et des anneaux de serrage. Il est également essentiel de prévenir un choc thermique des cellules. La chambre est donc plongée dans un bassin d'eau maintenu à 37°C qui circule entre ce dernier et un bain-marie par le biais d'une pompe péristaltique. Comme la température de l'air ambiant est d'environ 22°C, le bain-marie doit être chauffé à 47°C pour compenser les pertes de chaleur et maintenir le milieu de culture à 37°C. Finalement, un miroir plat installé à un angle de 45° au dessus de la chambre d'éclatement réfléchit l'image du substitut vers la caméra.



**Figure 2.12 : Montage utilisé pour les essais de fluage et de fatigue**

La Figure 2.13 montre l'interface graphique utilisée pour le contrôle du montage de la Figure 2.10 lors des essais de fluage. Un écran affiche l'image enregistrée par la caméra CCD en temps réel. Un écran semblable à celui d'un oscilloscope permet de suivre le contrôle et les changements de pression dans le vaisseau. Les échelles de temps et de pression sont ajustables pour voir les variations plus rapides de la pression ou pour avoir un aperçu à plus long terme de sa stabilité. Un bouton de type <<radio>> permet à l'utilisateur de sélectionner le nombre d'images à enregistrer par minute. Ceci permet de faire varier le taux d'acquisition d'images tout au long de l'essai. Il peut être intéressant, par exemple, de faire l'acquisition d'images à un taux plus élevé au début de l'essai. Ceci augmente la précision des observations alors que, lors de la pressurisation initiale, le substitut peut démontrer davantage de compliance. Le taux d'acquisition d'images peut aussi être laissé constant pour la durée complète de l'essai.

Des indicateurs affichent les noms des répertoires de sauvegarde des données de pression et des photos du vaisseau. Un autre donne une lecture en temps réel de la pression à l'intérieur du vaisseau. Deux boutons sont nécessaires pour complètement arrêter l'essai.



**Figure 2.13 : Interface de contrôle du montage pour les essais de compliance**

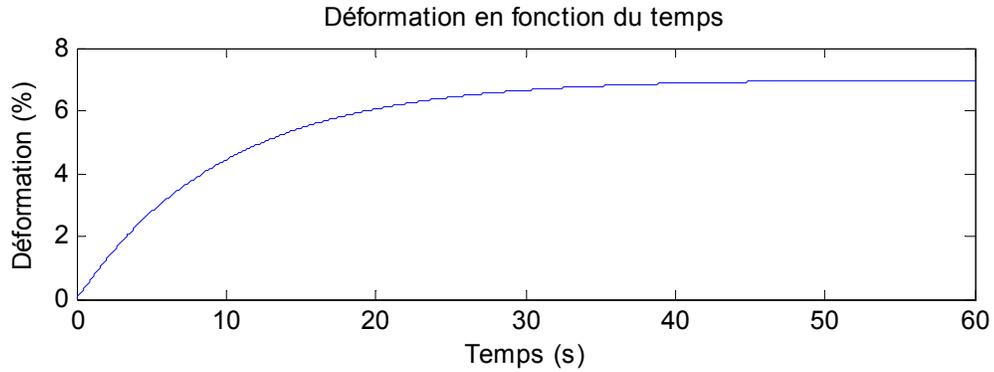
Lors d'un essai de fluage, l'utilisateur démarre l'application et fournit, dans la case *Pression cible mmHg*, la valeur minimale de pression en mmHg à laquelle soumettre le vaisseau. Il sélectionne ensuite la fréquence d'acquisition d'images et démarre la pressurisation. Le logiciel de contrôle envoie les commandes nécessaires au contrôleur du moteur et actionne ce dernier qui comprime la seringue et pressurise le vaisseau. Lorsque la pression cible est atteinte, le moteur est immobilisé et l'acquisition d'images est déclenchée au taux d'images par minute choisi par l'utilisateur. L'essai se poursuit pour la durée déterminée par l'utilisateur, soit 1, 2 ou 3 heures. La pression interne du vaisseau est continuellement contrôlée. Sous l'effet de la pression, le vaisseau peut se dilater, ce qui augmente le volume total sous pression et fait baisser la pression dans le substitut, la tubulure et la seringue. Lorsque la pression s'abaisse sous la valeur cible telle qu'entrée par l'utilisateur, le contrôleur actionne le moteur, ce qui comprime la seringue et pressurise le vaisseau de

nouveau. Cette boucle de rétroaction permet donc de maintenir constante et de façon automatique la pression interne du vaisseau et les conditions de stimulation mécanique.

#### **2.4.6 Résultats des essais de fluage**

Chaque image captée par la caméra est sauvegardée en tant que fichier individuel dans le répertoire choisi par l'utilisateur. Une routine MatLab utilisant le même algorithme que pour l'analyse des images acquises lors des essais d'éclatement permet d'analyser ces images et de produire une courbe telle que montrée dans la Figure 2.3B. Il peut arriver, lors des essais de fluage et de fatigue, que de petites bulles d'air se forment à la surface du vaisseau. Quoique ces bulles d'air ne nuisent en rien au vaisseau, elles sont quand même détectées par la caméra et pourraient influencer la mesure du diamètre du vaisseau. Leur apparition à la surface du vaisseau est facilement détectable en regardant la courbe de variation de diamètre du vaisseau. Il se produit alors une hausse subite et irrégulière de la valeur du diamètre. L'algorithme d'analyse d'images est programmé pour filtrer et éliminer ces variations rapides et produire une courbe de variation plus lisse qui reflète davantage les véritables variations de diamètre du vaisseau.

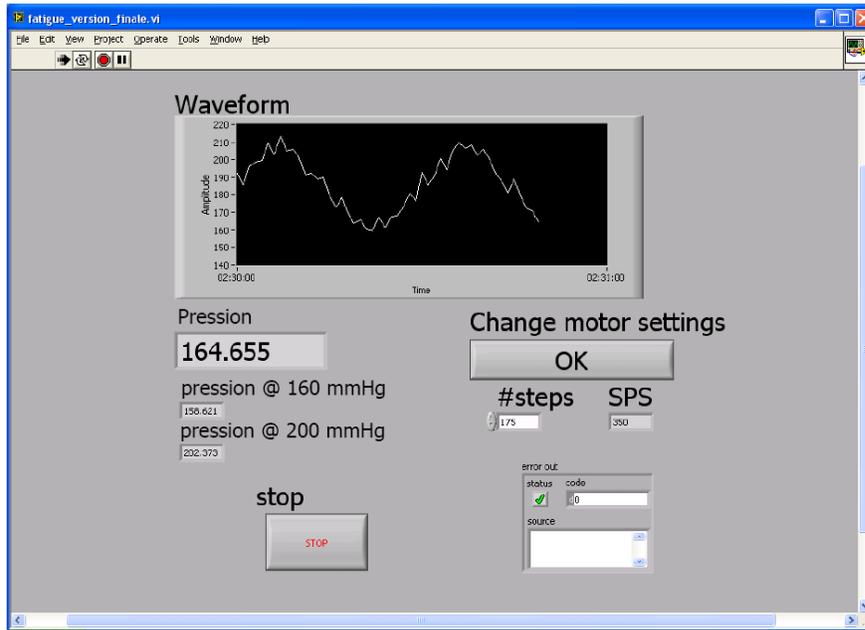
La première image enregistrée lors de l'essai est affichée à l'écran et permet à l'utilisateur de délimiter une zone pour le calcul du diamètre du substitut. La routine calcule ensuite le diamètre du vaisseau dans cette même zone pour toutes les autres images du vaisseau. Finalement, une figure comme celle de la Figure 2.3B et 2.14 est produite et les données de diamètre et leurs indices de temps durant l'essai sont sauvegardés dans des fichiers.



**Figure 2.14 : Exemple d'une courbe de déformation lors d'un essai de fluage**

#### **2.4.7 Logiciel de contrôle des essais de fatigue**

La Figure 2.15 montre l'interface graphique du logiciel de contrôle du montage lors des essais de fatigue. Un premier graphique semblable à un écran d'oscilloscope montre en temps réel les variations de pression interne du vaisseau. On peut reconnaître, sur la 2.14 que la forme d'onde de pression appliquée à l'intérieur du vaisseau est de type sinusoïdal. Un premier indicateur affiche la valeur instantanée de pression en temps réel. Deux autres indicateurs affichent les pressions minimales et maximales de stimulation telles que mesurées par le manomètre. Un bouton permet d'actualiser les commandes du moteur et une zone de saisie de texte permet à l'utilisateur de varier le nombre de pas que fait le moteur dans chacun de ses cycles de stimulation. Finalement, un dernier bouton permet d'arrêter l'essai et de sauvegarder les données enregistrées.



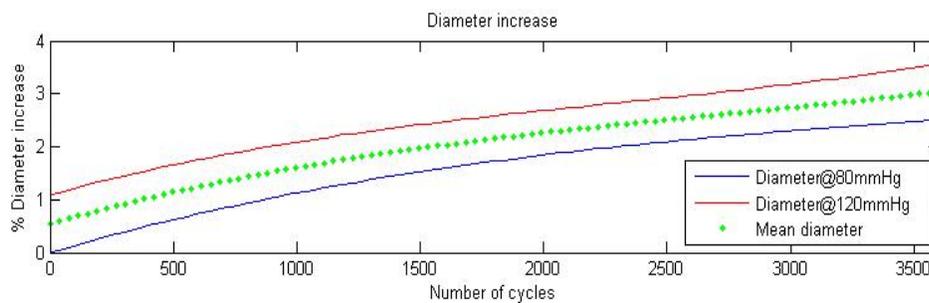
**Figure 2.15 : Interface de contrôle du montage pour les essais de fatigue**

L'essai de fatigue consiste en une exposition répétitive du vaisseau à des cycles de pression pour une durée déterminée par l'utilisateur. Les valeurs crêtes de la stimulation sont choisies par l'utilisateur ainsi que le nombre de pas que doit effectuer le moteur lors de la première séquence de cycles.

Lorsque le logiciel est démarré, l'ordinateur envoie les commandes nécessaires au contrôleur du moteur qui actionne ce dernier et pressurise le vaisseau jusqu'à ce que sa pression interne corresponde à la pression maximale choisie par l'utilisateur. Le contrôleur actionne ensuite le moteur pour qu'il fasse une série de rotations dans le sens horaire et antihoraire. Chacune de ces rotations compte le même nombre de pas, donc le moteur effectue toujours la même rotation sur son axe. Le moteur étant couplé à la seringue, il en résulte un mouvement de translation de va-et-vient de l'étau et du piston de la seringue. La pression elle aussi varie de la même manière, ce qui explique la forme sinusoïdale de l'onde de pression telle qu'affichée à l'oscilloscope de la Figure 14. Le vaisseau est soumis à un certain nombre prédéterminé de ces cycles de pression, avant que le système ne s'arrête momentanément à la pression minimale indiquée. La caméra capte ensuite une image du vaisseau et le moteur est actionné pour augmenter la pression à la valeur maximale

indiquée. La caméra capte alors une autre image du substitut. L'utilisateur peut, au cours des cycles de pressions, ajuster le nombre de pas qu'effectue le moteur durant la séquence suivante. Ceci permet d'ajuster la course du piston de la seringue et conséquemment l'amplitude de l'onde de pression sinusoïdale appliquée au vaisseau pour qu'elle soit exactement celle désirée. Un changement du module d'élasticité du vaisseau, par exemple, peut faire que l'amplitude de l'onde de pression ressentie diminue ou ne soit pas celle désirée. L'amplitude de l'onde de stimulation doit alors être corrigée pour assurer que la pression redescende jusqu'à la valeur minimale. Si un tel changement est nécessaire, le logiciel met à jour les commandes du moteur et ce dernier est actionné de nouveau pour une nouvelle suite de cycles de pression. Les images du vaisseau sont prises après chaque séquence de cycles et enregistrées pour analyse ultérieure à l'aide d'une routine MatLab. Elles permettent de suivre les changements de diamètre du vaisseau aux pressions d'intérêt, soit les pressions minimales et maximales de stimulation.

Les images du vaisseau, captées aux deux pressions d'intérêt, sont sauvegardées dans deux séries d'images automatiquement numérotées, ce qui facilite leur analyse séquentielle. La routine MatLab lit chaque séquence de photo, mesure le diamètre du vaisseau et enregistre les données sous la forme d'une matrice. Finalement, la routine crée un graphique des variations de diamètres en fonction du nombre de cycles tel que vu dans la Figure 2.16. Le diamètre aux pressions d'intérêt et le diamètre moyen sont affichés.



**Figure 2.16: Exemple de graphique produit lors d'un essai de fatigue**

Le chapitre qui suit présente un article qui résume les caractéristiques du montage et explique son principe de fonctionnement. Il présente également un aperçu des résultats

recueillis lors d'une étude des propriétés mécaniques des vaisseaux produit par la méthode d'auto-assemblage.

## Chapitre III - Article

### *Section 3.1 - Résumé de l'article*

Les substituts vasculaires peuvent être partiellement caractérisés en mesurant certaines de leurs propriétés mécaniques telles que la pression d'éclatement et la compliance et en les soumettant à des essais de fatigue et de fluage. Les travaux présentés dans cet article traitent de la conception, la fabrication et la validation d'un système permettant la mesure de ces propriétés mécaniques de manière fiable, précise et répétable. Le système contrôlé par ordinateur soumet les substituts à des pressions hydrodynamiques dont les valeurs sont enregistrées de façon synchronisée avec les variations de diamètre du substitut. L'analyse des données produites permet de calculer les propriétés mécaniques d'intérêts.

Les résultats recueillis ont démontré que ce nouveau système est capable de mesurer la pression d'éclatement de substituts vasculaires, de calculer leur compliance et de les soumettre à des essais de fatigue et de fluage. Les résultats ont permis d'améliorer la connaissance de la contribution de chaque couche cellulaire aux propriétés générales du substitut vasculaire.

**Journals:** Tissue Engineering (4.409), IEEE Transaction on Biomedical Engineering (1.622), Journal of Biomechanical Engineering (1.591)

### *Section 3.2 - New Apparatus for Characterization of the Mechanical and Viscoelastic Properties of Vascular Constructs Reconstructed In Vitro Using the Self-Assembly Approach.*

Philippe Lévesque<sup>1,2</sup>, Robert Gauvin<sup>1,2</sup>, Danielle Larouche<sup>1</sup>, François A. Auger<sup>1</sup>, Lucie Germain<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale/LOEX, Centre de Recherche FRSQ du CHA universitaire de Québec and Département de chirurgie, Université Laval, Québec, QC, Canada.

<sup>2</sup>P. Levesque and R. Gauvin contributed equally to this work.

\*Corresponding author

## Abstract

Blood vessel substitutes can be partly characterized by analyzing their mechanical properties using burst pressure testing, compliance measurement, creep and fatigue testing. Studying these parameters provides information on the capability of a fabrication method to produce functional tissue-engineered blood vessels (TEBV) presenting suitable resistance and viscoelastic properties in a physiological range. This study presents the design of an apparatus allowing accurate and reliable measurements of the mechanical properties of tissue-engineered vascular constructs. A computer controlled system was designed to monitor pressure and diameter variations of vascular constructs submitted to hydrostatic loading. The system was programmed to control the motorized portion of the setup and allow simultaneous data acquisition, analysis and real-time display. Data acquisition cards allow for synchronous monitoring of pressure and diameter of the constructs through a pressure transducer and a CCD camera. Computation of images analysis and pressure data resulted in compliance, creep and fatigue characterization of the tested tissues. This new experimental setup succeeded in measuring burst pressure, compliance, creep and fatigue of tissue-engineered vascular media (TEVM), adventitia (TEVA) and a combination of a media and an adventitia (TEVMA) reconstructed by the self-assembly method. Our apparatus has proven to be a precise and reliable tool for the characterization of the mechanical properties of vascular constructs.

## Introduction

Prevalence of cardiovascular diseases has been on a constant rise for the past years in industrialized countries. Sixteen million Americans suffered from coronary heart disease in 2004, while coronary artery bypass alone counted for more than 470 000 procedures during that same year (1). The current treatment of coronary and peripheral vascular diseases is still surgical bypass using an autologous blood vessel, although the limited availability of adequate or usable vascular tissue has restricted the appeal of this solution (2, 3). Dacron and expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) have also been used as building materials for blood vessel substitutes. While they have been successful for large diameter (> 6mm) vessel replacements, their compliance mismatch has been shown to cause restenosis in small diameter vessels (2). Furthermore, their synthetic nature prevents them from ever being completely integrated into the surrounding tissue and may induce foreign body reaction which could be a leading cause for failure of the graft (4).

Tissue engineering presents a promising approach for producing blood vessel substitutes presenting a structural organization similar to that of native blood vessels. The use of autologous cells, mechanical properties in the physiological range (4), non-thrombogenicity as well as better integration and remodeling potential (5) are significant characteristics suggesting that tissue-engineered blood vessels (TEBV) could succeed in small caliber blood vessel replacement. Results have also shown that mechanical stimulation of tissue-engineered vascular constructs prior to implantation could improve their properties by inducing the production of a more organized extracellular matrix (ECM) (6). Adequate tissue-engineered blood vessel should be capable of sustaining blood pressure at implantation and resist dilatation in time similarly to saphenous vein grafts currently used as in bypass surgeries (7). Hence, vascular constructs should present a natural elasticity that would prevent disturbing blood flow, since this latter can damage the vessel wall, particularly the endothelium (2, 8). In order to evaluate the mechanical and viscoelastic properties of TEBV and compare them to those of native blood vessels, it is of the utmost importance to be able to precisely measure these parameters. Furthermore, mechanical properties such as burst pressure and viscoelastic behavior characterized by compliance, creep and fatigue testing are essential knowledge prior to use and implantation

of a TEBV (7, 9, 10). Therefore, a testing apparatus is necessary to evaluate time-dependant properties in a precise and reliable fashion.

The self-assembly approach, based on the use of cells and their ability to produce their own ECM without any exogenous scaffold has been previously described (4). In order to assess the mechanical and viscoelastic properties of vascular constructs produced using the self-assembly approach, we designed an apparatus to perform creep and fatigue tests and capable of measuring burst strength and compliance of vascular tissues. Different types of tissue-engineered vascular constructs comprised of only a media (TEVM), only an adventitia (TEVA) or both a media and an adventitia (TEVMA) were tested.

## Materials and Methods

### **Cell Isolation and Culture**

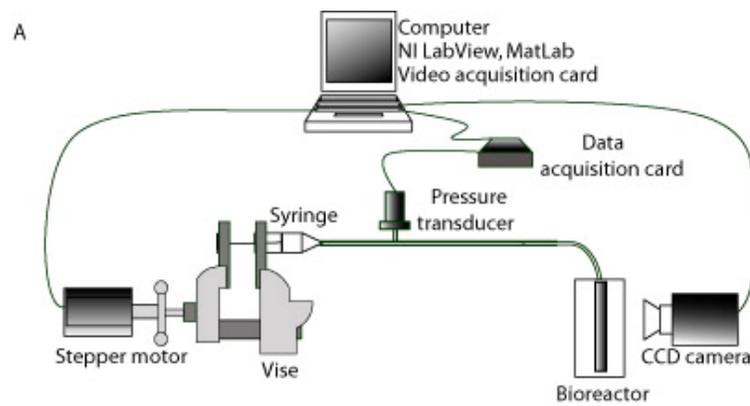
Human blood vessels were obtained after informed consent from an adult volunteer following a surgical saphenous vein-stripping procedure. Once collected, the vein biopsy was put in a transport medium and processed immediately. Vascular smooth muscle cells (VSMCs) and vascular fibroblasts (VFs) were isolated as previously described (12).

### **Tissue-engineered Vascular Constructs**

Tissue-engineered vascular constructs comprised of only a media (TEVM), an adventitia (TEVA) or both a media and an adventitia (TEVMA) were produced as previously described (12). Briefly, VSMC in the case of a TEVM or VF in the case of a TEVA were plated in 75cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (BD, Falcon) and cultured in Dulbecco modified Eagle medium with Ham's F12 (DMEM-Ham; ratio 3:1; Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with fetal bovine serum (FBS) (HyClone, Logan, UT), antibiotics and ascorbic acid to stimulate ECM synthesis until the formation of a self-assembled living tissue sheet. This tissue sheet was then peeled off from the culture flask and rolled onto a mandrel to form a tubular construct. Tissue-engineered vascular constructs were maintained in culture for two weeks prior to testing. In the case of the TEVMA, the sheet of VSMC was rolled on the mandrel first, followed by the addition of a VF sheet rolled on top of the TEVM to produce a TEVMA (12, 13).

### Mechanical Control System

A custom set of software and controls was designed to control a stepper motor (Excitron Corporation, Boulder, CO) coupled to a vise (General International, Drummondville, QC, Canada). The electric motor was coupled to the rotation axis of the vise by a custom designed axle, coupling the motor shaft directly to the vise screw and therefore allowing for the linear motion of the sliding part of the vise. The stepper motor was used to control the opening and closing action of the vise. Text commands sent by a computer through a serial port and cable can initiate, pause or stop the execution of motion profiles stored in the onboard controller of the motor. The controller was programmed to perform three different motion profiles, depending on the nature of the test. Direction, speed, acceleration rate and number of steps were all preset parameters in the controller memory to dictate the motor action. Fixed values assured consistency in testing conditions for all tissue-engineered vascular constructs. Custom designed plates were machined to accept a 60cc syringe and were attached to the vise mobile and fixed parts. The rotation of the vise screw controlled the compression or decompression of a syringe filled with DMEM which injected the culture medium into rigid tubing and pressurized the vascular construct being tested. The motor was set to perform  $0.9^\circ$  steps for very precise rotation of the vise screw, resulting in precise compression and decompression of the syringe and pressure control (Figure 3.1). Different virtual instruments (VI) were designed using the LabView software (Version 8.0, National Instruments, Austin, TX,) to control the apparatus during each test.



**Figure 3.1 Schematic diagram of the mechanical testing apparatus**

**Pressure Line**

Rigid polytetrafluoroethylene (PTFE) tubing (Cole-Parmer Canada, Montréal, QC, Canada) was used in the pressure line in order to minimize the compliance of the experimental setup. Special care was taken during the priming of the pressure line to eliminate any air in the tubing system prior to testing to avoid erroneous measurements.

**Pressure Data Acquisition**

A pressure transducer (Cole-Parmer) connected to the system was used to monitor the pressure variations within the vascular constructs. Electrical output of the transducer was connected to a data acquisition card (National Instrument) which recorded the voltage output of the device. The pressure transducer calibration data was later used in a VI to convert voltage readings from the acquisition card to pressure data recorded and expressed in millimeters of mercury (mmHg). Pressure readings were triggered by the system control VI and synchronized with a video acquisition card (National Instrument) allowing for the imaging of the construct being pressurized.

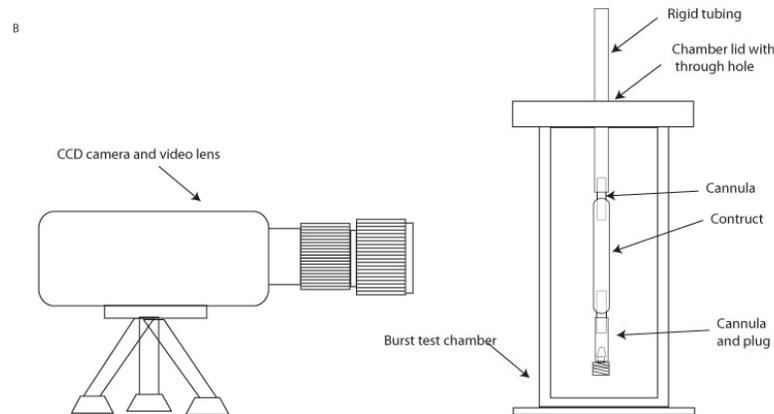
**Image acquisition**

A combination of a CCD camera (Sony Corporation, Tokyo, Japan) and lens (Edmund Optics, Barrington, NJ, USA) were used to perform imaging of the construct during the different testing procedures. Images were acquired via a video acquisition card and inserted into a movie file. Image acquisition was set at a constant rate during creep tests and was software triggered by the VI. Acquisition and analysis of the construct imaging data allowed for the computation of diameter variations. Pressure readings and images of the constructs were acquired synchronously and combined to allow the calculation of construct compliance. The same image analysis was used to evaluate creep and fatigue of the construct as a function of time and number of duty cycles.

**Environmental chambers**

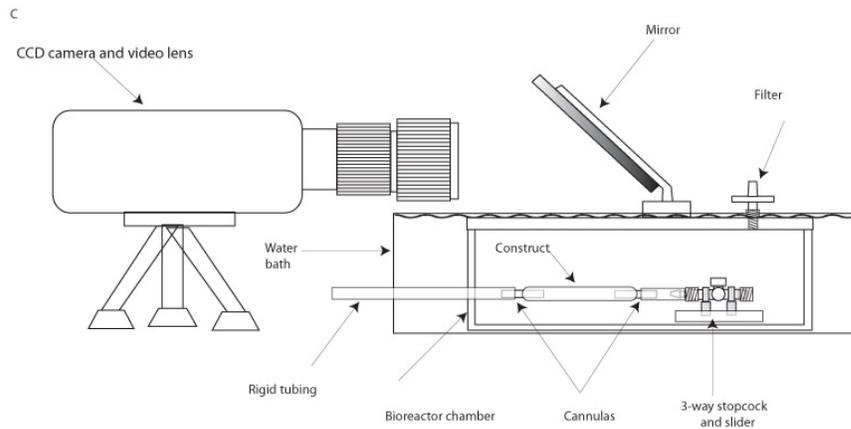
In order to preserve the integrity of the vascular constructs being tested, two different environmental chambers were designed to maintain the tissues at 37°C and in appropriate media during the procedures. In both chambers, the vascular construct was attached to in-

house designed stainless steel cannula and connected to the pressure line of the system. In the case of the chamber built for burst pressure testing the vascular construct was installed vertically in a polycarbonate chamber with transparent windows to allow the camera to capture images of the construct during the experiment. The chamber was filled with phosphate buffered saline (PBS) kept at 37°C, while the vascular construct was being pressurized at a constant rate until failure of the specimen (Figure 3.2).



**Figure 3.2 Environmental chamber and camera setup for burst tests**

Creep and fatigue tests required that vascular constructs remain in culture media and in an “incubator-like” environment for the complete duration of the experiment. The environmental chamber designed for these procedures allows for the tissues to be in appropriate media at 37°C and in a sterile environment. The chamber is water tight and a 0.22 µm filter (Millipore, Billerica, MA, USA) is installed on a luer port on the lid of the chamber to allow for gas exchange while preserving sterility. Temperature inside the chamber is kept constant by submerging it in a water bath at 37°C. A thin film of water covers the top of the chamber in order to prevent any scratches or defects in the transparent polycarbonate wall to be picked up by the camera installed over the chamber. The vascular construct is installed horizontally and maintained on a small polycarbonate plate which supports one end of the construct. This plate act as a slider during the procedure since the construct tends to stretch longitudinally while being pressurized. A mirror is used to reflect the image of the construct back to the camera in order to be able to visualize the horizontal setup (Figure 3.3).



**Figure 3.3 Environmental chamber and camera setup for creep and fatigue tests**

### **Burst pressure test and compliance measurement**

Burst pressure tests ask for motor action to be initiated by the VI as well as image and pressure data acquisition. Constructs are pressurized to failure at a constant rate of 4ml/min. The highest hydrostatic pressure value reached prior to vessel failure is recorded as its burst pressure. Pressure data and image acquisition are synchronized and set at the maximum camera rate of 30 samples and 30 frames per second respectively. Each frame sent to the acquisition card triggers the output of a trigger pulse sent to the data acquisition card. This synchronization allows for pressure readings to be easily correlated with the proper diameter measurements made from the acquired images. Pressure data analysis allows the retrieval of the images of the constructs at 80 and 120 mmHg to measure diameter and calculate construct compliance. Compliance is calculated using the following equation:

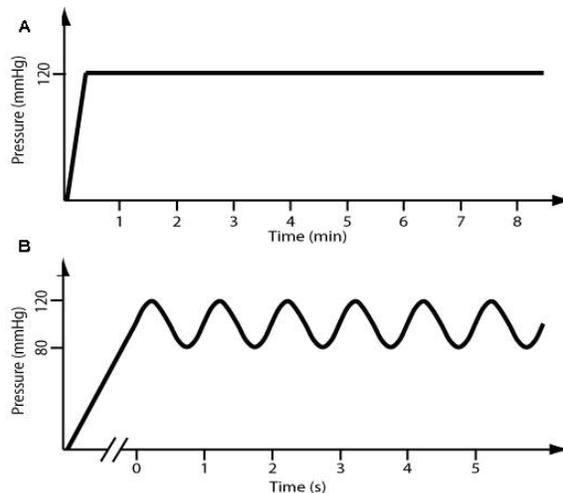
$$(1) \quad C = \frac{d_{120} - d_{80}}{d_{80}} \times 100\%$$

where  $d_{120}$  and  $d_{80}$  are the construct diameters at 120 and 80 mmHg, respectively.

### **Creep test**

Creep tests allow for the evaluation of a vascular construct capability to withstand a definite pressure for an extended period of time. The creep testing VI initiates motor action to compress the syringe at a rate of 2 milliliters per minute and continuously monitors pressure at a rate of 30 samples per second. Once the nominal test pressure is reached, the motor is controlled through a closed-loop VI which uses the pressure transducer output as a

feedback signal: the stepper motor coupled to the vise is controlled to maintain the internal pressure constant for the whole duration of the test (Figure 3.4A). Any diminution of the internal pressure of the construct commands the motor to make slow steps to bring the pressure back to its nominal test value. Images of the construct are taken at a fixed rate and saved as a sequential set of pictures during the test in order to correlate diameter variations as a function of time.



**Figure 3.4 Internal pressure maintained in the vascular constructs for creep and fatigue tests**

### Fatigue test

Fatigue testing is performed in order to evaluate the ability of a vascular construct to sustain a pulsatile pressure for an extended period of time. The initial segment of the test commands the motor to pressurize the construct at a rate of 2 milliliters per minute to a maximum set value. The fatigue test VI then initiates a reciprocal motion of the motor shaft, applying a pulsatile pressure inside the construct. The amplitude of the pressure variations is directly proportional to the number of steps made by the motor in the reciprocal motion and can be manually adjusted through the VI interface. The frequency of the sinusoidal motion can be test-specified, but is usually set to 1 Hz to reproduce a physiological condition of 60 heartbeats per minute. After a predetermined number of cycles, pictures of the construct are taken at the minimum and maximum cycle pressures, typically 80 and 120 mmHg when simulating a resting heart rate or 160 and 200 mmHg when simulating an exercising heart rate. The fatigue test VI is programmed to control the

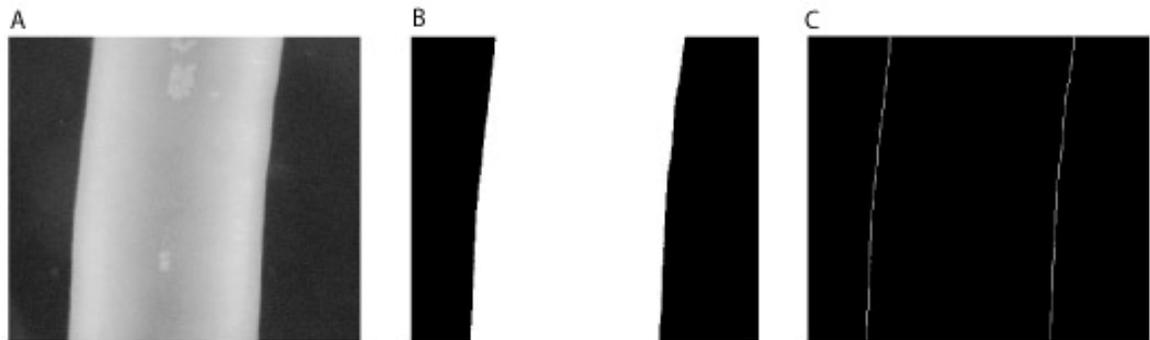
motor and camera to continuously repeat the reciprocal motion – picture cycle. A pressure drop caused by an increase in construct diameter is corrected by increasing the pulsatile pressure waveform amplitude. In order to maintain the set pressures, the number of steps traveled by the motor in the reciprocal motion must be adjusted (Figure 3.4B).

### Image analysis

A MatLab® (MathWorks, Natick, MA.) script was written to extract diameter measurements from the acquired images. The Image Processing Toolbox is used to read movie frames or pictures (Figure 3.5A), convert the images to black and white (Figure 3.5B), detect edges and measure mean diameter of the constructs (Figure 3.5C). These measurements are plotted on the same time-frame as the pressure curves and correlated with the data from the latter plots. Diameter variations are calculated using the equation

$$(2) \quad \Delta D = \frac{d - d_0}{d_0} \times 100\%$$

where  $d_0$  is the initial diameter of the vascular construct.



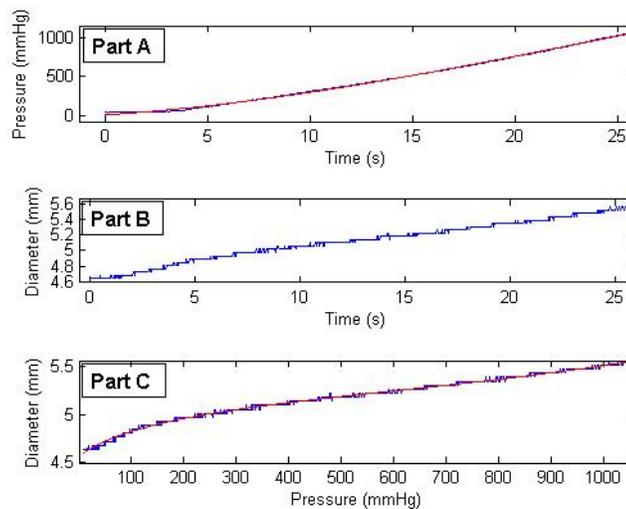
**Figure 3.5 Image analysis of the diameter measurements**

## Results

### Burst pressure testing

Results obtained from burst pressure testing of a TEVA demonstrate the precision and accuracy of the system (Figure 3.6). The pressure data plotted as a function of time shows that the pressure increase is the result of a steady flow rate and vascular construct structural capacity to withstand supraphysiological pressure (Figure 3.6A). The diameter increase measured as the vessel is being pressurized allows for the analysis of the time dependant

response of the vascular construct tested (Figure 3.6B). Diameter variations were monitored with sufficient precision ( $25\ \mu\text{m}$ ) to characterize construct behavior and calculate its compliance with precision. The diameter data plotted as a function of pressure readings displayed characteristic features of viscoelastic material: a toe-region followed by a linear diameter-pressure relationship until failure of the sample (Figure 3.6C). The burst pressure and compliance of human TEVM, TEVA and TEVMA measured by the apparatus described in figure 3.1 show that TEVMA and TEVA are more resistant than TEVM, whereas the compliance of TEVMA was greater than for TEVM and TEVA (Table 3.1). Reproducibility of the curve obtained demonstrated the accuracy of the system and the consistency in testing methodologies for every tissue tested (data not shown).



**Figure 3.6 Example of burst test results**

**Table 3.1:** Mechanical properties of TEVM, TEVA and TEVMA as measured using the apparatus described in Figure 3.1.

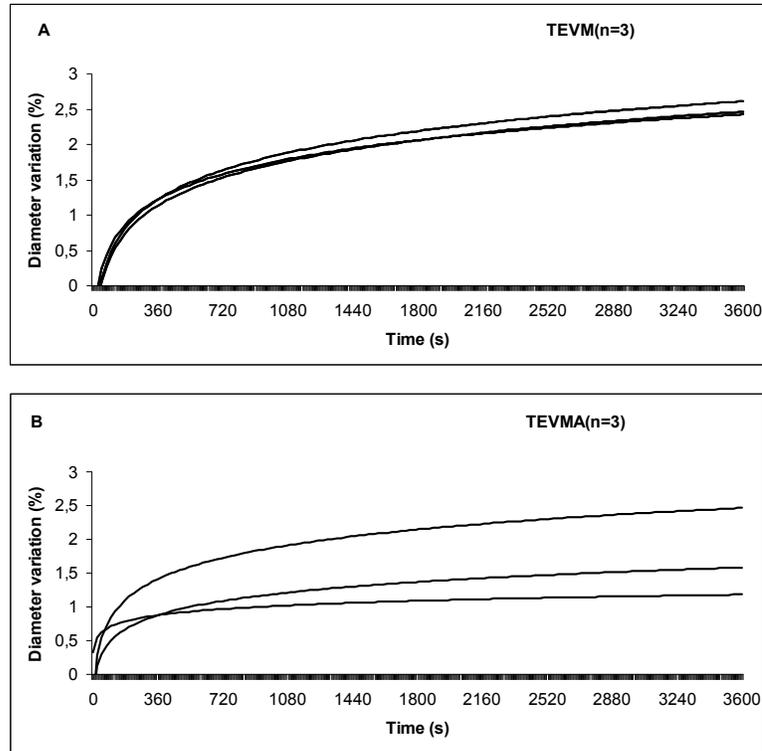
Vessel type	Burst pressure (mmHg)	Compliance (percent)*
TEVM	309 ± 40 (n=2)	2.7 ± 1.1 (n=2)
TEVA	1083 ± 98 (n=3)	1.76 ± 0.5 (n=3)
TEVMA	1075 ± 132 (n=2)	4.6 ± 0.4(n=2)
HSV**	1680-2200	0.7-1.5
Human artery**	2031-4225	4.5-6.2
ePTFE**	ND	1.6

\*: Calculated for a pressure difference of 40 mmHg between 80 and 120 mmHg

\*\* : Adapted from L'Heureux et al (5)

### Creep and fatigue tests

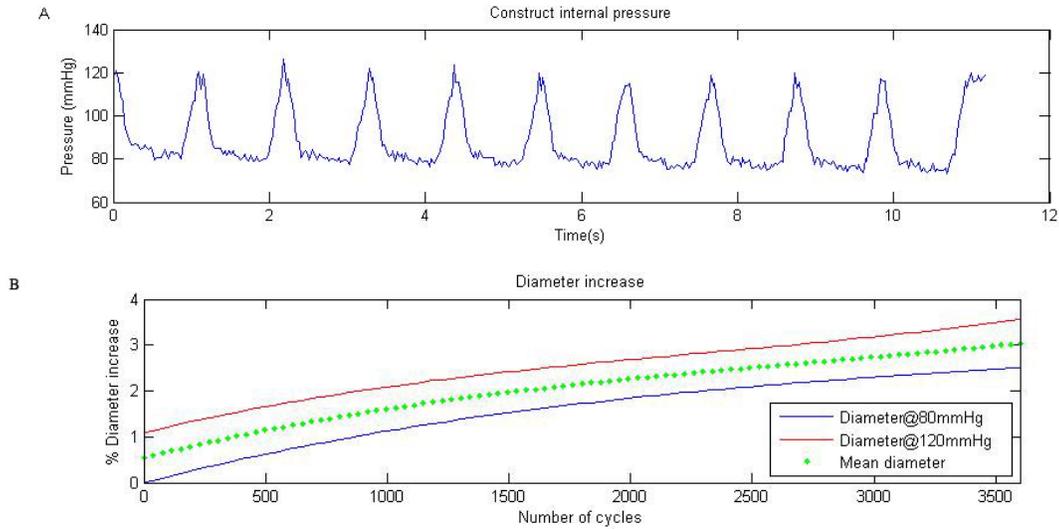
The creep data collected during one hour of testing for a TEVM shows that the apparatus allows for accurate measurements of the diameter variation over time of the vascular constructs (Figure 3.7A). The similarity between the curves indicates the consistency in the fabrication method and testing protocols. Similar measurements for TEVM and TEVMA demonstrate the capacity of the system to precisely differentiate the creep behavior of the different constructs tested (Figure 3.7B). The differences between the curves obtained for the different construct types allow for precise characterization of the tissue behavior and therefore confirm the accuracy and reliability of the setup.



**Figure 3.7 Diameter variations recorded during creep test**

Fatigue testing of vascular constructs requires for constant pressure variations inside the construct during the complete duration of the test. The pressure monitoring module allowed for control of the motor according to test protocol. As shown in figure 3.8A, the system successfully maintains the pressure between the set values (80 and 120 mmHg) and display a pulsatile-like waveform, mimicking a physiological pressure gradient. The selected CCD camera and lens offered sufficient resolution to monitor the variations of construct diameter as it changed as a function of time. An example of diameter variations measured during 1 hour of fatigue testing is shown in Figure 3.8B. Construct diameter at 80 and 120 mmHg were successfully monitored as a function of time and average deformation could be calculated with precision.

Repeatability of curves allowed easy comparison of construct deformation as a function of time or of the number of pressure cycles to which they were submitted (data not shown).



**Figure 3.8 (A) Pressure variation during a fatigue test (B) Diameter variation during a fatigue test**

## Discussion

Tissue engineering offers a promising solution for the production of blood vessel substitutes. Mechanical strength and biomechanical properties close to native vasculature is of the utmost importance to the functionality of tissue-engineered vascular constructs. Thus, it becomes primordial to design adequate testing instruments to characterize the mechanical properties and viscoelastic behavior of those constructs. The results obtained in this study confirmed that the testing apparatus designed in our laboratory is an adequate and reliable tool for evaluating the biomechanical properties of tissue-engineered vascular constructs. Burst pressure testing is one of the most utilized tests in vascular tissue engineering in order to determine the resistance to failure of blood vessel substitutes. In the present study, the burst pressure setup was implemented to allow for the measurement of the diameter of the blood vessel during its pressurization to obtain, after computerized analysis, the compliance of the vessel. Furthermore, the system was designed to perform long-term studies such as creep and fatigue testing on the vascular constructs, giving important information on the viscoelastic behavior of the tissues. This apparatus will improve our knowledge of the mechanical properties of our vascular constructs, as well as the contribution of the different layers to the overall mechanical properties of the tissue-engineered vessel produced using the self-assembly method. Results collected with this

apparatus will be useful in attempts to improve the performance of the vascular constructs through variations in cell and vessel culture conditions.

## Conclusion

Evaluation of the mechanical properties of individual and combined layers of reconstructed vascular tissue will help understand the contribution of each component to the overall mechanical properties of TEBV. This will help determine the optimal fabrication method allowing for the production of a tissue-engineered vascular substitute presenting matching mechanical properties with a native blood vessel. This newly designed apparatus provides a valuable tool for performing a standardized evaluation of the mechanical properties of tissue-engineered vascular constructs through analysis of the maximal internal pressure tolerated and diameter variations under constant and cyclic pressure. This apparatus will also be useful for measuring burst pressure and compliance of other tubular reconstructed tissues such as urethras and trachea. Ongoing experiments have also shown the capability of the system for measuring burst pressure and compliance of reconstructed human urethras and trachea.

## Acknowledgments

The authors want to thank Cindy Perron, Todd Galbraith, Jean-François Oigny, Julie Guérard, and Martine Magnan for technical assistance and helpful discussion. This work was supported by grants from Canadian Institutes of Health Research (CIHR), L.G. holds a Canadian Research Chair on Stem Cells and Tissue Engineering from CIHR.

## References

1. American Heart Association web site HDaSS.
2. Sarkar S, Salacinski HJ, Hamilton G, Seifalian AM. The mechanical properties of infrainguinal vascular bypass grafts: their role in influencing patency. *Eur J Vasc Endovasc Surg.*31:627-36. 2006.
3. McKee JA, Banik SS, Boyer MJ, Hamad NM, Lawson JH, Niklason LE, et al. Human arteries engineered in vitro. *EMBO Rep.*4:633-8. 2003.
4. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger F. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB Journal.*12:47-56. 1998.
5. L'Heureux N, Dusserre N, Konig G, Victor B, Keire P, Wight TN, et al. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med.*12:361-5. 2006.
6. Seliktar D, Black RA, Vito RP, Nerem RM. Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro. *Ann Biomed Eng.*28:351-62. 2000.
7. Nerem RM. Tissue engineering a blood vessel substitute: the role of biomechanics. *Yonsei Med J.*41:735-9. 2000.
8. Fisher AB, Chien S, Barakat AI, Nerem RM. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*281:L529-33. 2001.
9. Roeder R, Wolfe J, Lianakis N, Hinson T, Geddes LA, Obermiller J. Compliance, elastic modulus, and burst pressure of small-intestine submucosa (SIS), small-diameter vascular grafts. *J Biomed Mater Res.*47:65-70. 1999.
10. Nerem RM. Tissue engineering of the vascular system. *Vox Sang.*87 Suppl 2:158-60. 2004.
11. Berglund JD, Nerem RM, Sambanis A. Viscoelastic testing methodologies for tissue engineered blood vessels. *J Biomech Eng.*127:1176-84. 2005.
12. Laflamme K, Roberge CJ, Grenier G, Remy-Zolghadri M, Pouliot S, Baker K, et al. Adventitia contribution in vascular tone: insights from adventitia-derived cells in a tissue-engineered human blood vessel. *Faseb J.*20:1245-7. 2006.
13. Laflamme K, Roberge CJ, Pouliot S, D'Orleans-Juste P, Auger FA, Germain L. Tissue engineered human vascular media production in vitro by the self-assembly approach present functional properties similar to those of their native blood vessels. *Tissue Engineering.*12:2275-81. 2006.

## Figure Captions

Figure 3.1: Schematic diagram of the mechanical testing apparatus. The rotation of the stepper motor coupled to the axis of the vise controls the compression of a syringe filled with culture medium. Internal pressure of the vascular construct is monitored by a pressure transducer and images of the construct are acquired using a CCD camera throughout testing in order to analyze the pressure-diameter relationship of the tissues.

Figure 3.2: Environmental chamber and camera setup for burst tests. The vascular construct is attached to stainless steel cannula, connected to the PTFE tubing on one end and plugged at the other. The CCD camera captures images of the construct during its pressurization. Images will later be analyzed to calculate construct compliance.

Figure 3.3: Environmental chamber and camera setup for creep and fatigue tests. The vascular construct is maintained in culture media kept at 37°C. The CCD camera captures images of the construct while the motor is controlled to internally pressurize the construct according to test requirements (constant pressure in the case of creep or pulsatile pressure in the case of fatigue testing).

Figure 3.4: Internal pressure maintained in the vascular constructs for creep (A) and fatigue (B) testing.

Figure 3.5: Image analysis of the diameter measurements. The CCD camera images the vascular construct (A), the VI converts the images to black and white (B), detects edges and measures mean diameter of the constructs (C). These measurements are plotted on the same time-frame as the pressure curves and correlated with the data from the latter plots.

Figure 3.6: Example of burst test results. Construct internal pressure (A) and diameter (B) were monitored during burst test and plotted as a function of time. Pressure and diameter

data were later used to plot the diameter vs. pressure curve and to calculate construct compliance between 80 and 120 mmHg (C).

Figure 3.7: Diameter variations recorded during creep test. Reproducibility of the curve obtained for a TEVM (n=3) (A) and a TEVMA (n=3) (B) demonstrate the accuracy of the system. Note that diameters were monitored while internal pressure was kept constant at 200 mmHg for every specimen tested.

Figure 3.8: Pressure variation during a fatigue test (A). The reciprocal motion made by the motor acted on the syringe to induce a 1 Hz pulsatile pressure gradient in the constructs. Note the pulsatile-like waveform, mimicking a physiological pressure gradient. Diagram of diameter monitoring during fatigue testing (B). Construct diameter was monitored periodically during fatigue tests at minimum and maximum pressure, i.e. 80 and 120 mmHg. Further data analysis allowed for the computation of the average diameter increase as a function of the number of cycles applied on the construct.

## Chapitre IV - Discussion

### *Section 4.1 - Considérations sur le système de mesure des propriétés mécaniques*

L'article du chapitre précédent résume les travaux de la présente étude dont le premier objectif était de concevoir un système automatisé capable de mesurer quatre propriétés mécaniques de substituts vasculaires. En plus de sa conception et sa fabrication, la fiabilité du système devait être démontrée lors de plusieurs séries d'essais qui avaient pour but de mesurer les propriétés mécaniques de substituts vasculaires produits par la méthode d'auto-assemblage. Ces essais ont également fourni une période de validation de l'instrument en permettant de comparer les résultats obtenus avec ceux présents dans la littérature et ceux obtenus de façon expérimentale avec d'autres instruments.

Plus précisément, le système devait, de manière répétable et automatique, être capable de pressuriser un substitut vasculaire à un taux constant jusqu'à son éclatement. Durant la pressurisation, le système devait enregistrer les variations de pression interne du vaisseau et les variations de diamètre de façon synchronisée et produire la valeur de pression d'éclatement du vaisseau ainsi que calculer sa compliance.

Deuxièmement, le système devait être capable de soumettre les vaisseaux reconstruits à des essais de fluage et de fatigue. Ces deux essais impliquent un contrôle serré de la pression interne du vaisseau, un suivi précis de son diamètre externe et un traitement de données capable de produire les courbes de variations de diamètre du vaisseau en fonction du temps et du nombre de cycles de pression auxquels il est exposé.

Pour que l'instrument soit considéré comme un outil fiable, il devait soumettre les substituts vasculaires analysés à un ensemble de conditions environnementales et à une stimulation mécanique répétables. Ceci exige un contrôle serré du taux de pressurisation des vaisseaux, le maintien d'une pression interne constante (fluage), le contrôle de la pression entre deux valeurs précises (fatigue), le contrôle de la température du milieu de culture dans lequel il est plongé et le maintien de sa stérilité à long terme. Le taux

d'acquisition de données doit être constant et suffisamment élevé pour détecter les fines variations des valeurs de pression interne et du diamètre du vaisseau.

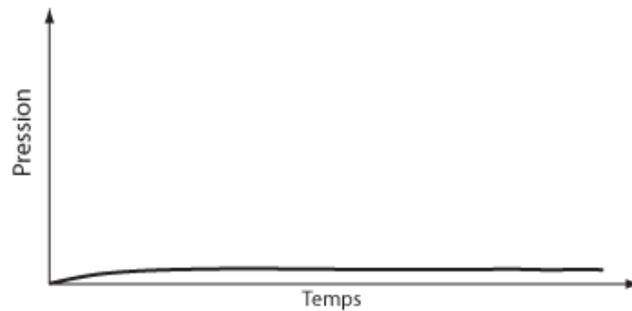
Finalement, les logiciels de contrôle du système devaient être suffisamment simples pour permettre à un usager non-expérimenté de préparer le système pour les essais, d'opérer le système durant les essais et de recueillir les données produites à la fin des essais. Les données devaient également être recueillies dans des fichiers et sous un format qui permet leur traitement.

#### ***Section 4.2 - Implication des résultats obtenus***

Les résultats recueillis, dont un échantillon est présenté dans l'article du chapitre précédent, démontrent que les objectifs du projet ont été atteints. Le montage permet en effet de caractériser plusieurs propriétés mécaniques des substituts vasculaires. L'ensemble des composantes du montage, combinée avec les logiciels de contrôle et d'analyse de données, forment un système complet et fonctionnel et permet à un usager de mesurer la pression d'éclatement d'un vaisseau et d'obtenir le calcul de sa compliance ou de le soumettre à un essai de fluage ou de fatigue d'une durée de son choix. Le plus grand nombre possible de paramètres est gardé constant pour assurer une grande reproductibilité des conditions expérimentales, minimiser l'erreur humaine, assurer une quantité et une précision suffisantes des données recueillies et permettre une correction systématique des données si elle s'avère nécessaire. Parmi ces paramètres, la vitesse de rotation du moteur, donc le taux de compression de la seringue et d'augmentation de la pression, est toujours maintenu constant. Les taux d'acquisition de données de pression et d'images sont tous les deux de 30 échantillons par seconde, ce qui facilite l'analyse de données et produit une quantité bien suffisante de données pour révéler les variations relativement lentes de diamètre et de pression. La répétabilité des résultats recueillis, tels que ceux présentés à la figure 3.7 du chapitre précédant, appuie également l'affirmation que le système réussit à reproduire, essai après essai, les mêmes conditions expérimentales.

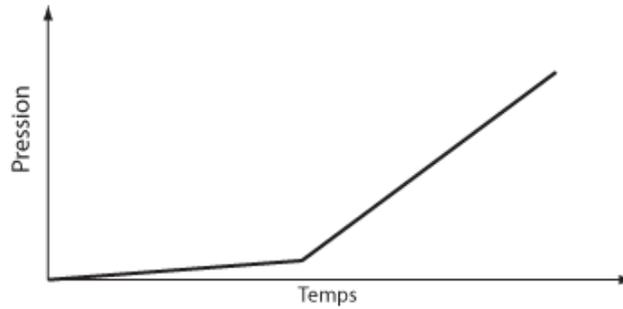
L'analyse des courbes de variations de pression et de diamètre des vaisseaux peut permettre d'identifier certains traits typiques des substituts analysés ainsi que des critères de

vérification des conditions expérimentales. Les informations supplémentaires que fournit une courbe de pression telle que celle de la figure 3.6, en plus des données brutes, permettent à l'utilisateur de vérifier que le substitut a été soumis à un essai dans des conditions expérimentales appropriées. Il est alors possible de déterminer que le substitut possédait, au départ, une certaine intégrité structurale, c'est-à-dire une paroi sans trous, ni déchirures et dont les multiples couches se sont bien fusionnées les unes aux autres.



**Figure 4.1 : Courbe de pressurisation d'un substitut avec un trou ou une déchirure**

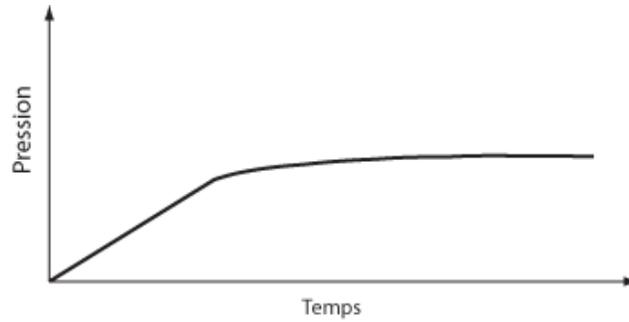
La figure 4.1 montre l'exemple d'une courbe de pressurisation d'un substitut avec une déchirure ou un trou. La faible augmentation de pression est le résultat d'une fuite constante dans le système. Cette fuite est le résultat d'un défaut déjà présent dans le substitut ou d'une manipulation abusive du substitut par la personne qui l'installe sur les canules. Le défaut peut être causé par un ensemble de facteurs biologiques et expérimentaux tels qu'un ensemencement inégal de cellules, un manque de nutriments, des morts cellulaires, une manipulation abusive lors du roulement des feuillets sur le mandrin ou l'absence d'une structure suffisamment résistante pour être manipulable. Peu importe la raison du défaut en question, l'utilisation fréquente du montage permet à un utilisateur expérimenté d'identifier, par une analyse rapide de la courbe de pression, certains des essais ou des données à rejeter. Dans le cas où un nombre élevé de substituts sont rejetés, on peut conclure que la méthode de fabrication n'a pas la capacité de produire des substituts possédant des caractéristiques intéressantes ou qu'une autre méthode d'analyse des propriétés mécaniques, tel qu'un essai de traction, s'impose.



**Figure 4.2 : Courbe de pressurisation d'un substitut en présence d'air ou de forte compliance**

La figure 4.2 montre une courbe de pression avec première région de plus faible pente. Ceci peut être le résultat de la présence d'air dans le système de tubulure ou d'une très grande compliance du substitut à faible pression. Dans le premier cas, l'utilisateur peut facilement faire circuler le fluide utilisé dans la tubulure pour enlever les bulles qui pourraient s'y trouver. Si l'essai se poursuit, l'augmentation de pression s'accélère habituellement, tout dépendant de la quantité d'air présent dans la tubulure. La présence d'air dans le système présente le risque que l'air étant infiniment plus compressible que le fluide, ce premier empêche la pression interne du substitut d'augmenter suffisamment pour le faire éclater. Dans le deuxième cas, une analyse de la courbe de diamètre confirme habituellement que le diamètre du substitut a augmenté rapidement au début de l'essai et dans le cadre des travaux présentés ici, cela se traduit habituellement par une faible résistance à l'éclatement et une compliance élevée.

La figure 4.3 montre un exemple de courbe de pression avec une première région de forte pente et une deuxième région aplatie. Il peut alors s'agir d'un substitut possédant une bonne intégrité structurale initiale et où il y a une absence d'air dans la tubulure, mais où le substitut présentait une faiblesse structurale qui empêche de le faire éclater de façon destructive. Dans le cas substituts vasculaires analysés pour cette étude, il s'agit habituellement d'une délamination des couches de matrice extracellulaire. On peut alors observer le chemin qu'emprunte le fluide entre les couches du substitut en partant du centre en allant vers l'extérieur jusqu'au lieu précis de la fuite. Dans d'autres cas, il peut s'agir de



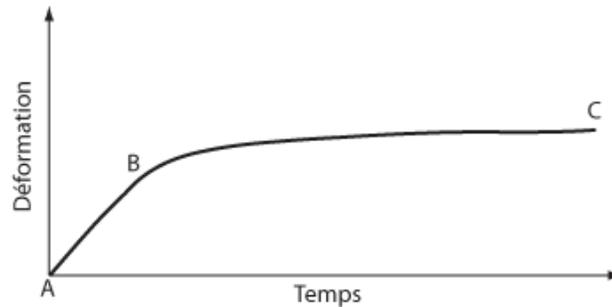
**Figure 4.3 : Courbe de pressurisation d'un substitut qui subit une délamination**

simples irrégularités sur la paroi interne du vaisseau où se concentrent les contraintes mécaniques et qui causent une défaillance structurale. Dans tous les cas, la pression d'éclatement de ce type de substitut est quand même considérée comme étant la pression maximale enregistrée lors de l'essai puisqu'elle cause un bris du substitut.

Le lieu de la défaillance du substitut doit aussi être considéré pour déterminer la validité d'un essai d'éclatement. En effet, comme lors d'un essai de traction, il est souhaitable que le substitut ne cède pas aux lieux d'ancrage ou de scellage, mais plus près du centre. Ceci indique que la défaillance du substitut testé est effectivement due à la contrainte mécanique imposée, une pression hydrodynamique dans le cas présent et non pas à la résistance que possède le tissu à ne pas déchirer sous la force de compression qu'impose le mécanisme de scellage. Si cette défaillance s'avère récurrente, un autre mécanisme de scellage qu'un *o-ring* doit être utilisé.

Dans le cas des essais d'éclatement, la forme des courbes de diamètres donne encore une fois plus d'informations que les simples données brutes sur le comportement général du substitut. En effet, les matériaux viscoélastiques subissent dans le domaine élastique, une déformation instantanée suivie d'une déformation différée. Les substituts analysés durant cette étude présentent le même comportement. Ils présentent une première déformation rapide (Figure 4.4, section AB de la courbe) due à la présence de collagène et d'élastine dans la matrice extracellulaire. Cette déformation est habituellement élastique et réversible. La déformation différée est elle aussi élastique au début, mais au-delà d'un certain seuil de déformation, elle devient plastique si la contrainte est augmentée. C'est durant ce type

déformation qu'une contrainte croissante mène à la défaillance ultime du substitut (Figure 4.4, section BC ).



**Figure 4.4 : Courbe de déformation viscoélastique**

La porosité d'un substitut est une autre donnée intéressante que peut fournir un essai de fluage. En effet, la matrice extracellulaire d'un vaisseau sanguin normal présente une certaine porosité qui permet aux cellules d'acheminer nutriments, molécules et autres substances de la lumière du vaisseau vers l'extérieur. Il devient donc intéressant et opportun, dans le cadre d'un essai de fluage, de mesurer et la porosité d'un substitut vasculaire et de la comparer avec d'autres substituts composés de cellules d'une souche différente, de substituts d'épaisseurs différentes ou de substituts composés de multiples couches cellulaires (média seule, adventice seule, media et adventice). Il s'agit de mesurer le volume de fluide qui s'accumule à l'extérieur du substitut en fonction du temps pour déterminer, par exemple, la porosité d'un substitut à une pression donnée. Il peut également être intéressant de faire varier la pression interne d'un substitut pour caractériser sa porosité.

### ***Section 4.3 - Pertinence des travaux***

La grande répétabilité des conditions expérimentales permet non seulement d'obtenir les valeurs précises des propriétés mécaniques à l'étude, mais permet du même coup de quantifier la variabilité de la méthode de fabrication des substituts vasculaires. En effet, de par leur nature, les cellules que contient chacun des substituts ne se comporteront jamais de façon identique d'un substitut à l'autre. Un instrument comme celui développé dans le cadre de ce projet peut permettre de quantifier cette variabilité et de mesurer directement les effets d'une variante de la méthode d'auto-assemblage sur la structure et le degré

d'intégrité d'un substitut. Il pourrait s'agir d'un site différent de prélèvement de cellules, de l'ajout d'un facteur de croissance dans le milieu de culture, de conditions d'expansion cellulaire différentes, de stimulation mécanique ou électrique des cellules ou des substituts, etc. Un meilleur contrôle de la méthode de fabrication implique que les propriétés du substitut produit seront plus prévisibles. Ceci permettrait de produire davantage de substituts vasculaires possédant des caractéristiques intéressantes, de maximiser les chances de succès d'une implantation et minimiser les complications pour les patients. De plus, un système qui permet de reproduire fidèlement des analyses des propriétés mécaniques des substituts présente un intérêt indéniable pour le contrôle de la qualité et la mise en place d'un système de production capable de rencontrer des normes de production standardisées telles que celles exigées pour obtenir une certification de Bonne Pratiques de Fabrication ("*Good Manufacturing Practice*").

Une bonne caractérisation de la méthode pourrait également permettre d'identifier d'autres indicateurs, préférablement non destructifs, du degré d'intégrité d'un substitut, et qui donneraient un indice du temps de maturation optimal. Ceci permettrait de minimiser l'attente d'une greffe et d'en augmenter les chances de succès. On éviterait aussi de produire des substituts multiples avec comme seul objectif d'avoir des copies du substitut implanté pour effectuer les essais mécaniques qui déterminent son « implantabilité ».

#### ***Section 4.4 - Limites du système***

Dans sa configuration actuelle, le système peut être utilisé pour caractériser des vaisseaux de faible calibre (<6mm) et d'une longueur d'environ 10 cm. La pression maximale qui peut être produite est d'environ 2000 mmHg. Pour caractériser de plus gros vaisseaux, il serait nécessaire d'augmenter la force du moteur et possiblement de remplacer le manomètre par un modèle semblable mais de plus grande capacité. Tout dépendant du diamètre et de la longueur du substitut, il pourrait également être nécessaire d'augmenter la taille de la seringue pour injecter un plus grand volume de milieu de culture pour un même déplacement. Il faudrait alors ajuster la vitesse de rotation du moteur pour obtenir un débit d'injection semblable à celui utilisé dans le cadre de cette étude.

D'autre part, la configuration actuelle du système limite sa capacité à produire une onde de pression parfaitement sinusoïdale. De manière à produire une onde plus lisse et répétitive, une boucle de rétroaction serait nécessaire pour comparer le signal de pression enregistré par la sonde de pression à celui d'une consigne parfaitement sinusoïdale. Avec l'ajout d'un algorithme de correction ou un contrôleur de type PID (proportionnel, dérivée, intégrale), la vitesse du moteur serait contrôlée pour suivre la consigne de pression de plus près. On pourrait également envisager la conception ou l'utilisation d'un différent mécanisme de pressurisation du vaisseau. L'approche adoptée ici était nécessaire pour obtenir les pressions élevées pour faire éclater les substituts. Cependant, dans un montage consacré à une stimulation mécanique ou des essais de fluage et de fatigue à des pressions physiologiques peu élevées (entre 80 et 120 mmHg), le mécanisme de compression composé du moteur, de l'étau et de la seringue pourrait, par exemple, être remplacé par un cylindre actionné par un moteur linéaire. Ce type de moteur est plus approprié pour effectuer des mouvements de va-et-vient de façon continue.

D'autre part, une lecture de pression plus près du substitut aurait amélioré la précision du système. En effet, la longueur de tubulure qui sépare le manomètre et le substitut cause des pertes de charges et introduit un retard de phase qui pourrait être évité si le manomètre était situé plus près du substitut. La longueur de tubulure entre l'endroit où s'effectue la mesure de pression et le spécimen devrait donc être minimisée. L'utilisation d'un manomètre à fibre optique, par exemple, permettrait d'effectuer la mesure de pression à l'intérieur même du substitut, ce qui éliminerait le retard de phase et permettrait une meilleure corrélation temporelle des mesures de pression et de diamètre.

La fréquence d'acquisition de données de pression est déterminée par la fréquence d'acquisition d'images du substitut et cette dernière est fixée à 30 images par secondes. Cela implique donc que 30 mesures de pression sont effectués chaque seconde, ce qui est bien au delà de la plus haute fréquence de pressurisation du substitut de 1 Hz. Les variations de diamètre des substituts est toujours lente et la précision et le nombre de lectures obtenues étaient suffisantes pour mesurer précisément les valeurs de pression d'éclatement des vaisseaux. Une mesure de la bande passante du système d'acquisition de données de

pression pourrait caractériser davantage la réponse du système. Cette analyse serait nécessaire si les fréquences de stimulation des substituts étaient d'un ordre de grandeur supérieur. Il s'avérerait peut-être aussi nécessaire d'augmenter la vitesse d'acquisition d'images. De façon générale, une vitesse d'acquisition dix fois supérieure à la fréquence de stimulation est supposée suffisante.

#### ***Section 4.5 - Suite du projet***

Cette première étude sur les propriétés mécaniques des substituts produits par la méthode d'auto-assemblage comportait l'analyse de trois types de substituts: des substituts formés seulement d'une média, de seulement un adventice et des substituts formés d'une superposition des deux types de substituts mentionnés précédemment. De plus, tous ces substituts ont été fabriqués dans des conditions statiques où les couches, enroulées sur un mandrin étaient simplement plongées dans du milieu de culture changé à intervalles réguliers. Les substituts étaient laissés sur les mandrins pour des périodes de maturation déterminées et la mesure de leurs propriétés mécanique était effectuée immédiatement après le retrait du mandrin. L'instrument développé dans le cadre de cette étude a fourni quelques données relatives à ce protocole expérimental qu'on pourrait nommer "protocole de base".

À l'avenir, plusieurs modifications pourraient être incluses dans ce protocole expérimental pour mesurer leurs effets sur les propriétés mécaniques des substituts produits. La stimulation mécanique est un excellent exemple d'une deuxième étape de maturation qui pourrait grandement influencer le comportement général du substitut et l'amélioration de ses propriétés mécaniques. On pourrait imaginer un protocole comportant une perfusion des substituts avec un milieu de culture à débit contrôlé et qui augmenterait avec le temps pour atteindre des valeurs physiologiques. La pression interne du substitut pourrait également être maintenue constante et/ou ensuite variée pour reproduire une pulsation cardiaque. La stimulation mécanique *in vitro* des substituts pourraient améliorer leurs propriétés mécaniques en les pré-conditionnant à une exposition aux conditions présentes dans le corps humain ou animal et favoriser une meilleure intégration et un meilleur remodelage de la matrice extracellulaire par les cellules environnantes. Le système conçu dans le cadre de

ces travaux pourrait être utilisé pour quantifier l'effet de différents régimes de stimulation mécanique sur les propriétés mécaniques.

En plus de la stimulation mécanique, le système développé pourrait être un instrument précieux pour l'étude de l'effet d'agents pharmacologiques sur les cellules qui forment les feuillets qui composent les substituts ou sur les substituts eux-mêmes. On pourrait en effet développer des protocoles expérimentaux comportant l'ajout d'agents pharmacologiques à différentes étapes de la production des substituts vasculaires. Le système de caractérisation pourrait mesurer les propriétés des substituts immédiatement après leur maturation dans ces nouvelles conditions ou suite à une stimulation mécanique et l'ajout d'un agent vasodilatateur ou vaso-constricteur dans le système de perfusion du substitut.

Finalement, l'ajout d'un endothélium pourrait également influencer les propriétés mécaniques des substituts produits par la méthode d'auto-assemblage. Comme il est plus longuement expliqué dans le Chapitre 1, l'endothélium est une couche cellulaire de grande importance dans les vaisseaux natifs. Son ajout pourrait être une étape importante dans la tentative de les recréer. Encore une fois, le système mis au point durant les travaux présenté ici pourrait servir d'outil pour mesurer la contribution de l'endothélium, par ses effets sur les cellules de la média, de l'adventice et de la matrice extracellulaire, sur les propriétés mécaniques et le comportement mécanique des substituts en général.

Le système améliore la connaissance de chaque composante des substituts et l'influence individuelle et combinée de variations de conditions de culture, de stimulation mécanique et d'agents pharmacologiques au processus de production de substituts vasculaires.

## **Conclusion**

Le génie tissulaire constitue une approche intéressante pour la production de substituts vasculaires. Il importe, pour assurer leur fonctionnalité, de produire des substituts vasculaires possédants des propriétés mécaniques semblables à celles des vaisseaux natifs auxquels ils sont anastomosés. Une bonne connaissance des propriétés mécaniques des tissus reconstruits est essentielle à leur optimisation. Il est donc primordial de concevoir des appareils capables de caractériser les propriétés mécaniques des substituts. Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail confirment que le système conçu et validé est un outil adéquat et fiable pour une utilisation dans l'analyse des propriétés mécaniques de substituts vasculaires produits par la méthode d'auto-assemblage. Le système a amélioré la connaissance des propriétés mécaniques de chaque couche cellulaire d'un vaisseau reconstruit et a permis de mieux comprendre leurs contributions individuelles respectives au comportement du substitut en général. Cette étude s'est donc révélée comme étant pertinente dans le cadre de l'optimisation de la méthode d'auto-assemblage et dans l'amélioration des connaissances des substituts vasculaires qu'elle permet de produire.

## Bibliographie

1. American Heart Associate web site, Heart Disease and Stroke Statistics 2007 Update,  
<http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/CIRCULATIONAHA.106.179918#SEC80>  
<http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4478>
2. Departments of Health and Human Services, Center for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/nccdphp/publications/factsheets/Prevention/cvh.htm>
3. Sarkar S. et al. The Mechanical Properties of Infrainguinal Vascular Bypass Grafts: Their Role in Influencing Patency, Euro. J of Endovac. Surg
4. L'Heureux N., Paquet S., Labbé, Germain L., Auger F.A. (1998). "A completely biological tissue-engineered human blood-vessel." FASEB Journal;12:47-5
5. Roeder R et al. Compliance, elastic modulus, and burst pressure of small-intestine submucosa (SIS), small-diameter vascular grafts, J of Biomedical Mater. Research, pp. 65-70, 1999
6. Nerem R.M., Tissue Engineering a Blood Vessel Substitute: The Role of Biomechanics, Yonsei Medical Journal, Vol. 41, No.6, pp.735-739,2000
7. Berglund J.D et al, Viscoelastic Testing Methodologies for Tissue Engineered Blood Vessels, Transactions of the ASME, Vol. 127, pp. 1176-1184, December 2005
8. Laflamme K. et al, Adventitia contribution in vascular tone : insights from adventitia-derived cells in a tissue-engineered human blood vessel, FASEB Journal, Vol. 20(8), 1245-7, June 2006
9. Laflamme K. et al., Tissue-engineered human vascular media produced in vitro by the self-assembly approach present functional properties similar to those of their native blood vessels, Tissue Eng. 2006 Aug;12(8):2275-81.
10. Grenier, G. et al., Isolation and culture of the three vascular cell types from a small vein biopsy sample. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. **39**, 131, 2003.
11. Grenier G. et al., Tissue Reorganization in Response to Mechanical Load Increases Functionality, Tissue Eng. 2005 Jan-Feb;11(1-2):90-100.
12. Nerem et Seliktar, Vascular Tissue Engineering, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2001, 3:225-43
13. Haruguchi et al, Intimal hyperplasia and hemodynamic factors in arterial bypass and arteriovenous grafts: a review, J Artif Organs. 2003;6(4):227-35

14. Szilagyi et al, Long-term behavior of a dacron arterial substitute, clinical, reontgenologic and histologic correlations, *Annals of Surgery*, September 1965
15. Conte MS. The ideal small arterial substitute: A search for the Holy Grail?, *FASEB J.* 12:43-45
16. Guidoin et al, Expanded polytetrafluoroethylene arterial prostheses in humans: histopathological study of 298 surgically excised grafts, *Biomaterials.* 1993 Jul;14(9):678-93
17. Formichi et al, Expanded PTFE prostheses as arterial substitutes in humans: late pathological findings in 73 excised grafts, *Ann Vasc Surg.* 1988 Jan;2(1):14-27
18. Abbott et al, Evaluation and Performance standards for arterial prostheses, *Journal of Vascular Surgery*, Volume 17, Number 4, 1993
19. Gong et al, Blood Vessels Engineered from Human Cells, *TCM Vol.* 16, No. 5, 2006
20. L'heureux et al., Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization, *Nature Medecine*, Vol. 12, Number 3, 2006
21. Knez et al., Rotational In Vitro Compliance Measurement of Diverse Anastomotic Configurations: A Tool for Anastomotic Engineering, *Jour. Biomech.*, 37,275
22. Kidson et al., Low Compliance and Arterial Graft Occlusion, *Circulation*, 58,11.
23. Isenberg et al., Small-Diameter Artificial Arteries Engineered In Vitro, *Circulation Research*, 2006;98;25-35
24. Tranquillio R., The Tissue-Engineered Small-Diameter Artery, *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 961:251-254,2002
25. Mitchell S., Niklason L, Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts, *Cardiovascular Pathology*, 12, 59-64,2003
26. Lehoux S., Tedgui A., Bases cellulaires de la mécanotransduction dans la cellule endothéliale, *Médecine/Sciences*, Num. 5, Vol. 20, pp. 551-555, mai 2004
27. Girton T.S., Mechanisms of stiffening and strengthening in media-equivalents fabricated using glycation, *Jour. Biomechanical Eng.* 122, 216-233, 2000
28. *Handbook of Physiology*, Section 2: The Cardiovascular system, American Physiological Society, 1980

29. Canham et al., Contrasting structure of the saphenous vein and internal mammary artery used as coronary bypass vessels, *Cardiovascular Research* 34\_1997.557–567
30. Mertens R.A. et al., Surgical management of infrainguinal arterial prosthetic graft infections: Review of a thirty-five-year experience., *Journal Vascular Surgery*, 21, 782-791
31. [www.granddictionnaire.com](http://www.granddictionnaire.com), Office de la langue française du Gouvernement du Québec.
32. Weinberg C.B et Bell E, A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells, *Science* 231, 397-400,1986
33. Tortora, Brabowski, *Principes d'anatomie et de physiologie*,
34. Michel et al., Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, vol. 35, pp 318-26,1999
35. *Principles of tissue-engineering*, 2<sup>nd</sup> edition, San Diego, Academic Press, 2000 pp.3-7
36. Goulet F.R. et al., Tendons and Ligaments, in *Principles of Tissue Engineering*, San Diego, Academic Press, 2000 pp.3-7
37. Germain L. et al., Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering, *Pathobiology*, vol 67, pp 140-7, 1999
38. Silver F.H, , Mechanical Properties of the Aorta: A Review, *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, Vol. 17, Issue 4, 1989
39. Dahl S., Mechanical Properties and Compositions of Tissue Engineered and Native Arteries, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 35, No. 3, March 2007
40. Stegemann J.P., Mechanical, biochemical and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype, *J Applied Physiol*, 98:2321-2327,2005
41. Gilbert T.W et al, Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials*, 27, 3675-3683, 2006
42. Nerem R., Tissue Engineering: The Hope, the Hype, and the Future, *Tissue Engineering*, Vol. 12, Number 5, pp 1143-1150, 2006
43. Gilbert T.W et al, A quantitative method for evaluating the degradation of biologic scaffold materials, *Biomaterials*, 28, pp147-150,2007

44. Lantz GC, Small intestinal submucosa as a vascular graft: a review, *J Invest Surg.* 1993 May-Jun;6(3):297-310.
45. Zisch A, Fibrin-based matrices for angiogenic stimulation, *Jour Vasc. Surgery* 31(6), pp 1303-5, 2000
46. Cummings C.L. et al, Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin and collagen-fibrin mixtures, *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 3699-3706, 2004
47. Bonzon N. et al., New artificial connective matrix made of fibrin monomers, elastin peptides and type I+III collagens; structural study, biocompatibility and use as tympanic membranes in rabbit, *Biomaterials*, 16(11), pp 881-5, 1995
48. He H et al., Arterial replacement with compliant hierarchic hybrid vascular graft: biomechanical adaptation and failure, *Tissue Eng.*, 8(2), pp. 213-24, 2002
49. Naito M et al, Substrate-bound fibrinogen, fibrin and other cell attachment-promoting proteins as a scaffold for cultured vascular smooth muscle cells, *Atherosclerosis*, 96(2-3), pp 237-34, 1992
50. Schense et al., Cross-linking exogenous bifunctional peptides into fibrin gels with factor XIIIa, *Bioconjugate Chem*, 10(1), pp. 75-81, 1999
51. Saltz R. et al., Experimental and clinical applications of fibrin glue., *Plat. Reconstr. Surg*, 88(6), 1005-17, 1992
52. L'heureux et al., In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study, *J. Vasc. Surg.*, 17, 499-509, 1993
53. Tranquillo et al., Magnetically oriented tissue-equivalent tubes: application to a circumferentially oriented media-equivalent, *Biomaterials*, 17, 349-357
54. Seliktar et al., Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro, *Ann Biomed Eng.* 2000 Apr;28(4):351-62
55. Isenberg B.C., Tranquillo R.T., Long-term cyclic distension enhances the mechanical properties of collagen-based media-equivalents, *Ann. Biomed. Eng.* 31, 937-949.
56. Grassl E.D., A fibrin-based arterial media equivalent, *J Biomed Mater Res A.* 2003 Sep 1;66(3):550-61
57. Nerem R.M., Tissue engineering of the vascular system, *Vox Sanguinis*, 87, Suppl. 2, 5158-60, 2004

58. Freed L.E., Advanced tools for tissue engineering: Scaffolds, bioreactors, and signaling, *Tissue Engineering*, Vol.12, Number 12, 2006
59. Long JL, Elastic fiber production in cardio-vascular tissue-equivalents, *Matrix Biol.*, 22, 339-350, 2003
60. Yang, J. et al, Novel Biphasic Elastomeric Scaffold for Small-Diameter Blood Vessel Tissue Engineering, *Tissue Engineering*, Vol. 11, Num. 11/12, 2005
61. Niklason L.E et al, Functional Arteries Grown in Vitro, *Science*, vol 284, 1999
62. Freed L. et al., Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering, *Bio/Technology*, 12, 689-693, 1994
63. L'Heureux et al., A human tissue-engineered vascular media: a new model for pharmacological studies of contractile responses, *FASEB Journal*, Vol. 15, pp. 515-524, 2001
64. Ross R., The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers, *Journal Cell Biology*, 50, 172-186
65. Davidson J.M. et al, Ascorbate Differentially Regulates Elastin and Collagen Biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by peritranslational mechanisms, *Journal of Biological chemistry*, vol. 272, No. 1, 345-352, 1997
66. Smith-Mungo L.I. et al, Lysyl oxidase: Properties, regulation and Multiple Functions in Biology, *Matrix Biology Review*, Vol. 16, pp. 387-398, 1997/98
67. Raja S.G., Haider Z., Ahmad M., Zaman H.: Saphenous vein grafts: to use or not to use? *Heart Lung Circ* **13**(2): 150-6, 2004
68. Sabik J.F., 3rd, Lytle B.W., Blackstone E.H., Houghtaling P.L., Cosgrove D.M.: Comparison of saphenous vein and internal thoracic artery graft patency by coronary system. *Ann Thorac Surg* **79**(2): 544-51; discussion 544-51, 2005
69. Manchio J.V., Gu J., Romar L., Brown J., Gammie J., Pierson R.N., 3rd, Griffith B., Poston R.S.: Disruption of graft endothelium correlates with early failure after off-pump coronary artery bypass surgery. *Ann Thorac Surg* **79**(6): 1991-8, 2005
70. Sellke F.W., Boyle E.M., Jr., Verrier E.D.: Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the pathophysiology of vasomotor dysfunction. *Ann Thorac Surg* **62**(4): 1222-8, 1996

71. Borschel G.H., Huang Y.C., Calve S., Arruda E.M., Lynch J.B., Dow D.E., Kuzon W.M., Dennis R.G., Brown D.L.: Tissue engineering of recellularized small-diameter vascular grafts. *Tissue Eng* **11**(5-6): 778-86, 2005

72. Dardik A., Liu A., Ballermann B.J.: Chronic in vitro shear stress stimulates endothelial cell retention on prosthetic vascular grafts and reduces subsequent in vivo neointimal thickness. *J Vasc Surg* **29**(1): 157-67, 1999

73. Niklason L.E., Gao J., Abbott W.M., Hirschi K.K., Houser S., Marini R., Langer R.: Functional arteries grown in vitro. *Science* **284**(5413): 489-93, 1999

74. Berger K., Sauvage L.R., Rao A.M., Wood S.J.: Healing of arterial prostheses in man: its incompleteness. *Ann Surg* **175**(1): 118-27, 1972

75. Rahlf G., Urban P., Bohle R.M.: Morphology of healing in vascular prostheses. *Thorac Cardiovasc Surg* **34**(1): 43-8, 1986

76. Swartz D.D., Russell J.A., Andreadis S.T.: Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**(3): H1451-60, 2005