

KARINE VALLIÈRES

**AMÉLIORATION DES QUALITÉS  
FONCTIONNELLES DES IMPLANTS À DESTINÉE  
VASCULAIRE**

Thèse présentée  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de doctorat en Génie de la métallurgie et des matériaux  
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor, (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DE GÉNIE DES MINES, MÉTALLURGIE ET MATÉRIAUX  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2009

## Résumé

L'objectif global de ce projet de doctorat est d'améliorer les qualités fonctionnelles des prothèses vasculaires de téflon (PTFE). En ce sens, deux stratégies ont été développées: l'une pour diminuer les risques de thromboses et l'autre pour inhiber l'hyperplasie intimale.

Les thromboses se produisent dans les prothèses synthétiques car les matériaux utilisés sont non-hémocompatibles. Puisque le seul tissu hémocompatible connu est l'endothélium, le PTFE a été modifié afin de favoriser l'adhésion et la survie des cellules endothéliales. Le PTFE a d'abord été aminé par plasma d'ammoniac puis des bras d'ancrage ont été greffés sur les amines de la surface. Deux bras différents ont été employés, soit l'anhydride glutarique (GA) et le sulfo-SMPB (SMPB). L'autre extrémité des bras d'ancrage a été utilisée pour greffer la fibronectine (FN), une glycoprotéine d'adhésion présente dans les matrices extracellulaires. Le succès de chaque étape de modification a été vérifié par des analyses XPS. La quantité, l'activité et la *conformation* de la FN sur chacun des bras d'ancrage ont été étudiées par dosage radioactif, des essais d'adhésion cellulaire, ELISA, AFM et angle de contact. La FN favorise l'adhésion des cellules endothéliales sur le PTFE, particulièrement lorsqu'elle est greffée sur GA. La FN greffée sur GA a une plus grande activité biologique et une *conformation* plus étendue que celle greffée sur SMPB.

L'hyperplasie intimale est un épaissement de la couche interne des artères dû à la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (SMCs) et à leur production de matrice extracellulaire. Cet épaissement entraîne une réduction de la lumière artérielle et du flux sanguin, puis ultimement, l'échec de la prothèse. Pour contrer ce phénomène, le potentiel du mésylate d'imatinib à inhiber spécifiquement les SMCs sans nuire à la croissance des cellules endothéliales a été évalué *in vitro*. Des essais de prolifération de cellules musculaires et endothéliales en mono et en co-culture ont été faits avec différentes concentrations de mésylate d'imatinib. Il a été démontré que des concentrations de 1.2 à 3.7 $\mu$ M de mésylate d'imatinib inhibent les SMCs et favorisent la prolifération des cellules endothéliales. De plus, l'analyse de l'expression des protéines PARP et caspase 3 clivée par western blot a montré qu'à ces concentrations, le mésylate d'imatinib n'entraîne pas l'apoptose des cellules.

## Abstract

The overall objective of this Ph.D. thesis is to improve the patency of PTFE vascular prostheses. To achieve this goal, two strategies were developed: one aiming to decrease thromboses risks and the other to inhibit intimal hyperplasia.

Thromboses happen in synthetic prostheses because they are made of non-haemocompatible materials. Since the only known haemocompatible tissue is the endothelium (monolayer of endothelial cells covering the inner wall of all blood vessels and heart), the PTFE was modified in order to promote adhesion and survival of endothelial cells. PTFE was first functionalized by low pressure ammonia plasma to introduce amino groups and linking arms were grafted onto these functional groups. Two different linkers were used, glutaric anhydride (GA) and sulfo-SMPB (SMPB). The free end of linking arms was used to graft fibronectin (FN), an adhesion protein found in most extracellular matrix. The success of each step of modification was ascertained by XPS analyses. FN quantity, activity and conformation on each linking arm was studied by radiolabeling assays, cellular adhesion assays, ELISA, AFM and contact angle. FN greatly promotes endothelial cell adhesion on PTFE, especially when it is grafted onto GA. It was demonstrated that FN grafted on GA had a better biological activity and a more unfolded conformation than FN grafted on SMPB.

Intimal hyperplasia is a thickening of the innermost layer of artery wall due to migration and proliferation of smooth muscle cells and their matrix production. This thickening leads to a decrease in lumen size and blood flow which ultimately cause the prosthesis failure. To counter this phenomenon, the inhibition potential of imatinib mesylate over smooth muscle cells and its harmlessness to endothelial cells were evaluated *in vitro*. Proliferation assays of muscular and endothelial cells were performed in mono and co-culture with different imatinib mesylate concentrations. It was demonstrated that imatinib mesylate inhibits smooth muscle cells and promotes endothelial cell proliferation in a concentration range of 1.2 to 3.7 $\mu$ M. Furthermore, PARP and cleaved caspase 3 expression analyses by western blotting showed that in this concentration range, imatinib mesylate did not cause cell apoptosis.

## Avant-Propos

Mon sujet de doctorat est partie intégrante d'un vaste projet de recherche ayant pour objectif le développement d'une prothèse artérielle synthétique efficace à long terme pour le remplacement d'artères de petit diamètre. Les prothèses utilisées actuellement ayant un taux de *perméabilité* à long terme de moins de 50% à 5 ans, le développement d'une prothèse efficace est essentiel pour éviter l'amputation, voire la mort de milliers de patients. Un tel projet ne se réalise pas en trois ans mais j'ose espérer que le travail présenté dans cette thèse est un pas dans la bonne direction. Dans le cadre de ce doctorat, les objectifs fixés étaient l'élaboration et l'évaluation *in vitro*, de stratégies pour remédier aux deux problèmes majeurs rencontrés avec les prothèses artérielles synthétiques, soit la thrombose et l'hyperplasie intimale. Dans ce projet à caractère très multidisciplinaire, la biologie est à la base de la problématique et de l'évaluation *in vitro* des surfaces alors que les principes de chimie et de physique sont primordiaux en ce qui concerne les modifications ainsi que la caractérisation des surfaces de PTFE. Toutes les modifications de surface et les essais d'adhésion et de prolifération cellulaire ont été effectués sur des films de PTFE et non sur des prothèses de PTFE expansé. Ces résultats devront donc être confirmés ultérieurement sur le PTFE expansé.

Cette thèse est rédigée sous la forme d'insertion d'articles. Les résultats et discussion sont présentés aux chapitres III-IV et V qui sont constitués d'un article chacun. Ces articles résultent du travail expérimental effectué pendant le doctorat et sont rédigés en anglais mais précédés d'un avant-propos et d'un résumé en français. Je suis première auteure de ces trois articles qui ont toutefois été réalisés en collaboration avec plusieurs collègues, soit Christian Sarra-Bournet, étudiant au doctorat en génie des matériaux et de la métallurgie à l'Université Laval, Pascale Chevallier, Docteure en chimie et assistante de recherche à l'hôpital St-François d'Assise, Stéphane Turgeon, docteur en physique et assistant de recherche à l'hôpital St-François d'Assise, Gaétan Laroche, professeur titulaire et directeur du département de génie des mines, de la métallurgie et des matériaux à la Faculté des sciences et de génie de l'Université Laval et Éric Petitclerc, professeur sous octroi au département de médecine de la Faculté de médecine de l'Université Laval.

Le premier article intitulé " Covalent Grafting of Fibronectin onto Plasma-Treated PTFE: Influence of the Conjugation Strategy on Fibronectin Biological Activity" porte sur l'ancrage covalent de la fibronectine sur le PTFE et son influence sur l'activité biologique de la protéine d'adhésion. Cet article a été soumis à la revue *Macromolecular Bioscience* le 28 novembre 2006, révisé le 17 janvier 2007 et accepté le 19 janvier 2007. Le manuscrit inséré dans la thèse est identique à la version publiée. Ma contribution à cet article a été de 85% alors que mes coauteurs Laroche et Petitclerc ont contribué pour 15%. J'ai préparé les échantillons et effectué toutes les expérimentations, conçu les schémas et figures et rédigé une première version de l'article en entier. Les coauteurs ont guidé la recherche en donnant leur avis et conseils tout au long des étapes expérimentales et ont corrigé l'article.

Le second article intitulé "AFM Imaging of Immobilized Fibronectin: Does the Surface Conjugation Scheme Affect the Protein Orientation/Conformation?" porte sur l'étude de la *conformation* adoptée par la fibronectine sur le silica selon la stratégie d'ancrage utilisée. Cet article a été soumis à la revue *Langmuir* le 7 mai 2007 et accepté le 9 juillet 2007. Le manuscrit inséré dans la thèse est identique à la version publiée. Ma contribution à cet article a été de 55%. J'ai effectué tous les greffages de fibronectine, les expériences de dosage par radiomarquage, les essais d'adhésion cellulaire et les analyses statistiques (sauf pour l'analyse des images AFM). J'ai également rédigé l'abstract, l'introduction et la conclusion de même que le matériel et méthode, les résultats et la discussion pour les sections marquage de la FN et adhésion cellulaire. Les coauteurs Chevallier et Sarra-Bournet ont contribué pour 35%; ils ont préparé tous les échantillons (coupe, lavage, piranha, plasma, bras d'ancrage), effectué l'imagerie AFM, l'analyse des images AFM et les tests statistiques sur les données recueillies, les analyses XPS, l'angle de contact et ils ont contribué à la rédaction de la méthode, des résultats et de la discussion de ces parties. Les coauteurs Turgeon et Laroche ont contribué pour 10% en corrigeant l'article et en veillant au bon déroulement des manipulations.

Le troisième article intitulé " On the Ability of Imatinib Mesylate to Inhibit Smooth Muscle Cell Proliferation Without Delaying Endothelialization: An in vitro Study" porte sur l'évaluation in vitro du potentiel du mésylate d'imatinib à inhiber l'hyperplasie intimale. Cet article a été accepté pour publication dans la revue *Vascular Pharmacology* le 13 février

2009. Le manuscrit inséré dans la thèse est identique à la version qui sera publié. Ma contribution à cet article a été de 85% alors que mes coauteurs Laroche et Petitclerc ont contribué pour 15%. J'ai effectué toutes les expérimentations, conçu les schémas et figures et rédigé une première version de l'article en entier. Les coauteurs ont guidé la recherche en donnant leur avis et conseils tout au long des étapes expérimentales et ont corrigé l'article.

Je remercie mes deux directeurs, les professeurs Gaétan Laroche et Éric Petitclerc, pour m'avoir guidée tout au long de mon doctorat. J'ai beaucoup apprécié la grande liberté de travail que vous m'avez accordée de même que la considération que vous avez eu pour mes idées. Je remercie le Dr. Laroche de m'avoir donné la chance de participer à plusieurs congrès, dont deux à l'extérieur du Canada; ce fut une expérience très enrichissante.

Merci à Pascale Chevallier, Jean Lagueux, Marie-France Côté, Jacques Lacroix et Stéphane Turgeon qui m'ont grandement aidée dans l'élaboration de mes protocoles et la résolution des problèmes inhérents aux manipulations; à Christian Sarra-Bournet et Sébastien François pour leur esprit critique et pour l'animation du midi; à tous les gens qui ont fait du laboratoire un endroit agréable et propice aux échanges et finalement, merci Jay pour ton support, ta patience et toutes les corrections d'anglais.

Je remercie le conseil de recherche en sciences naturelles et génie du Canada (CRSNG) pour le soutien financier qu'il m'a apporté tout au long de mes études graduées.

Je dédie cette thèse à ma mère, pour les longues heures passées sur le coin de la table à me faire faire mes devoirs, à mon père pour son appui inconditionnel et à ma plus grande découverte au laboratoire, Jay.

*À mes parents et à ma plus belle découverte!*

## Table des Matières

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>II</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XVI</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I – PROBLÉMATIQUE .....</b>	<b>4</b>
<b>I. Le système cardiovasculaire .....</b>	<b>5</b>
1. Le sang.....	6
1. 1. L'hémostase.....	9
1. 1. 1. L'hémostase primaire .....	10
1. 1. 2. La coagulation plasmatique .....	12
1. 1. 3. La fibrinolyse.....	15
2. Le cœur.....	15
3. Les matrices extracellulaires .....	16
4. Les vaisseaux sanguins.....	17
4. 1. Les artères et les veines .....	17
4. 1. 1. L'intima .....	18
4. 1. 1. 1. L'endothélium .....	19
4. 1. 1. 2. La membrane basale .....	21
4. 1. 2. La média .....	22
4. 1. 3. L'adventice .....	22
4. 2. Les capillaires .....	22
5. Athérosclérose et pathologies associées.....	24
6. Traitements des maladies cardiovasculaires.....	27



<b>II. Les prothèses artérielles synthétiques.....</b>	<b>29</b>
1. Définition.....	29
2. Matériaux utilisés .....	30
3. Le teflon (PTFE).....	32
<b>III. Causes du mauvais rendement des prothèses de ePTFE.....</b>	<b>33</b>
1. Thromboses .....	33
2. Hyperplasie intimale.....	35
<b>CHAPITRE II – OBJECTIFS, HYPOTHÈSES, REVUE DE LA LITTÉRATURE ET STRATÉGIES.....</b>	<b>37</b>
<b>I. Favoriser la néo-endothélialisation afin de réduire les risques de thromboses .....</b>	<b>38</b>
1. Hypothèses .....	38
2. Revue de la littérature.....	38
2. 1. Mécanismes d'adhésion, de survie et de migration cellulaire.....	39
2. 1. 1. La membrane plasmique.....	39
2. 1. 2. L'adhésion et la survie cellulaire.....	40
2. 1. 3. La migration cellulaire.....	44
2. 2. Molécule d'adhésion: adsorption et activité biologique.....	45
2. 3. Recouvrement de surface.....	46
2. 4. Les modifications de surface .....	47
3. Stratégie sélectionnée .....	48
3. 1. La fibronectine (FN) .....	48
3. 1. 1. Structure et fonctions.....	49
3. 2. Les traitements plasmas .....	52
3. 3. Ancrage covalent de la FN.....	54
<b>II. Contrôle de l'hyperplasie intimale .....</b>	<b>58</b>
1. Hypothèses .....	58
2. Revue de la littérature.....	58
2. 1. Inhibiteur du muscle lisse .....	60
3. Stratégie sélectionnée .....	62

3. 1. Mésylate d'imatinib (Gleevec®) .....	62
--	----

### **CHAPITRE III - ARTICLE 1: INFLUENCE DE L'ANCRAGE COVALENT DE LA FIBRONECTINE SUR SON ACTIVITÉ BIOLOGIQUE ..... 65**

1. Avant-propos .....	67
2. Résumé .....	67
3. Abstract.....	68
4. Introduction .....	68
5. Experimental Part .....	70
5. 1. Materials .....	70
5. 2. Methods .....	71
5. 2. 1. Preparation of PTFE Surfaces.....	71
5. 2. 2. PTFE Treatment by Radiofrequency Glow Discharge (RFGD) Ammonia Plasma.....	71
5. 2. 3. Chemical Derivatization .....	71
5. 2. 4. Glutaric Anhydride (GA) Grafting .....	72
5. 2. 5. Sulfo-succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrate (SMPB) Grafting .....	72
5. 2. 6. FN Grafting.....	73
5. 2. 7. XPS Analyses .....	73
5. 2. 8. FN Radiolabeling.....	74
5. 2. 9. Cell Culture.....	74
5. 2. 10. Cell Adhesion Assay on Modified PTFE .....	74
5. 2. 11. ELISA .....	75
5. 2. 12. Statistical Analyses .....	76
6. Results and Discussion .....	76
6. 1. FN Grafting.....	76
6. 2. Radiolabeling Assay .....	77
6. 3. Cell Adhesion .....	79
6. 4. ELISA .....	81
7. Conclusions .....	83
8. Acknowledgements .....	84

<b>CHAPITRE IV- ARTICLE 2: ÉTUDE DE LA CONFORMATION DE LA FN PAR AFM .....</b>	<b>85</b>
1. Avant-propos .....	87
2. Résumé .....	87
3. Abstract.....	88
4. Introduction .....	88
5. Experimental Section.....	90
5. 1. Materials .....	90
5. 2. Surface Modifications.....	91
5. 2. 1. Piranha Activation .....	91
5. 2. 2. Plasma Treatments.....	92
5. 2. 3. Crosslinker Grafting .....	92
5. 2. 4. FN Grafting.....	93
5. 3. Experiments .....	93
5. 3. 1. XPS Analyses .....	93
5. 3. 2. FN Radiolabeling.....	93
5. 3. 3. Cell Adhesion .....	94
5. 3. 4. Contact Angle .....	94
5. 3. 5. AFM Imaging .....	95
5. 3. 6. AFM Image Analysis.....	95
5. 3. 7. Data Analysis.....	96
6. Results and Discussion.....	96
6. 1. XPS Analyses .....	96
6. 2. Radiolabeling Assays.....	99
6. 3. Cell Adhesion Assays .....	100
6. 4. Contact Angle Measurements.....	100
6. 5. Atomic Force Microscopy .....	101
7. Conclusion.....	105
8. Acknowledgments .....	106

<b>CHAPITRE V- ARTICLE 3: LE MÉSYLATE D'IMATINIB INHIBE LA CROISSANCE DU MUSCLE LISSE ET STIMULE LA CROISSANCE DE L'ENDOTHÉLIUM.....</b>	<b>107</b>
1. Avant-propos .....	109
2. Résumé .....	109
3. Abstract.....	110
4. Introduction .....	110
5. Materials and Methods .....	113
5.1 Chemicals.....	113
5.2 Cell cultures .....	113
5.3 Resazurin proliferation assay.....	114
5.4 Immunofluorescence.....	114
5.5 PCNA proliferation assay .....	115
5.6 Western blotting.....	115
5.7 Statistical analysis.....	116
6. Results .....	116
6.1 Imatinib mesylate inhibits SMC proliferation .....	116
6.2 Enhanced EC proliferation with low doses of imatinib mesylate.....	117
6.2 The effects of imatinib are potentiated by vascular cell co-cultures .....	118
6.3 PCNA expression confirms the stimulating effect of imatinib on endothelial cells .....	121
6.4 Apoptosis is not accountable in the antiproliferative effect of imatinib on SMCs .....	122
6. Discussion.....	123
7. Conclusions .....	125
8. Acknowledgements .....	125
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>126</b>
<b>Favoriser la néo-endothélialisation.....</b>	<b>126</b>
<b>Contrôler l'hyperplasie intimale.....</b>	<b>131</b>
<b>GLOSSAIRE .....</b>	<b>135</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>139</b>

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Résumé des caractéristiques et fonctions des éléments figurés du sang.....	8
<b>Tableau 2.</b> Rendement de réaction des différents bras d'ancrage avec le PTFE aminé.....	56
<b>Tableau 3.</b> Comparaison de quelques inhibiteurs de prolifération des cellules musculaires lisses selon leur mode d'action. ....	61
<b>Table 4.</b> Water Contact Angles ( $\theta^\circ$ deg) of Silica at Different Steps of Surface Modification .....	101
<b>Table 5.</b> Roughness <sup>a</sup> (nm) of Silica Surfaces at Different Steps of Surface Modification	102
<b>Table 6.</b> FN Diameter and Height (nm) on Different Surfaces <sup>a</sup> .....	103

## Liste des Figures

Figure 1. Le système cardiovasculaire.....	5
Figure 2. Composants du sang d'un adulte normal. ....	6
Figure 3. Changement de conformation des plaquettes lors de l'adhésion. ....	11
Figure 4. Agrégation plaquettaire via la liaison du fibrinogène au récepteur GpIIb/IIIa activé.....	12
Figure 5. Cascade de la coagulation. ....	14
Figure 6. Pression sanguine à l'intérieur des différents vaisseaux. ....	17
Figure 7. Schéma comparatif d'une artère et d'une veine. ....	18
Figure 8. L'effet de pompe de la contraction musculaire dans les membres inférieurs. ....	19
Figure 9. Différentiels de pression permettant la filtration capillaire.....	23
Figure 10. Développement de l'athérosclérose dans une artère naturelle .....	25
Figure 11. Formation des cellules spumeuses dans la paroi artérielle.....	26
Figure 12. Schéma d'une plaque sténosante au niveau des membres inférieurs. ....	27
Figure 13. Traitements chirurgicaux endovasculaires et conventionnels des maladies cardiovasculaires.....	29
Figure 14. Structure chimique du PTFE et du PET. ....	31
Figure 15. Micrographie du PTFE et du ePTFE.....	32
Figure 16. Schéma de la structure d'une membrane plasmique.....	40
Figure 17. Les quatre familles majeures de molécules d'adhésion cellulaire et de récepteurs d'adhésion .....	41
Figure 18. Schéma des jonctions cellulaires spécialisées.....	43
Figure 19. Les sites d'interactions moléculaires de la FN.....	50
Figure 20. Les intégrines sont le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. ....	51
Figure 21. Activation d'une molécule de FN. ....	52

Figure 22. Schéma d'un gaz neutre et d'un plasma. ....	53
Figure 23. Réacteur radiofréquence à plasma froid du Laboratoire d'Ingénierie de Surface. .....	54
Figure 24. Schéma de greffage direct de la FN sur le PTFE aminé .....	55
Figure 25. Schéma de greffage de la FN sur le PTFE aminé via le GA et le sulfo-SMPB ..	57
Figure 26. Schematic representation of the conjugation strategies used to covalently bind FN onto PTFE. ....	73
Figure 27. XPS analyses after each PTFE surface modification step. ....	77
Figure 28. Radiolabeling assays of FN grafted or adsorbed on different surfaces. ....	78
Figure 29. BAECs adhesion onto clean and modified PTFE surfaces with and without FN. .....	80
Figure 30. FN ELISA results normalized with respect to PTFE/FN. ....	82
Figure 31. Correlation between cell adhesion and the availability rate of the FN cell binding peptide normalized with respect to PTFE/FN. ....	83
Figure 32. Schematic representation of both strategies used to covalently bind the FN on silica surfaces. ....	91
Figure 33. Analysis technique used to determine fibronectin moieties height and width dimensions on surfaces. ....	96
Figure 34. XPS survey spectra of silica surface before and after its activation in piranha solution and after a MW plasma treatment .....	98
Figure 35. Radiolabeling assays of FN on modified silica surfaces. ....	99
Figure 36. BAECs adhesion normalized with respect to piranha control surface. ....	100
Figure 37. Tapping mode AFM images (700 X 700 nm) of the different modification steps .....	102
Figure 38. Normalized Frequency distribution of fibronectin height (a) and diameter (b)	105
Figure 39. Effect of imatinib mesylate on smooth muscle cell proliferation. ....	117
Figure 40. Effect of imatinib mesylate on endothelial cell proliferation. ....	118
Figure 41. Fluorescence micrographs of BAECs and BAOSMCs after 72 h of co-culture with various concentrations of imatinib mesylate. ....	120

Figure 42. Proliferating cell percentage after 24 h of culture with or without imatinib mesylate. .... 121

Figure 43. Representative western blot analyses of BAOSMC and BAEC extracts untreated, treated with 3.7  $\mu$ M imatinib mesylate, or treated with 200 nM paclitaxel..... 122



## Liste des Abréviations

- ADP: Adénosine diphosphate  
 AFM: Microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy)  
 AMPc: Adénosine monophosphate cyclique  
 ATP: Adénosine triphosphate  
 BAEC: Cellule endothéliale d'aorte bovine (Bovine Aortic Endothelial Cell)  
 BAOSMC: Cellule musculaire d'aorte bovine (Bovine Aortic Smooth Muscle Cell)  
 CAMs : Molécules d'adhésion cellulaire (Cell-adhesion Molecules)  
 EC: Cellule endothéliale (Endothelial Cell)  
 ELISA: Dosage immunoenzymatique sur support solide (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)  
 FGF: Facteur de croissance des fibroblastes (Fibroblast Growth Factor)  
 FN: Fibronectine  
 GA: Anhydride glutarique (Glutaric Anhydride)  
 HMG-CoA réductase: 3-Hydroxy-3-Méthyl-Glutaryl-CoA réductase  
 HSA: Albumine de sérum humain (Human Serum Albumin)  
 HUVEC: Cellule endothéliale de veine ombilicale humaine (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)  
 HVSMC: Cellule musculaire lisse vasculaire humaine (Human Vascular Smooth Muscle Cell)  
 IFN- $\gamma$ : Interféron gamma  
 IL-1: Interleukine 1  
 MMP-9: Métalloprotéinase de matrice-9 (Matrix Metalloproteinase-9)  
 NO: Monoxyde d'azote (Nitric Oxide)  
 PAF: Facteur activant des plaquettes (Platelet Activator Factor)  
 PAI-1: Inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène (Plasminogen Activator Inhibitor-1)  
 PC: Phosphorylcholine  
 PCNA: (Proliferating Cell Nuclear Antigen)  
 PDE: Phosphodiesterase  
 PDGF: Facteur de croissance dérivé des plaquettes (Platelet Derived Growth Factor)  
 PDGF-R: Récepteur du PDGF (Platelet Derived Growth Factor Receptor)  
 PEGs: Poly(éthylène glycol)s  
 PET: Polyéthylène téréphtalate ou dacron  
 PGI<sub>2</sub> : Prostacyclines  
 PTFE: Polytétrafluoroéthylène ou téflon  
 ePTFE: téflon expansé  
 rHGF: Facteur de croissance des hépatocytes recombinant (recombinant hepatocyte growth factor)  
 RGD: Peptide "arginine-glycine-acide aspartique"  
 sEH: Époxyde hydrolase soluble (Soluble Epoxyde Hydrolase)  
 SCF: Facteur des cellules souches (Stem Cell Factor)  
 SMC: Cellule musculaire lisse (Smooth Muscle Cell)  
 SMPB: Sulfo-succinimidyl-4-(*p*-maleimidophenyl)butyrate

TGF- $\beta$ : facteur de croissance transformant (Transforming Growth Factor  $\beta$ )

t-PA: Activateur tissulaire du plasminogène (Tissu Plasminogen Activator)

TXA<sub>2</sub>: Thromboxane A<sub>2</sub>

VEGF: Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGFR: Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)

vWF: Facteur von Willebrand (von Willebrand Factor)

XPS: Spectroscopie de photoélectrons X (X-ray Photoelectron Spectroscopy)

## Introduction

On nomme "biomatériaux" les matériaux utilisés pour fabriquer des prothèses, des implants et le matériel de chirurgie. Ces matériaux doivent être tolérés par le corps et servent à évaluer, traiter, augmenter ou remplacer un tissu. Il existe une vaste gamme de biomatériaux naturels et synthétiques incluant des polymères (biologiques ou non), des métaux, des alliages et des céramiques. Le domaine des biomatériaux a connu une expansion fulgurante aux cours des 50 dernières années, notamment dans le domaine cardiovasculaire. Le développement de cœurs artificiels, de stimulateurs cardiaques, du matériel pour circulation extracorporelle, de prothèses pour le remplacement d'artères et de valves cardiaques, d'*endoprothèses* pour l'isolation d'*anévrismes*, du matériel pour angioplastie ainsi que des tuteurs a révolutionné la chirurgie cardiovasculaire.

Malgré tous les progrès qui ont été faits dans les traitements des maladies cardiovasculaires, elles demeurent la première cause de *morbidité* et de mortalité au Canada [1, 2]. Une des raisons expliquant la grande incidence des maladies cardiovasculaires est l'abondance et l'omniprésence des facteurs de risque dans la population. L'hypercholestérolémie, le diabète, l'hypertension artérielle, l'âge, l'usage de tabac, la sédentarité, l'obésité et le stress sont tous des facteurs augmentant le risque de développer des maladies cardiovasculaires.

Lorsque les régimes préventifs et les médicaments ne suffisent pas, la chirurgie est le dernier recours pour traiter ces maladies. Aujourd'hui, des *chirurgies endovasculaires* beaucoup moins invasives que les chirurgies traditionnelles sont souvent pratiquées. Elles consistent à intervenir à distance sur les lésions artérielles grâce à des cathéters et des techniques d'imageries en temps réel. Évidemment, les patients se remettent plus rapidement de ce type d'opérations et demeurent moins longtemps à l'hôpital. Toutefois, elles ne sont pas toujours adaptées et le pontage, c'est-à-dire la greffe d'un vaisseau naturel ou synthétique pour court-circuiter ou remplacer une artère obstruée, demeure essentiel pour un grand nombre de patients.

Depuis 1958, lorsque les patients n'ont plus de vaisseaux utilisables pour une autogreffe, des prothèses artérielles synthétiques peuvent être implantées [1]. Les principaux matériaux utilisés pour fabriquer ces prothèses sont le Dacron® (polyester, PET) et le Teflon® (ePTFE). De nos jours, on a souvent recours à ces substituts artériels synthétiques pour améliorer ou prolonger la vie des patients. Les prothèses de PET sont très efficaces pour le remplacement d'artères de grand diamètre comme l'aorte; toutefois, elles thrombosent rapidement lorsqu'elles sont utilisées pour les artères de petit et moyen diamètres dans les membres. Les prothèses de ePTFE sont plus utilisées pour ces calibres de vaisseaux mais leur taux de *perméabilité* à long terme demeure faible. Trop souvent, les prothèses doivent être explantées à cause de *resténoses* [3-5]. Les deux principales causes de *resténose* sont les thromboses et l'hyperplasie intimale.

L'objectif ultime de ce projet de recherche étant d'améliorer les qualités fonctionnelles des prothèses à destinée vasculaire, l'enjeu est de réduire l'occurrence des phénomènes de thromboses et d'hyperplasie intimale dans les prothèses. Pour ce faire, deux stratégies ont été élaborées: une reposant sur des modifications de la surface de la prothèse pour la rendre hémocompatible, et l'autre basée sur un nouveau traitement pharmacologique de l'hyperplasie intimale.

Enfin, cette thèse se divise en cinq grands chapitres. Le premier porte sur la physiologie du système cardiovasculaire et aborde certaines pathologies et les traitements associés. Parmi les traitements, on s'intéresse principalement aux prothèses artérielles et aux matériaux utilisés pour les fabriquer. Cette section décrit et explique la problématique à la base du projet de doctorat.

Dans le second chapitre, une revue de la littérature est présentée parallèlement aux stratégies que nous avons employées pour résoudre la problématique. Ces stratégies incluent de favoriser l'adhésion des cellules endothéliales sur les prothèses via des modifications de surface du PTFE ainsi que le contrôle pharmacologique de l'hyperplasie intimale en utilisant le mésylate d'imatinib.

Les trois chapitres suivants (III-IV et V) sont dédiés aux résultats et présentent trois articles publiés dans trois journaux différents. Les deux premiers articles concernent le premier objectif qui est de favoriser la néo-endothélialisation afin de réduire les risques de thromboses. Le premier, inséré dans le chapitre III présente les méthodes de modification de surface du PTFE, deux techniques de greffage de la FN ainsi que la caractérisation des surfaces modifiées. L'activité de la FN et la biocompatibilité du matériau sont aussi évaluées grâce à des essais d'adhésion cellulaire et des ELISA. Dans cet article, il est démontré que l'activité biologique de la FN est régulée par la stratégie de conjugaison.

Le second article, présenté au chapitre IV, vise à identifier la cause de cette différence d'activité biologique via plusieurs techniques telles que le dosage par radiomarquage à l'iode 125, la microscopie à force atomique et l'angle de contact. La concentration surfacique et la *conformation* de la FN greffée sont ainsi caractérisées en fonction de la stratégie de conjugaison.

Le troisième article est inséré au chapitre V et porte sur le deuxième objectif de la thèse soit l'inhibition de l'hyperplasie intinale. Il présente les résultats de l'évaluation *in vitro* du potentiel du mésylate d'imatinib à inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses sans nuire à la croissance des cellules endothéliales.

Enfin l'ouvrage se termine par une section réservée aux conclusions générales et aux perspectives futures du projet de doctorat.

N.B. Les mots ou expressions qui sont en *italique* dans le texte sont définis dans le glossaire en page 135.

## Chapitre I – Problématique

## I. Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est composé des vaisseaux sanguins parcourant tout l'organisme, du cœur et du sang que ces organes creux contiennent (Fig.1). Ses fonctions sont variées et en liens avec les propriétés du sang.

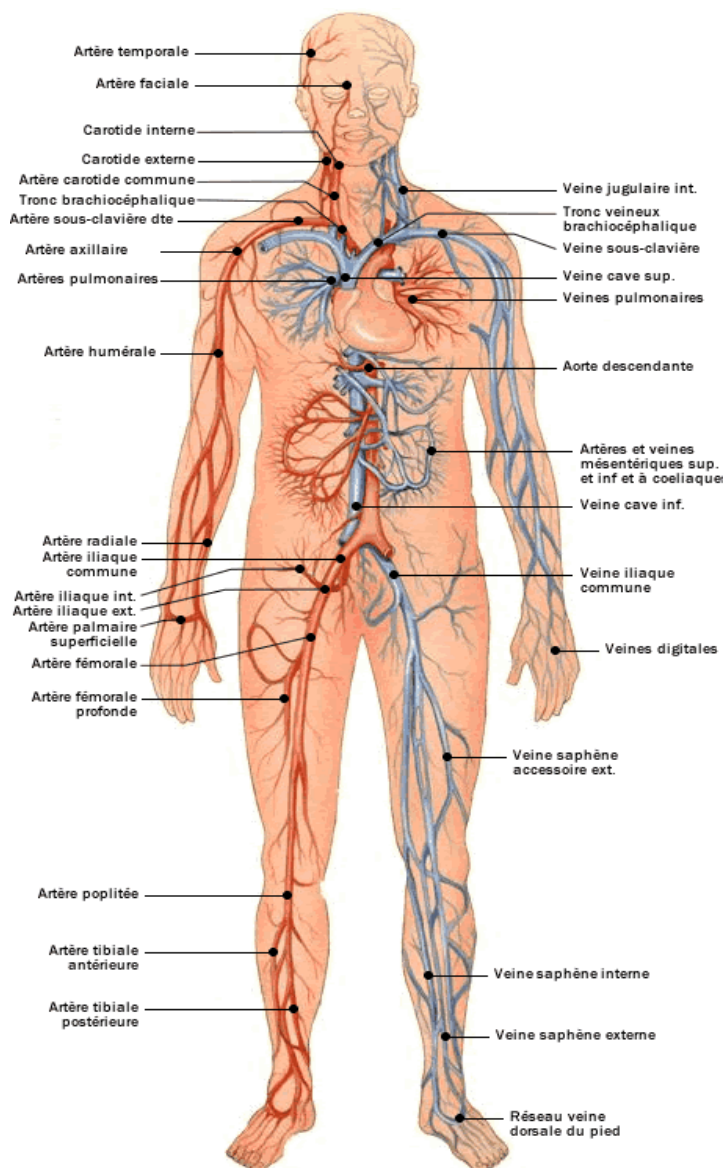


Figure 1. Le système cardiovasculaire. On voit en rouge les principaux vaisseaux du système artériel et en bleu leurs homologues du système veineux. [6]

## 1. Le sang

Le sang est composé de 55 % de plasma (phase liquide) et 45 % d'éléments figurés (cellules) (Fig. 2). Ce ratio est important pour maintenir une bonne circulation et assurer toutes les fonctions du sang [7].

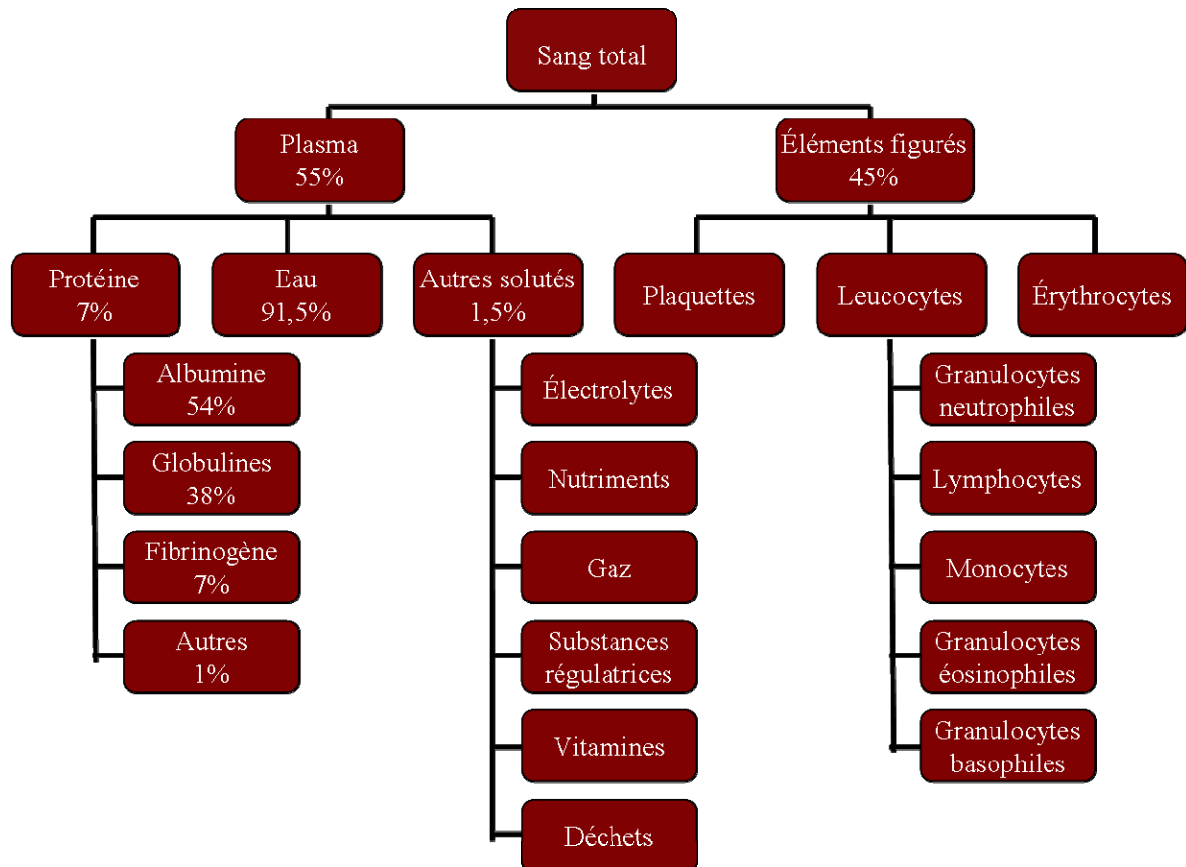


Figure 2. Composants du sang d'un adulte normal.[7]

La circulation sanguine permet l'oxygénation et la nutrition des cellules de l'organisme ainsi que l'excrétion des déchets métaboliques. Le sang, par l'intermédiaire des globules rouges (érythrocytes), apporte de l'oxygène à toutes les cellules du corps et permet l'élimination du dioxyde de carbone (déchet métabolique) par les voies respiratoires. Les globules rouges sont de petites cellules biconcaves et anucléées qui donnent la pigmentation rouge au sang dû à leur forte teneur en hémoglobine. L'hémoglobine des



globules rouges capte l'oxygène et relâche le dioxyde de carbone au niveau des capillaires alvéolaires des poumons car la pression d'oxygène ( $P_{O_2}$ ) est plus élevée que la pression en dioxyde de carbone ( $P_{CO_2}$ ). Dans les autres tissus du corps, la  $P_{CO_2}$  est plus grande que la  $P_{O_2}$  donc les globules rouges libèrent l'oxygène qu'ils transportaient et captent du  $CO_2$ .

Les gaz ne sont pas les seules molécules à être échangées entre le sang et les tissus; des nutriments et des déchets cellulaires transitent également au niveau des capillaires. Les nutriments venant de l'alimentation entrent dans la circulation sanguine majoritairement au niveau de l'intestin et sont distribués aux cellules de tout l'organisme grâce au vaste réseau vasculaire. Les déchets métaboliques sont transportés par le sang jusqu'aux reins où ils sont filtrés et évacués dans l'urine à l'exception du  $CO_2$  qui est éliminé par les poumons lors de l'expiration.

Bien qu'il joue un grand rôle dans le transport, le sang a des fonctions de régulation et de protection toutes aussi importantes. Grâce à ses propriétés tampon et à sa forte teneur en eau, il régule le pH et la température du corps permettant l'homéostasie. Il contient également les plaquettes et les facteurs de la coagulation qui préviennent les hémorragies. De plus, le sang protège l'organisme contre les infections par le biais des cellules du système immunitaire, des protéines du complément et des anticorps qu'il contient. Le tableau 1 présente les types de cellules retrouvées dans le sang ainsi que leurs caractéristiques et fonctions.

**Tableau 1.** Résumé des caractéristiques et fonctions des éléments figurés du sang. [7]

Nom	Concentration	Caractéristiques*	Fonctions
<b><u>Érythrocytes</u></b>	4,8 millions/ul chez la femme; 5,4 millions/ul chez l'homme.	Diamètre de 7 à 8 um; disques biconcaves anucléés; durée de vie d'environ 120 jours.	L'hémoglobine des érythrocytes transporte la majeure partie de l'oxygène et une partie du gaz carbonique dans le sang.
<b><u>Leucocytes</u></b>	5 000 à 10 000/ul	La plupart ne vivent que quelques heures à quelques jours.**	Lutte contre les agents pathogènes et autres substances étrangères qui envahissent l'organisme.
<i>Granulocytes:</i>			
Neutrophiles	60 à 70 % de tous les leucocytes.	Diamètre de 10 à 12 um; noyau de 2 à 5 lobes unis par de minces bandes de chromatine; granulations lilas pâle très fines.	Phagocytose. Destruction des bactéries par les lysozymes, les défensines et de puissants oxydants comme l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et l'anion hypochlorite.
Éosinophiles	2 à 4 % de tous les leucocytes.	Diamètre de 10 à 12 um; noyau de 2 ou 3 lobes; grandes granulations rouges orangées remplissant le cytoplasme.	Lutte contre les effets de l'histamine lors des réactions allergiques, phagocytose des complexes antigène-anticorps et destruction de certains vers parasitaires.
Basophiles	0,5 à 1 % de tous les leucocytes.	Diamètre de 8 à 10 um; noyau à 2 lobes; grosses granulations cytoplasmiques violet sombre.	Libération d'héparine, d'histamine et de sérotonine lors des réactions allergiques.
<i>Agranulocytes:</i>			
Lymphocytes	20 à 25 % de tous les leucocytes.	Petits lymphocytes : 6 à 9 um; grands lymphocytes : 10 à 14 um; noyau rond ou légèrement dentelé; cytoplasme formant un anneau d'apparence bleu ciel autour du noyau; plus la cellule est grosse, plus le cytoplasme est visible.	Médiation des réponses immunitaires. Les lymphocytes B se transforment en plasmocytes qui sécrètent des anticorps. Les lymphocytes T attaquent les virus, les cellules cancéreuses et les cellules des tissus greffés. Les cellules NK attaquent une grande variété de microbes et certaines cellules tumorales
Monocytes	3 à 8 % de tous les leucocytes.	Diamètre de 12 à 20 um; noyau en forme de fer à cheval; cytoplasme gris bleu.	Phagocytose (après leur conversion en macrophages).

---

<b><u>Plaquettes</u></b>	150 000 à 400 000/ul	Fragments cellulaires d'un diamètre de 2 à 4 um; vivent 5 à 9 jours; aucun noyau.	Formation du clou plaquettaire lors de l'hémostase; libération de substances chimiques qui favorisent le spasme vasculaire et la coagulation.
--------------------------	-------------------------	---	--

---

\* Couleur obtenue à la coloration de Wright.

\*\* Certains lymphocytes mémoire peuvent vivre plusieurs années une fois qu'ils sont formés.

### 1. 1. L'hémostase

L'hémostase est l'ensemble des processus physiologiques visant à maintenir l'écoulement fluide du sang, prévenir les hémorragies spontanées et arrêter le saignement après une rupture vasculaire. Cela permet l'arrêt des saignements dans les petits vaisseaux ou pour des lésions ponctiformes mais pour des blessures majeures, une intervention chirurgicale peut être nécessaire. L'hémostase est un équilibre entre trois processus qui s'initient simultanément : l'hémostase primaire, la coagulation plasmatique et la fibrinolyse. Ces processus, décrits en détail dans les prochaines sections, nécessitent l'intervention des plaquettes, des vaisseaux sanguins, des facteurs de la coagulation et du système de la fibrinolyse. [8]

Les plaquettes sont des fragments cellulaires anucléés qui proviennent de la désintégration des mégacaryocytes lors de leur dernier stade de maturation. Elles contiennent trois types de granules: les granules alphas, les granules denses et les lysosomes. Le contenu des granules alpha et denses est excrété lorsque la plaquette est activée. Les lysosomes libèrent leur contenu seulement suite à une puissante stimulation. Ce sont les granules denses qui renferment la plupart des activateurs plaquettaires tel l'adénosine diphosphate (ADP), l'adénosine triphosphate (ATP), le calcium et la sérotonine, alors que les granules alpha renferment plutôt des protéines (*facteur von Willebrand* (vWF), *fibrinogène*, facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène (PAI-1),...).

La paroi semi-perméable des vaisseaux ainsi que les plaquettes, préviennent les saignements spontanés. En effet, il semble qu'une concentration minimale de plaquettes

soit nécessaire pour maintenir l'étanchéité des vaisseaux. De plus les plaquettes jouent un rôle majeur dans l'hémostase primaire pour colmater les brèches vasculaires.

Les facteurs de la coagulation sont essentiels à la formation du réseau de *fibrine* qui consolide le thrombus plaquettaire alors que le système de la fibrinolyse prévient la formation d'un caillot de taille démesurée et assure la lyse progressive de ce dernier ainsi que la reperméabilisation des vaisseaux.

### 1. 1. 1. L'hémostase primaire<sup>[8]</sup>

L'hémostase primaire est la formation du clou plaquettaire, aussi appelé thrombus blanc puisqu'il ne contient pas de globules rouges. Ce processus est déclenché par une brèche vasculaire et s'effectue en deux temps totalisant environ 5 minutes. Lorsque l'*endothélium* est endommagé, il y a une vasoconstriction locale qui réduit la brèche et la lumière du vaisseau, c'est le temps vasculaire. Le temps plaquettaire débute ensuite car la *membrane basale*, constituée entre autres de collagène, est mise à découvert. C'est le contact du sang avec la *membrane basale* qui provoque l'adhésion, la sécrétion et l'agrégation plaquettaire. L'adhésion des plaquettes est un phénomène rapide et réversible qui est influencé par les *forces de cisaillement*, la concentration plaquettaire et la concentration de globules rouges. La rapidité de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire est fonction de la fréquence des collisions entre les plaquettes et la brèche vasculaire. De ce fait, la *rhéologie du sang* influence grandement l'adhésion.

Le sang circulant dans un vaisseau n'a pas une vitesse uniforme, elle est maximale au centre et minimale en périphérie due à la friction imposée par l'endothélium. Toutefois, dans une section rectiligne, l'écoulement est laminaire, c'est-à-dire que les couches sanguines de vitesses variables se déplacent parallèlement. En général, dans les vaisseaux non ramifiés à paroi lisse, le *nombre de Reynolds (Re)* doit excéder une valeur située aux environs de 1000 pour que l'écoulement devienne turbulent; cette valeur est rarement atteinte. Par contre, au niveau d'une ramification artérielle, des tourbillons peuvent apparaître pour des valeurs de Re de l'ordre de 200 [9]. La force de cisaillement est un

paramètre hémorhéologique mesurant la vitesse relative des couches sanguines concentriques qui se succèdent de l'extérieur vers l'intérieur. Les *forces de cisaillement* sont non uniformes dans toute la lumière d'un vaisseau. Elles sont proportionnelles au débit sanguin et inversement proportionnelles au calibre du vaisseau et à la viscosité. Les globules rouges forment des rouleaux qui se concentrent dans l'axe central du vaisseau, là où les *forces de cisaillement* sont les plus faibles et la vitesse maximale. Les couches périphériques de plasma contiennent peu de cellules et agissent comme lubrifiant pour le passage du convoi central. Les *forces de cisaillement* y sont plus élevées à cause de la contrainte de l'*endothélium* qui réduit la vitesse des premières couches. Les plaquettes sont poussées dans ces couches de plasma périphériques par les globules rouges plus gros et plus rapides. Ceci favorise les collisions entre les plaquettes et la brèche vasculaire et donc l'adhésion plaquettaire. De plus, l'adhésion des plaquettes est facilitée par une cytoadhésine plasmatique, le vWF. Ce dernier est sécrété dans le sang par les cellules endothéliales et les plaquettes. Dans sa *conformation* native le vWF ne peut pas se lier aux plaquettes mais lorsqu'il se lie au collagène sous endothélial, il change de *conformation*. Ce changement permet une liaison spécifique et dépendante du calcium à la glycoprotéine Ib (GpIb), récepteur membranaire des plaquettes. L'adhésion des plaquettes provoque un changement de forme, il y a d'abord apparition de pseudopodes et centralisation des granules, puis la plaquette s'étale entièrement (voir Fig. 3). Ce changement modifie également la *conformation* des récepteurs GpIIbIIIa présents à la surface plaquettaire, et entraîne l'externalisation, dans leur *conformation* active, de nouveaux GpIIbIIIa [10]. Ce récepteur glycoprotéique est impliqué dans l'agrégation plaquettaire, soit la liaison des plaquettes entre elles via le *fibrinogène* (Fig.4).

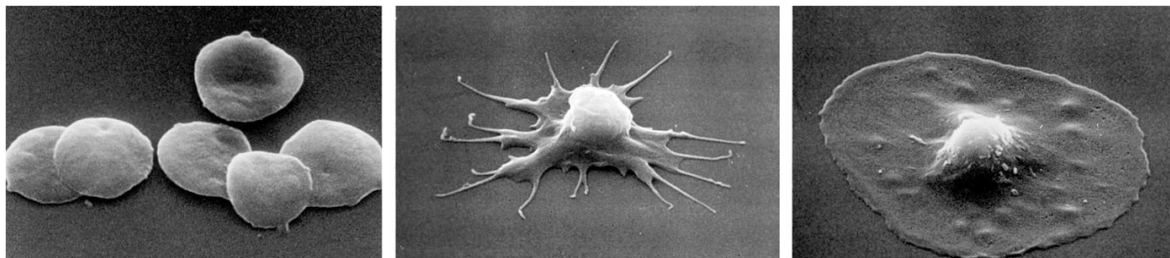


Figure 3. Changement de conformation des plaquettes lors de l'adhésion. [11]

Le *fibrinogène* est une glycoprotéine très importante dans l'hémostase puisque c'est le précurseur de la *fibrine*, la composante principale du caillot, et il permet l'agrégation plaquettaire. Il est présent dans le sang (2 à 4g/L) et dans les granules alpha des plaquettes. Le *fibrinogène* est soluble grâce à ses fibrinopeptides A et B; ces derniers sont la cible de la thrombine, l'enzyme qui transforme le *fibrinogène* soluble en *fibrine* insoluble. L'agrégation primaire augmente le nombre de récepteurs membranaires occupés à la surface des plaquettes, ce qui les active davantage et entraîne la sécrétion des granules alpha, denses et de la *thromboxane A2 (TXA<sub>2</sub>)*. L'agrégation primaire est réversible si l'activation plaquettaire n'est pas suffisante pour provoquer la sécrétion des granules. Toutefois, si elles sont sécrétées, les granules et la *TXA<sub>2</sub>* stimulent une deuxième vague d'agrégation encore plus puissante et irréversible. Les cellules endothéliales saines limitent l'activation des plaquettes en aval et en amont de la brèche en sécrétant de la *prostacycline*.

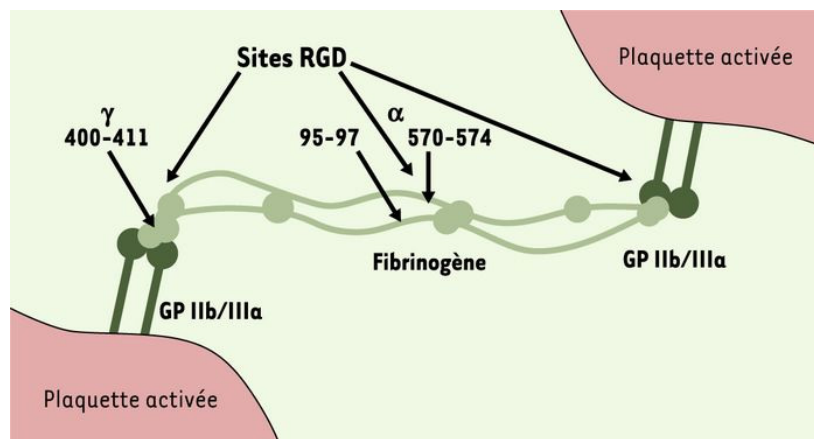


Figure 4. Agrégation plaquettaire via la liaison du fibrinogène au récepteur GpIIbIIIa activé. [10]

### 1. 1. 2. La coagulation plasmatique

La coagulation se déroule en même temps que l'hémostase primaire et vise elle aussi à colmater la brèche vasculaire. Cependant, le résultat de la coagulation est le thrombus

rouge. Ce processus nécessite de nombreux facteurs et se déroule en trois étapes : formation de la prothrombinase, formation de thrombine puis, formation de *fibrine*.

Les facteurs de la coagulation sont désignés par des chiffres romains; on compte un substrat (I, *fibrinogène*), sept zymogènes (II, prothrombine; VII, proconvertine; IX; X, Stuart; XI; XII, Hageman; XIII) et deux cofacteurs (V; VIII) de la coagulation. Les zymogènes sont des précurseurs inactifs, une fois activées, les enzymes résultantes portent le numéro de leur précurseur suivi d'un "a" minuscule (ex, Xa; IIa). Le *facteur von Willebrand* joue également un rôle dans la coagulation puisqu'il lie le facteur VIII du sang et le protège de la dégradation. Le substrat est le *fibrinogène* inter plaquettaire; il est transformé en *fibrine* insoluble par la thrombine (IIa) qui coupe ses fibrinopeptides A et B. Les monomères de *fibrine* s'agrègent spontanément entre eux grâce à des ponts hydrogènes pour former un « polymère de *fibrine* » labile. Ce dernier sera stabilisé par le facteur XIIIa, lui-même activé par la thrombine. Le facteur XIIIa est une transglutaminase qui, en présence de calcium, forme des liens covalents entre les monomères de *fibrine*. Les cofacteurs interagissent avec les facteurs IXa et Xa pour amplifier leur activité. Tous les facteurs de la coagulation sont synthétisés par le foie, néanmoins, la synthèse du cofacteur VIII n'est pas exclusive au foie. Les facteurs II, VII, IX et X doivent subir une carboxylation dépendante de la vitamine K pour être actifs. Cette transformation leur permet de chélater le calcium, favorisant ainsi leur liaison aux phospholipides membranaires.

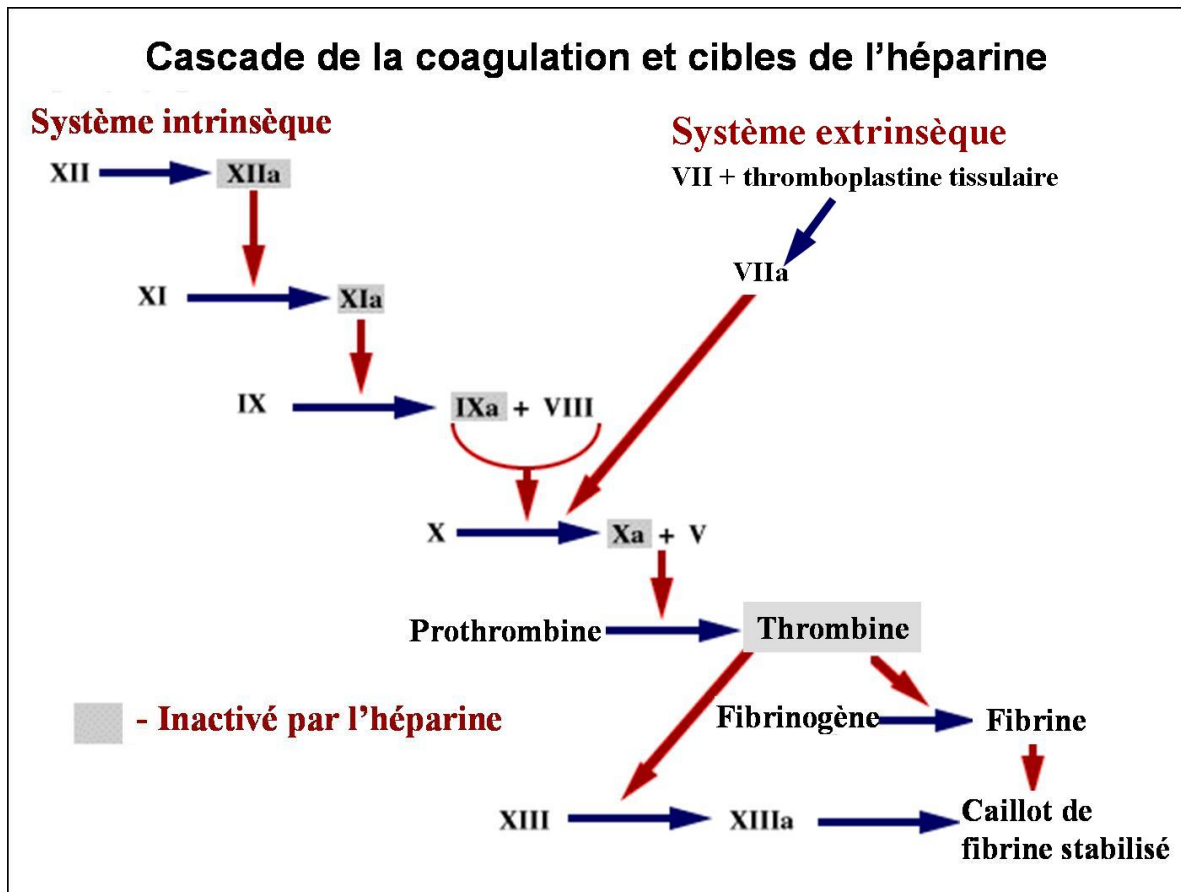


Figure 5. Cascade de la coagulation. Les deux voies d'activation de la cascade, soit le système intrinsèque et le système extrinsèque sont représentées. [12]

Dans la voie intrinsèque (Fig. 5), la cascade débute par l'activation du facteur XII suite au contact avec le collagène sous endothélial; Le facteur XIIa transforme le facteur XI en facteur XIa qui à son tour, en présence de calcium va activer le facteur IX. Le facteur IXa active, avec le cofacteur VIII et du calcium, le facteur X et il y a formation du complexe prothrombinase. Ce dernier est constitué du facteur Xa, du cofacteur V, du calcium et du facteur 3 plaquettaire (phosphatidylsérine). Le complexe prothrombinase transforme la prothrombine (II) en thrombine (IIa). La thrombine agit à plusieurs niveaux, en plus de transformer le *fibrinogène* en *fibrine*, elle active le facteur XIII qui stabilise le caillot et les cofacteurs V et VIII. La première cascade s'effectue lentement car les cofacteurs ne sont pas activés mais les autres cycles sont grandement accélérés grâce à l'activation des cofacteurs V et VIII par la thrombine fraîchement formée. Pour ce qui est de la voie



extrinsèque, elle débute par l'activation du facteur VII par la thromboplastine tissulaire en présence de calcium. Cette lipoprotéine transmembranaire est contenue dans différents tissus dont la paroi vasculaire. Le facteur VIIa avec la thromboplastine tissulaire active rapidement le facteur X puis il y a formation du complexe prothrombinase. La suite de la cascade est commune à la voie intrinsèque.

### 1. 1. 3. La fibrinolyse

Le système fibrinolytique permet la dissolution de la *fibrine* intra et extravasculaire ainsi que la reperméabilisation des vaisseaux. Pour ce faire, le plasminogène, un zymogène, doit être transformé en plasmine, l'enzyme qui dégrade la *fibrine*. Il existe plusieurs activateurs et inhibiteurs du plasminogène, de même que des inhibiteurs de la plasmine qui permettent une régulation fine de la fibrinolyse.

## 2. Le cœur

Pour atteindre toutes les cellules de l'organisme, être réoxygéné cycliquement et ne pas coaguler, le sang doit constamment circuler. Le cœur est la pompe qui propulse le sang dans les quelques 100 000 km de vaisseaux sanguins [7]. C'est un petit organe d'environ la taille d'un poing dont les parois sont constituées de trois couches fonctionnelles. L'endocarde est en contact direct avec le sang, c'est la continuité de l'intima des vaisseaux et il assure les mêmes fonctions (voir section suivante). Le myocarde est constitué de cellules musculaires striées qui permettent la contraction du cœur; c'est la couche la plus importante en volume. L'épicarde, la tunique externe, est un mince feuillet qui rend la surface externe du cœur lisse et glissante pour éviter les frictions lors des battements. À l'intérieur du cœur, le sang circule dans quatre cavités, deux atriums et deux ventricules. L'atrium droit communique avec le ventricule droit par la valve atrio-ventriculaire droite ou valve tricuspide alors que l'atrium gauche communique avec le ventricule gauche par la valve mitrale. Toutefois, le cœur droit (atrium et ventricule droit), qui est responsable de la circulation pulmonaire, est complètement séparé du cœur gauche (atrium et ventricule gauche), responsable de la circulation systémique. Ainsi, le sang désoxygéné du cœur droit

n'entre pas en contact avec le sang oxygéné dans le cœur gauche; il est d'abord pompé dans les poumons où il s'oxygène avant de revenir dans l'atrium gauche.

### 3. Les matrices extracellulaires

À l'exception des cellules sanguines qui vivent en suspension dans le plasma, les cellules doivent être attachées à un support physique pour survivre et former un tissu fonctionnel. Généralement, les cellules sécrètent elles-mêmes le support dont elles ont besoin soit la matrice extracellulaire. La structure et la composition des matrices extracellulaires varient d'un tissu à l'autre selon leurs fonctions. De même, il existe des matrices plus ou moins spécialisées pour répondre aux besoins des différents tissus. Par exemple, la matrice extracellulaire des os et des tendons doit être résistante alors que celle du cartilage sert d'amortissement. La *membrane basale* est la matrice extracellulaire spécialisée des épithéliums, c'est une mince couche dense de matrice semi-perméable qui supporte les cellules. Toutefois, dans la plupart des tissus, la matrice est la « colle » qui assure la cohésion entre les cellules.

Les constituants généraux de toutes les matrices sont les protéines fibrillaires, les *glycosaminoglycanes* et les glycoprotéines structurales. Les protéines fibrillaires confèrent les propriétés élastiques et permettent l'ancrage d'autres éléments dans les matrices. Dans la paroi des vaisseaux sanguins on retrouve principalement le collagène de type IV, l'élastine, la fibrilline et la fibronectine (FN). Les *glycosaminoglycanes* forment un gel hydraté dont la taille des pores et la charge électrique peuvent varier en fonction de leur nature et de leur arrangement. Quant aux glycoprotéines structurales, elles servent d'intermédiaire de liaison entre les cellules et la matrice. Les parois vasculaires contiennent notamment la FN, la laminine et l'entactine. Les matrices extracellulaires sont constamment remodelées par les cellules et les changements dans leur composition peuvent moduler le comportement cellulaire. De plus, elles servent de réservoir à plusieurs messagers extracellulaires comme les facteurs de croissance. Ces derniers sont trappés par les *glycosaminoglycanes* qui les rendent plus disponibles aux cellules.

## 4. Les vaisseaux sanguins

Il y a trois types de vaisseaux : les artères, les capillaires et les veines. Ces vaisseaux possèdent des caractéristiques propres à leur fonction et influencées par la pression sanguine à laquelle ils sont soumis [7]. La pression décroît plus on s'éloigne du cœur car elle est générée par les battements cardiaques qui font circuler le sang (Fig.6). Ainsi, la pression est pulsée au niveau des artères où elle est relativement élevée mais pas dans les capillaires ni les veines où elle est faible mais constante.

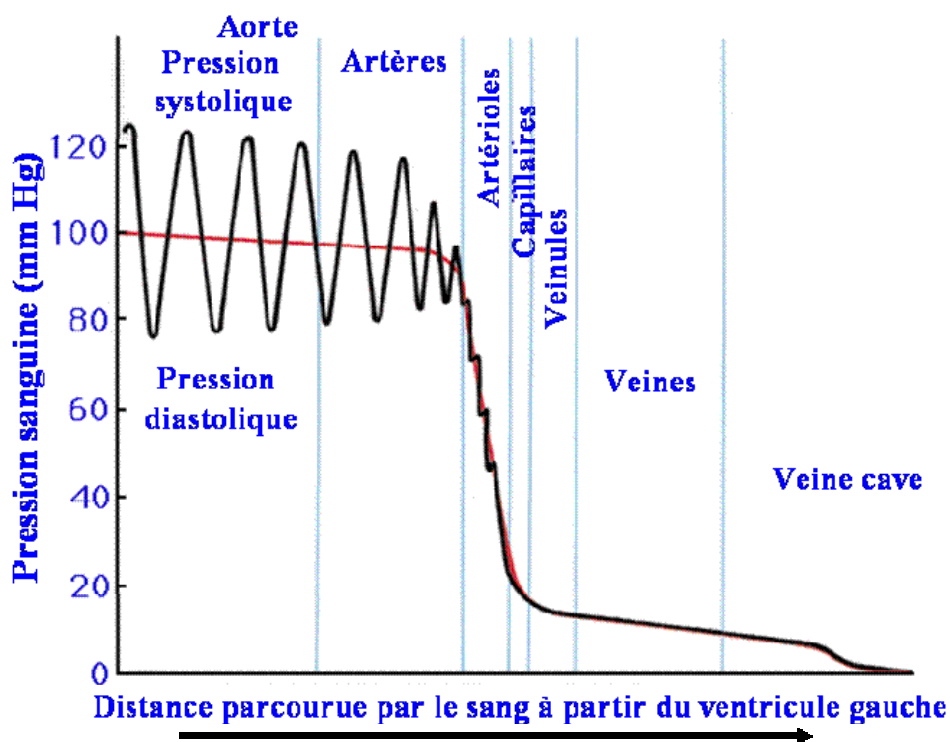


Figure 6. Pression sanguine à l'intérieur des différents vaisseaux. Plus on s'éloigne du cœur, moins la pression est grande. On remarque que la pression est pulsée seulement au niveau des artères. [13]

### 4. 1. Les artères et les veines

Les artères sont les vaisseaux qui contiennent le sang qui voyage du cœur vers le reste de l'organisme. À l'exception des artères pulmonaires et ombilicales, le sang qu'elles contiennent est oxygéné. Parallèlement, les veines permettent le retour du sang de la

périphérie vers le cœur donc à l'exception des veines pulmonaires et ombilicales, il est désoxygéné. Les artères et les veines sont constituées de trois couches fonctionnelles, soit l'intima, la média et l'adventice, séparées par deux limitantes élastiques (interne et externe) (Fig.7). Toutefois, l'importance de ces couches varie d'un vaisseau à l'autre. Normalement, la paroi d'une artère est plus épaisse et sa lumière plus petite que celles de sa veine homologue.

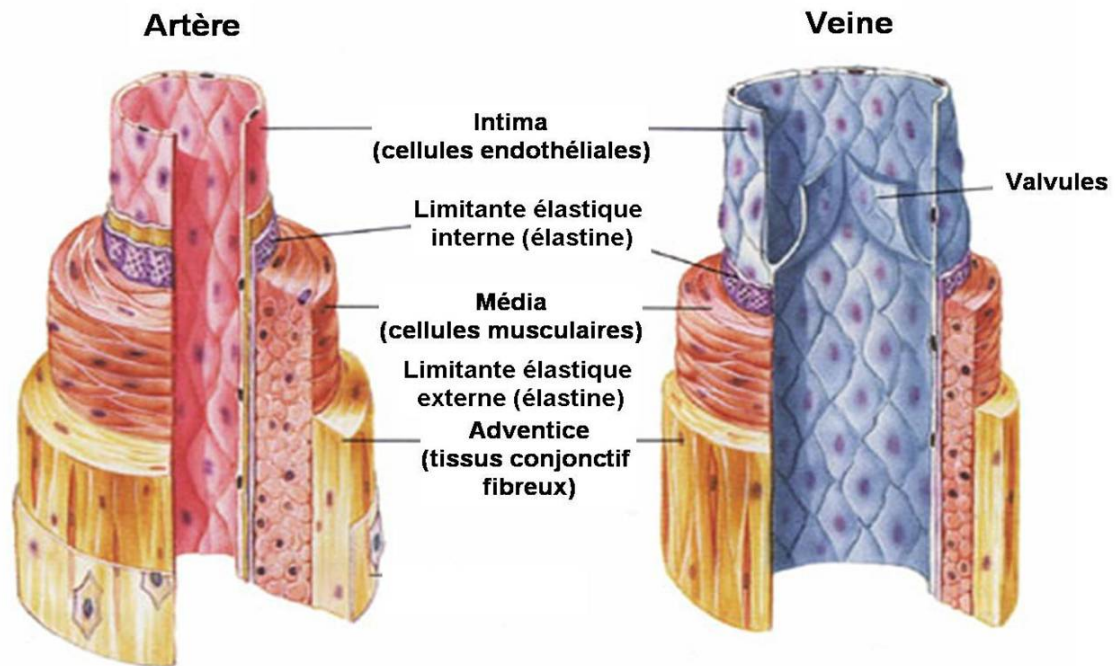


Figure 7. Schéma comparatif d'une artère et d'une veine. [14]

#### 4. 1. 1. L'intima

L'intima est formée d'un *endothélium* et d'une *membrane basale*. Elle est très similaire dans ces deux types de vaisseaux excepté que les artères n'ont pas de valvules. Ces dernières servent à empêcher le sang de revenir en arrière. Dans les artères, la pression est suffisamment élevée pour assurer un flux unidirectionnel. Dans les veines, surtout celles des membres inférieures, la pression sanguine est trop faible pour permettre le retour du sang au cœur. Il existe donc d'autres mécanismes facilitant le drainage veineux. Par exemple, les contractions musculaires compriment les veines avoisinantes, forçant

l'expulsion du sang de cette région. Comme les valvules l'empêchent de revenir en arrière, le sang monte vers le cœur (Fig.8). Lorsque le muscle se relâche, le sang ne peut pas redescendre car il est arrêté par les valvules. La contraction musculaire n'est pas la seule façon de comprimer les veines, les massages ou simplement l'appuie du pied au sol favorisent le retour veineux.

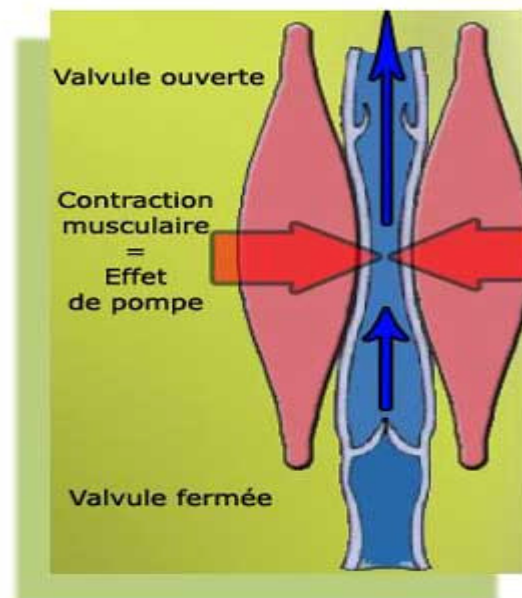


Figure 8. L'effet de pompe de la contraction musculaire dans les membres inférieurs. [15]

#### 4. 1. 1. 1. L'endothélium

L'*endothélium*, une monocouche de cellules endothéliales, est le seul tissu naturellement en contact avec le sang. Il tapisse l'intérieur de tous les vaisseaux et du cœur (dans le cœur on le nomme endocarde), constituant l'unique tissu hémocompatible de l'organisme. Les cellules endothéliales vasculaires mesurent environ 50 microns et ont une forme allongée et aplatie qui leur confère un ratio surface/volume très élevé. Leur grand axe est orienté dans le sens du flux sanguin. Afin d'assurer l'étanchéité des vaisseaux, les cellules de l'*endothélium* sont fortement liées par des jonctions serrées. Ce type de lien cellule-cellule limite la diffusion de molécules entre les cellules de même que la migration des protéines membranaires spécialisées d'un pôle cellulaire à l'autre. Ce dernier élément est

important puisque les cellules endothéliales sont polarisées, c'est-à-dire que leur membrane plasmique est organisée en deux régions distinctes : la région apicale en contact avec le sang et la région basale en contact avec la matrice [11]. Les protéines transmembranaires varient en fonction de la région; la région basale contient majoritairement des *intégrines*, soit des protéines d'adhésion à la matrice alors que l'apex concentre les protéines impliquées dans le transport par *pinocytose*. La région apicale des cellules endothéliales est aussi tapissée d'une couche de *glycocalyx* chargée négativement.

Le *glycocalyx* est formé par les glycoprotéines et les glycolipides de la membrane et peut avoir différentes fonctions comme protéger ou charger la membrane, intervenir dans l'adsorption de molécules ainsi que dans la *perméabilité* de la membrane. Les cellules, de même que la majorité des protéines sanguines, sont chargées négativement à pH neutre tout comme l'*endothélium* donc elles n'ont pas tendance à s'adsorber. Cela contribue à faire de l'*endothélium* une surface antiadhésive. Ce sont majoritairement les *glycosaminoglycanes* contenus dans le *glycocalyx* qui déterminent les propriétés de ce dernier. L'héparane sulfate, un important *glycosaminoglycane* en surface de l'endothélium, a la propriété d'activer l'anti-thrombine III, un inhibiteur de la thrombine. De plus, les cellules endothéliales peuvent exprimer la thrombomoduline, qui comme l'anti-thrombine III, active la protéine C. Ces interactions amplifient le pouvoir anticoagulant de l'*endothélium* puisque la protéine C activée clive les facteurs Va et VIIIa de la coagulation [16].

L'*endothélium* peut limiter la coagulation mais ce n'est pas son seul niveau d'action, il peut aussi inhiber l'agrégation plaquettaire. La surface membranaire des cellules endothéliales vasculaires contient des enzymes comme l'ADPase qui dégrade rapidement l'ADP un activateur de l'agrégation. De plus, les cellules endothéliales synthétisent de la *prostacyclines* (PGI<sub>2</sub>) et de l'adénosine, des *antagonistes* respectifs de la TXA<sub>2</sub> et de l'ADP. Normalement, un *endothélium* intact et continu prévient toute amorce des réactions d'hémostase dans les vaisseaux. Les cellules endothéliales synthétisent et

sécrètent plusieurs autres molécules et récepteurs membranaires nécessaires à leurs multiples fonctions. Par exemple, lorsqu'elles sont activées par des *cytokines* sécrétées lors de l'inflammation, les cellules endothéliales expriment des récepteurs membranaires facilitant l'adhésion des leucocytes et leur migration à travers l'endothélium. D'autre part, par des mécanismes encore inconnus, l'*endothélium* peut détecter les changements de pression et de débit sanguin ainsi que les variations de pression en oxygène dans le sang. En réponse à ces changements, il module le calibre des vaisseaux en sécrétant des *prostacyclines* (PGI<sub>2</sub>) et du monoxyde d'azote (NO) pour la vasodilatation ou de l'endothéline-1 et de l'angiotensine II pour la vasoconstriction. En cas de lésion, il peut également activer l'hémostase en sécrétant du facteur von Willebrand, du facteur activant des plaquettes (PAF) et la thromboplastine. Finalement, même la fibrinolyse peut être activée par les cellules endothéliales puisqu'elles produisent du "tissu plasminogen activator" (t-PA).

#### 4. 1. 1. 2. La membrane basale

La *membrane basale* est le support sur lequel les cellules endothéliales croissent, migrent et se divisent. C'est une matrice extracellulaire spécialisée qui sert d'interface entre l'*endothélium* et la matrice extracellulaire non spécialisée. Elle est produite et constamment remodelée par les cellules endothéliales. L'adhésion des cellules endothéliales à la *membrane basale* sous-jacente via les *intégrines* permet une communication bidirectionnelle (entre l'intérieur et l'extérieur des cellules) qui influence profondément leurs fonctions métaboliques telles la régulation de la coagulation/fibrinolyse, de l'adhésion plaquettaire, du calibre des vaisseaux ainsi que de la réponse immunitaire et inflammatoire [11, 17]. Les principaux constituants de la *membrane basale* sont le collagène de type IV, la laminine, l'héparane sulfate protéoglycane, l'entactine et la fibronectine (FN). Sa composition peut varier et régule la croissance et la différenciation cellulaire. En plus de ses rôles de support et de régulation, la *membrane basale* constitue une barrière semi-perméable dont la dimension des pores peut varier en fonction de son arrangement. Cette barrière empêche la diffusion des grosses protéines du sang dans les tissus. De plus, la

*membrane basale* est une surface très pro coagulante. Lors d'une brèche dans l'endothélium, c'est le contact du sang avec la *membrane basale* qui provoque la formation d'un clou plaquettaire suivi d'un caillot de *fibrine* pour colmater la brèche et arrêter l'hémorragie.

#### 4. 1. 2. La média

La media est constituée, dans des proportions variables, de cellules musculaires lisses et de fibres d'élastines disposées de façon concentrique autour de la lumière. C'est la couche qui permet tous les mouvements des vaisseaux, soit la vasodilatation et la vasoconstriction grâce à ses fibres musculaires. Elle confère également une certaine *compliance* aux vaisseaux grâce à ses fibres d'élastines qui se déforment élastiquement sous la pression. La média est généralement assez développée dans les artères pour qu'elles puissent résister à la forte pression sanguine et moduler leur diamètre. Dans les veines, la média est moins importante en volume et contient surtout de l'élastine pour permettre une grande *compliance*.

#### 4. 1. 3. L'adventice

L'adventice est un tissu conjonctif fibreux composé principalement de fibres de collagène, d'élastine et de fibroblastes. Cette couche contient aussi de microscopiques vaisseaux sanguins, appelés vasa vasorum, qui assurent l'apport en nutriments et en oxygène des cellules de la paroi externe des vaisseaux de plus d'un millimètre de diamètre. Outre son rôle de jonction avec les tissus environnant, l'adventice est la couche rigide et résistante qui limite la *compliance*. La pression sanguine étant beaucoup plus forte dans les artères, l'adventice y est plus développée que dans les veines.

### 4. 2. Les capillaires

Les capillaires sont les intermédiaires de transition entre les artères et les veines. Ils sont formés d'une seule couche de cellules endothéliales entourées d'une *membrane basale* et leur diamètre interne est de 5 à 10 microns. Ils forment des réseaux très ramifiés



augmentant ainsi la surface disponible pour les échanges de gaz, de nutriments et de déchets. La grande *perméabilité* des capillaires permet aussi des échanges de liquides. La filtration capillaire s'effectue passivement grâce aux pressions osmotique et hydrostatique. La pression osmotique est une force qui tend à faire passer le liquide interstitiel vers l'intérieur des vaisseaux alors que la pression hydrostatique tend à faire sortir l'eau des vaisseaux. La pression osmotique étant la même avant et après un lit capillaire, c'est la pression hydrostatique, liée à la pression sanguine, qui détermine le sens du mouvement net de l'eau (Fig. 9). Étant donné que la pression artérielle est plus grande que la pression veineuse, on observe une sortie de liquide dans la partie proximale du lit capillaire et une réabsorption dans la partie distale. La réabsorption est légèrement plus faible que l'excrétion donc il y a une diminution du volume sanguin et une augmentation du liquide interstitiel. Ce liquide est rapidement drainé par le système lymphatique et renvoyé dans la circulation sanguine.

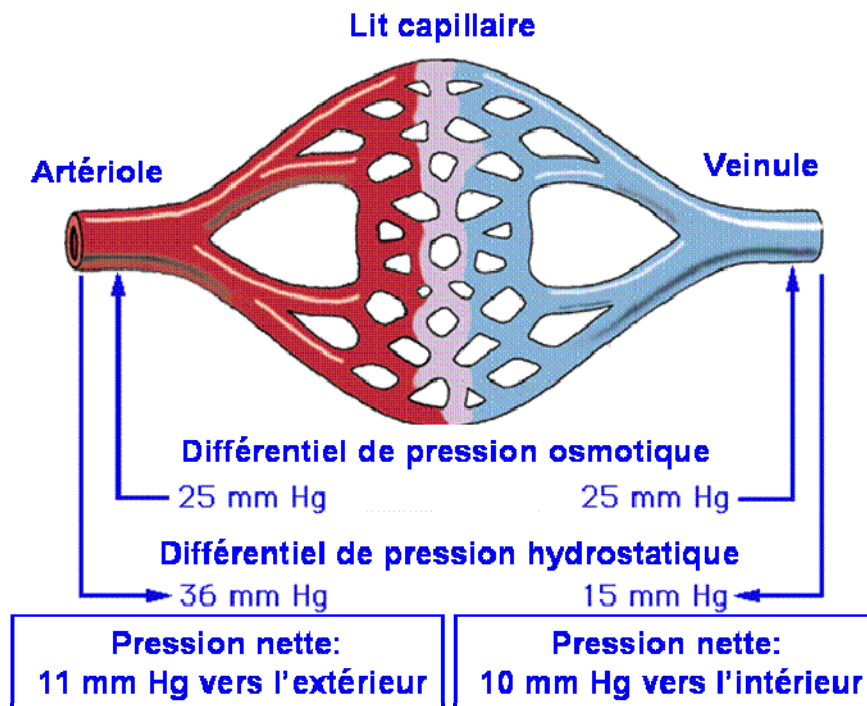


Figure 9. Différentiels de pression permettant la filtration capillaire. [18]

## 5. Athérosclérose et pathologies associées [11]

L'athérosclérose est une dysfonction fréquente des artères caractérisée par la déposition progressive de cholestérol, de lipides, de cellules et de constituants des matrices extracellulaires à l'intérieur des parois artérielles (Fig.10). C'est la forme la plus commune d'artériosclérose définissant toute affection qui entraîne l'épaississement et le durcissement de la paroi artérielle. Le processus débute par une augmentation de l'incorporation de lipoprotéines dans la paroi et l'expression de glycoprotéines d'adhésion spécifiques par les cellules endothéliales. Les lymphocytes T et les monocytes adhèrent à ces glycoprotéines et migrent à travers l'*endothélium* en réponse à des facteurs chimiotactiques. Une fois dans la paroi, les monocytes se différencient en macrophages et phagocytent en grande quantité le cholestérol des lipoprotéines. Des gouttes lipidiques s'entassent alors dans le cytoplasme des macrophages les transformant en cellules spumeuses (Fig. 11).

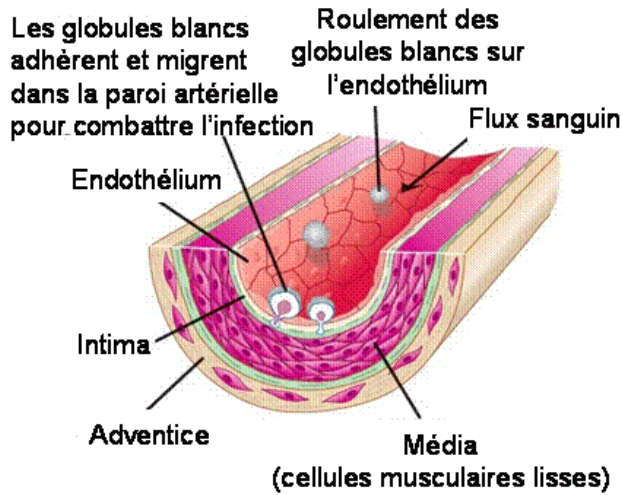
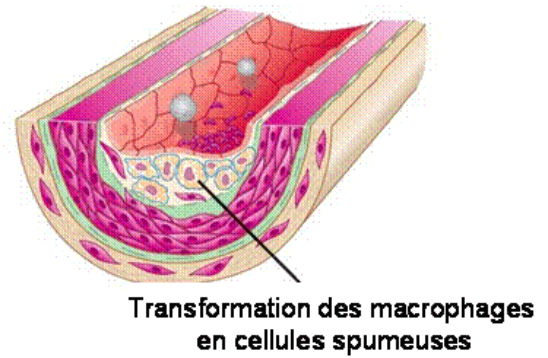
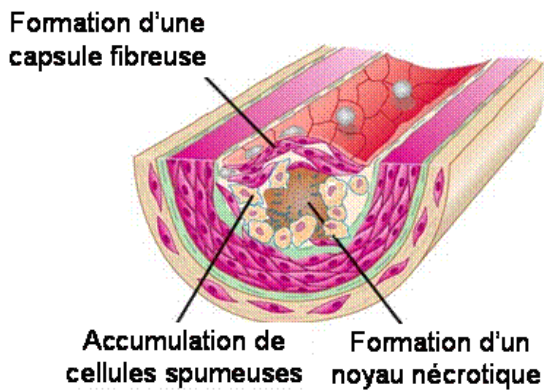
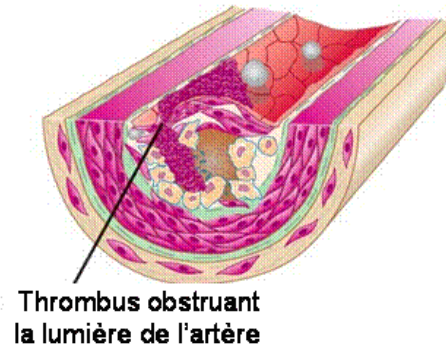
**(a) Paroi artérielle normale****(b) Formation de bandes graisseuses****(c) Formation d'une plaque athéroscléreuse****(d) Rupture de l'endothélium et formation d'un thrombus**

Figure 10. Développement de l'athérosclérose dans une artère naturelle. [11]

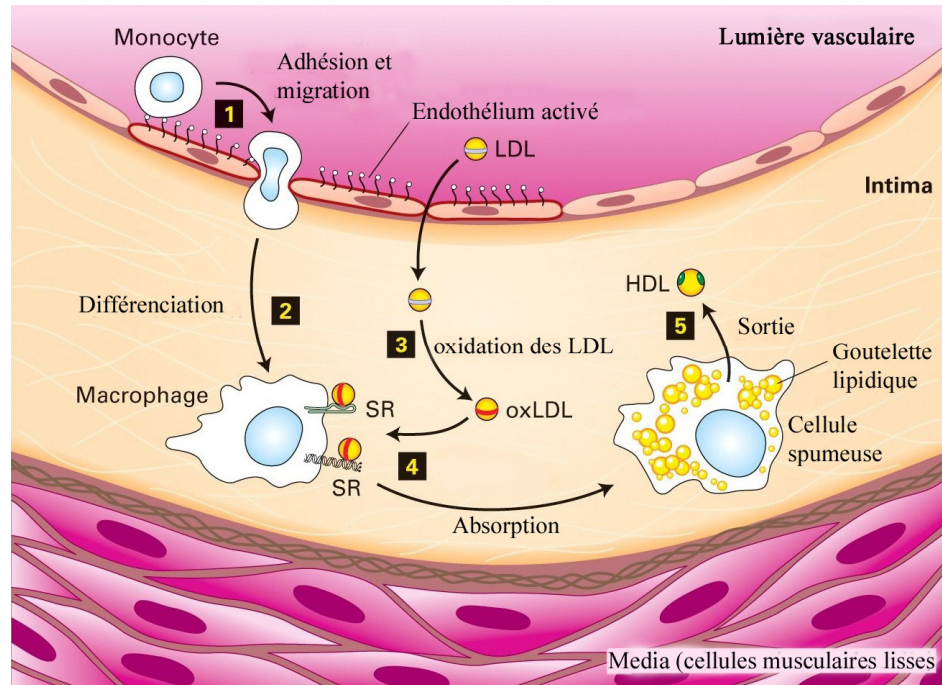


Figure 11. Formation des cellules spumeuses dans la paroi artérielle. [11]

L'accumulation de cellules spumeuses dans la paroi artérielle est le premier stade de l'athérosclérose. Le second stade est caractérisé par la prolifération des cellules musculaires lisses et leur migration de la média vers l'intima. Ces cellules sécrètent de la matrice extracellulaire et le tout forme une plaque athéromateuse. Les cellules du centre de la plaque (cellules spumeuses et musculaires lisses) meurent, formant un noyau nécrotique riche en cholestérol. La plaque athéromateuse continue d'évoluer et une capsule fibreuse, formée de collagène et de muscle lisse, finit par la recouvrir [11, 19]. Les plaques athéromateuses rendent les artères plus sujettes aux *anévrismes* puisqu'elles causent leur durcissement et leur perte d'élasticité. Dans ces conditions, les artères sont plus vulnérables à la pression sanguine et peuvent être déformées de façon permanente (*anévrisme*), voir même déchirées (rupture d'*anévrisme*). L'athérosclérose augmente aussi les risques de thromboses car la déformation de la paroi artérielle altère l'écoulement laminaire du sang, causant l'augmentation des *forces de cisaillement* et l'activation des plaquettes. Par ailleurs, lorsque les plaques grossissent, elles projettent de plus en plus dans la lumière de l'artère et la rétrécissent (Fig. 12). Si l'apport sanguin en aval de la lésion est trop diminué,

les tissus deviennent *ischémiques* et douloureux. Les plaques elles-mêmes peuvent donc entraîner un blocage de la circulation sanguine.

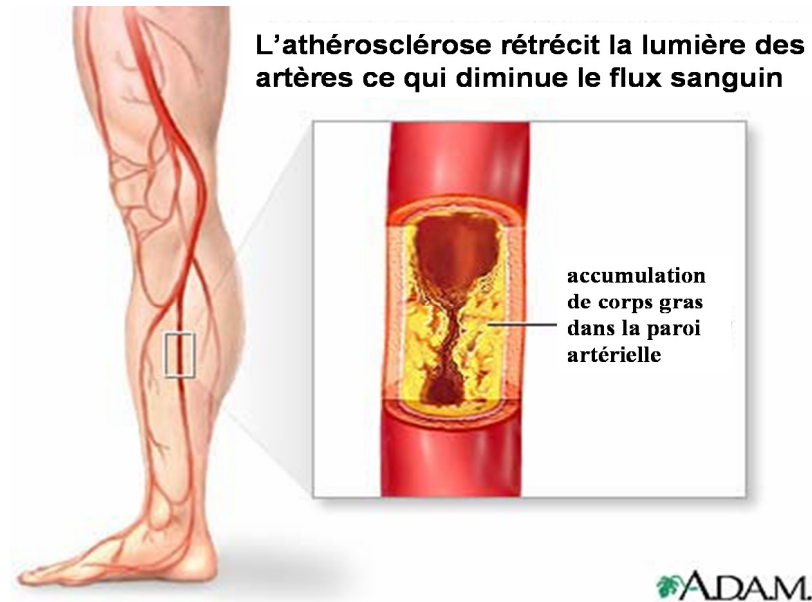


Figure 12. Schéma d'une plaque sténosante au niveau des membres inférieurs. [20]

Lorsqu'elles évoluent, les plaques athéromateuses peuvent engendrer plusieurs maladies cardiovasculaires tels que l'insuffisance coronarienne, l'angine de poitrine, l'infarctus du myocarde, l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs, l'accident vasculaire cérébral, l'*anévrisme* et l'embolie pulmonaire.

## 6. Traitements des maladies cardiovasculaires

Lors de l'apparition des premiers signes, les médecins favorisent la prévention par une saine alimentation et l'élimination des facteurs de risques contrôlables comme la cigarette, le stress et la sédentarité. Lorsque cela ne suffit pas, une médication appropriée est prescrite, généralement des anticoagulants pour éviter les complications. Chez un certain nombre de patients, les médicaments sont inefficaces et la chirurgie est la seule alternative.

Il existe aujourd'hui des *chirurgies endovasculaires* beaucoup moins invasives que les chirurgies traditionnelles pour traiter les maladies vasculaires. Par exemple, l'angioplastie est souvent utilisée pour rétablir la circulation dans les artères *sténosées*. Elle consiste à insérer, par voie endovasculaire, un cathéter muni d'un ballonnet au niveau de l'artère sténosée et à le gonfler à plusieurs reprises pour écraser la plaque sténosante et ainsi, rétablir le diamètre interne normal de l'artère (Fig.13a). Dans certains cas, un *tuteur (stent)* est placé dans l'artère malade pour éviter qu'elle s'affaisse provoquant une *resténose*. Une angioplastie est d'abord pratiquée puis un cathéter muni d'un ballonnet recouvert par le *tuteur* est inséré; le *tuteur* est déployé par le gonflement du ballonnet (Fig.13b). Des *endoprothèses* sont aussi disponibles pour les chirurgies endovasculaires, ce sont des tuteurs inclus dans des tubes de polymère (Fig.13c). Ce type de prothèse est principalement utilisé pour isoler les *anévrismes*. On les déploie avec un ballonnet comme le *tuteur* mais la pression est appliquée seulement en amont et en aval de l'*anévrisme* pour que l'*endoprothèse* soit collée à l'artère naturelle dans les sections saines et que le sang passe entièrement dans la prothèse et non dans la section malade de l'artère. Malheureusement, ces nouveaux traitements ne sont pas toujours adaptés et le pontage demeure essentiel pour un grand nombre de patients. Un pontage est la greffe d'un vaisseau naturel (veine ou artère) ou d'une prothèse synthétique pour court-circuiter ou remplacer une artère obstruée. (Fig.13d) [21]. Le greffon, s'il est naturel, peut provenir du patient (autogreffe), d'un autre individu (allogreffe) ou d'un animal (xéno greffe) mais des réactions de rejets causent souvent l'échec des greffes non autologues. Les caractéristiques de la lésion, telles la sévérité, le type, la longueur, la topographie, le caractère isolé ou étendu ainsi que la qualité des vaisseaux en amont et en aval sont déterminantes dans le choix du traitement [22]. Pour les lésions sténosantes longues et diffuses, le pontage est généralement le traitement de choix puisque l'angioplastie et les tuteurs ne traitent que des petites sections d'artère ( $\leq 3$  cm) [23]. Par ailleurs, ce type de lésion est rarement isolé et les patients n'ont parfois plus de vaisseaux utilisables pour une autogreffe [23, 24]. Depuis 1958, les médecins peuvent remplacer les artères malades par des prothèses artérielles synthétiques lorsque le patient n'a pas de vaisseaux disponibles [1].

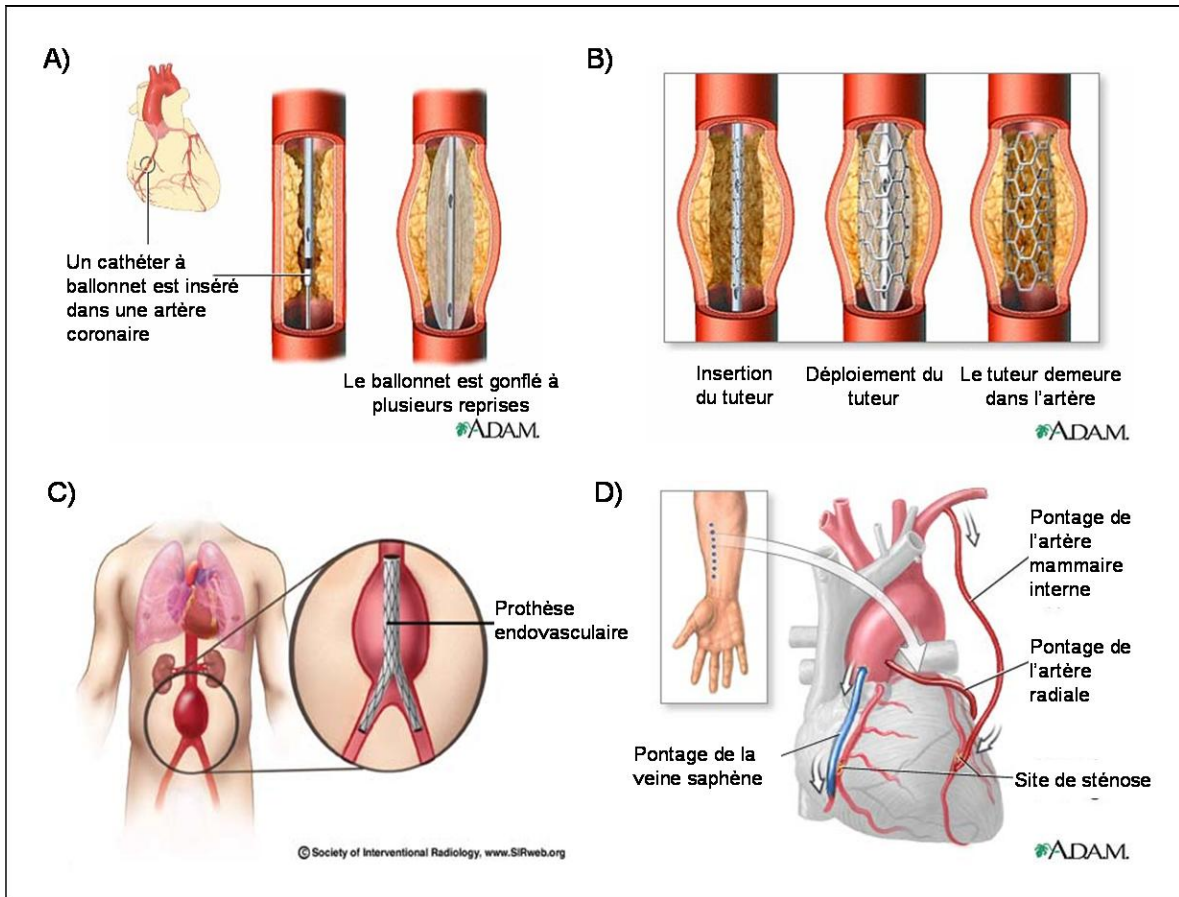


Figure 13. Traitements chirurgicaux endovasculaires et conventionnels des maladies cardiovasculaires. [25-27]

## II. Les prothèses artérielles synthétiques

### 1. Définition

Les prothèses artérielles sont des tubes de diamètre et de longueur variables, fait de matériaux synthétiques et utilisés pour le remplacement d'artères malades afin de rétablir le flux sanguin. Idéalement, les prothèses artérielles synthétiques devraient être résistantes à la dégradation et aux infections, flexibles, faciles à suturer, biocompatibles, hémocompatibles, avoir des propriétés mécaniques semblables aux artères naturelles et entraîner peu de

saignement lors de l'implantation [28, 29]. Cependant, à ce jour aucun matériau n'a su répondre à tous ces critères.

## **2. Matériaux utilisés**

Les polymères sont largement utilisés pour des applications médicales, particulièrement dans le domaine cardiovasculaire [30]. Un polymère est une macromolécule organique constituée d'une chaîne de sous-unités identiques liées par des liens covalents. Ces sous-unités sont appelées « monomères ». Les chaînes d'un polymère peuvent être plus ou moins longues et elles interagissent entre elles en créant des liens secondaires tels les ponts hydrogènes et les interactions de van der Waals. Généralement, les polymères ne sont pas de bons conducteurs thermiques ni électriques car les liens covalents mobilisent les électrons les empêchant ainsi de circuler. Les propriétés mécaniques des polymères dépendent de la longueur des chaînes (poids moléculaire), de la composition du noyau et des groupes latéraux ainsi que de la structure et l'organisation des chaînes.

Depuis 1950, plusieurs polymères tels l'Orlon®, le Nylon®, l'Ivalon®, le Teflon® et le Dacron® ont été testés pour évaluer leur potentiel à fabriquer de bonnes prothèses artérielles [31]. Toutefois, la stérilisation et l'implantation en milieu physiologique exigent une résistance extrême des matériaux. Pour dégrader un polymère on doit altérer soit les interactions inter chaînes, soit les liens covalents intra chaînes. Les techniques de stérilisation des biomatériaux comme l'autoclavage, l'irradiation et la stérilisation chimique peuvent endommager certains polymères [30]. De plus, l'intérieur du corps étant un environnement hostile pour le « non-soi », la plupart de ces matériaux sont rapidement modifiés voir même dégradés par des mécanismes de défense de l'hôte. La biodégradation peut être physique et/ou chimique. Les changements physiques qui risquent de se produire in vivo sont le gonflement, la plastification, la cristallisation, la fatigue, le fluage et la pliure du polymère. Par ailleurs, les changements chimiques incluent l'hydrolyse, l'oxydation par les médiateurs de l'inflammation et la calcification [32]. Parmi les polymères testés à ce jour, seuls le Teflon (polytétrafluoroéthylène, PTFE) et le Dacron (polyéthylène téréphtalate, PET) se sont avérés résistants à la dégradation à long terme. La structure chimique de ces deux matériaux est présentée à la figure 14.



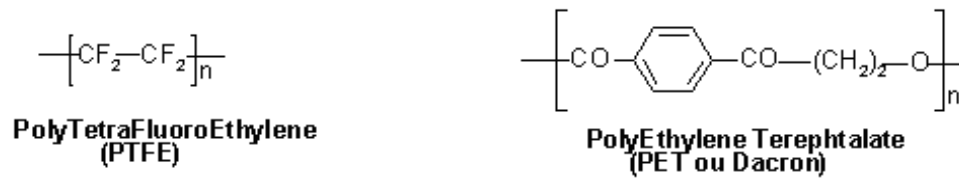


Figure 14. Structure chimique du PTFE et du PET.

C'est d'abord le PET qui a envahi le marché des prothèses artérielles car le PTFE est moins maniable et plus difficile à suturer. Les prothèses de PET performant bien pour le remplacement d'artères de grand diamètre (> 10 mm) pour lesquelles le débit sanguin est important. Toutefois, pour des artères de moyen et petit diamètres elles thrombosent rapidement. Dans les années 1970, le développement du PTFE dit microporeux ou expansé (ePTFE) a révolutionné le marché des prothèses artérielles. Le ePTFE est produit par *frittage* du PTFE suivi d'une *extrusion* et d'un *étirage*. Le matériau obtenu est souple et possède une structure alvéolaire ouverte composée de deux entités de base disposées perpendiculairement, le nodule et la fibrille (Fig. 15). Les nodules ont un plus grand diamètre et sont reliés entre eux par les fibrilles. Les prothèses de ePTFE sont beaucoup plus faciles à manipuler et à suturer que le PTFE conventionnel [33] et quoique leur supériorité n'ait jamais été démontrée, les chirurgiens les préfèrent aux prothèses de PET pour le remplacement d'artères de petit et moyen diamètres [34]. Inversement, les prothèses de ePTFE sont peu utilisées pour les grands diamètres même si des études ont montré que le ePTFE et le PET ont des rendements comparables pour le remplacement de l'aorte abdominale [35]. Actuellement, les prothèses de ePTFE sont les plus utilisées pour le remplacement d'artères de petit et moyen diamètres (< 6 mm) [34]. Toutefois, leur taux de *perméabilité* à long terme demeure faible, soit environ 50% à 5 ans [36, 37].

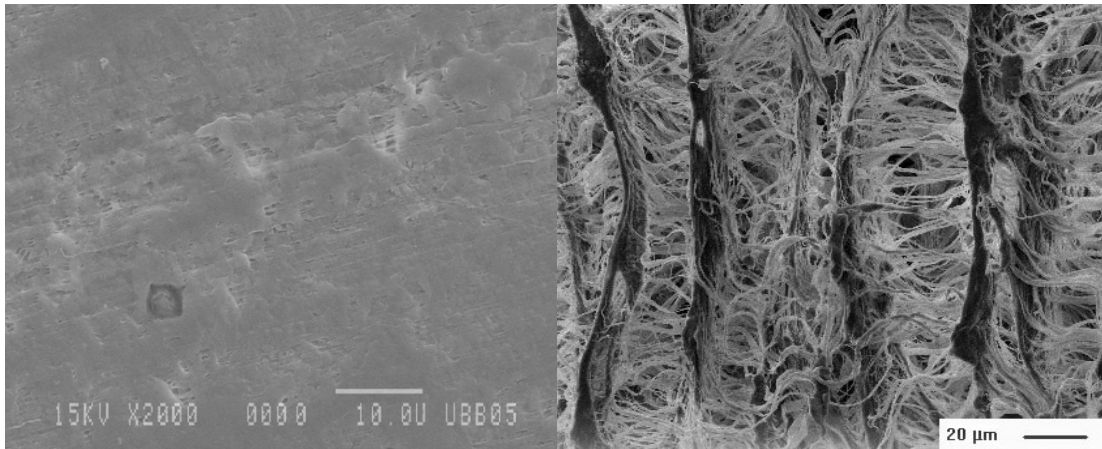


Figure 15. Micrographie du PTFE (gauche) et du ePTFE (droite). La barre d'échelle de la figure de gauche correspond à 10  $\mu\text{m}$ .

### 3. Le teflon (PTFE)

Le polytétrafluoroéthylène (PTFE) est un des polymères les plus utilisés en médecine [38]. Comme on le voit à la figure 14, il est constitué de monomères de  $\text{CF}_2$ . Ces derniers forment de très longues chaînes non ramifiées et hautement cristallisables. Les propriétés électriques et mécaniques du PTFE demeurent stables jusqu'à  $250^\circ\text{C}$  et il est extrêmement résistant aux agents corrosifs et aux solvants. Grâce à ces caractéristiques, le PTFE est facile à stériliser. De plus, il est chimiquement inerte, il a un faible coefficient de friction, il est hautement hydrophobe et il est antiadhésif. Toutes ces qualités en ont fait un matériau de choix pour fabriquer des implants faciaux, des tubes pour la régénération de nerfs, des membranes pour la réparation de hernies, des fils de sutures ainsi que des prothèses vasculaires [39-43]. Les prothèses vasculaires de PTFE se dilatent peu et ne s'allongent pas après implantation [41]. De plus, il est possible de faire des prothèses en PTFE microporeux (ePTFE) qui sont plus maniables et permettent l'infiltration tissulaire, donc une meilleure cicatrisation [44]. Malgré tous ces avantages, le PTFE microporeux n'est pas très efficace pour le remplacement d'artères de moyen et petit diamètres.

### III. Causes du mauvais rendement des prothèses de ePTFE

Les deux principaux facteurs responsables de la piètre performance des prothèses vasculaires de ePTFE sont le manque d'*hémocompatibilité* du matériau et sa différence de *compliance* par rapport aux artères naturelles [32]. Un contact plus ou moins prolongé des prothèses avec le sang peut activer les mécanismes de la coagulation et éventuellement causer une thrombose. De plus, la faible *compliance* des prothèses comparativement aux artères naturelles contribue au développement d'hyperplasie intimale au niveau des anastomoses [45].

Dans les vaisseaux sains, l'*endothélium* prévient la formation de thrombose et le développement d'hyperplasie intimale en sécrétant des inhibiteurs des plaquettes et de la coagulation et en régulant les cellules musculaires lisses. Les prothèses de ePTFE utilisées en clinique présentement ne possèdent pas de substitut à l'*endothélium* et ne permettent pas la formation de ce dernier *in vivo* [46]. C'est la raison pour laquelle elles sont si thrombogènes [24]. Comme nous l'avons vu précédemment, les artères naturelles sont composées de trois couches concentriques soit l'adventice, la média et l'intima. La fonction de l'adventice est assez bien remplie par les prothèses de ePTFE, par contre, la média et l'intima ne sont pas reproduites. Les implants résultants ne sont pas hémocompatibles ce qui représente un obstacle majeur à l'accomplissement de leur fonction.

#### 1. Thromboses

Une thrombose est la formation d'un caillot ou thrombus dans un vaisseau sanguin ou une cavité cardiaque. Ce caillot peut obstruer partiellement ou totalement le vaisseau où il a été formé et provoquer l'*ischémie* des tissus environnants. Il peut aussi se détacher et migrer dans le flux sanguin, dans ce cas, le caillot se nomme embolie. Généralement l'embolie va obstruer un vaisseau de plus petit calibre situé en aval et provoque une *ischémie*, on parle alors d'une embolie. Plusieurs causes peuvent activer la coagulation et entraîner la

formation d'un caillot dans un vaisseau. Par exemple, une diminution du flux sanguin, une modification des propriétés des parois vasculaires ou encore une modification dans les propriétés du sang. Dans le cas des prothèses vasculaires, la cascade est surtout initiée par l'adsorption de protéines plasmatiques à la surface de la paroi vasculaire synthétique et l'augmentation des *forces de cisaillement* engendrées par la prothèse et/ou l'hyperplasie intimale. Malgré les propriétés antiadhésives du PTFE, une certaine quantité de protéines plasmatiques y est adsorbée [47]. Dans les secondes qui suivent l'implantation d'une prothèse artérielle, les protéines et les *glycosaminoglycanes* du plasma adhèrent à la surface synthétique; c'est l'effet Vroman. Ce phénomène varie en fonction des caractéristiques du matériau telles que la charge, l'hydrophobicité, la rigidité, ainsi que de la composition du plasma et les *forces de cisaillement* [48-50]. De même, les adsorptions ne sont pas permanentes, une protéine ayant plus d'affinité pour la surface pouvant à tout moment en déloger une autre de faible affinité. Certaines protéines adsorbées peuvent entraîner l'activation des phagocytes et des plaquettes, ce qui cause de l'inflammation, l'agrégation plaquettaire et la prolifération des cellules musculaires lisses. Cette cascade peut aussi être provoquée par des modifications du flux sanguin augmentant les *forces de cisaillement*. Les propriétés mécaniques de la prothèse ainsi que l'hyperplasie intimale peuvent modifier l'écoulement du sang. Les prothèses de ePTFE n'ont pas la même *compliance* que les artères naturelles auxquelles elles sont anastomosées [51] et donc, le flux sanguin n'est plus laminaire après son entrée dans la prothèse. Les *forces de cisaillement* engendrées activent les plaquettes qui sécrètent du PDGF (platelet derived growth factor), un facteur de croissance du muscle lisse, et d'autres molécules qui poursuivent l'activation des plaquettes. L'hémostase primaire et la coagulation étant misent en branle, il y aura formation d'un thrombus si la fibrinolyse n'est pas stimulée. Toutefois, même si l'équilibre est maintenu entre ces trois phénomènes, les cellules musculaires lisses en prolifération représentent un risque d'hyperplasie intimale et pourraient causer une *resténose*.

## 2. Hyperplasie intimale

L'hyperplasie intimale est caractérisée par l'accroissement du volume de l'intima, la couche interne de la paroi artérielle, dû à la prolifération de cellules musculaires lisses et à leur production de matrice extracellulaire. Contrairement aux cellules endothéliales qui croissent en monocouches, les cellules musculaires lisses forment des multicouches; le tissu compact qui en résulte réduit graduellement la lumière du vaisseau et obstrue le passage du sang. Lorsque la lumière est diminuée de 50% ou plus, on parle de sténose ou de *resténose* selon le cas. Les cellules musculaires lisses maintiennent une plasticité de phénotype importante dans plusieurs processus physiologiques tels le développement et la guérison. Cependant, cette plasticité est aussi impliquée dans certaines pathologies, dont l'hyperplasie intimale. Les cellules musculaires lisses matures sont quiescentes et présentent un phénotype contractile différencié. Par contre, lors du développement, suite à une blessure vasculaire ou lors de la croissance *in vitro*, elles peuvent se dédifférencier, entrer dans le cycle cellulaire, proliférer, diminuer l'expression des protéines contractiles et augmenter la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire [52]. On dit alors qu'elles ont le phénotype synthétique. L'hyperplasie intimale se développe pendant les premiers mois suivant une blessure artérielle. Ces blessures sont souvent causées par des interventions chirurgicales telles l'angioplastie, l'implantation d'un *tuteur (stent)* ou l'implantation d'une prothèse artérielle. Dans le cas des prothèses artérielles, l'hyperplasie se produit surtout à partir de l'anastomose distale et sur quelques centimètres de l'artère naturelle distale. Suite à la blessure, les plaquettes, les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires libèrent des facteurs de croissances qui entraînent la dédifférenciation des cellules musculaires lisses au stade synthétique [53]. Il a longtemps été considéré que les cellules musculaires constituant la néointima provenaient de la média et avaient migré et proliféré dans l'intima. Toutefois, des études récentes, ont démontré que les cellules de la moelle osseuse qui se différencient en cellules musculaires lisses auraient aussi un grand rôle à jouer dans le remodelage artériel et le développement de l'hyperplasie intimale [54-56].

Plusieurs facteurs peuvent expliquer la prolifération et la migration des cellules musculaires ainsi que le recrutement de cellules progénitrices au niveau des anastomoses des prothèses artérielles synthétiques. Les cellules musculaires lisses expriment le facteur des cellules souches (SCF, stem cell factor) sous forme membranaire [57], or, il a été démontré qu'une blessure vasculaire engendrait la libération de la métalloprotéinase de matrice 9 (MMP-9), responsable de la libération du SCF sous forme soluble [57, 58]. L'interaction entre le SCF (stem cell factor) et son récepteur à tyrosine kinase "c-Kit" régule la survie, la prolifération, la *chimiotaxie* et la maturation des cellules qui l'expriment [59, 60]. Curieusement, l'expression du récepteur c-Kit par les cellules musculaires lisses est augmentée suivant une blessure vasculaire [57]. Le SCF pourrait donc agir de façon autocrine sur les cellules musculaires suite à une blessure. De plus, Wang *et al.* ont démontré que le sentier de signalisation cellulaire du SCF (stem cell factor) et son récepteur c-Kit, était crucial pour le développement de néointima par les cellules progénitrices de la moelle osseuse [56]. Le SCF serait donc également impliqué dans le recrutement des cellules progénitrices par *chimiotaxie*. Par ailleurs, les prothèses synthétiques n'ont pas la même *compliance* que les vaisseaux naturels et donc elles ne se comportent pas de la même façon sous la pression sanguine. Lors du passage du sang, ces différences de propriétés mécaniques engendrent de la turbulence et une augmentation des *forces de cisaillement* exercées sur la prothèse et/ou la paroi artérielle ainsi que sur les plaquettes du sang. Ces contraintes peuvent endommager la paroi artérielle et activer les plaquettes. Les plaquettes activées sécrètent des activateurs de l'agrégation (ADP, TXA<sub>2</sub>) et le PDGF, un puissant activateur des cellules musculaires lisses et des fibroblastes. Le PDGF stimule la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi que leur production de matrice extracellulaire [5, 61].

## Chapitre II – Objectifs, Hypothèses, Revue de la Littérature et Stratégies

# **I. Favoriser la néo-endothélialisation afin de réduire les risques de thromboses**

## **1. Hypothèses**

Étant donné que l'*endothélium* est le seul tissu hémocompatible du corps, nous avons posé l'hypothèse que le recouvrement de la surface interne des prothèses par des cellules endothéliales constituerait une surface naturellement hémocompatible, évitant ainsi les thromboses. Malheureusement, le ePTFE n'est pas un support adéquat à la croissance d'un *endothélium* car très peu de liens sont possibles entre le polymère et les cellules. Dans les vaisseaux naturels, les cellules endothéliales croissent sur la *membrane basale*, une matrice extracellulaire spécialisée. Tel que mentionné au chapitre I, des glycoprotéines spécialisées dans l'adhésion cellulaire font partie intégrante de la *membrane basale* et servent d'intermédiaire de liaison entre les cellules endothéliales et la matrice. Nous misons donc sur la présence de ces glycoprotéines spécialisées à l'intérieur des prothèses de ePTFE pour augmenter l'adhésion et la survie des cellules endothéliales à la surface du polymère afin de permettre l'endothélialisation des prothèses. Les molécules de la matrice extracellulaire ont le potentiel d'améliorer les prothèses synthétiques en exploitant les signaux biologiques naturels "cellule-matrice" pour réguler l'adhésion des cellules et leurs fonctions métaboliques [17].

## **2. Revue de la littérature**

Le PTFE n'est pas hémocompatible car ce n'est pas un support favorable à l'endothélialisation. La surface interne des prothèses doit donc être modifiée pour favoriser l'adhésion des cellules endothéliales. Plusieurs tentatives ont été faites pour rendre les prothèses artérielles de PTFE attrayantes pour les cellules endothéliales puisque ces dernières constituent une surface hémocompatible. Idéalement, les molécules utilisées



devraient permettre la formation d'une matrice extracellulaire capable d'assurer le développement et la survie d'un endothélium.

## 2. 1. Mécanismes d'adhésion, de survie et de migration cellulaire

Afin de bien comprendre les mécanismes d'adhésion, de survie et de migration cellulaire, il faut connaître les constituants et la structure des membranes plasmiques.

### 2. 1. 1. La membrane plasmique [7, 11]

La membrane plasmique est une barrière sélectivement perméable qui sépare le cytoplasme des cellules du milieu extracellulaire. La structure de la membrane est présentée à la figure 16. Elle est constituée d'une bicouche lipidique, de protéines et de glucides. La bicouche lipidique est composée de trois classes de lipides: les phospholipides, les stéroïdes et les glycolipides. Les phospholipides sont les plus abondants; c'est leur caractère *amphiphile* qui permet la formation spontanée de la bicouche en milieu aqueux. Le cholestérol et ses dérivés (stéroïdes) servent principalement à augmenter la rigidité des membranes alors que les glycolipides, présents uniquement dans le feuillet exoplasmique, forment le *glycocalyx* (avec les glycoprotéines). Le centre hydrophobe de la bicouche lipidique est primordial car il empêche la diffusion simple des molécules hydrosolubles et des ions au travers la membrane. Toutefois, la présence de protéines permet aux cellules de transporter des molécules spécifiques. Les membranes contiennent des protéines transmembranaires, des protéines périphériques et des protéines de surface (Figure 16). La nature et la densité de protéines membranaires varient beaucoup selon les types cellulaires et leur localisation dans le corps puisqu'elles sont directement reliées aux fonctions des cellules. De même, il existe différentes sortes de protéines membranaires selon la fonction qu'elles accomplissent. On notera les protéines "canal", les transporteurs et les pompes, qui permettent le transport passif ou actif de certaines molécules et des ions; les enzymes qui catalysent une réaction à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule; les récepteurs qui transmettent un signal intracellulaire lors de la liaison de leur ligand spécifique; les marqueurs de l'identité cellulaire ainsi que les amarres qui lient la membrane au *cytosquelette* à l'intérieur et à la matrice extracellulaire à l'extérieur (lien cellule-matrice) en plus de participer aux liens

cellule-cellule. Les protéines membranaires peuvent également être glycosylées du côté extracellulaire. Les lipides et la plupart des protéines sont libres de diffuser latéralement dans la bicouche lipidique, cependant, la liaison des protéines au *cytosquelette* peut ralentir ou même empêcher la diffusion de certaines protéines.

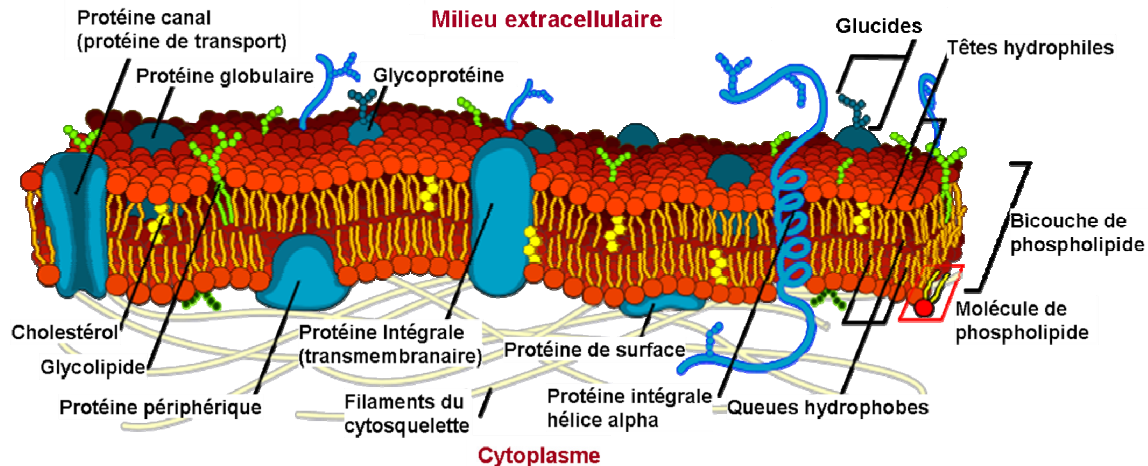


Figure 16. Schéma de la structure d'une membrane plasmique. [62]

### 2. 1. 2. L'adhésion et la survie cellulaire

À quelques exceptions près, les cellules ont besoin d'adhérer à un support pour survivre. L'interaction de la membrane plasmique avec les cellules avoisinantes ou la matrice extracellulaire permet la transmission de signaux de survie ou de mort cellulaire à l'intérieur de la cellule [63, 64]. Les interactions cellule-cellule s'effectuent généralement grâce à des molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) alors que les liens cellule-matrice extracellulaire s'effectuent via des récepteurs d'adhésion. Ces derniers sont des protéines transmembranaires (intégrales), parfois glycosylées, comprenant un domaine intra- et un domaine extracellulaire. La formation des différents tissus et leur organisation en organes sont dépendantes de l'expression et de l'interaction de ces molécules au niveau cellulaire. La liaison des cellules entre elles et avec la matrice extracellulaire ne permet pas uniquement d'agréger les cellules en tissus mais aussi le transfert bidirectionnel d'informations entre l'intérieur et l'extérieur des cellules [65, 66]. La plupart des CAMs et

des récepteurs d'adhésion font partie de quatre grandes familles majeures: les cadhérines, la superfamille des immunoglobulines, les *intégrines* et les sélectines (Figure 17). D'autres molécules participent à l'adhésion cellule-cellule sans toutefois correspondre à une de ces classes.

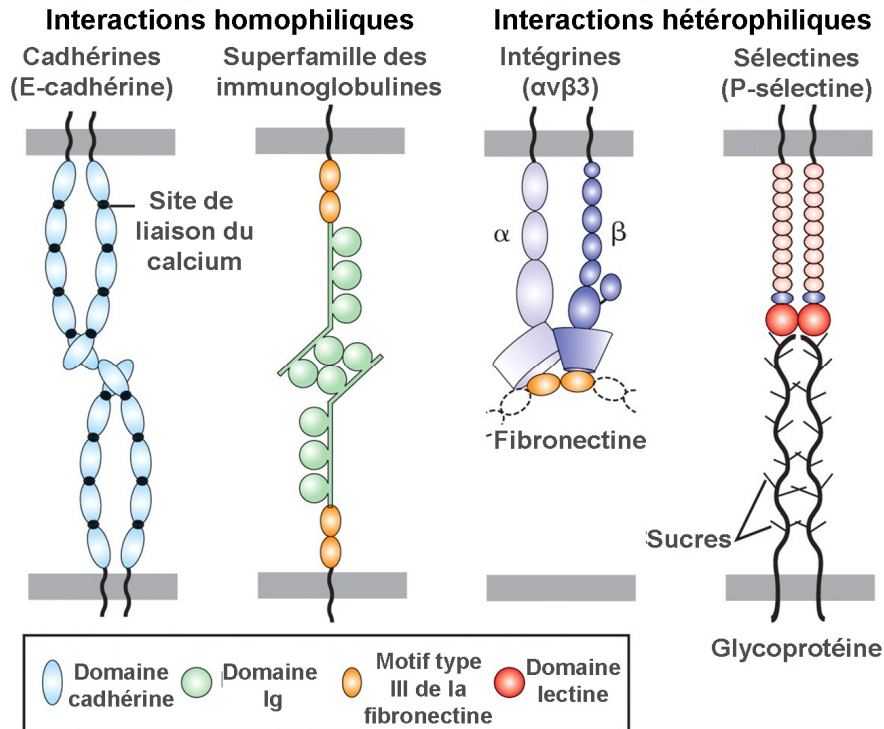


Figure 17. Les quatre familles majeures de molécules d'adhésion cellulaire et de récepteurs d'adhésion. [11]

La plupart des CAMs et récepteurs d'adhésion sont constitués d'un agencement particulier de divers motifs qui peuvent se retrouver sur plusieurs d'entre eux. Leurs propriétés d'adhésion sont attribuables à certains de ces motifs. Via leur domaine extracellulaire, les CAMs peuvent lier des cellules de même type (adhésion homotypique) ou de type différent (adhésion hétérotypique). Également, l'adhésion peut se faire entre des CAMs de même classe (interaction homophile) ou de classes différentes (interaction hétérophilique). Les récepteurs d'adhésion sont quant à eux responsables des liaisons aux différents constituants des matrices extracellulaires. Toutes ces liaisons peuvent être fortes et durables ou faibles et transitoires. Malgré que l'adhésion s'effectue via le domaine extracellulaire, le domaine

cytosolique des CAMs et des récepteurs d'adhésion est tout aussi important. C'est via ce domaine qu'ils peuvent se lier à des protéines adaptatrices qui font le lien avec le *cytosquelette*, à des molécules impliquées dans une voie de signalisation cellulaire ou même au domaine cytosolique des CAMs ou des récepteurs d'adhésion voisins [65]. Le regroupement des CAMs ou des récepteurs d'adhésion latéralement peut s'effectuer via leur domaine intra- ou extracellulaire et résulte en la formation d'oligomères. Ces structures sont essentielles au développement de jonctions cellulaires spécialisées (Figure 18). Il existe plusieurs types de jonctions cellulaires qui remplissent différentes fonctions: les jonctions serrées, les jonctions communicantes, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les hémidesmosomes [11]. Les jonctions communicantes permettent la diffusion rapide de petites molécules hydrosolubles entre le cytoplasme de deux cellules adjacentes. Contrairement aux autres types de jonctions, ces dernières ne sont pas reliées au *cytosquelette*. Les jonctions serrées et adhérentes de même que les desmosomes et les hémidesmosomes sont composées de trois parties: les récepteurs d'adhésion ou les CAMs au niveau de la membrane, les protéines adaptatrices et les filaments du *cytosquelette* ou les molécules de signalisation. Ces jonctions maintiennent la cohésion des cellules dans les tissus. Les jonctions serrées limitent également la diffusion des solutés entre les cellules et la migration des protéines membranaires. Les jonctions adhérentes, qui sont reliées aux filaments d'actine, permettent de moduler la forme des cellules. Quant aux desmosomes et hémidesmosomes, ils sont liés aux filaments intermédiaires et confèrent de la rigidité aux cellules en plus de transmettre les *forces de cisaillement* de cellules en cellules dans les tissus. L'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice varie beaucoup en fonction des CAMs et des récepteurs d'adhésion impliqués et du tissu. Parmi les facteurs qui influencent l'adhésion cellulaire, notons l'affinité de liaison des CAMs entre elles ou des récepteurs d'adhésion pour la matrice, leur distribution spatiale, leur densité, leur *conformation* active ou inactive, ainsi que les forces externes telles le flux sanguin laminaire ou turbulent dans le système cardiovasculaire.

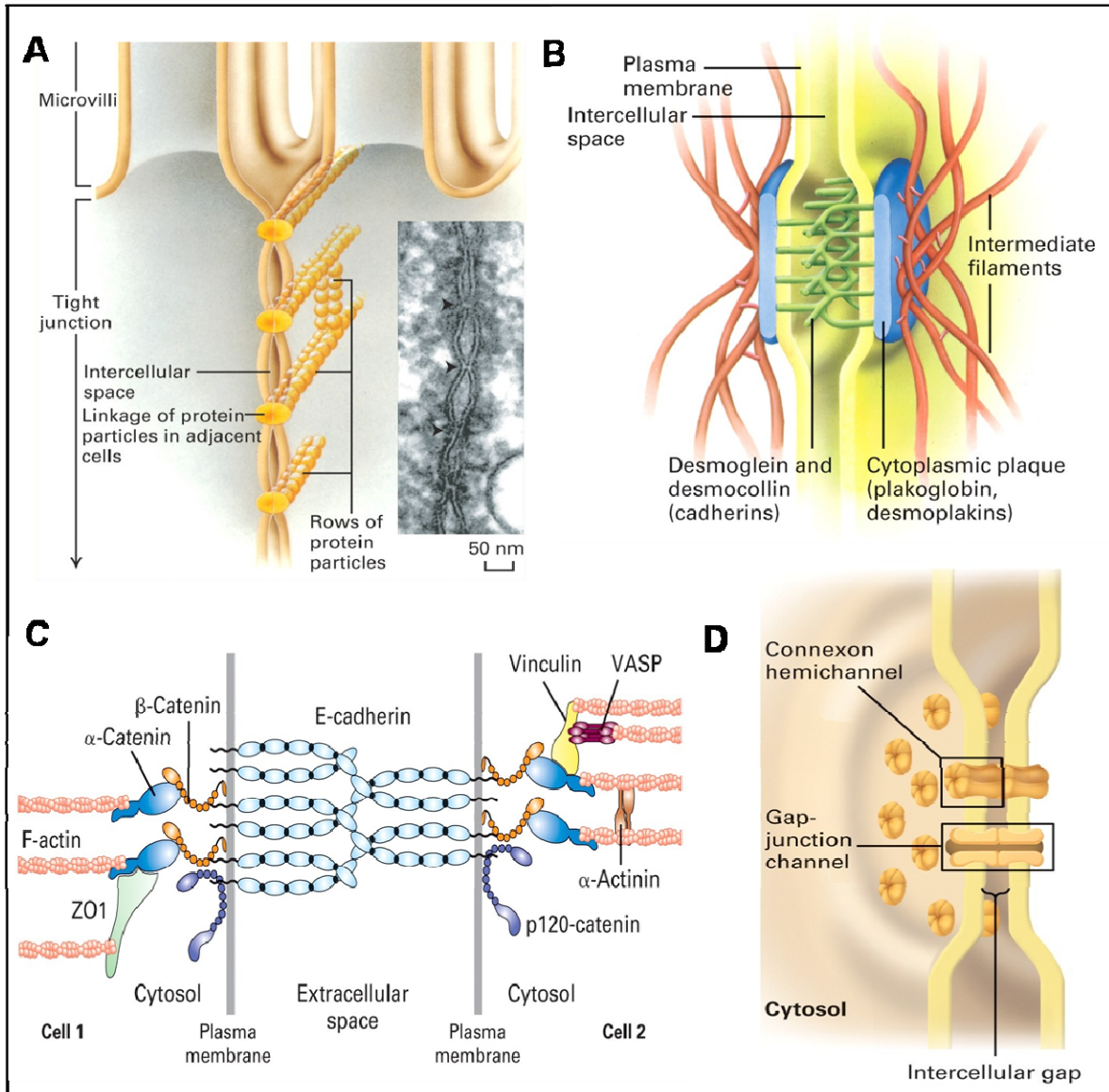


Figure 18. Schéma des jonctions cellulaires spécialisées. A) Jonction serrée, B) desmosome, C) jonction adhérente et D) jonction communicante. [11]

Dans le cas qui nous intéresse, nous voulons faciliter l'adhésion des cellules endothéliales à la surface de PTFE en permettant la formation de lien cellule-matrice. La plupart de ces liens s'effectuent via des *intégrines*, des protéines transmembranaires hétérodimériques. Il existe au moins 24 *intégrines* formées à partir de différentes combinaisons des 18 sous-unités  $\alpha$  et des 8 sous-unités  $\beta$  [66]. Ces protéines sont spécialisées dans l'adhésion aux différents récepteurs des matrices extracellulaires. Les liaisons des *intégrines* à leur ligand

sont généralement de faibles affinités mais un grand nombre de ces faibles liaisons peut générer une forte adhésion. De plus, la faiblesse des liens individuels facilite la migration cellulaire. Le domaine cytosolique des *intégrines* est habituellement lié aux microfilaments d'actine du *cytosquelette* et/ou à des molécules de signalisation intracellulaire via des protéines adaptatrices. L'interaction des *intégrines* avec leurs ligands peut ainsi moduler la *conformation* cellulaire via les filaments d'actine ou agir sur différentes voies de signalisations intracellulaires pour donner des signaux de survie ou de mort cellulaire, de prolifération ou pour moduler l'expression de gènes par exemple [66]. C'est la communication "outside-in". Les *intégrines* permettent aussi la communication "inside-out". En fait, la plupart des *intégrines* ont deux *conformations*, l'une active, l'autre inactive. La cellule, par des voies de signalisation intracellulaire, peut modifier la *conformation* des *intégrines* et ainsi moduler leur capacité à se lier à leurs ligands [66].

### 2. 1. 3. La migration cellulaire [11]

Le *cytosquelette* des cellules est composé de trois types de fibres: les microfilaments, les filaments intermédiaires et les microtubules. Ces fibres sont formées par la polymérisation de leurs monomères protéiques via des liens non-covalents. Les microfilaments sont constitués d'actine, les microtubules de tubuline- $\alpha$  et - $\beta$  alors que les filaments intermédiaires peuvent être formés par toute une famille de protéines incluant la lamine, la desmine, la kératine et la vimentine. La forme des cellules est déterminée par les microfilaments qui sont attachés à la membrane plasmique par l'intermédiaire de protéines adaptatrices. Les microfilaments sont aussi directement impliqués dans le mouvement cellulaire. La membrane nucléaire de même que les liens cellule-cellule sont stabilisés par les filaments intermédiaires. Ces filaments sont les plus stables du *cytosquelette* et sont attachés aux jonctions desmosomes et héli-desmosomes via des protéines adaptatrices. Ainsi les filaments intermédiaires d'une cellule sont reliés à ceux des cellules voisines et à la matrice extracellulaire. Quant aux microtubules, ils émergent tous d'un centrosome, le centre d'organisation des microtubules. Ils sont essentiels à la division cellulaire puisqu'ils

divisent les chromosomes également entre les deux cellules filles. Les microtubules jouent également un rôle dans le maintien des organelles et le transport intracellulaire.

Les cellules possèdent deux mécanismes requérant l'énergie de l'ATP pour générer le mouvement; l'assemblage et le désassemblage des microfilaments et des microtubules et l'utilisation de protéines motrices. Les protéines motrices ont la particularité de pouvoir utiliser l'énergie de l'ATP pour "se hisser" le long des microtubules ou des microfilaments. Ces dernières sont surtout utilisées pour la contraction musculaire (myosine) et le transport intracellulaire. La migration des cellules est plutôt assurée par l'assemblage et le désassemblage des microfilaments d'actine. Le mouvement est amorcé par la formation de grandes protubérances dans la membrane plasmique en direction du mouvement. Cette déformation de la membrane est provoquée par la polymérisation et l'organisation rapide de l'actine formant des lamellipodes ou des filopodes. Ces structures forment rapidement des contacts focaux avec la surface sous-jacente pour éviter de se rétracter et pour permettre à la cellule de se tirer vers l'avant. Les contacts focaux sont des liens cellule-matrice formés par l'agrégation de plusieurs molécules dont les *intégrines*. Il survient ensuite une translocation du corps cellulaire par un mécanisme inconnu mais qui implique sûrement tout le *cytosquelette*. Finalement, la dernière étape est le détachement de l'arrière de la cellule. Les contacts focaux sont brisés et la membrane plasmique se rétracte immédiatement vers l'avant. La capacité des cellules à migrer est donc une balance entre les forces mécaniques que le *cytosquelette* peut générer et la force de résistance créée par l'adhésion. Une cellule trop fortement attachée ne peut pas migrer mais une cellule pas attachée non plus. Certains facteurs de croissance stimulent la formation de lamellipodes et de filopodes en réponse à leur liaison sur leur récepteur membranaire et favorisent ainsi la migration cellulaire. De plus, des molécules solubles peuvent guider la migration des cellules par *chimiotaxie*. La cellule détecte la molécule et se dirige dans le sens de son gradient de concentration.

## **2. 2. Molécule d'adhésion: adsorption et activité biologique**

La FN et d'autres constituants des matrices ont souvent été adsorbés sur différentes surfaces afin d'en améliorer la *biocompatibilité* [67-71]. Cependant, les molécules liées ou

adsorbées à une surface ne conservent pas nécessairement leur structure tridimensionnelle et elles peuvent perdre leur activité biologique. La *conformation* prise par une biomolécule adsorbée dépend de la charge, l'hydrophobicité, la composition chimique et la rugosité de la surface et de la molécule [72]. Plusieurs études ont démontré que la quantité de FN adsorbée sur différentes surfaces ne corrèle pas directement avec son activité [73, 74]. De plus, la FN soluble ne compétitionne pas avec la FN liée pour les sites d'adhésion cellulaire [74]. Ceci démontre clairement que la *conformation* de la protéine a un impact déterminant sur son activité biologique.

### 2. 3. Recouvrement de surface

Une alternative afin d'augmenter la *biocompatibilité* des prothèses de PTFE est de couvrir la surface synthétique de molécules biologiques ou chimiques. Toutefois, l'utilisation de matériel biologique allogénique ou même xénogénique comporte des risques de réactions immunitaires et de transfert de pathogènes. Par contre, ces risques sont moindres si on utilise des molécules hautement conservées, c'est-à-dire peu modifiées dans l'évolution, qui ont une grande homologie entre les espèces. De plus, on peut maintenant stériliser un grand nombre de molécules.

Ces recouvrements ont divers objectifs. Parfois, on tente simplement de camoufler le PTFE afin d'éviter toute réaction face au corps étranger que représente la prothèse synthétique. Dans ce cas, on utilise des molécules antiadhésives comme les poly(éthylène glycol)s (PEGs) [75-79], le chitosane[80], le dextrane [81, 82] et la phosphorylcholine (PC) [83-89]. Différents résultats ont été obtenus avec ces molécules: les PEGs semblent diminuer l'adsorption de lipides et de protéines [75, 77-79] alors que le chitosane et le dextrane favorisent la prolifération des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales [80]. Quant à la PC, elle inhibe l'adhésion plaquettaire [83-89]. Par contre, aucune de ces molécules ne permet d'atteindre l'objectif ultime à savoir l'endothélialisation des prothèses.

Un autre objectif souvent visé est de transformer la surface de PTFE inerte en une surface proactive pouvant interagir favorablement avec les tissus humains environnants. La technique la plus simple est d'imprégner les prothèses de molécules ayant des propriétés



antiplaquettaires, anticoagulantes ou d'adhésion cellulaire. Par exemple, les performances biologiques de prothèses imprégnées d'héparine ou d'héparane sulfate [90-92], de collagène [93], de FN [94, 95] et de peptides synthétiques contenant la séquence RGD [95] ont été étudiées. L'adsorption d'héparine sur le PTFE s'est montrée bénéfique en inhibant la formation de thrombus [91, 96]. De même, la FN et les peptides contenant la séquence RGD augmentent l'adhésion et la rétention des cellules endothéliales sur le PTFE [94, 95]. Par contre, le collagène semble ralentir le processus de guérison [93]. Même si certaines molécules sont relativement efficaces *in vitro*, *in vivo* les liens électrostatiques qui les unissent au PTFE ne résistent pas au flux sanguin et tout est lavé en peu de temps. Laredo et al. ont montré que l'héparine adsorbée sur le PTFE a un effet antithrombotique à court terme. Par contre, après sept jours d'implantation, il ne reste plus que 2% de l'héparine adsorbée à la surface de la prothèse [96]. Le flux sanguin et la composition du plasma entraînent la désorption de la plupart des molécules. Une étude a démontré que le plasma était la meilleure solution de lavage pour désorber la FN du polystyrène comparativement au tampon Tris, à une solution de HSA (human serum albumin), de HSA dénaturée et de *fibrinogène* [74].

#### 2. 4. Les modifications de surface

Promouvoir l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales sur le PTFE grâce à des biomolécules est une stratégie intéressante. Toutefois, comme nous venons de le voir, l'adsorption peut entraîner des changements conformationnels affectant l'activité de ces molécules [74] et le flux sanguin risque de les désorber du PTFE. Pour avoir un effet à long terme, les biomolécules doivent être ancrées en *conformation* active et de façon covalente sur le PTFE. Dans cette optique, le PTFE, normalement inerte chimiquement, doit être modifié. Cependant, il a été sélectionné au départ en raison de ses propriétés chimiques et mécaniques avantageuses pour la fabrication de prothèses artérielles. Dans ce contexte, les modifications pour améliorer sa *biocompatibilité* doivent affecter la surface interne des prothèses seulement et non les propriétés massiques du polymère. Parmi les techniques de modification chimique de surfaces, les traitements par plasma [97, 98] et l'exposition aux rayons ultraviolets sont particulièrement utilisés pour modifier le PTFE [38, 99, 100]. Les

traitements par plasma du PTFE servent la plupart du temps à remplacer des atomes de fluor en surface par d'autres espèces chimiques plus réactives. La nature de ces dernières est déterminée par le gaz utilisé pour le traitement. Dans le cas du PTFE, l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) ainsi que des mélange d'azote et d'hydrogène sont souvent utilisés pour y incorporer des amines ( $\text{NH}_2$ ) [4, 71, 97, 98, 101-103]. Les amines sont des groupements hydrophiles très réactifs qui permettent des greffages subséquents. Elles augmentent l'hydrophilicité de la surface du PTFE, qui est très hydrophobe au départ, mais diminuent du même coup ses propriétés antiadhésives. *In vitro*, les cellules endothéliales peuvent adhérer sur le PTFE aminé et croître jusqu'à confluence mais de façon non-spécifique [38, 44, 99]. Comme ce sont des charges positives qui permettent l'adhésion et non une séquence peptidique spécifique, tous les types cellulaires et les protéines plasmatiques s'adsorbent aussi sur ces surfaces modifiées [104]. L'exposition aux ultraviolets est utilisée dans le même but que les traitements par plasma. Les surfaces de PTFE sont exposées à des radiations UV de moins de 200nm sous une atmosphère d'ammoniac afin de remplacer des atomes de fluor par des C-H, des C=O et des C-NH<sub>2</sub> [99].

### **3. Stratégie sélectionnée**

Parmi les biomolécules d'adhésion, nous avons sélectionné la fibronectine (FN) pour favoriser l'adhésion, la prolifération et la survie des cellules endothéliales sur le PTFE. Dans cette optique, la FN a été immobilisée sur le PTFE en tant qu'intermédiaire de liaison entre la prothèse et les cellules endothéliales. Dans cette section, la structure et les fonctions de la FN seront détaillées de même que les techniques employées pour modifier le PTFE et greffer la FN.

#### **3. 1. La fibronectine (FN)**

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous misons sur les propriétés de la FN pour favoriser l'endothélialisation du PTFE. La FN a été sélectionnée car c'est la première protéine des matrices extracellulaires qui est exprimée et elle est essentielle à la migration et à la différenciation de plusieurs types cellulaires lors du développement embryonnaire [105]. De plus, la composition et la stabilité des matrices extracellulaires sont régulées par

la polymérisation de la FN [106]. Plusieurs études ont démontré que l'incorporation de collagène, de thrombospondine-1 [106, 107], de ténascine C [108], de fibuline [109] et de *fibrinogène* [110] dans les matrices extracellulaires est dépendante de la FN. Contrairement à plusieurs constituants des matrices qui sont conservés de la mouche à l'humain tels le collagène et la laminine, la FN se retrouve uniquement chez les vertébrés. Son apparition dans l'évolution correspond à l'apparition d'organismes munis de vaisseaux sanguins recouverts d'un *endothélium* [111, 112]. De plus, les souris dépourvues du gène codant pour la vitronectine, de l'ostéopontine ou du *fibrinogène* sont tout de même viables alors que celles privées du gène codant pour la FN meurent au début du stade embryonnaire, suggérant un rôle primordial de cette protéine [111].

### 3. 1. 1. Structure et fonctions

La FN est une glycoprotéine dimérique comprenant deux sous-unités d'environ 220 kDa reliées queue à queue par deux ponts disulfures. Elle est présente dans le sang sous forme globulaire soluble ainsi que dans la matrice extracellulaire de la plupart des tissus humains sous forme de fibrilles insolubles [113]. Par ailleurs, elle joue un rôle majeur dans l'adhésion et la migration cellulaire, l'organisation du *cytosquelette*, la régulation de l'apoptose et la morphogenèse [114]. La FN possède des séquences de liaisons aux *intégrines* contenues dans les membranes cellulaires ainsi qu'à une variété d'autres molécules (Fig. 19).

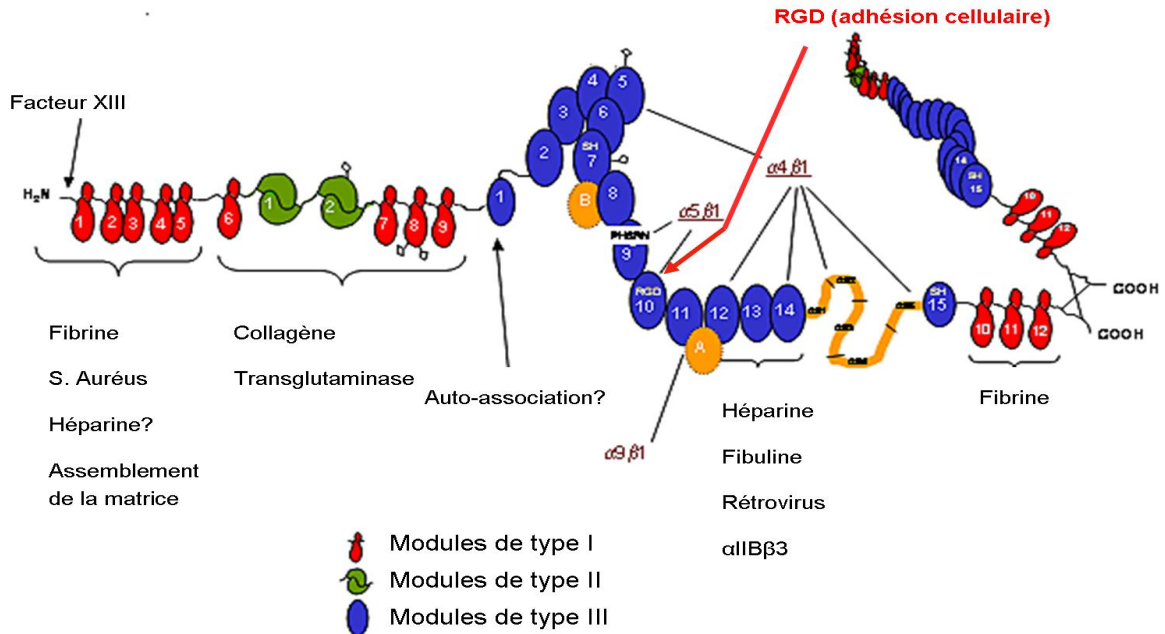


Figure 19. Les sites d'interactions moléculaires de la FN. [115]

Elle contient trois types de motifs homologues appelés modules, séparés par des séquences de connexions. Chaque monomère de FN contient 12 modules I, 2 modules II et 15 modules III. Il existe aussi trois domaines d'épissage alternatif, soit les domaines A, B (aussi appelé EIIIA et EIIB car ce sont des modules III) et V. La FN plasmatique est synthétisée par les hépatocytes et ne contient pas les segments d'épissage alternatif A et B mais possède le domaine V sur une de ses deux sous-unités. La FN produite par les autres cellules contient une variété de combinaisons des domaines A, B et V. Les sites d'adhésion cellulaire se situent majoritairement dans les modules de type III, les plus connus étant le III-10 (contenant la fameuse séquence RGD) et son site synergique le III-9. Ces modules se lient aux *intégrines*  $\alpha_5\beta_1$  retrouvées dans les membranes de plusieurs types cellulaires y compris les cellules endothéliales. Les *intégrines* sont les liens transmembranaires entre la matrice extracellulaire, le *cytosquelette* et les molécules cytoplasmiques qui initient les cascades de signalisation intracellulaires et modulent le comportement cellulaire (Fig.20) [116, 117].

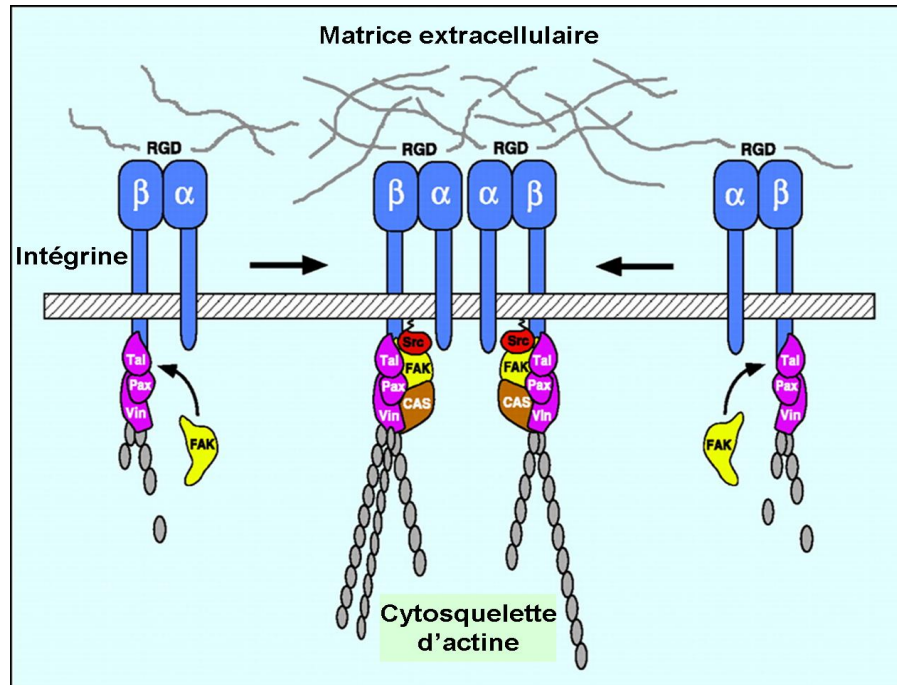


Figure 20. Les intégrines sont le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. La liaison de la FN à une intégrine entraîne une cascade de signalisation intracellulaire qui influence le devenir de la cellule. [118]

Dans le sang, la FN est sous sa forme globulaire soluble et la majorité de ses domaines de liaison sont cachés. Elle prend une *conformation* allongée et expose ses sites de liaison cellulaire seulement lorsqu'elle est activée [11, 119]. *In vivo*, son activation est surtout médiée par sa liaison à une *intégrine* (Fig. 21); *in vitro*, la FN peut être activée par adsorption sur certaines surfaces, un changement de force ionique ou de pH, par interaction avec le collagène ou l'héparine, de même que par un agent dénaturant doux [120-122]. Toutefois, il faut garder à l'esprit qu'il existe une foule de *conformations* intermédiaires possibles entre la forme globulaire et la forme totalement allongée. L'activité biologique de la FN dans chacune de ces *conformations* dépend de la disponibilité de ses sites de liaison. Pour exercer son rôle biologique à la surface du PTFE, la FN doit être immobilisée en *conformation* active.

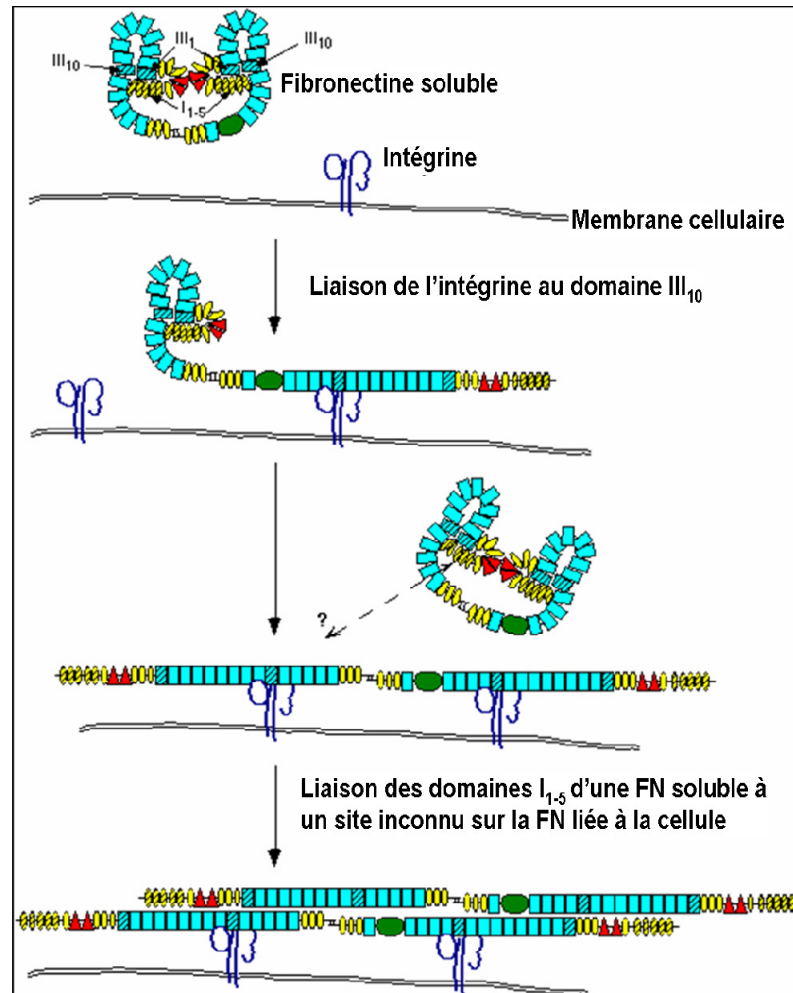


Figure 21. Activation d'une molécule de FN. Une fois déroulée, la FN peut interagir avec les autres molécules de la matrice extracellulaire et lier plus solidement les cellules.

### 3. 2. Les traitements plasmas

Le Laboratoire d'Ingénierie de Surface ayant développé une bonne expertise dans les modifications de surfaces par plasma [75, 97, 101, 123, 124], nous avons choisi cette technique pour fonctionnaliser la surface du PTFE. Le terme plasma désigne un quatrième état de la matière, venant après l'état solide, liquide et gazeux sur l'échelle de la température. Un plasma est constitué d'atomes (molécules neutres), d'ions, d'électrons et de radicaux libres mais il est globalement neutre (Fig.22). Une force électrique se crée entre les particules chargées des plasmas entraînant un comportement collectif qui n'existe pas dans les gaz neutres et qui confère aux plasmas des propriétés uniques.

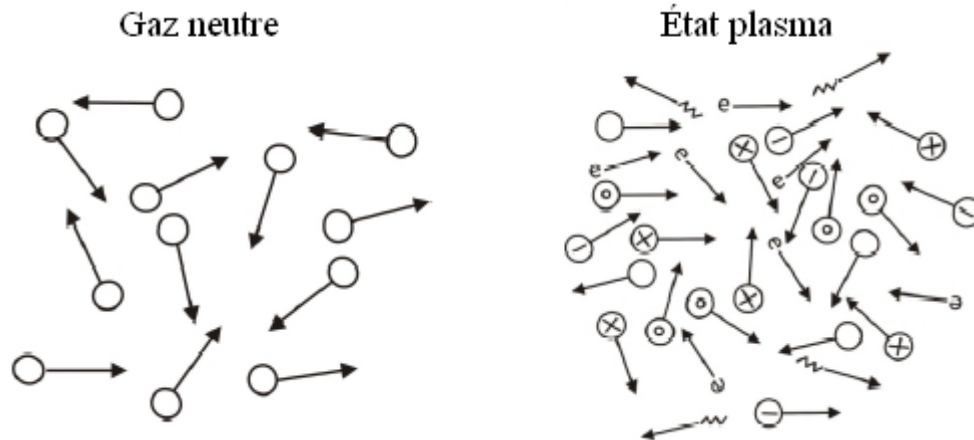


Figure 22. Schéma d'un gaz neutre et d'un plasma.

Il existe des plasmas chauds et des plasmas froids. Comme leur nom l'indique, les plasmas chauds se produisent à très haute température alors que dans les plasmas froids, seuls les électrons sont chauds car ils captent la majorité de l'énergie mais globalement, le gaz demeure près de la température ambiante. La méthode la plus simple de générer et maintenir un plasma froid est d'appliquer un champ électrique sur un gaz neutre. Les électrons étant chargés et très petits, ils captent rapidement la quasi-totalité de l'énergie du champ électrique. Ils atteignent ainsi une énergie cinétique suffisante pour effectuer des collisions inélastiques pouvant exciter, ioniser et dissocier les atomes et molécules neutres du gaz. Par ces collisions inélastiques, les électrons transmettent leur énergie à des particules lourdes qui, à leur tour, peuvent modifier le substrat. Les électrons sont donc les particules les plus énergétiques dans les plasmas; ils sont responsables de l'ionisation du gaz et de la création des radicaux libres utilisés pour la modification de surface. Normalement, les radicaux libres ne franchissent que quelques centaines d'Angströms dans le substrat, limitant ainsi les modifications à la surface du matériau. Cette technique permet de conférer les propriétés désirées à la surface d'un matériau sans affecter ses propriétés massiques.

Le réacteur à plasma froid utilisé au Laboratoire d'Ingénierie de Surface fonctionne à basse pression. Il est constitué d'une chambre à vide en verre, d'un système d'introduction des

gaz, d'un contrôleur de pression, d'un système de pompage (une pompe mécanique et une pompe turbo moléculaire), d'un générateur de radiofréquences (RF) et d'un porte-échantillon mobile (Fig.23). Ce réacteur a été décrit auparavant [97, 101].

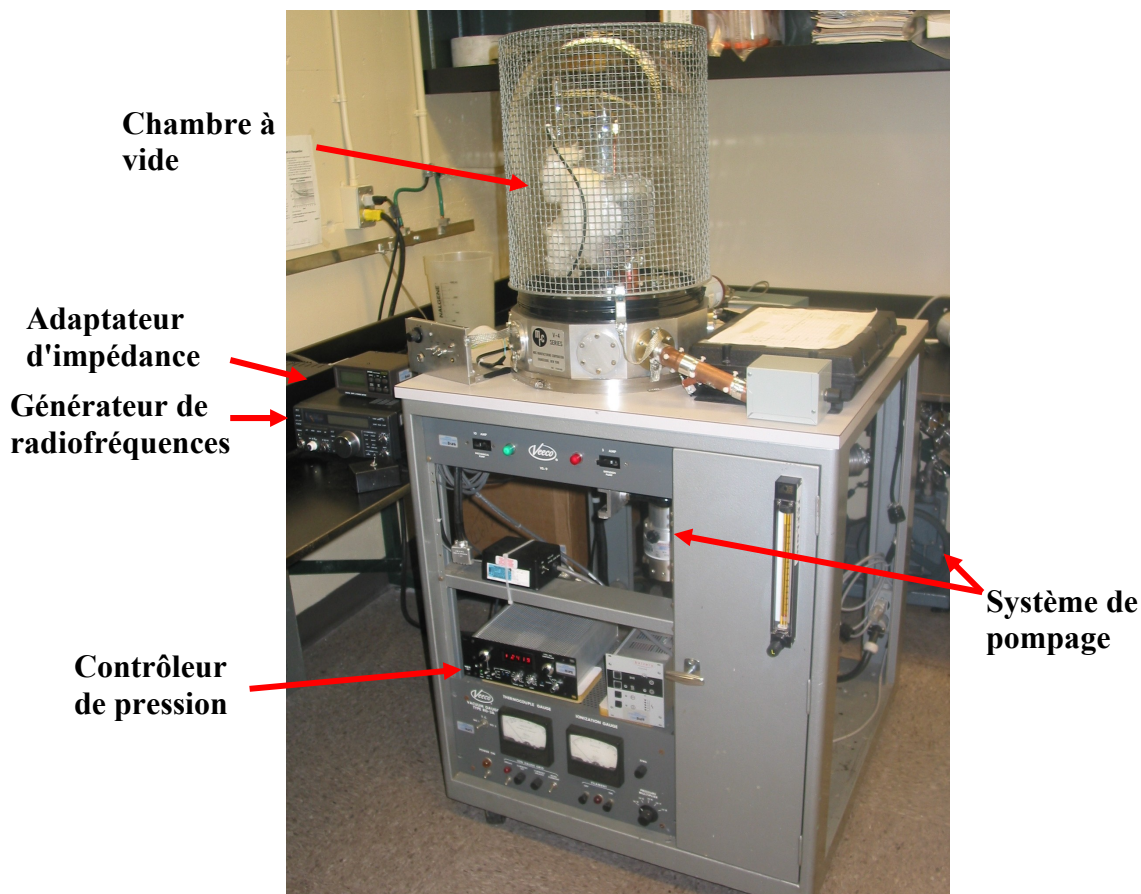


Figure 23. Réacteur radiofréquence à plasma froid du Laboratoire d'Ingénierie de Surface.

Dans le cadre de ce projet de doctorat, les traitements par plasma ont pour but d'incorporer des amines à la surface du PTFE pour permettre le greffage subséquent de bras d'ancrage et de la FN. Le gaz utilisé est l'ammoniac.

### 3. 3. Ancrage covalent de la FN

Une fois les amines greffées à la surface du PTFE, une foule de molécules, dont la FN, peuvent y être conjuguées. Toutefois, lorsqu'un lien covalent est créé entre une molécule et



une surface, la position de ce lien peut moduler la *conformation* de la molécule [125]. Étant donné que l'activité biologique de la FN est dépendante de sa *conformation*, un greffage pourrait moduler son activité. La FN est plus allongée dans sa *conformation* active et une liaison avec le collagène ou une *intégrine* provoque cet allongement [122]. Cependant, le mécanisme exact de ce changement de *conformation* demeure toujours inconnu. Puisqu'une augmentation du pH ou de la force ionique peut également induire un changement de *conformation* de la FN, il semble que sa structure tridimensionnelle repliée soit dépendante d'interactions ioniques intramoléculaires [121, 122]. La formation d'un ou plusieurs liens covalents aux bons endroits sur la molécule pourrait alors engendrer le déroulement de la protéine. Malheureusement, ces sites de liaisons stratégiques sont inconnus.

La liaison directe de la FN sur les amines à la surface du PTFE nécessite l'activation des acides carboxyliques de la protéine. Cependant, une fois activés les acides carboxyliques peuvent réagir aussi bien avec les amines primaires des autres molécules de FN qu'avec les amines à la surface du PTFE (Figure 24). De plus, les amines à la surface du PTFE ne sont peut-être pas très accessibles dû à l'encombrement stérique causé par la dimension de la FN d'une part, et la rugosité de la surface du PTFE d'autre part. Bref cette stratégie n'est pas très optimisée pour le greffage covalent de la FN en *conformation* active sur le PTFE.

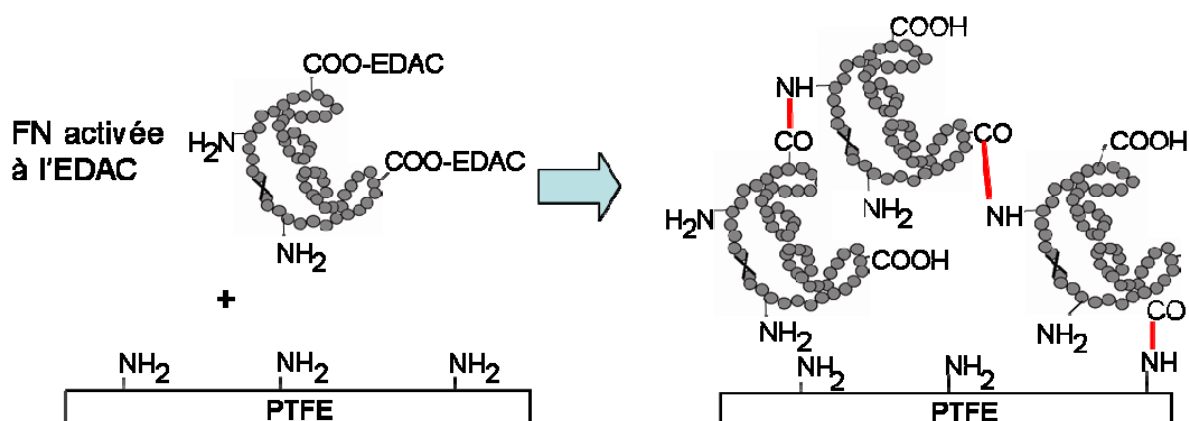


Figure 24. Schéma de greffage direct de la FN sur le PTFE aminé. Les acides carboxyliques activés peuvent réagir avec les amines libres sur les molécules de FN et celles à la surface du PTFE.

Afin de limiter les interactions entre la FN et le PTFE de même que l'encombrement stérique de la surface, des bras d'ancrage peuvent être utilisés. Les bras d'ancrage sont des molécules homos- ou hétérobifonctionnelles servant d'adaptateur entre deux molécules. L'efficacité de liaison de plusieurs bras d'ancrage sur le PTFE aminé a été évaluée au Laboratoire d'Ingénierie de Surface: les anhydrides glutariques et cis-aconitiques pour obtenir des fonctions acides carboxyliques, le bromoacétaldéhyde diéthylacétal pour des diéthylacétals, un précurseur des aldéhydes, des dérivés du sulfo-succinimidyle (sulfo-SMCC et sulfo-SMPB) pour des fonctions maléimides et le réactif de Traut (2-iminothiolane) pour des fonctions thiols (Tableau 2) [124]. Toutes ces molécules ont été greffées avec succès sur le PTFE traité par plasma d'ammoniac.

**Tableau 2.** Rendement de réaction des différents bras d'ancrage avec le PTFE aminé [124]

Fonctionnalité	Bras d'ancrage	Taux de réaction	Réagit avec:
Acide	Anhydride glutarique	96%	NH <sub>2</sub>
	Anhydride cis-aconitiques	76%	NH <sub>2</sub>
Aldéhyde	BADEA	57%	NH <sub>2</sub>
Succinimidyle	Sulfo-SMCC	100%	SH
	Sulfo-SMPB	100%	SH

Dans le cadre de ce projet de doctorat, nous avons sélectionné l'anhydride glutarique (GA) et le sulfo-succinimidyl-4-(*p*-maleimidophenyl)butyrate (SMPB) pour lier la FN sur le PTFE. Dans les deux cas, des rendements de réaction de près de 100% ont été calculés (Tableau 2)[124] et aucune activation n'est effectuée sur la FN ce qui prévient les liaisons covalentes entre les molécules de FN. Ces deux bras d'ancrage se lient d'une part aux amines sur la surface de PTFE mais exposent d'autre part des fonctionnalités différentes pour réagir avec la FN. Le GA a été sélectionné pour fournir une fonction acide carboxylique pouvant réagir avec les amines primaires alors que le SMPB fournit une fonction maléimide pouvant réagir avec les thiols de la FN (Figure 25). On ne contrôle pas exactement la position des liaisons sur la FN car la fonctionnalité qui réagit avec le bras d'ancrage est assurément présente à plusieurs endroits dans la protéine. Par contre, deux bras d'ancrage qui réagissent avec des fonctionnalités différentes ne peuvent se lier au

même endroit. La FN possède une amine terminale, une amine primaire sur chaque lysine et un groupement thiol par cystéine. Une molécule de FN contient environ 70 lysines et 60 cystéines par sous-unité. Toutefois, à l'exception de deux cystéines par sous-unité, elles sont toutes liées entre elles par des ponts disulfures et donc indisponibles [115]. Par conséquent, la liaison de la FN par le GA offre beaucoup plus de possibilités concernant la position du lien (environ 140 sites possibles) que sa liaison par le SMPB qui est limité à 4 sites possibles. Les deux bras d'ancrage ont tout de même été utilisés afin d'augmenter les probabilités de greffer la FN en *conformation* active sur le PTFE.

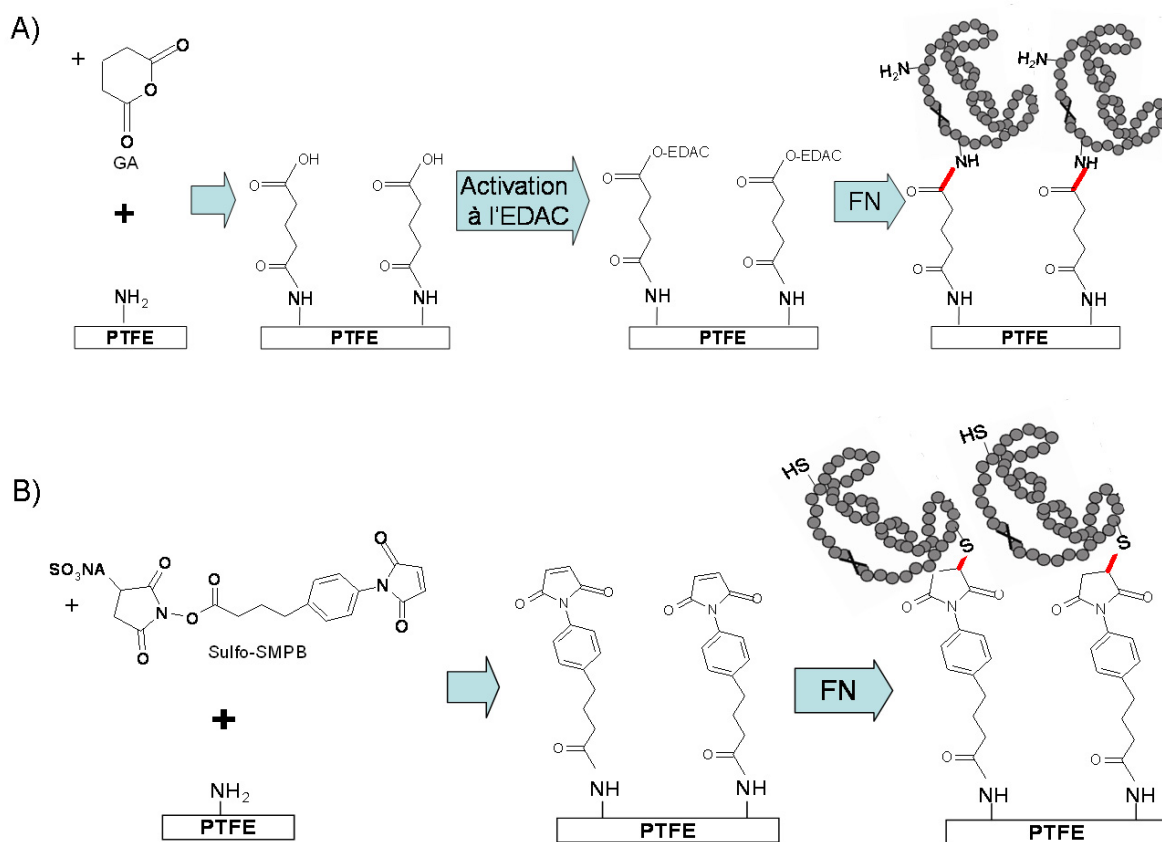


Figure 25. Schéma de greffage de la FN sur le PTFE aminé via le GA et le sulfo-SMPB. (A) Le GA se lie à une amine de la surface et présente un acide carboxylique, qui une fois activé, réagit avec une amine libre de la FN. (B) Le sulfo-SMPB se lie à une amine de la surface et présente une fonction maléimide pouvant réagir avec un thiol libre de la FN.

## II. Contrôle de l'hyperplasie intimale

### 1. Hypothèses

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, l'hyperplasie intimale est caractérisée par un épaississement de l'intima dû à la prolifération des cellules musculaires lisses en réponse à divers stimuli produits suite à une blessure vasculaire telle que l'implantation d'une prothèse artérielle. Tout d'abord, la différence de *compliance* entre l'artère naturelle et la prothèse engendre des turbulences dans le flux sanguin, l'activation des plaquettes et la libération du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF). Ensuite, la blessure vasculaire engendre la sécrétion de MMP-9, la métalloprotéinase de matrice qui libère le SCF présent sur les membranes des cellules musculaires lisses [58], et l'augmentation de l'expression du récepteur c-Kit à leur surface. Le SCF peut alors agir de façon autocrine sur les cellules musculaires lisses et même favoriser le recrutement de cellules progénitrices et leur différenciation en cellules musculaires [57, 58]. Puisqu'il est impossible d'empêcher la libération de toutes ces molécules qui stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses, contrer leurs effets par l'utilisation d'inhibiteurs semble une bonne alternative. L'inhibition pharmacologique des cellules musculaires lisses vasculaires, le temps de permettre l'endothélialisation des prothèses, pourrait grandement améliorer le taux de succès à long terme des prothèses vasculaires de PTFE expansé.

### 2. Revue de la littérature

Plusieurs travaux ont été faits dans le but de remédier à l'hyperplasie intimale se développant aux anastomoses des prothèses synthétiques dans les mois qui suivent l'implantation. Puisque la différence de *compliance* entre les artères naturelles et les prothèses est une cause importante d'hyperplasie, certains chercheurs concentrent leurs efforts dans le développement de nouveaux matériaux aux propriétés plus similaires aux artères. Par exemple, plusieurs polyuréthanes ont été développés et leurs propriétés ont été évaluées *in vitro* et *in vivo* [126, 127]. Par contre, comme nous l'avons vu au chapitre I, peu de matériaux résistent à la biodégradation et, exception faite de sa faible *compliance*, le

PTFE a des propriétés très intéressantes pour la fabrication de prothèses. Afin de bénéficier de la grande résistance chimique et mécanique du PTFE, d'autres groupes tentent plutôt de contrôler l'hyperplasie intinale qui se développe suite à l'implantation de ces prothèses. Les stratégies employées sont diverses mais toutes visent à inhiber la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses. L'administration systémique ou locale d'immunosuppresseurs a été étudiée chez le rat en 2001 et s'est avérée totalement inefficace pour contrer l'hyperplasie intinale en plus d'avoir des effets toxiques [128]. Les injections intraveineuses de facteurs de croissance des hépatocytes recombinants (rHGF) étaient très prometteuses puisque le rHGF favorise la ré-endothélialisation *in vitro* et que les cellules endothéliales inhibent le muscle lisse. Cependant, *in vivo* les résultats se sont avérés mitigés; une étude chez le lapin ayant conclu que le rHGF inhibe l'hyperplasie intinale [129] alors qu'une autre chez le rat a permis de déterminer que le rHGF a une demi-vie trop courte au niveau de la lésion et n'a donc aucun effet [130]. Afin d'augmenter la demi-vie du HGF au site de la lésion, certaines équipes ont tenté d'injecter une protéine de fusion du HGF contenant une séquence de liaison au collagène (CBD-HGF). Cette protéine injectée chez le rat suite à une blessure artérielle par angioplastie a augmenté significativement la ré-endothélialisation mais également la formation de néointima [131]. L'irradiation postopératoire au laser des régions d'anastomoses a beaucoup été étudiée, tant chez l'homme que sur les modèles animaux, et si certaines études concluent à une diminution de l'hyperplasie intinale, aucune ne prouvent une amélioration de la *perméabilité* à long terme des prothèses [132-136]. Des prothèses et des films de polymère contenant des médicaments antiprolifératifs ont aussi été conçus et testés sur des modèles animaux. Les médicaments les plus utilisés sont la rapamycine (sirolimus) et le paclitaxel (taxol) puisque leur utilisation a été approuvée pour les *stents* à libération contrôlée de médicament. La rapamycine ou sirolimus est un immunosuppresseur qui entraîne la différenciation des cellules musculaires lisses et donc une diminution de leur prolifération et de leur production de matrice en inhibant le sentier cellulaire mTOR [52, 137]. Ce médicament semble réduire l'hyperplasie intinale mais aucune étude ne démontre une amélioration du rendement des prothèses de PTFE [137, 138]. De plus, les inhibiteurs de mTOR réduisent également la prolifération des cellules endothéliales, ce qui retarde ou même empêche l'endothélialisation des prothèses [139]. Le paclitaxel est un stabilisateur

des microtubules qui empêche leur désassemblage et par le fait même la division cellulaire. Il peut également causer l'apoptose des cellules en se liant à la protéine Bcl-2 ou en séquestrant la tubuline. Dû à son mécanisme d'action, il affecte particulièrement les cellules qui prolifèrent rapidement mais il n'est pas spécifique à un type cellulaire. Plusieurs inconvénients limitent les applications cliniques du paclitaxel; il a été démontré qu'il engendre un retard d'endothélialisation dans les *stents* forçant l'administration d'anticoagulants [140], qu'il est susceptible à la solvololyse [141] et que son caractère très hydrophobe complique sa libération *in vivo* ainsi que les essais *in vitro* [142]. Bien que l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses par le biais d'un médicament semble une avenue prometteuse, aucune molécule ne s'est avérée efficace *in vivo* pour prévenir le développement d'hyperplasie intimale à l'anastomose distale des prothèses artérielles synthétiques.

### 2. 1. Inhibiteur du muscle lisse

*In vivo*, la prolifération des cellules musculaires lisses est régulée par des promoteurs et des inhibiteurs de croissance. Les promoteurs incluent le PDGF, le FGF, l'IL-1, l'IFN- $\gamma$  et le SCF alors que l'héparane sulfate, le NO et le TGF- $\beta$  sont des inhibiteurs. Lors de l'implantation d'une prothèse vasculaire, les cellules musculaires lisses prolifèrent car il y a un déséquilibre entre la stimulation et l'inhibition de la croissance. Comme nous l'avons vu au chapitre I, les prothèses de PTFE augmentent les *forces de cisaillement*, ce qui active les plaquettes et entraîne la libération de PDGF. Les inhibiteurs physiologiques de la croissance des cellules musculaires lisses mentionnés ci-haut sont des molécules à très court rayon d'action qui, à part l'héparane sulfate, sont dégradées rapidement. Afin de contrebalancer l'effet du PDGF, il faudrait augmenter leur production localement, ce qui n'est pas chose simple. Toutefois, il existe beaucoup d'autres molécules ayant un effet inhibiteur connu sur les cellules musculaires lisses et qui pourraient potentiellement être utilisées pour contrôler l'hyperplasie intimale (Tableau 3).

<b>Tableau 3. Comparaison de quelques inhibiteurs de prolifération des cellules musculaires lisses selon leur mode d'action.</b>		
<b>Modes d'action</b>	<b>Inhibiteur</b>	<b>Caractéristiques</b>
Inhibiteur des tyrosines kinases	Mésylate d'imatinib (Gleevec®)	Spécifique aux récepteurs PDGF, c-Kit et à Bcr/Abl [143, 144]
	PTK787	Inhibe les récepteurs du VEGF, c-Kit, PDGF et c-FMS [145]
Augmentation de la production d'AMPc	Nipradilol (bloqueur $\beta$ -adrénergique)	-Antihypertenseurs [146] -Inhibent l'agrégation plaquettaire [146] -L'augmentation de l'AMPc dans les ECs inhibe la prolifération induite par le VEGF [147, 148]
	Forskolin	
	PGE <sub>2</sub>	
	Salbutamol	
Inhibiteur de la dégradation de l'AMPc par la PDE	Cilostazol (inhibiteur PDE III)	
	Rolipram (inhibiteur PDE IV)	
	Théophylline (inhibiteur non sélectif de la PDE)	
Inhibiteur de la HMG-CoA réductase	Lovastatin	-Inhibent la liaison des protéines nucléaires aux facteurs de transcription kappaB et AP-1 -Antihypertenseurs
	Simvastatin	
	Atorvastatin	
Inhibiteur du facteur de transcription kappa B	I-kappaB E5510	-Anti-inflammatoires -Agissent aussi sur les ECs [149] -Inhibent la synthèse du cholestérol [150]
Inhibiteur de la sEH	1-cyclohexyl-3-dodecyl-urea (CDU)	-Antihypertenseur -Anti-inflammatoire [151, 152]
Inhibiteur des microtubules	Paclitaxel	-Inhibe le désassemblage et donc la réorganisation des microtubules -Bloque la division cellulaire -Non spécifique aux SMCs
Inconnu	Sodium spirulan (Na-SP)	-Inhibent la prolifération des SMCs et des ECs
	Calcium spirulan (Ca-SP)	-Le Na-SP dépolymérisé conserve son activité sur les SMCs mais n'inhibe plus les ECs [153, 154]

† AMPc = Adénosine monophosphate cyclique

†† ECs = cellules endothéliales.

‡ SMCs = cellules musculaires lisses.

‡‡ PDE = Phosphodiesterase

§ HMG-CoA réductase = 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase

§§ sEH = époxyde hydrolase soluble

### 3. Stratégie sélectionnée

Dans le cadre de ce projet, l'inhibiteur du muscle lisse choisi ne doit pas interférer avec la croissance des cellules endothéliales car l'inhibition de l'hyperplasie intinale doit se faire conjointement avec l'endothélialisation de la prothèse. Nous avons choisi le mésylate d'imatinib (Gleevec®) car il est spécifique à trois tyrosines kinases peu susceptibles d'inhiber les cellules endothéliales et il interfère directement avec l'action du PDGF et du SCF sur les cellules musculaires en bloquant l'activation de leurs récepteurs. En effet, parmi les cibles du mésylate d'imatinib, le PDGF-R et Bcr/Abl ne sont pas exprimées par les cellules endothéliales vasculaires matures alors que l'expression du récepteur c-Kit est controversée [59, 155]. De plus, le Gleevec® est sur le marché depuis 2001 et par le fait même, les données concernant son absorption, sa biodistribution, sa biodisponibilité, son élimination de même que ses effets secondaires et les interactions médicamenteuses possibles sont disponibles.

#### 3. 1. Mésylate d'imatinib (Gleevec®)

Le mésylate d'imatinib est un inhibiteur pharmacologique de la tyrosine kinase Bcr-Abl et des récepteurs à tyrosine kinase c-Kit (récepteur du SCF) et PDGF-R. Ce médicament a été commercialisé par Novartis Pharma sous le nom de Gleevec®. En Amérique du nord il est utilisé depuis 2001 pour le traitement des leucémies myéloïdes chroniques (CML) et des tumeurs du stroma gastro-intestinal (GIST). Les leucémies myéloïdes chroniques sont associées à la présence du chromosome Philadelphie dans lequel une translocation a fusionné une partie du gène *c-abl*, qui encode la tyrosine kinase Abl, avec le gène *bcr* de fonction inconnue. L'oncoprotéine résultante, la tyrosine kinase Bcr-Abl, est active constitutivement et engendre plusieurs signaux intracellulaires pouvant ainsi transformer les cellules normales en cellules cancéreuses [11]. De même, le gène *c-kit* est un *proto-oncogène*, c'est-à-dire qu'une mutation peut en faire un oncogène et favoriser la transformation des cellules. Les cellules des tumeurs du stroma gastro-intestinal, ont une mutation du gène *c-kit* et elles expriment un récepteur constitutivement actif [156]. Le mésylate d'imatinib, en inhibant ces oncoprotéines, bloque la prolifération et induit l'apoptose de ces deux types de cellules cancéreuses. Actuellement le mésylate d'imatinib



est le traitement le plus efficace contre les CML et les GIST, toutefois, comme tout médicament il entraîne certains effets secondaires. Les plus communs sont les nausées, l'œdème, les crampes musculaires, les diarrhées, les vomissements, les hémorragies, les démangeaisons de la peau, les maux de tête, la fatigue, les douleurs articulaires, les indigestions et le souffle court. La liste peut paraître longue mais selon Novartis (compagnie qui synthétise et distribue le Gleevec®), seulement 4 à 8% des patients doivent arrêter le traitement à cause des effets secondaires.

Le mésylate d'imatinib est intéressant pour remédier à l'hyperplasie intimale grâce à son effet inhibiteur sur les récepteurs du PDGF et du SCF. Pour agir, les facteurs de croissance doivent entrer en contact avec leur récepteur en surface des cellules. Les cellules musculaires lisses expriment le PDGF-R c'est pourquoi le PDGF stimule normalement leur prolifération. En présence de mésylate d'imatinib, le PDGF sécrété par les plaquettes ne peut que partiellement (ou pas du tout) stimuler son récepteur et n'induit donc pas la prolifération des cellules musculaires lisses. De plus, les cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse sont recrutées au niveau des lésions vasculaires par un phénomène de homing médié par le SCF et son récepteur c-Kit [56]. Ces cellules se différencient ensuite en cellules musculaires et contribuent au développement d'hyperplasie intimale. Enfin, les cellules musculaires lisses expriment très faiblement le récepteur c-Kit dans les vaisseaux sains mais lors d'une blessure vasculaire, son expression est augmentée et permet une stimulation autocrine. En bloquant le récepteur c-Kit, le mésylate d'imatinib devrait inhiber la boucle de stimulation autocrine et le recrutement de cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse, limitant ainsi le développement d'hyperplasie intimale. Heureusement, les cellules endothéliales vasculaires matures n'expriment pas le PDGF-R ni la tyrosine kinase Bcr/Abl et leur expression du récepteur c-Kit est incertaine [59, 155]. Il est donc fort probable que le mésylate d'imatinib n'interfère pas avec leur croissance.

Enfin, les doses requises pour la prévention de l'hyperplasie intimale devraient être inférieures à celles pour le traitement du cancer ce qui diminuera les effets secondaires indésirables. De plus, un traitement localisé dans les prothèses plutôt que systémique est envisageable. Éventuellement, un système à libération contrôlée du mésylate d'imatinib dans les prothèses artérielles pourrait être développé. C'est dans cette optique que nous

avons évalué, *in vitro*, le potentiel du mésylate d'imatinib à inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses sans interférer avec le processus d'endothélialisation.

Chapitre III - Article 1: Influence de l'Ancrage Covalent de  
la Fibronectine sur son Activité Biologique

---

---

**Covalent Grafting of Fibronectin onto Plasma-Treated PTFE: Influence  
of the Conjugation Strategy on Fibronectin Biological Activity**

---

---

Karine Vallières 1,2, Éric Petitclerc 1,3, Gaétan Laroche \* 1,2

1 Unité de Biotechnologie et de Bioingénierie, Centre de recherche du CHUQ, Hôpital  
Saint-François d'Assise, 10 rue de l'Espinay, Qué., Canada G1L 3L5

2 Laboratoire d'ingénierie de surface, Département de Génie des mines, de la métallurgie  
et des matériaux, Faculté des sciences et génie

3 Département de Médecine, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada,  
G1K 7P4

Published in Macromolecular Bioscience

2007

\* Corresponding author

Email : [gaetan.laroche@gmn.ulaval.ca](mailto:gaetan.laroche@gmn.ulaval.ca)

Fax : (418) 656-5343

## 1. Avant-propos

Comme nous l'avons vu au chapitre I, les prothèses de PTFE de petit et moyen diamètres ont un faible taux de *perméabilité* à long terme dû, en partie, au manque d'*hémocompatibilité* du matériau. Au chapitre II nous avons vu que le seul tissu hémocompatible est l'*endothélium* et que la fibronectine est une glycoprotéine d'adhésion susceptible d'améliorer l'adhésion des cellules endothéliales sur le PTFE. Cependant, avec le flux sanguin, la simple adsorption de la FN sur le PTFE a peu de chance d'être stable *in vivo*. De plus, l'activité biologique de cette molécule est hautement dépendante de sa *conformation*. Le premier objectif de cette thèse a donc été de greffer la FN, en *conformation* active, de façon covalente sur le PTFE. Dans cet article, deux techniques de greffage de la FN sur le PTFE sont présentées ainsi que l'évaluation de l'activité biologique de la FN greffée.

La contribution de chacun des auteurs a été décrite dans la section "Avant-propos" à la page IV.

## 2. Résumé

Les recouvrements de surface de biomatériaux sont souvent utilisés pour améliorer la biocompatibilité des implants. Dans cette étude, nous avons greffé la fibronectine de façon covalente sur du PTFE aminé par plasma d'ammoniac via deux bras d'ancrage soit l'anhydride glutarique (GA) et le sulfosuccinimidyl-4-(p-maleimidophényl)butyrate (SMPB). En comparaison avec le PTFE non modifié, l'adhésion cellulaire est nettement augmentée sur les deux surfaces de PTFE greffées FN. Toutefois, la FN greffée via le GA favorise deux fois plus l'adhésion cellulaire que la FN greffée via le SMPB. Des ELISA réalisés avec un anticorps anti-FN polyclonal ont démontré que la même quantité de FN était greffée via les deux bras d'ancrage. Par contre, les ELISA effectués avec un anticorps monoclonal contre le site d'adhésion cellulaire de la FN (RGD) ont clairement démontré une plus grande disponibilité du site RGD lorsque la FN est greffée via le GA que via le

SMPB. Ces résultats démontrent l'influence de la stratégie de conjugaison sur la *conformation* adoptée par les protéines et, par conséquent, sur leur activité biologique.

### 3. Abstract

Surface coating of synthetic materials is often considered to improve biomedical devices biocompatibility. In this study, we covalently bound fibronectin (FN) onto ammonia plasma-treated PTFE via two crosslinkers, namely glutaric anhydride (GA) and sulfo-succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrate (SMPB). With respect to clean PTFE, cell adhesion increased markedly on both FN grafted surfaces, although it was twice higher on PTFE-GA-FN than on PTFE-SMPB-FN. ELISA experiments performed with a polyclonal antibody revealed that the amount of FN is identical on both surfaces while monoclonal antibody specific to the RGD binding site clearly demonstrated a greater availability when FN is surface grafted through GA. These results provide evidence of a variation in protein conformation correlated with the surface conjugation strategy.

### 4. Introduction

Small diameter PTFE vascular prostheses currently implanted in humans have a low patency rate. It has been well established that the outcome of biomaterials after implantation depends on tissue-material interactions. For blood contacting materials, these interactions begin with the adsorption of plasmatic proteins which occurs within seconds after implantation [47, 157]. This phenomenon, called the Vroman effect, depends on material properties such as hydrophobicity, roughness, charge, stiffness, as well as plasma composition and shear stress [49, 50]. The resulting adsorbed layer influences all subsequent blood-material interactions by its composition, surface density and protein conformation [158, 159]. After protein adsorption, several surface interactions can occur with platelets, leucocytes, erythrocytes, coagulation factors, fibrinolysis factors and complement factors [158]. These events, which often lead to thrombosis and failure of the implanted devices, are mainly catalyzed by the protein layer. Consequently, adverse blood-material interactions could be minimized through control of initial protein adsorption [157].

In healthy arteries, the endothelium prevents all non-specific protein adsorption as well as activation of platelets and coagulation cascade, therefore avoiding thrombus formation. Thus, the presence of an endothelium inside synthetic prostheses could greatly improve their patency. However, endothelial cells do not grow on PTFE since they require an extracellular matrix to survive. Therefore, two different approaches have been investigated to control protein adsorption on biomaterials. The first approach aims to inhibit all protein adsorption with anti-adhesive molecules such as polyethylene glycol, phosphorylcholine, chitosan or dextran [80, 82, 84, 86, 123]. Unfortunately, until now, a complete inhibition of protein adsorption has never been obtained. The second approach is to promote the binding of selected molecules chosen for their biological activity. These molecules can, for example, promote cell adhesion (fibronectin, laminin, vitronectin, RGDS peptide) [67, 68, 70, 94, 95, 160], migration and proliferation (VEGF, FGF) [161-163] or inhibit coagulation (heparin, heparan sulfate) [90, 92, 96]. Biomolecules are frequently used to modify the surface of biomaterials with the objective of improving their biocompatibility. However, such improvements often require that these molecules remain in their natural active state. Several studies have shown that adsorption of these biomolecules onto biomaterials can result in a conformational change and a loss of their biological activity [160, 164-166]. The conformation of adsorbed molecules depends on the nature of the biomolecule and the substratum, hydrophobicity, pH, ionic strength and temperature [72]. Furthermore, the stability of such surfaces inside the body isn't guaranteed, especially for blood contacting materials such as synthetic vascular prostheses. Some groups have covalently bound biomolecules onto surfaces in order to prevent the blood flow from washing away biomolecules [123, 167-169]. However, very little is known about the effect of covalent grafting on molecules bioactivity.

In this study, we investigated the influence of the conjugation strategy on FN bioactivity. FN was covalently grafted onto ammonia plasma-treated PTFE using two different conjugation schemes. FN is a matrix protein known to bind many other matrix components and to induce cell adhesion [106]. This protein has long been used to modify surfaces in order to improve biocompatibility and allow endothelialization but its activity highly depends on its conformation [160]. Consequently, we compared two conjugation strategies of FN onto PTFE in regards to the bioactivity of modified surfaces. Radiofrequency glow

discharge (RFGD) ammonia plasma treatments were first performed to introduce amino groups onto PTFE surfaces. Two heterobifunctional crosslinkers were used to form a covalent link between amino groups on PTFE and FN molecules: glutaric anhydride (GA) which binds FN by its primary amines and Sulfo-succinimidyl 4-[p-maleimidophenyl] butyrate (sulfo-SMPB) which binds FN by its sulfhydryl groups. Radiolabeling assays confirmed the covalent grafting of FN onto these crosslinkers. Then, the effect of conjugation strategies on FN bioactivity was investigated through adhesion assays with bovine aortic endothelial cells (BAECs). We demonstrated that the conjugation strategy influences the conformation and consequently, the biological activity of the grafted FN. Our results showed that FN bioactivity is better preserved when grafted via GA than SMPB.

## **5. Experimental Part**

### **5. 1. Materials**

Poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) films were purchased from Goodfellow (Berwin, PA, USA). Methanol and acetone were from Laboratoire MAT (Montreal, QC, Canada). Dulbecco phosphate buffered saline (PBS), Tween 20, culture medium (DMEM high glucose), 5-bromosalicylaldehyde, 1 Ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC), MES buffer, glutaric anhydride and bovine serum albumin (BSA) were obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Human fibronectin (FN) was purchased from Roche Diagnostics (Laval, QC, Canada) and resazurine from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). The Bio-Dot apparatus was purchased from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON, Canada) while Microcon centrifugal filter units were from Millipore (Nepean, On, Canada). Costar 96-well tissue culture plates were purchased from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada). The monoclonal antibody anti-FN cell binding peptide (MAB-1934) was purchased from CHEMICON International Inc. (Temecula, CA, USA), the polyclonal antibody anti-FN (F3648) from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA) and the horseradish peroxidase linked secondary antibodies (an anti-mouse IgG from sheep and an anti-rabbit Ig from donkey) were from Amersham/GE Healthcare Bio-Sciences (Piscataway, NJ, USA ). Calf serum was purchased from Wisent (St-Bruno, QC,



Canada) and Antibiotics were obtained from Life Technologies (St. Paul, MN, USA). Finally, bovine aortic endothelial cells (BAECs) were purchased from Cambrex Bio Science (Walkersville, MD, USA).

## 5. 2. Methods

### 5. 2. 1. Preparation of PTFE Surfaces

Poly(tetrafluoroethylene) film of 250  $\mu\text{m}$  of thickness was cut in sample of 1.6 x 4.5cm and washed successively with deionised water, acetone and methanol for 10 minutes in an ultrasonic bath and air-dried between each step. After cleaning, PTFE films were kept under vacuum until use. XPS analyses confirmed the efficiency of the cleaning procedure as the survey spectra revealed the presence of only carbon and fluorine in the appropriate stoichiometric ratio.

### 5. 2. 2. PTFE Treatment by Radiofrequency Glow Discharge (RFGD) Ammonia Plasma

The RFGD ammonia plasma treatment and system apparatus were described elsewhere [97, 101]. In this study, PTFE films were rolled without any superimposition and slid in the sample support, a cylinder of 6mm internal diameter. The sample support was then put in the radiofrequency plasma reactor. The treatments were performed under 300mTorr of high purity ammonia with 15W of RF power at 13,56MHz for 60s. These parameters were previously optimized to graft a sufficient amount of amine while minimizing surface damage [101]. Due to the cylindrical configuration, only the internal side of the films was treated.

### 5. 2. 3. Chemical Derivatization

Since both crosslinkers first react with surface amino groups, amine ( $\text{NH}_2$ ) surface concentration was quantified through vapour-phase chemical derivatizations with 5-bromosalicylaldehyde followed by XPS analysis as described previously [101]. Taking into account the nine newly bonded atoms upon reaction of 5-bromosalicylaldehyde with the

surface, the amino group relative surface concentration can be determined through the following equation:

$$\% \text{NH}_2 = (\% \text{Br} / (100 - 9 \times \% \text{Br})) \times 100 \quad (1)$$

These investigations demonstrated that all plasma-treated PTFE films had an amine relative surface concentration ranging between 3 to 5% as determined by chemical derivatization.

#### 5. 2. 4. *Glutaric Anhydride (GA) Grafting*

In a glove box purged with dry nitrogen, ammonia plasma treated PTFE films were submerged in acetone and 0.1g/mL of GA was added in 3 times at 0, 20 and 40 minutes. After an overnight reaction under mechanical agitation, the films were successively washed 3 times with acetone and 5 times with deionised water and then air-dried. Films were kept under vacuum until FN grafting. Prior to further reaction, GA-grafted films, which provide carboxylic acid functionalities on the surface, were activated with a solution containing approximately 3mg/mL of 1-Ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC) in MES buffer (0.1M, pH 4.75). Two subsequent additions of 3mg/mL of EDAC were made every 10 minutes to minimize the effect of the water-induced hydrolysis of the activator on grafting efficiency. The reaction was performed at room temperature and under stirring. After 30 minutes of reaction, these films were washed with MES buffer and used immediately.

#### 5. 2. 5. *Sulfo-succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrate (SMPB) Grafting*

Ammonia plasma treated films were submerged in PBS<sub>7.4</sub> buffer containing 2 to 3mg/mL of sulfo-SMPB for 2 hours under stirring and sheltered from light to prevent light-induced degradation of the crosslinker. After grafting, films were washed once with PBS<sub>7.4</sub>, air-dried and kept under vacuum still sheltered from light until FN grafting.

### 5. 2. 6. FN Grafting

GA and SMPB modified PTFE samples were reacted with FN 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in  $\text{PBS}_{7.4}$  solution for 3 hours under stirring at room temperature. After the reaction, samples were washed 5 times with  $\text{PBS}_{7.4}$ .

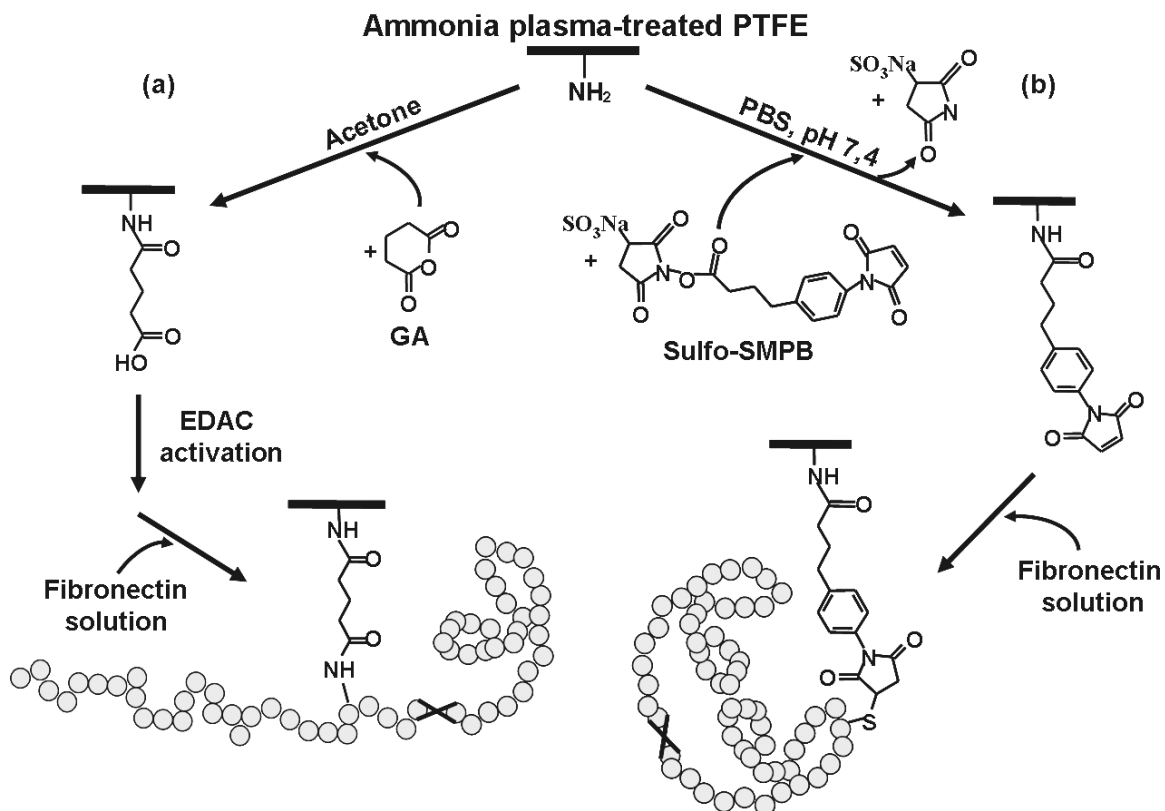


Figure 26. Schematic representation of the conjugation strategies used to covalently bind FN onto PTFE. In both cases, the first step was an ammonia plasma treatment to introduce amino groups on PTFE. Two crosslinkers were then used to form a link between PTFE and FN: (a) GA. (b) Sulfo-SMPB.

### 5. 2. 7. XPS Analyses

XPS analyses were performed on samples of 3 X 8mm after each surface modification. A Physical Electronics (Eden Prairie, MN, USA) PHI 5600-ci spectrometer was used to record the spectra. A monochromatic aluminium X-ray source (1486.6eV) at 300W was

used along with a charge neutralizer to record survey spectra while a monochromatic magnesium X-ray source (1253,6eV) was used to record high resolution spectra. Detection was performed with a take-off angle of 45°.

#### *5. 2. 8. FN Radiolabeling*

Grafted and adsorbed FN concentration was assessed through  $^{125}\text{I}$  radiolabeling assays.  $\text{Na}^{125}\text{I}$  was first activated in an IODO-GEN pre-coated tube and then made to react with FN in another tube to avoid contact between the protein and IODO-GEN reagent. The reaction was stopped with a scavenging buffer saturated in tyrosine. Unreacted iodine was filtered in a microcon YM-100 and protein was rinsed twice with PBS. Iodinated protein had a specific activity of about  $2.5 \times 10^{11} \mu\text{Ci/mol}$  and was kept at 4°C in lead container for up to 30 days. Iodinated FN was grafted onto GA and SMPB modified PTFE surfaces following the aforementioned protocol. Two types of washes were used in separate experiments in order to discriminate between adsorption and covalent conjugation of FN; a mild wash consisting in 5 immersions in  $\text{PBS}_{7.4}$  with vortex agitation and a strong wash consisting in 5 immersions of 2 minutes in  $\text{PBS}_{7.4}$  with 0.1% of Tween 20 in an ultrasonic bath. Surfaces were then counted in an automatic gamma counter wizard 1470 (PerkinElmer, Woodbridge, On, CA).

#### *5. 2. 9. Cell Culture*

Bovine aortic endothelial cells (BAECs) were cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) with 10% calf serum, 100U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g/mL}$  streptomycin to be used at passages 3-4.

#### *5. 2. 10. Cell Adhesion Assay on Modified PTFE*

To evaluate the biological activity of bound FN, cell adhesion tests were performed with bovine aortic endothelial cells (BAECs). With the aim of exposing only the treated face of the various samples, clean PTFE, PTFE-GA and PTFE-SMPB specimens were put into a Bio-Dot apparatus so the bottom of each well was sealed by PTFE samples. Each rectangular sample covered 10 wells; FN was grafted or adsorbed in all wells except for 3

negative controls on each sample. After 3 hours, FN wells were washed 5 times with PBS<sub>7.4</sub>. All wells were then blocked with PBS<sub>7.4</sub> containing 1% of bovine serum albumin (BSA) for 1 hour at 37°C to prevent any non-specific cell/surface interaction and rinsed once with PBS<sub>7.4</sub>. BAECs in culture were harvested with trypsin, counted and diluted in DMEM containing 0.1% BSA, 100U/mL penicillin, and 100µg/mL streptomycin but without serum. 20 000 cells/well were seeded and the plate was incubated for 10 minutes at 37°C. Surfaces were then washed twice with DMEM and incubated 24 hours with resazurin. Resazurin is a non-fluorescent product that living cells oxidize into resorufin, a fluorescent product. This technique does not only allow evaluating the number of cells but also monitoring their viability. The fluorescent solution in each well of the Bio-Dot apparatus was transferred in a 96-well tissue culture plate to read fluorescence at wavelengths of 485nm/590nm (excitation/emission) using a Bio Tek FL600 reader (Bio Tek, VT, USA). A standard curve of fluorescence as a function of number of BAECs was performed in 96-well tissue culture plate for each experiment.

#### *5. 2. 11. ELISA*

Again, with the aim of exposing only the treated face of PTFE, samples of clean PTFE (2), PTFE-GA and PTFE-SMPB were put into a Bio-Dot apparatus so the bottom of each well was sealed by PTFE samples. FN was grafted or adsorbed onto all samples except for one clean PTFE specimen which acted as a control surface. After 3 hours, FN wells were washed 5 times with PBS<sub>7.4</sub>. All wells were then blocked with PBS<sub>7.4</sub> containing 1% of BSA for 1 hour at 37°C and rinsed once with PBS<sub>7.4</sub>. ELISAs were performed with two different primary antibodies, a mouse monoclonal antibody anti-FN cell binding peptide (MAB-1934) and a rabbit polyclonal antibody anti-FN (F3648). Surfaces were incubated overnight at 4°C with a primary antibody and rinsed three times with PBS<sub>7.4</sub>. Wells were then filled with the appropriate horseradish peroxidase linked secondary antibody (either an anti-mouse IgG HRP linked whole antibody from sheep or an anti-rabbit Ig HRP linked whole antibody from donkey) for 2 hours at 37°C and rinsed three times with ELISA washing buffer (tris-base buffer with Tween 20). Finally, surfaces were incubated 15 minutes with amplex red, a substrate of peroxidase, which was transformed in resorufin. A

fixed volume of liquid from each wells were transferred in a 96-well tissue culture plate for fluorescence reading at 485nm/590nm in a Bio Tek FL600 reader (Bio Tek, VT, USA).

### 5. 2. 12. Statistical Analyses

Statistical analyses of the differences between groups were performed using the analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test or T-test where appropriate. P values of less than 0.05 were considered significant and all data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE).

## 6. Results and Discussion

### 6. 1. FN Grafting

Both FN surface conjugation strategies are depicted in Figure 26. As can be seen, the first step in both approaches consisted in performing an ammonia plasma treatment to introduce amino groups on PTFE. Either GA or SMPB were then reacted with the aminated surface to further act as linking arms between PTFE and FN. On one hand, GA reacts with amino groups thereby exposing a carboxylic acid functionality which was then activated with EDAC therefore enabling nucleophilic addition between any primary amine and the activated ester. On the other hand, Sulfo-SMPB reacts with amino groups thereby exposing a maleimidyl functionality which can further react with FN through any sulfhydryl groups contained in cysteine amino acids. Because these two conjugation strategies targeted different linking sites on FN, it was expected that protein conformation, orientation and even bioactivity could be different while comparing both situations. The success of each step of modification was ascertained by XPS analyses (Fig. 27). As can be seen, the surface of clean PTFE contains only fluorine and carbon in appropriate ratio of 2:1. After plasma treatment, nitrogen and oxygen peaks appear and the fluorine relative surface concentration decreases because the plasma took out fluorine to introduce nitrogen-containing species [97]. The grafting of GA and SMPB was confirmed by the increase in oxygen content as these two molecules provide 3 new oxygen atoms on the polymer surface upon surface

conjugation. Furthermore, the yield of these reactions was previously calculated in our laboratory and was demonstrated to be close to 100% [124].

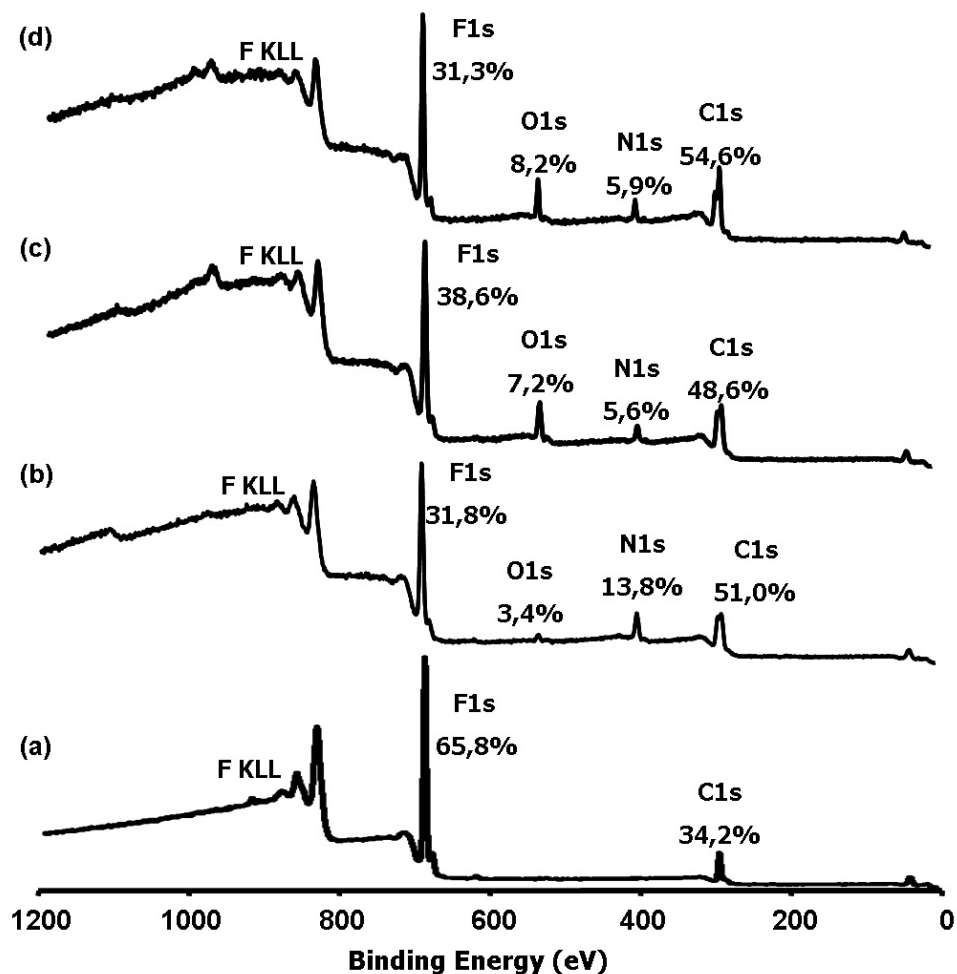


Figure 27. XPS analyses after each PTFE surface modification step. Survey spectra of (a) clean PTFE, (b) plasma-treated PTFE, (c) PTFE-GA, (d) PTFE-SMPB.

## 6. 2. Radiolabeling Assay

Radiolabeling assays were performed to quantify the FN on all modified surfaces investigated and determine whether or not FN was effectively covalently bound on GA and SMPB modified surfaces. First, these assays were performed using mild wash procedures with PBS under vortex agitation (Fig. 28). In these conditions, a similar amount of FN was

measured on clean PTFE and PTFE-GA surfaces (about 100ng/cm<sup>2</sup>) while slightly more protein was detected (approx. 150ng/cm<sup>2</sup>) on PTFE-SMPB surfaces. Subsequent assays were performed using a strong wash protocol with 0.1% of Tween 20 in an ultrasonic bath (Fig. 28) and clearly demonstrated an almost complete FN desorption on clean PTFE while GA and SMPB treated surfaces retained 77±9ng/cm<sup>2</sup> and 79±11ng/cm<sup>2</sup> of the protein, respectively. These latter results evidenced the covalent conjugation of FN on both PTFE-GA and PTFE-SMPB surfaces. In addition, these two surfaces exhibited very similar affinity towards FN grafting. These data also demonstrate that surfaces with FN grafted via SMPB exhibited a slightly higher affinity to adsorb additional protein molecules. This could be explained by the fact that the density of adsorbed molecules depend on the nature, hydrophobicity, charge and roughness of the substratum [170]. These properties may be modified by the crosslinkers as well as by the conformation adopted by the covalently linked FN.

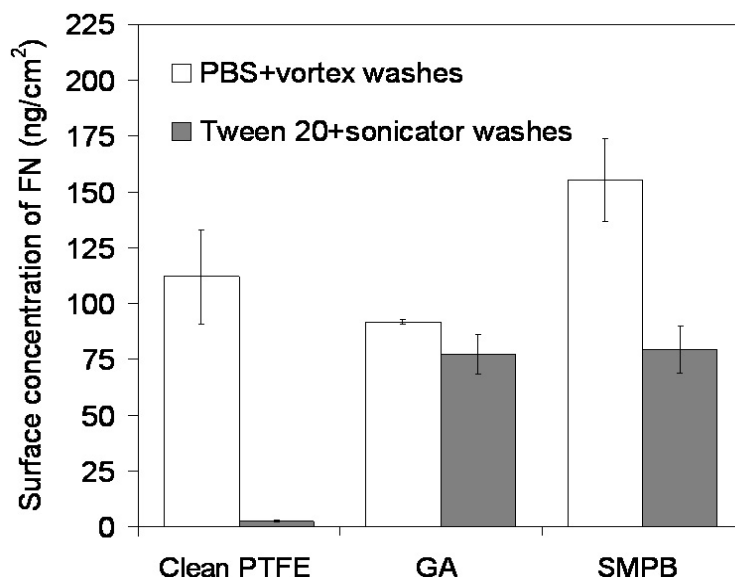


Figure 28. Radiolabeling assays of FN grafted or adsorbed on different surfaces. Two types of washes were used to distinguish between adsorbed and grafted FN; a mild wash in PBS with vortex (white columns) and a strong wash with 0.1% of Tween 20 in an ultrasonic bath (gray columns).



It should be pointed out here that the strong washing procedures were not appropriate for further experiments because they probably denature the protein. For this reason, cell adhesion experiments were performed on surfaces conjugated with FN gently washed with PBS. In addition, vortex agitation was not possible due to the dimension of the Bio Dot apparatus. In these conditions, the adsorbed amount of FN may be different to the aforementioned surface concentrations. Consequently, one should keep in mind that the next experiments were performed on surfaces consisting of mixtures of bound and adsorbed FN molecules and that the conformation of adsorbed FN is driven by the one of the underlying covalently bound FN. In this context, the conformation of surface-grafted FN is of prime importance for further interactions with cells.

### **6.3. Cell Adhesion**

Because FN is a binding protein implicated in cell/matrix adhesion, we evaluated the biological activity of the various surfaces using BAECs adhesion assays (Fig. 29). The first striking observation is that a clean PTFE film is not appropriate to support cell adhesion. This result is further confirmed by many other publications and is explained by the non sticking behaviour of PTFE [94, 95, 102]. In order to ascertain that the observed cell adhesion behaviour pertain to the presence of FN on surfaces and not to any previous surface modification step, cell adhesion measurements were performed on PTFE after each stage required for protein conjugation. These intermediate surfaces (e.g. PTFE, PTFE-GA and PTFE-SMPB surfaces) do not support cell adhesion, therefore showing the absence of specific interactions between BAECs and the aforementioned surfaces.

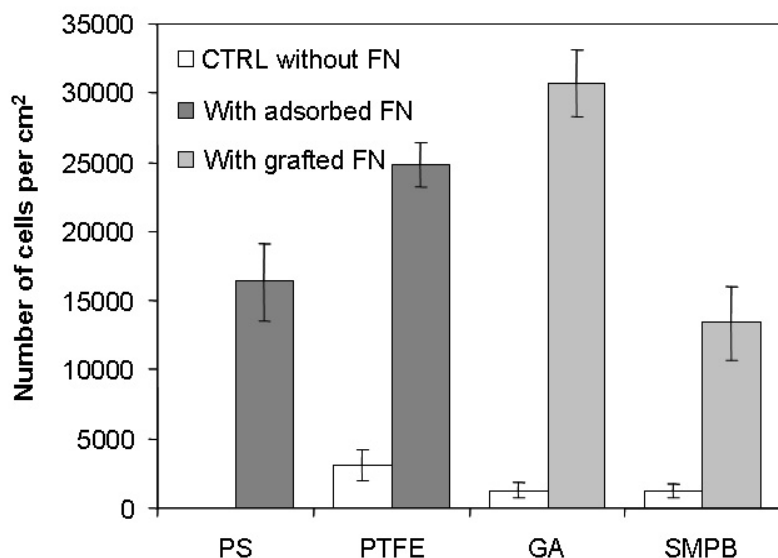


Figure 29. BAECs adhesion onto clean and modified PTFE surfaces with and without FN. On surfaces without FN, analysis of variance (ANOVA) showed no difference between groups. For surfaces with FN, all differences were significant ( $p < 0.01$ ) except between SMPB-treated PTFE and polystyrene (PS) wells where no significant difference was observed. These results are representative of three different experiments.

The great potential of FN to promote specific cell adhesion is also illustrated in Figure 29. As can be seen, adsorbing FN on polystyrene promotes the adhesion mechanism between BAECs and the surface. Such behaviour has already been observed by others [119] and clearly demonstrates the presence of site specific interactions between the protein and cells. In addition, the level of this cell/protein interaction has been shown to depend on the conformation of the adsorbed protein. Since the substrate properties influence the conformation of adsorbed FN [72, 160, 164, 165], the substrate could manage the biological activity of FN. Our results are in accordance with the literature since adsorbed FN enhances more or less cell adhesion depending on the substrate. Indeed, FN adsorption on polystyrene increases cell adhesion to about 16 000 cells/cm<sup>2</sup> whereas its adsorption on clean PTFE resulted in a little higher adhesion of 25 000 cell/cm<sup>2</sup>. In this situation, the surface covalent conjugation of FN may greatly influence its potential to promote cell adhesion. This statement is further supported by BAECs adhesion data also presented in Figure 29. FN conjugated onto GA derivatized PTFE surfaces (which means that the

protein is covalently bound to the surface through the amino groups of its lysyl moieties) leads to an important increase of BAECs adhesion (up to about 30 000 cells/cm<sup>2</sup>), which is even better than the one observed on the positive control (FN adsorbed on polystyrene, around 16 000 cells/cm<sup>2</sup>). However, surface conjugation of FN through its cysteinylic functionalities on SMPB derivatized surfaces lead to only about half the amount of cells compared with the GA-FN samples (around 13 000 cells/cm<sup>2</sup>). These results demonstrated that FN, adsorbed or grafted, can really enhance in vitro endothelial cell adhesion on PTFE. Furthermore, we showed that the conjugation strategy influences the bioactivity of grafted FN. In fact, FN seems to be more pro-adhesive when it is grafted via GA than SMPB.

At this point, several reasons can be put forward to explain the difference in cell adhesion capabilities of GA-FN surfaces with respect to SMPB-FN samples. The first explanation would be that more FN binds to GA derivatized PTFE than on the SMPB counterpart in the protein conjugation conditions used to perform cell adhesion assays. To verify this hypothesis, ELISAs were performed with a polyclonal antibody anti-FN.

#### 6. 4. ELISA

A polyclonal antibody anti-FN was used to monitor the amount of FN adsorbed and/or grafted on PTFE. For these experiments, surfaces were washed exactly the same way than for the adhesion tests. The results were normalized with respect to PTFE/FN to take into account any eventual variation in fluorescence between experiments. As can be seen in Figure 30(a), the detected fluorescence is very low on PTFE control surfaces which confirmed the antibody specificity to FN. All other investigated surfaces lead to an almost identical fluorescence signals, therefore pointing to an equivalent amount of FN on both PTFE-GA and PTFE-SMPB surfaces. These data therefore unambiguously demonstrated that the FN surface concentration can not be considered to explain variations between the two FN grafted surfaces. In these circumstances, the possibility that both crosslinkers induced different conformations to the FN molecules was also investigated. This hypothesis was also examined through ELISA by probing the availability of the FN cell binding site with the protein bound to PTFE either with GA or SMPB. In this case, a monoclonal antibody anti-FN cell binding peptide was used to evaluate the availability of the cell binding site on surface conjugated FN. The results (normalized with respect to PTFE/FN)

for grafted and/or adsorbed FN on different surfaces are summarized in Figure 30(a). This figure shows that GA-FN surfaces exhibit more available cell binding sites than PTFE/FN and SMPB-FN surfaces. This observation is further confirmed by the ratio of monoclonal over polyclonal fluorescence signal (Figure 30(b)) because this ratio probe the availability of the cell binding peptide with respect to the total amount of FN on the surface. This provided evidence that the FN cell binding site is more available when the protein is grafted via GA than SMPB.

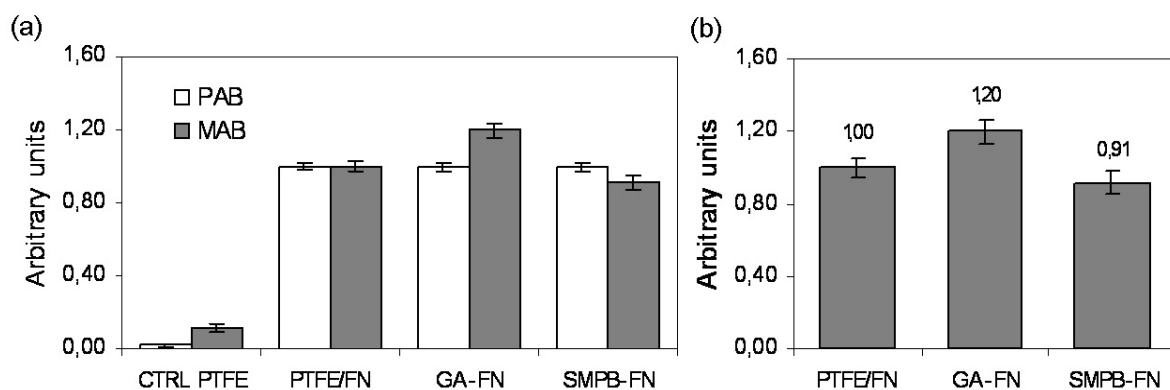


Figure 30. FN ELISA results normalized with respect to PTFE/FN. (a) FN was either adsorbed on clean PTFE or grafted on GA and SMPB modified PTFE. Two antibodies were used, one polyclonal anti-FN and one monoclonal anti-FN cell binding peptide. Analysis of variance (ANOVA) on polyclonal antibody results showed no significant difference between groups. For the monoclonal antibody experiments, Dunnett tests showed differences between all groups except between SMPB-FN and PTFE/FN ( $p < 0.01$ ). The ratio of monoclonal to polyclonal signals is presented in (b) since it represents the availability rate of the cell binding site on immobilized FN. These results come from three different experiments ( $n=12$ ).

Furthermore, a strong correlation was noticed between the availability of the cell binding peptide and BAECs adhesion results (Fig. 31). The cell binding peptide availability on different surfaces follow the pattern GA-FN > PTFE/FN > SMPB-FN which also corresponds to cellular adhesion level. However, the difference of cellular adhesion between GA-FN and SMPB-FN surfaces is not directly correlated to the relative availability of the cell binding peptide. This discrepancy could be due to the fact that FN

possesses other cell binding sites that were not targeted by the monoclonal antibody used in this study.

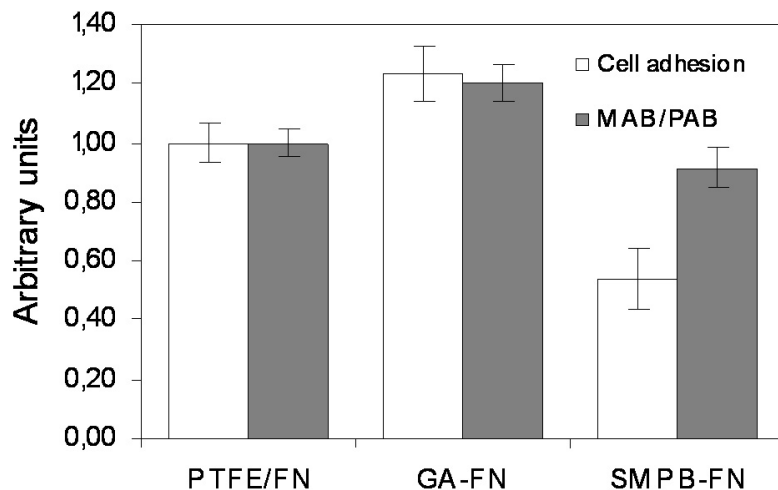


Figure 31. Correlation between cell adhesion and the availability rate of the FN cell binding peptide normalized with respect to PTFE/FN.

## 7. Conclusions

In this study, the influence of the surface conjugation strategy on the biological activity of FN grafted to PTFE was investigated. FN molecules were covalently grafted onto plasma-treated PTFE using two different crosslinkers (GA and SMPB) and adhesion assays were performed to evaluate their bioactivity. FN biological activity was demonstrated to be highly dependent on the crosslinker used to immobilize FN onto PTFE. Cell adhesion was more than 2 fold higher on FN grafted via GA than via SMPB. Our data clearly demonstrated that this behaviour was due to a difference in conformation and/or orientation of the protein on these crosslinkers which could lead to the exposure or hiding of the cell binding site. Since FN is known to promote adhesion mainly via its cell binding site (including the RGD sequence), the availability of this domain was investigated by ELISA. As expected, greater availability of the cell binding site was detected on GA-FN than on SMPB-FN although the difference was less marked than for cell adhesion. Our results showed that not only adsorbed molecules but also bound molecules can undergo conformational changes resulting in a modification of their biological activity.

Consequently, the choice of a conjugation strategy to immobilize biomolecules is a crucial step in the development of proactive biomaterials.

## **8. Acknowledgements**

This study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (G.L.).Éric Petitclerc is a scholar from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). Karine Vallières acknowledges a Canada graduate scholarship from NSERC. The authors would like to express their gratitude to Pascale Chevallier and Jean Lagueux for technical assistance.

Chapitre IV- Article 2: Étude de la Conformation de la FN  
par AFM

---

---

**AFM Imaging of Immobilized Fibronectin: Does the Surface Conjugation Scheme Affect the Protein Orientation/Conformation?**

---

---

Karine Vallières<sup>1,2</sup>, Pascale Chevallier<sup>1</sup>, Christian Sarra-Bournet<sup>1,2</sup>, Stéphane Turgeon<sup>1</sup>,  
Gaétan Laroche<sup>1,2</sup> \*

<sup>1</sup> Unité de Biotechnologie et de Bioingénierie, Centre de recherche du CHUQ, Hôpital  
Saint-François d'Assise, 10 rue de l'Espinay, Qué., Canada G1L 3L5

<sup>2</sup> Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Département de Génie des mines, de la métallurgie  
et des matériaux, Faculté des sciences et génie, Université Laval, Québec, Canada, G1K  
7P4

Published in Langmuir

August 2007

\* Corresponding author. Phone: 1 418 656-2131 ext 7983. Fax: 1 418 656-5343. E-Mail:  
gaetan.laroche@gmn.ulaval.ca.



## 1. Avant-propos

Dans le premier article, il a été démontré que la stratégie de conjugaison influence l'activité biologique de la FN. Puisque la quantité de FN greffée par chacune des méthodes a été déterminée équivalente, nous avons posé l'hypothèse que la différence d'activité biologique est causée par une différence de conformation de la FN. Cet article a été consacré à la démonstration de cette hypothèse.

La contribution de chacun des auteurs a été décrite dans la section "Avant-propos" à la page IV.

## 2. Résumé

L'ancrage covalent de biomolécules à la surface des biomatériaux peut potentiellement améliorer leur biocompatibilité. Toutefois, ces molécules doivent être ancrées en *conformation* active pour jouer leur rôle biologique. Cette étude a pour but de vérifier l'influence du mode de conjugaison sur l'orientation et l'activité biologique de la fibronectine (FN) greffée sur du silica via deux bras d'ancrage, soit l'anhydride glutarique (GA) et le sulfosuccinimidyl-4-(p-maleimidophényl)butyrate (SMPB). La FN greffée a été dosée par radiomarquage à l'iode 125 et sa bioactivité a été évaluée par des essais d'adhésion cellulaire. Ces essais ont démontré que l'adhésion des cellules à la FN est plus grande lorsqu'elle est greffée via le GA que via le SMPB. Dans ce contexte, la *conformation* de la FN sur les deux bras d'ancrage a été étudiée par AFM et angle de contact. En premier lieu, l'angle de contact de l'eau à la surface des silica-GA-FN et silica-SMPB-FN était statistiquement différent. Cela démontre une différence d'hydrophilicité et donc une influence de la stratégie de conjugaison sur l'organisation de la protéine. De plus, il a été démontré par AFM que la topographie et la rugosité de ces surfaces sont différentes. L'analyse des courbes de distribution de la hauteur et du diamètre de la FN a confirmé ces observations puisque la taille de la FN était significativement plus grande sur le GA que sur le SMPB. Cette étude confirme que la stratégie d'immobilisation de biomolécules influence leur *conformation* et donc leur activité.

### 3. Abstract

Covalent grafting of biomolecules could potentially improve the biocompatibility of materials. However, these molecules have to be grafted in an active conformation to play their biological roles. The present work aims at verifying if the surface conjugation scheme of fibronectin (FN) affects the protein orientation/conformation and activity. FN was grafted onto plasma-treated fused silica using two different crosslinkers, glutaric anhydride (GA) or sulfosuccinimidyl 4-(*p*-maleimidophenyl)butyrate (SMPB). Fused silica was chosen as a model surface material because it presents a roughness well below the dimensions of FN, therefore allowing AFM analyses with appropriate depth resolution. Cell adhesion assays were performed to evaluate the bioactivity of grafted FN. Cell adhesion was found to be higher on GA-FN than on SMPB-FN. Since FN-radiolabeling assays allowed us to rule out a surface concentration effect (approximately 80ng/cm<sup>2</sup> of FN on both crosslinkers), it was hypothesized that FN adopted a more active conformation when grafted via GA. In this context, the FN conformation on both crosslinkers was investigated through AFM and contact angle analyses. Before FN grafting, GA and SMPB modified surfaces had a similar water contact angle, topography and roughness. However, water contact angles of GA-FN and SMPB-FN surfaces clearly show differences in surface hydrophilicity, therefore indicating a dependence of protein organization toward the conjugation strategy. Furthermore, AFM results demonstrated that surface topography and roughness of both FN-conjugated surfaces were significantly different. Distribution analysis of FN height and diameter confirmed this observation as the protein dimensions were significantly larger on GA than SMPB. This study confirmed that the covalent immobilization scheme of biomolecules influences their conformation and, hence, their activity. Consequently, selecting the appropriate conjugation strategy is of paramount importance in retaining molecule bioactivity.

### 4. Introduction

Immobilization of biomolecules onto or within synthetic materials is a commonly used method to develop biosensing devices [171, 172], drug delivery systems [173], and proactive biomaterials [68, 123, 174-178]. However, to ensure the success of such devices,

the bioactivity of these molecules has to be preserved. Fibronectin (FN) is one of the most studied biomolecules because of its implication in numerous physiologic processes like wound healing, cell adhesion, migration, spreading, differentiation and survival [105, 106, 114, 177]. Indeed, FN is a large dimeric glycoprotein present in two forms in the body; a soluble globular conformation in the blood and an insoluble fibrillar structure in the extracellular matrix. This glycoprotein induces cell adhesion mainly through a well-known cell binding site containing the RGD amino acid sequence [160, 179]. This site is specifically recognized by integrin receptors present in cell membranes. Nevertheless, some protein conformations can hide or denature the cell binding site so the biological activity of FN is highly dependent on its conformation. Several studies have investigated physical adsorption of FN onto different substratum which is an easy and inexpensive way to immobilize molecules [70, 74, 165, 180]. It was demonstrated that the conformation of adsorbed FN depends on pH, ionic strength, electrical charge, hydrophobicity, roughness and chemical composition of the substratum [72, 160, 164, 165]. Consequently, immobilizing FN molecules while leaving the cell binding site exposed and available remains a challenge. Covalent immobilization is more complex to perform than physical adsorption but it presents the great advantage of producing controllable and stable surfaces. However, little is known about the influence of covalent immobilization on molecule bioactivity. In a previous work, our group demonstrated that the conjugation strategy used to bind FN onto PTFE surfaces influences its biological activity [181]. Two crosslinkers, namely glutaric anhydride (GA) and sulfosuccinimidyl 4-(*p*-maleimidophenyl)butyrate (SMPB), were used to link FN molecules onto plasma-treated PTFE samples via the protein primary amines or sulfhydryl groups respectively. Endothelial cell adhesion was significantly higher when FN was grafted onto PTFE via GA than via SMPB. Furthermore, it was shown that this effect was not due to a difference in FN concentration. We hypothesized that the conformation of FN was modulated by the conjugation strategy but this was not further investigated since the PTFE surface is too rough to allow FN imaging.

In this study, FN was immobilized on fused silica via the two conjugation scheme previously developed in our laboratory [181]. Fused silica was chosen as model material because like PTFE, it can be modified by plasma to introduce amino groups but contrary to PTFE, it presents a roughness well below the dimensions of the protein of interest. The

amount of grafted FN via both crosslinkers was quantified by radiolabeling assays while cell adhesion assays were performed to evaluate its bioactivity. Contact angle and AFM measurements were performed in ambient conditions to assess the influence of the conjugation scheme on the structure of FN when covalently grafted onto fused silica. All of these experiments provide insight toward the effect of the conjugation strategy on FN concentration, activity, and conformation. Such information is of prime importance to develop proactive biomaterials.

## 5. Experimental Section

### 5. 1. Materials

Fused silica slides (1 in. x 1 in.) were purchased from Technical Glass Products (Painesville Twp., OH). Human fibronectin (FN) was supplied by Roche Applied Sciences (Laval, QC, Canada). Most of the chemicals such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33 wt %), concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, chlorobenzaldehyde, glutaric anhydride, 1-ethyl-3-(3-dimethylamino)propyl)carbodiimide (EDC), MES buffer, dulbecco phosphate buffered saline (DPBS) and culture medium (DMEM) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Sulfo-succinimidyl-4-(*p*-maleimidophenyl)butyrate (S-SMPB) and costar 96-well tissues culture plates were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada) whereas resazurin was from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Iodine-125 was purchased from Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC, Canada), IODO-GEN pre-coated iodination tubes from Pierce (Rockford, IL) and Microcon centrifugal filter units from Millipore (Nepean, ON, Canada). All chemical products were used as received. The Bio-Dot apparatus was purchased from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON, Canada). Calf serum was purchased from Wisent (St-Bruno, QC, Canada) and bovine aortic endothelial cells (BAECs) were obtained from Cambrex Bio Science (Walkersville, MD).

1st step : amination of the silica surface

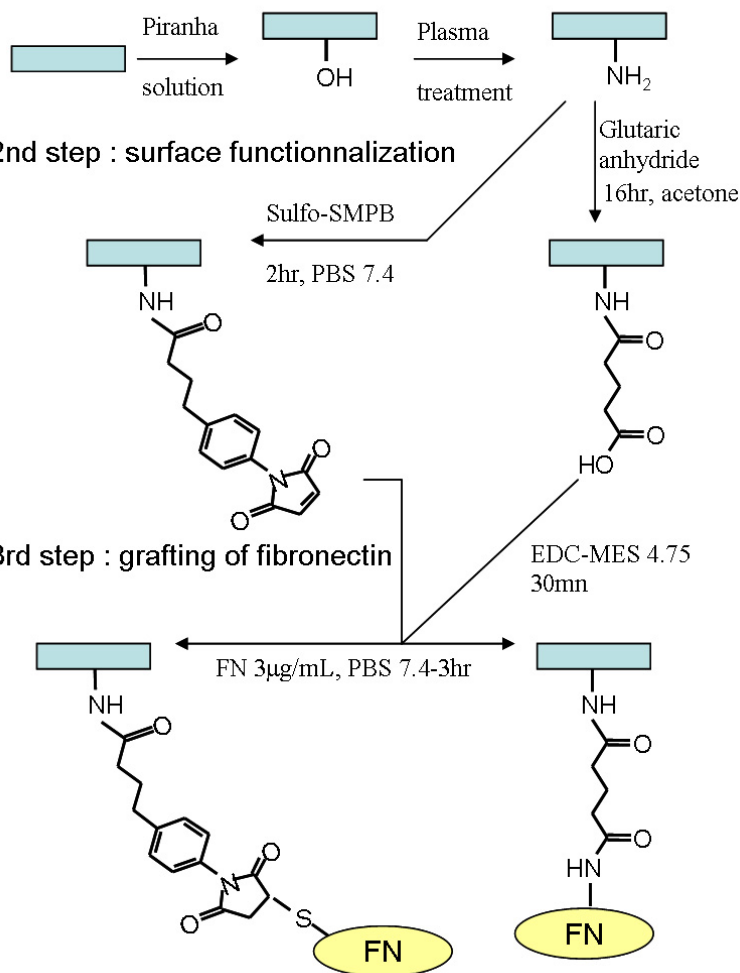


Figure 32. Schematic representation of both strategies used to covalently bind the FN on silica surfaces.

## 5. 2. Surface Modifications (Fig. 32)

### 5. 2. 1. Piranha Activation

The fused silica materials were cut into 10 mm x 10 mm samples and then successively cleaned in acetone, deionized water and isopropanol in an ultrasonic bath. Samples were then activated in piranha solution (mixture of 3 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33 wt %) and 7 mL of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) for 15 min in an ultrasonic bath and washed three times for 10 min in water and once in acetone for 2 min, also in an ultrasonic bath. Afterward, the activated

surfaces were dried under vacuum for 30 min. The piranha activation allows the surface concentration of hydroxyl groups on glass to be increased.[182] This preplasma procedure was demonstrated to maximize the surface amination (data not shown), probably because hydroxyl groups are easily replaced by amino moieties in the plasma environment (see plasma procedure below)

### *5. 2. 2. Plasma Treatments*

Hydroxylated surfaces were plasma treated in a commercial Microwave (MW) plasma reactor from Plasmionique Inc. (Varenes, Qc, Canada) in order to functionalize the surface with amino groups. The treatment was performed in a downstream MW plasma reactor with high purity hydrogen and nitrogen gas (50%, 50%) at 300W, 2.45 GHz, and 500 mTorr for 600 s.

### *5. 2. 3. Crosslinker Grafting*

The amino functionalities of the plasma-treated silica were then used to graft crosslinkers on the sample immediately after surface modification. In agreement with the objectives of the study, two different crosslinkers were used for surface immobilization of fibronectin. First, GA was used to introduce carboxylic groups on the surface of the plasma-treated fused silica samples. Once activated, these functionalities react with amino groups of fibronectin to form stable amide bonds. Second, Sulfo-SMPB was used to provide maleimide functionalities suitable for chemical reaction with thiolated moieties such as those contained in the free cystein residues of fibronectin. Surface conjugation of crosslinkers was performed as described elsewhere.[124] Briefly, the aminated surfaces were made to react with GA in acetone or sulfo-SMPB in PBS<sub>7.4</sub> for 16 and 3 h, respectively. Before FN grafting, carboxylic groups obtained from the reaction with GA were activated with EDC for 30 min in MES buffer (0,1 M, pH 4.75).

#### 5. 2. 4. FN Grafting

Finally, GA- and SMPB-grafted surfaces were made to react with 3  $\mu\text{g/mL}$  of human fibronectin in  $\text{PBS}_{7.4}$  for 3 h under stirring. Thereafter, surfaces were washed thoroughly with deionized water prior to analysis by XPS, contact angle and AFM.

### 5. 3. Experiments

#### 5. 3. 1. XPS Analyses

Each step of silica surface modification was characterized by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) analyses, using a PHI 5600-ci spectrometer (Physical Electronics, Chanhassen, MN). A standard aluminum X-ray source (1486.6 eV) at 300 W with a charge neutralizer was used to record the survey spectra while high-resolution spectra were obtained using the standard magnesium X-Ray source (1253.6eV) at 300W without charge neutralization. The detection was performed at  $45^\circ$  with respect to the surface normal.

Amine surface concentration was quantified by a vapor-phase chemical derivatization technique developed in our laboratory using chlorobenzaldehyde [101]. Briefly, the derivatization reactions were performed in vapor phase at  $40^\circ\text{C}$  for 2 h in a sealed glass tube in which a 1-cm-thick bed of soda-lime glass beads was used to separate the reagent and the reactive surfaces. The surfaces were then degassed overnight under vacuum and analyzed by XPS.

#### 5. 3. 2. FN Radiolabeling

Grafted and adsorbed FN concentration was assessed by  $^{125}\text{I}$  radiolabeling assays.  $\text{Na}^{125}\text{I}$  was first activated in an IODO-GEN pre-coated tube and then made to react with FN in another tube to avoid contact between the protein and IODO-GEN reagent. The reaction was stopped with a scavenging buffer saturated in tyrosine. Unreacted iodine was filtered in a microcon YM-100 and the protein was rinsed twice with  $\text{PBS}_{7.4}$ . Iodinated protein had a specific activity of about  $2.5 \times 10^{11} \mu\text{Ci/mol}$  and was kept at  $4^\circ\text{C}$  in a lead container for up to 30 days. Iodinated FN was grafted onto GA- and SMPB-modified silica surfaces

following the protocol of FN grafting described previously. The radioactivity of the surfaces was then counted in an automatic gamma counter wizard 1470 (Perkin-Elmer, Woodbridge, On, Canada).

### *5. 3. 3. Cell Adhesion*

To evaluate the biological activity of bound FN, adhesion assays were performed with bovine aortic endothelial cells (BAECs). With the aim of exposing only the treated face of silica, 6 samples of silica-piranha, 6 silica-GA, and 6 silica-SMPB were put into a Bio-Dot apparatus so the bottom of each well was sealed by silica samples. FN was grafted (onto silica-GA and silica-SMPB) or adsorbed (onto silica-piranha) onto 3 samples of each group, whereas 3 others were used as negative controls. After 3 h, FN wells were washed 5 times with PBS<sub>7.4</sub>. All wells were then blocked with PBS<sub>7.4</sub> 1% BSA for 1 h at 37 °C and rinsed once with PBS<sub>7.4</sub>. BAECs in culture were harvested with trypsin, counted and diluted in DMEM without serum containing 0.1% BSA, 100 U/mL of penicillin, and 100µg/mL of streptomycin. A total of 20 000 cells per well were seeded, and the plate was incubated for 10 min at 37 °C. Surfaces were then washed twice with DMEM and incubated for 24 h with resazurin. Resazurin is a nonfluorescent chemical that living cells oxidize into fluorescent resorufin. This technique not only allows the number of cells to be evaluated but also their viability. The fluorescent solution in each well of the Bio-Dot apparatus was transferred into a 96-well tissue culture plate to read fluorescence at 485 nm/590 nm (excitation/emission) using a Bio Tek FL600 reader (Bio Tek, VT). A standard curve of fluorescence as a function of number of BAECs was constructed in 96-well tissue culture plate for each experiment.

### *5. 3. 4. Contact Angle*

Static contact angle measurements were performed on the samples using a VCA 2500 XE system (AST, Billerica, MA). Drops of deionized water (1 µl) were deposited on surfaces. At least three drops per sample and three samples per modification step were analyzed.



### 5. 3. 5. *AFM Imaging*

Tapping mode Atomic Force Microscopy (AFM) was performed in ambient conditions with a Dimension<sup>TM</sup> 3100 Atomic Force Microscope (Digital Instruments, Santa-Barbara, CA) using etched silicon tips (OTESPA<sup>TM</sup>, tip radius of curvature <10 nm, aspect ratio  $\approx$  1.6/1). Surface topography was evaluated for areas of 700 X 700 nm using the Nanoscope program. Surface roughness was estimated by the parameter  $R_{\text{rms}}$  which is the root-mean-square average of height deviation taken from the mean data plane.

### 5. 3. 6. *AFM Image Analysis*

AFM images of FN grafted surfaces were further analyzed for diameter and height of FN moieties by using the profile feature in WSxM 4.0 Develop 7.71 Image Browser software. Since the proteins observed with the AFM were mostly round in the *X-Y* plane, 2D profiles in the *X-Z* plane were drawn on each feature on the 700 X 700 nm images as a diameter line passing through the center. The diameter was evaluated by measuring the distance between the two extremities of the line that was delimiting the feature whereas the height was measured as the *z*-value observed in the center of the circle delimited by the diameter (Figure 33). For each experimental condition (GA-FN, SMPB-FN and adsorbed FN), data were obtained from three different AFM images taken from three different treated surfaces. The number of moieties evaluated for statistical analysis was 602 for SMPB-FN, 435 for GA-FN, and 447 for adsorbed FN.

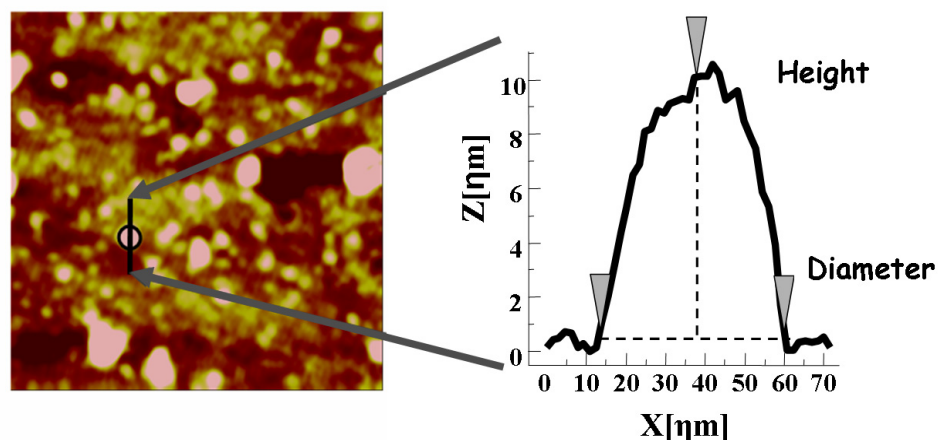


Figure 33. Analysis technique used to determine fibronectin moieties height and width dimensions on surfaces.

### 5. 3. 7. Data Analysis

Statistical analysis of the differences between each group was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni test where appropriate using SPSS® software (Chicago, IL). *P* values lower than 0.05 were considered as being significant and data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) except for the radiolabeling and adhesion assays for which mean  $\pm$  standard error (SE) is presented.

## 6. Results and Discussion

### 6. 1. XPS Analyses

Each step of surface modification as described in Figure 30 was followed by XPS analyses. Fused silica was first activated in piranha solution to obtain a highly hydroxylated surface [72, 182, 183]. This modification leads to a decrease of the percentage of carbon originating from the surface organic contamination inherent to exposure to air (Fig. 34a). The activation also decreases the roughness of the surfaces and makes them easier to functionalize by plasma probably because of the formation of reactive hydroxyl groups. Then, a MW plasma treatment was performed in a mixture of  $N_2/H_2$  gas to substitute some hydroxyl groups by amino groups. XPS analysis of plasma-treated surfaces shows 2% of nitrogen (Fig. 34a) which could come from various nitrogenous chemical species. In order

to specifically identify and quantify amino groups created on the surface, chemical derivatization reactions with chlorobenzaldehyde were performed [101, 124]. Indeed, from the relative percentage of chlorine atom detected by XPS, the percentage of amino groups present on the surface can be calculated. Amine percentage was estimated at 1.3%, meaning that ~65% of the nitrogen atoms introduced onto the surface are in amino groups. These functionalities were therefore used to graft either GA or SMPB to obtain terminal carboxylic groups or maleimide functionalities respectively (Fig. 32).

On GA and SMPB surfaces, XPS survey spectra revealed an increase of carbon components with a slight decrease of nitrogen (Fig. 34 panels b and c). These crosslinkers are mainly composed of C and O which explains the variations detected in surface composition. The oxygen percentage did not increase even if there are 3 oxygen atoms in each crosslinker because the relative percentage of oxygen was already higher in plasma-treated silica. The fibronectin grafting efficiency was confirmed on both crosslinkers by the increase of nitrogen percentage coming from the protein amino acids. It rose from 1.1% to 4.8% for FN on SMPB (Fig. 34b) and 1.1% to 4.5% for FN on GA (Fig. 34c). The carbon percentage also increases as it is a major constituent of proteins.

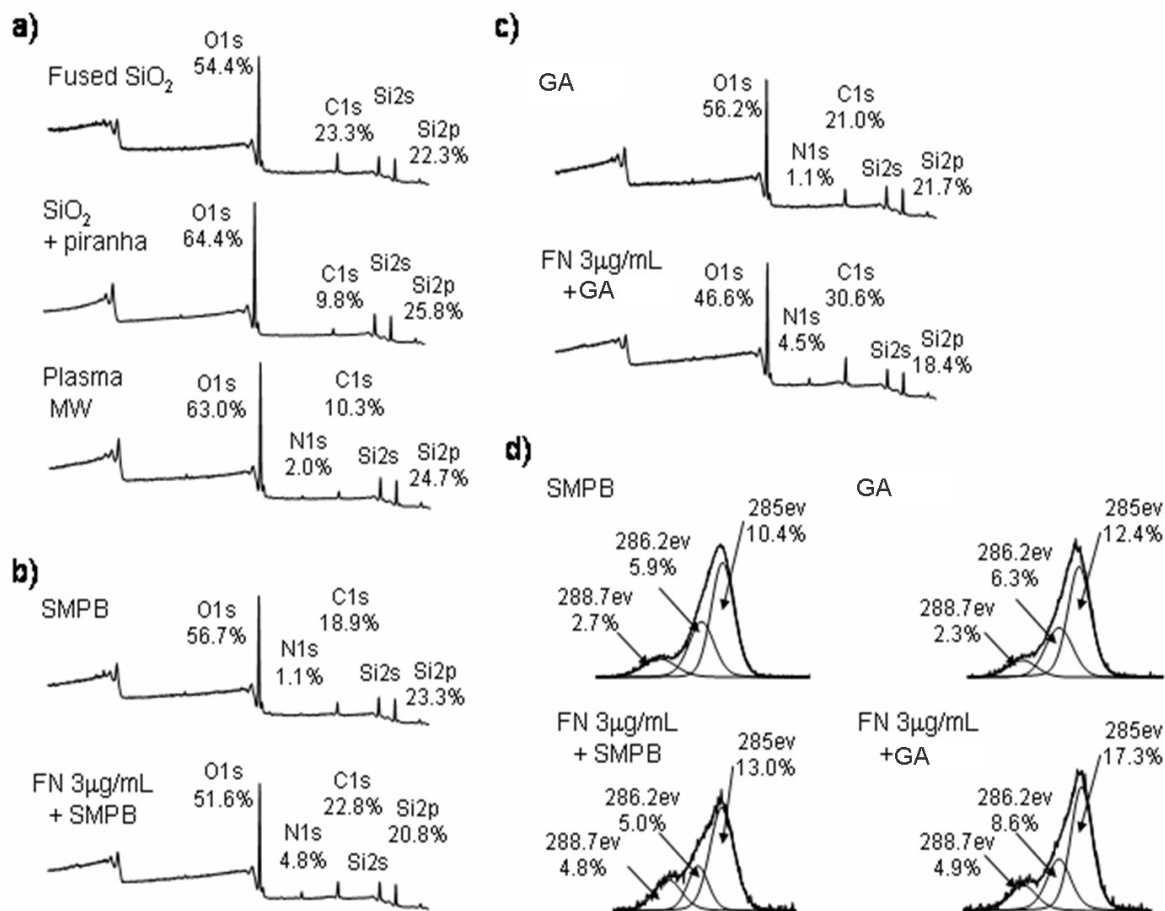


Figure 34. XPS survey spectra of silica surface before and after its activation in piranha solution and after a MW plasma treatment (a). Survey spectra of fibronectin grafted surface via SMPB (b) or GA (c). C1s high-resolution spectra for SMPB- and GA-grafted surfaces with and without fibronectin (d).

C1s high-resolution spectra were curve-fitted into three components at 288.7, 286.2 and 285 eV which were assigned to C=O groups, CN groups and CH<sub>x</sub>, CC, C=C moieties respectively (Fig. 34d).[184] The grafting efficiency of crosslinkers can be verified by the relative peak area of the carbonyl component at ~ 288.7 eV. Indeed, after plasma treatment, no signal was detected in this area (spectrum not shown). However, as shown in Figure 32, SMPB and GA contain 3 and 2 carbonyl groups, respectively, so their grafting should lead to the detection of C=O bounds. As expected, after SMPB and GA grafting, 2.7% and 2.3% of C=O was detected on the surfaces.

FN grafting on both crosslinkers is also evidenced on C1s high-resolution spectra by an increase of the carbonyl component that reached 4.8% for SMPB and 4.9% for GA (Fig. 34d). These results are in accordance with the chemical structure of proteins which consists in a long chain of amino acids linked by peptidic bonds (NH-C=O).

## 6. 2. Radiolabeling Assays

Once protein grafting was ascertained by XPS, radiolabeling assays were performed to quantify the amount of FN on each surface. The surface density of grafted (using GA or SMPB silica-treated surfaces) or adsorbed FN (on piranha-treated silica surfaces) is presented in Figure 35. After 3 h of reaction with a FN solution of 3  $\mu\text{g/mL}$ , the amount of protein is identical on the three investigated surfaces within experimental error (Fig. 35). Therefore, these results rule out any possible dose-dependent effect on FN activity. The concentration of about 80 ng of FN/cm<sup>2</sup> found on all surfaces is in agreement with literature data for adsorbed FN [160, 185]. In addition, it must be stated here that the occurrence of FN grafting on both GA and SMPB crosslinkers has been ascertained in a previous study [181].

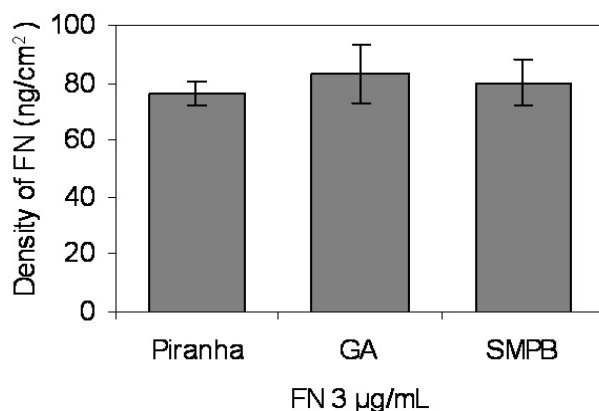


Figure 35. Radiolabeling assays of FN on modified silica surfaces.

### 6. 3. Cell Adhesion Assays

Since FN is a binding protein implicated in cell/matrix adhesion, its activity was evaluated by using BAECs adhesion assays. The number of cells adhered on modified silica surfaces was normalized with respect to a piranha control surface to take into account any fluorescence intensity variation between experiments. As can be seen in Figure 36, grafted (onto silica-GA and silica-SMPB) or adsorbed FN (onto piranha-treated silica) enhances in vitro cell adhesion on all three surfaces with respect to controls without FN (white columns). However, if no statistical difference in cell adhesion is observed between adsorbed FN and FN grafted through GA, BAECs adhesion to FN immobilized via SMPB is 1.5 to 2 fold lower. These results demonstrate that FN is more active when grafted via GA than via SMPB. Such a difference in FN biological activity has been observed for adsorbed FN depending on the substratum [72, 160] and between adsorbed and grafted FN [186, 187], but to our knowledge, it has never been shown between covalently grafted FN depending on the conjugation strategy.

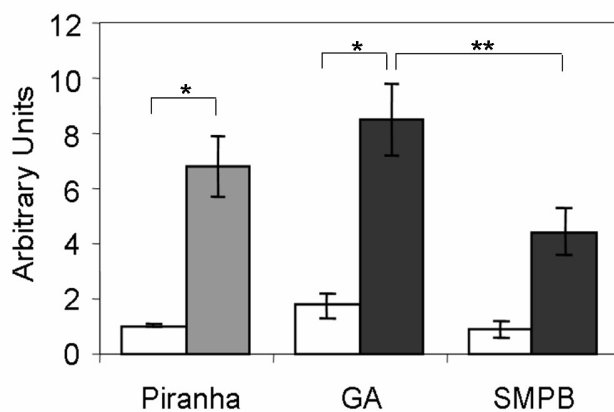


Figure 36. BAECs adhesion normalized with respect to piranha control surface. Adhesion assays were performed on control surfaces without FN (white columns), adsorbed FN on piranha (light gray column) and grafted FN on GA and SMPB (dark gray columns). \*  $p < 0.01$ . \*\*  $p < 0.05$ .

### 6. 4. Contact Angle Measurements

As for adsorbed molecules, the conformation of covalently grafted FN could be influenced by surface properties because protein immobilization proceeds through an initial surface adsorption. For this reason, the water contact angle and the roughness of the surfaces were

measured before and after FN adsorption or grafting. The water contact angle of a surface depends on different parameters such as hydrophilicity and roughness [188]. Table 1 shows the contact angle of piranha, GA and SMPB modified silica surfaces with and without FN. MW plasma treatment on the piranha surface leads to a water contact angle of  $20 \pm 5^\circ$ , thus the hydrophilicity of the surface after plasma is slightly increased (data not shown). GA and SMPB conjugated surfaces exhibit almost identical hydrophilicity therefore eliminating the possibility for FN to adopt different conformation due to surface tension considerations [165, 166].

Interestingly, contact angle values of the three FN-containing surfaces presented in Table 4 are all statistically different. These results point toward different protein organization on each of these surfaces. In other words, despite an almost identical FN surface concentration, the conformation adopted by the protein modulates the contact angle by hiding or exposing various hydrophilic and/or hydrophobic domains.

**Table 4.** Water Contact Angles ( $\theta^\circ$ deg) of Silica at Different Steps of Surface Modification

	Piranha	GA	SMPB
Without FN	$29 \pm 3$	$41 \pm 5$	$38 \pm 4$
With FN <sup>a</sup>	$65 \pm 5$	$49 \pm 2$	$57 \pm 3$

<sup>a</sup> 3 h in a FN solution of 3  $\mu$ g/mL.

### 6. 5. Atomic Force Microscopy

Topography and surface roughness measurements were recorded by AFM imaging under ambient conditions. The tapping mode AFM images obtained before and after protein immobilization on the different surfaces are shown in Figure 37. At first sight, surface functionalization with either GA or SMPB did not lead to important modification of surface topography with respect to piranha activated fused silica (Figure 37a, b and c). On the opposite, the presence of FN produced features with various apparent sizes and heights on each of the investigated surfaces (Figure 37d, e and f). These images suggest differences in FN orientation and/or conformation upon surface conjugation with each crosslinkers.

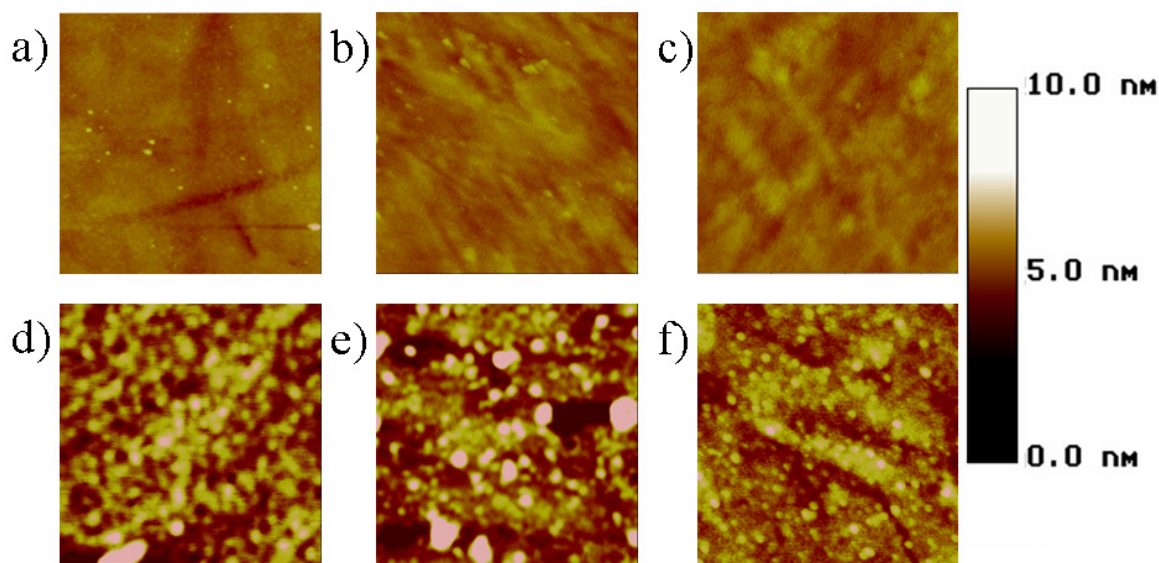


Figure 37. Tapping mode AFM images (700 X 700 nm) of the different modification steps, (a) “Piranha activated” SiO<sub>2</sub>, (b) SiO<sub>2</sub> + GA, (c) SiO<sub>2</sub> + SMPB, (d) “Piranha activated” SiO<sub>2</sub> + FN, (e) SiO<sub>2</sub> + GA + FN, and (f) SiO<sub>2</sub> + SMPB + FN.

Surface roughness has also been demonstrated to influence FN conformation [74, 165]. In this context, roughness root-mean-square ( $R_{\text{rms}}$ ) values calculated with several AFM images are presented in Table 5. As can be seen, piranha activated silica has a lower roughness than the surface grafted with the crosslinkers (with  $p < 0.01$ ). However, GA- and SMPB-grafted surfaces present similar roughness, meaning that any possible difference in FN conformation could not be explained by a roughness difference between these surfaces. Nevertheless, the roughness of GA-FN and SMPB-FN are significantly different, again suggesting a divergence in FN conformation depending on the crosslinker.

**Table 5.** Roughness<sup>a</sup> (nm) of Silica Surfaces at Different Steps of Surface Modification

	Piranha	GA	SMPB
Without FN	0.29 ± 0.01	0.39 ± 0.03	0.39 ± 0.04
With FN <sup>b</sup>	0.93 ± 0.01	0.98 ± 0.03	0.42 ± 0.01

<sup>a</sup> Estimated by the  $R_{\text{rms}}$  parameter of AFM pictures 700 x 700 nm.

<sup>b</sup> 3 h in a FN solution of 3 μg/mL.



In order to confirm this hypothesis, AFM images of surfaces with fibronectin were further analyzed to determine FN diameter and height. The shape and size of adsorbed FN on different substrates have been widely studied in the literature. For example, for elongated FN molecules adsorbed on Mica, Bergkvist et al. found a end to end distance of  $121 \pm 25$  nm,[72] whereas Erickson et al. measured a length of 110-160 nm.[120] Adsorbed FN in globular form was observed by MacDonald et al. on pure titanium for which they measured a molecular length of  $16.5 \pm 1.0$  nm, a height of  $2.5 \pm 0.5$  nm, and a width of  $9.6 \pm 1.2$  nm.[189] However, such investigation has never been performed on surface immobilized FN. The mean FN diameter and height determined by AFM profiles are shown in Table 6. For the three surfaces investigated, on average, a larger diameter and height is observed for FN grafted via GA compared to FN grafted via SMPB. The adsorbed protein (on piranha-treated silica) exhibits the largest diameter and a height between the one of GA-FN and SMPB-FN. Statistical analysis of the difference between groups was performed with a Bonferroni test. For height measurements, every condition (GA-FN, SMPB-FN and adsorbed FN) displayed statistically different results ( $p < 0.01$  between each pair), whereas for diameter, statistical differences were found between GA-FN / SMPB-FN and SMPB-FN / adsorbed FN ( $p < 0.01$ ) but not between GA-FN / adsorbed FN ( $p = 0.133$ ). Those statistical analyses are quite reliable due to the high number of samples for each condition and confirm that different grafting strategies result in different FN conformations.

**Table 6.** FN Diameter and Height (nm) on Different Surfaces<sup>a</sup>

	Adsorbed FN	GA-FN	SMPB-FN
Diameter	$33 \pm 8$	$32 \pm 9$	$29 \pm 11$
Height	$1.7 \pm 0.8$	$3 \pm 2$	$0.9 \pm 0.5$

<sup>a</sup> AFM imaging of immobilized fibronectin

The FN diameter and height distributions presented in Figure 38 emphasize the differences between FN dimensions on piranha, GA and SMPB modified silica surfaces. The data were curve fitted with chi-squared distributions. The asymmetry in distributions can be explained by the fact that the volume occupied by the protein is limited to a minimum value while it

has a lot more freedom to deploy in different conformations on the surface. Since XPS spectra of the surfaces with FN still showed the substrate beneath the protein layer and knowing the depth of analysis of XPS (~5 nm) and the AFM observed FN height (~0.5-5 nm), it is believed that the features observed on the AFM images correspond to an incomplete monolayer of proteins. According to these data, probabilities of protein superimposition are unlikely. However, the possibility that some data were taken from agglomerations of two or more proteins laying side by side on the surface cannot be ruled out. It can be noticed that the FN molecules height and diameter distributions are wider when FN is grafted via GA than via SMPB suggesting that there are more possible conformations adopted by the protein while grafted through GA. One possible explanation is that GA grafting introduces carboxylic groups at the surface which react with the N-terminus or lysine residues of fibronectin, whereas SMPB grafting provides maleimide functionalities suitable to conjugate the fibronectin by a free cysteine residue. Consequently, the availability and location of free lysine and cysteine residues in the protein determine the conformation and/or orientation possibilities of the grafted molecules. Since a FN molecule contains about 62 cysteine residues by subunit of which only 2 or 3 are free and therefore available for conjugation [190, 191], and about 76 lysine residues by subunit [190], there are much more conjugation possibilities through lysine residues. Furthermore it is likely that multiple conjugation through these moieties force the protein to adopt a more extended conformation.

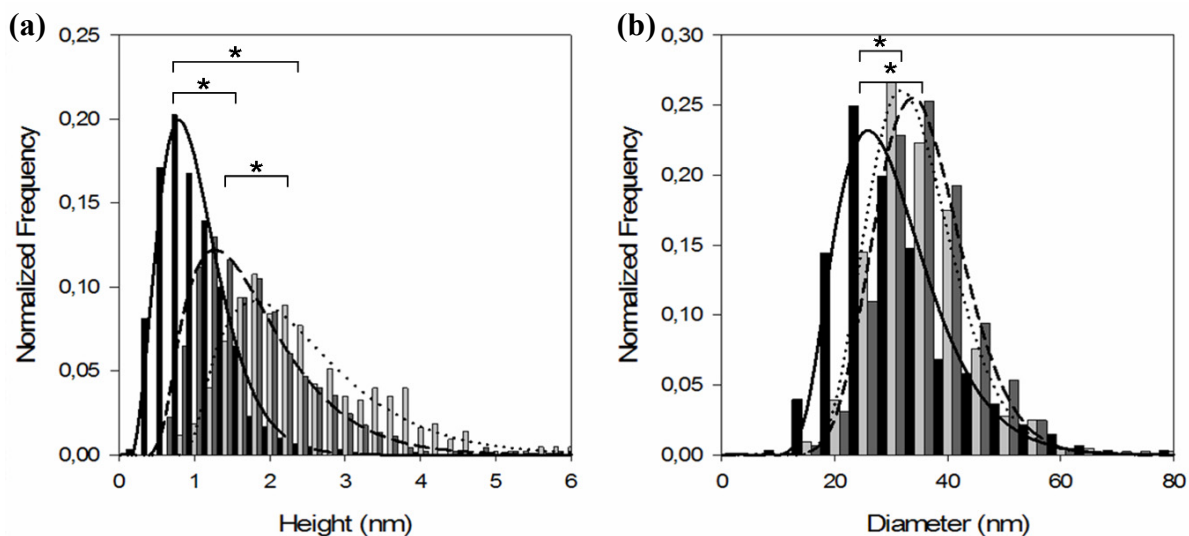


Figure 38. Normalized Frequency distribution of fibronectin height (a) and diameter (b) (■ SMPB-FN (straight line), ■ GA-FN (dotted line), ■ Adsorbed FN (dashed line)). \*  $p < 0.01$ .

## 7. Conclusion

In this study, the influence of the surface conjugation strategy on the conformation/orientation of silica grafted FN was investigated. FN molecules were covalently grafted onto plasma-treated silica using two different crosslinkers (GA and SMPB). Both XPS and radioactivity data clearly demonstrated that an almost identical amount of FN was grafted on GA- and SMPB-modified surfaces, therefore ruling out any possible dose-dependent effect to explain differences in biological activity and conformation/orientation of the immobilized protein on the different samples. In addition, it was demonstrated that the difference of protein conformation was not due to the surface hydrophilicity and roughness since GA- and SMPB-grafted surfaces presented similar water contact angles and roughness. Nevertheless, AFM imaging showed that the topography and roughness of protein immobilized surfaces were completely different depending on the crosslinker. Analyses of these images confirmed that fibronectin adopts a different conformation and/or orientation depending on the surface conjugation strategy privileged to immobilize the protein. FN molecules are higher and wider when grafted via GA than SMPB. Moreover, FN biological activity is better preserved when grafted via GA

rather than SMPB as demonstrated by cell adhesion assays. In fact, FN grafted with GA as the crosslinker displays a biological activity similar to that of adsorbed fibronectin. In conclusion, this study confirms that the protein conformation depends on the surface conjugation strategy and that this conformation influences its biological activity. It also points toward the fact that AFM imaging in ambient conditions provides insights on protein configuration.

## **8. Acknowledgments**

The authors thank S. Wiederkehr for precious help and advice concerning statistical analyses and J. Habermehl for language corrections. This study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (G. Laroche). K. Vallières and C. Sarra-Bournet acknowledge a Canada graduate scholarship from NSERC.

Chapitre V- Article 3: Le Mésylate d'Imatinib Inhibe la  
Croissance du Muscle Lisse et Stimule la Croissance de  
l'Endothélium

---

---

**On the Ability of Imatinib Mesylate to Inhibit Smooth Muscle Cell Proliferation without Delaying Endothelialization: An *in vitro* Study**

---

---

Karine Vallières<sup>a,b</sup>, Éric Petitclerc<sup>c</sup>, Gaétan Laroche<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Centre de Recherche sur les Matériaux Avancés, Département de génie des mines, de la métallurgie et des matériaux, Faculté des sciences et génie, Université Laval, Québec, QC, Canada, G1V 0A6.

<sup>b</sup> Centre de recherche du CHUQ, Hôpital Saint-François d'Assise, Québec, QC, Canada, G1L 3L5.

<sup>c</sup> Université Laval, Département de Médecine, Faculté de Médecine, Québec, QC, Canada, G1V 0A6.

Vascular Pharmacology

February 2009

In press

\* Corresponding author: Gaétan Laroche. Département de génie des mines, de la métallurgie et des matériaux, Faculté des sciences et génie, 1065 avenue de la médecine, Université Laval, Québec, Québec, Canada, G1V 0A6.

Tel.: +1418 656 2131

Fax: +1418 656 5343.

E-mail address: [gaetan.laroche@gmn.ulaval.ca](mailto:gaetan.laroche@gmn.ulaval.ca)

## 1. Avant-propos

Cet article porte sur le deuxième objectif de la thèse soit de contrôler l'hyperplasie intinale. Comme nous l'avons vu au chapitre I, le piètre taux de succès des prothèses de PTFE de petit et moyen diamètres est principalement causé par les thromboses et l'hyperplasie intinale. Les deux premiers articles sont le résultat du cheminement effectué pour améliorer l'*hémocompatibilité* du PTFE et ainsi diminuer les risques de thromboses. Ce dernier article présente les résultats *in vitro* de la stratégie que nous avons sélectionnée pour inhiber l'hyperplasie intinale.

La contribution de chacun des auteurs a été décrite dans la section "Avant-propos" à la page IV.

## 2. Résumé

La *resténose*, ou ré-occlusion d'une artère malade suivant une intervention chirurgicale, est la principale cause d'échec des traitements par angioplasties, *stents* ou pontages avec des vaisseaux naturels et artificiels. Dans les vaisseaux sains, l'*endothélium* limite la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses. Malheureusement, les chirurgies de revascularisation endommagent l'*endothélium* des vaisseaux naturels et les greffons synthétiques sont complètement dépourvus de cellules endothéliales. Plusieurs stratégies ont été développées afin d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses et réduire l'hyperplasie intinale mais la plupart des médicaments testés inhibent également l'endothélialisation et ne ciblent pas spécifiquement les cellules musculaires lisses. Le médicament idéal devrait avoir un effet antiprolifératif sur les cellules musculaires sans toutefois nuire à la cicatrisation vasculaire et à l'endothélialisation. Le mésylate d'imatinib est un inhibiteur spécifique de trois tyrosines kinases, dont deux, le PDGF-R et le c-Kit, sont impliqués dans la pathogénèse de l'hyperplasie intinale. Dans cette étude, nous avons évalué *in vitro* la capacité du mésylate d'imatinib à inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses et son effet sur les cellules endothéliales. Nos résultats indiquent que les faibles doses de mésylate d'imatinib n'inhibent pas les cellules endothéliales mais, au

contraire, augmentent leur prolifération tout en inhibant les cellules musculaires lisses. À la lumière de ces résultats, le mésylate d'imatinib semble un bon candidat pour inhiber l'hyperplasie intimale sans retarder la néo-endothélialisation.

### **3. Abstract**

Restenosis, the re-occlusion of a diseased vessel following a surgical intervention, is a major cause of failure of angioplasty, stenting, and bypass grafting with natural and synthetic vessels. In healthy vessels, the endothelium exerts a control over smooth muscle cell (SMC) proliferation and migration. Unfortunately, revascularization procedures damage the endothelium of natural vessels and bypass vessels are completely devoid of endothelial cells. Many strategies have been developed to inhibit SMC proliferation and reduce intimal hyperplasia, yet most of the drugs tested thus far simultaneously inhibit endothelialization and do not selectively target SMCs. The ideal biological agent should have anti-proliferative effects on SMCs while preserving vascular healing and endothelialization so as to prevent late thrombosis. Imatinib mesylate is a specific inhibitor of three tyrosine kinase receptors, two of which, PDGF-R and c-Kit, are implicated in the pathogenesis of intimal hyperplasia. In this study, we investigated in vitro the potential of imatinib mesylate to inhibit SMCs and its effect on ECs. Our findings indicate that low doses of imatinib mesylate successfully inhibit SMC proliferation. Furthermore, at these concentrations, the drug was not only harmless to ECs, but also enhanced their proliferation. In light of these in vitro results, imatinib mesylate shows potential as a good candidate to inhibit intimal hyperplasia without delaying neo-endothelialization.

### **4. Introduction**

Restenosis caused by intimal hyperplasia is a major cause of failure of most revascularization procedures such as angioplasty, stenting, and bypass grafting with natural and synthetic vessels [192, 193]. The intima is the innermost layer of blood vessels and is normally composed of an endothelium and its underlying basal lamina. In healthy vessels, the endothelial cell (EC) monolayer releases several factors (e.g. nitric oxide, prostacyclin)



which force the smooth muscle cells (SMCs) into a lower proliferating and invasive phenotype [194, 195]. However, following surgical revascularization, the endothelium is either damaged or absent, thus impeding proper function [16, 194, 195]. Intimal hyperplasia is characterized by a thickening of the intima which is due primarily to SMC proliferation and extracellular matrix production [142]. Synthetic prostheses, designed to replace beyond-repair damaged large vessels, have demonstrated a fair amount of efficiency [35]. However, small to medium-size vessels remain harder to replace by these synthetic prostheses [36, 37]. In this context, our work in recent years has been to characterize new ways to optimize the surface of such grafts so as to reduce intimal hyperplasia while enabling their endothelialization [175, 181, 196, 197].

In a previous study, we demonstrated that fibronectin (FN) grafted in active conformation onto PTFE greatly improved EC adhesion onto this polymer [181]. However, FN is an adhesion protein present in most extracellular matrix and is not recognized exclusively by endothelial cells [11]. Because smooth muscle cell proliferation in the anastomotic sites of prostheses leads to intimal hyperplasia, these cells must be selectively inhibited.

The origin of these SMCs is unclear. It was first assumed that they originated from the media and migrated into the intima [19, 198, 199], however some recent studies have shown that bone marrow cells are key factors in the development of intimal hyperplasia [54, 56, 200] and that due to an increase in stem cell factor (SCF) expression, c-Kit<sup>+</sup> bone marrow-derived progenitors are recruited at the site of vascular injury and give rise to a significant proportion of SMCs that contribute to intimal hyperplasia [56]. SCF promotes cell survival, proliferation, mobilization, and adhesion through the interaction with its receptor (c-Kit) [59, 60, 200]. Furthermore, c-Kit expression in SMCs, which express both the SCF and c-Kit, was shown to increase considerably following vascular injury [57]. This suggests that SCF/c-Kit signalling is involved in the pathogenesis of intimal hyperplasia and stimulates SMCs via an autocrine pathway [57, 200].

While many strategies have been developed to inhibit SMC proliferation, there remains no long-term effective therapy to prevent intimal hyperplasia in humans. The best results thus far have been obtained with the immunosuppressant drug sirolimus (rapamycin) and the microtubular inhibitor paclitaxel. These drugs have been approved for clinical use as stent coatings and have shown good short-term results [140, 201-203], despite the fact that their long-term safety has been questioned [204, 205] because of the continual increase in late stent thrombosis [206]. Most of the tested drugs do not specifically target SMCs and they inhibit endothelialization at the same time. The ideal biological agent should have an anti-proliferative effect on SMCs while preserving vascular healing and endothelialization [142].

Imatinib mesylate is a specific inhibitor of three tyrosine kinase receptors: PDGF-R, c-Kit, and Bcr/Abl. This inhibitor has been used to treat chronic myeloid leukemia (CML) and gastrointestinal stromal tumors (GIST), which are characterized by the presence of mutated Bcr/Abl and c-Kit, respectively [207]. Many studies have also demonstrated an anti-angiogenic effect of imatinib mesylate mediated via PDGF-R inhibition [208, 209]. Because muscle cells express both c-Kit and PDGF-R, two important mediators of intimal hyperplasia pathogenesis [54-57, 200, 210], this drug may potentially be highly effective in inhibiting SMC growth. Furthermore, mature ECs do not express PDGF-R and Bcr/Abl and their expression of c-Kit is uncertain [59, 155]. In this context, the possibility that imatinib mesylate does not interfere with EC growth should not be ruled out.

In this study, we evaluated *in vitro* the potential of imatinib mesylate to inhibit human and bovine SMC proliferation with no harm to human and bovine ECs. Proliferation assays were also performed on co-cultures of muscle and endothelial cells to evaluate the drug's activity in a scenario which more closely mimicked the *in vivo* competition between the two cell types.

## 5. Materials and Methods

### 5.1 Chemicals

A 100 mg caplet of imatinib mesylate (Novartis Pharmaceuticals Canada Inc., Dorval, QC, Canada) was obtained from the St-François d'Assise Hospital pharmacy. The caplet was crushed in a mortar and solubilised in 2 mL DMSO (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), and 3 mL of PBS was added to obtain a final concentration of 40% DMSO. Paclitaxel (Sigma-Aldrich) was used to induce endothelial cell apoptosis. Human fibronectin (FN) was supplied by Roche Applied Sciences (Laval, QC, Canada). Resazurin and the secondary antibodies conjugated with AlexaFluor 488 (anti-rabbit and anti-mouse) and AlexaFluor 568 (anti-mouse) were obtained from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). The polyclonal Von Willebrand factor antibody was supplied by Dako (Mississauga, ON, Canada), while the monoclonal alpha actin antibody and the Hoechst 33342 were purchased from Sigma-Aldrich. Antibodies to the cleaved caspase-3 and PARP were supplied by Cell Signalling Technology (Danvers, MA, USA). HRP-conjugated anti-rabbit and ECL detection reagent were obtained from Amersham/GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA) and PCNA antibody was supplied from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

### 5.2 Cell cultures

Human vascular smooth muscle cells (HVSMCs) were kindly provided by Dr. François Marceau from the Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated by limited digestion using bacterial chemotrypsin. Bovine aortic smooth muscle cells (BAOSMCs) were isolated using the explant technique by tissue sections from cow aortas obtained from a local slaughterhouse. The explants were first kept in a minimum volume of DMEM containing 10% FBS and 4% penicillin/streptomycin until the cells were seen migrating out of the tissue. The bovine aortic endothelial cells (BAECs) were purchased from Cambrex Bio Science (Walkersville, MD, USA). The human cells were cultured in medium M199 (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA) containing 20% inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen). For the human endothelial cells, 4  $\mu$ L/mL of endothelial cell growth supplement (ECGS) was added to the culture medium. The bovine

cells were cultured in high-glucose DMEM (HyClone, Logan, UT, USA) containing 10% inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin. All of the cells were used between passages 3 and 6.

### **5.3 Resazurin proliferation assay**

To verify the potential of imatinib mesylate to inhibit smooth muscle cell growth without harming endothelial cells, 72-hour proliferation assays were performed using increasing concentrations of the drug in the culture medium. These assays were performed with human vascular smooth muscle cells (HVSMCs), human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), bovine aortic smooth muscle cells (BAOSMCs), and bovine aortic endothelial cells (BAECs). A preliminary assay was performed to estimate the concentration of imatinib that was associated with 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) of BAOSMCs growth. Since IC<sub>50</sub> was found to be around 10 $\mu$ M, a 1/3 serial dilution ranging from 100 to 1.2 $\mu$ M was used for further experiments. The 100 $\mu$ M concentration was abandoned later because it was lethal to all cells. The cells were seeded in 48-well plates in their respective medium with serum. Imatinib was added directly to the medium at time zero and the plates were incubated at 37°C for 72 h. At the end of the proliferation period, the cells were washed with PBS and incubated with 50  $\mu$ g/mL of resazurin in culture medium without serum for 2 h at 37°C. Fluorescence measurements were recorded using excitation and emission wavelengths of 485 and 590 nm, respectively, in a BioTek FL600 reader (Winooski, VT, USA). The relative percentage of cells was calculated with respect to a control without imatinib and was expressed as a mean  $\pm$  standard error of at least 12 determinations.

### **5.4 Immunofluorescence**

Glass coverslips were placed in 24-well plates and sterilized in alcohol. Following two PBS washes, the coverslips were gelatinized overnight at 4°C. The wells were then washed with PBS and the cells were seeded in DMEM with serum and imatinib mesylate at 0, 1.2, 3.7, 11.1, and 33.3  $\mu$ M. The plates were incubated for 72 h at 37°C. All of the wells were washed with PBS, fixed for 15 min in formaldehyde 3.7%, and washed again in PBS. The cells were then blocked and permeabilized for 1 h with PBS containing 3% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% saponin prior to being incubated for 2 h with the primary

antibodies (anti-Von Willebrand factor and anti- $\alpha$  actin) diluted in PBS, 3% BSA, and 0.1% saponin. After washing with PBS containing 0.05% Tween 20, the secondary antibodies (Alexa Fluor 488 conjugated anti-rabbit and Alexa Fluor 568 anti-mouse) and Hoechst 33342 were added for 1 h. The wells were washed 5 times and the coverslips were mounted onto glass slides to be viewed under a fluorescence microscope (Olympus BX51, Markham, ON, Canada). Images were captured with a Retiga Exifast digital camera (QImaging, Surrey, BC, Canada) driven by Image Pro software (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, USA).

### **5.5 PCNA proliferation assay**

After 24 h of culture with 0, 1.2, or 3.7  $\mu$ M of imatinib mesylate, the PCNA expression was investigated by immunofluorescence in BAECs and BAOSMCs. The cells were cultured at low confluence on gelatinized glass coverslips. They were fixed, permeabilized, and marked following the immunofluorescence protocol. The primary antibody was an anti-PCNA, while the secondary antibody was an Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse. Hoechst 33342 was mixed with the secondary antibody. Immunofluorescence micrographs were analysed using ImageJ software to calculate the total cell numbers and PCNA-positive cell percentages. Cells expressing PCNA were considered as proliferating cells. At least 1700 cells per condition were counted.

### **5.6 Western blotting**

Proteins were isolated from BAOSMCs and BAECs cultured with 3.7  $\mu$ M imatinib mesylate, without the drug, and with 200 nM paclitaxel. After 24 h, both floating and adhered cells were collected, centrifuged, washed, and fractionated in a buffer with proteases. Proteins were quantified by spectroscopy using the Bradford protein assay. For the electrophoresis assay, equal amounts of protein were subjected to 10% (for PARP detection) or 15% (for cleaved caspase 3 detection) acrylamide gel with a 5% stacking gel. The proteins were blotted into a nitrocellulose membrane which was then blocked in TBS-T 5% dry non-fat milk for 1 h prior to being incubated overnight with the primary antibody (anti-PARP or anti-caspase 3) at 4°C. After washing, the HRP-conjugated secondary antibody was added for 1 h. The membrane was washed again and the detection of the

cleaved caspase 3 or PARP was performed by means of enhanced chemiluminescence (ECL). Each experiment was repeated 4 times.

### **5.7 Statistical analysis**

Statistical analyses of the differences between groups were performed using an analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test or t-test where appropriate. P values of less than 0.05 were considered significant and all of the data were expressed as means  $\pm$  standard error (SE).

## **6. Results**

### **6.1 Imatinib mesylate inhibits SMC proliferation**

We investigated the effect of imatinib mesylate on the proliferation rate of HVSMCs and BAOSMCs (Figure 39). As expected, imatinib mesylate inhibited proliferation in a similar fashion in both cell types (Figures 39a and 39b). With low concentrations (1.2 to 11.1  $\mu$ M), we observed approximately 40% less cells after 72 h of proliferation, compared to that evidenced in a control without imatinib. With higher doses, the percentage of cells declined to near zero, suggesting significant cell death. Furthermore, high doses (33.3  $\mu$ M) of imatinib mesylate induced the dissolution of the  $\alpha$ -actin fibres, which led to diffuse staining through the cytoplasm (Figure 39c).

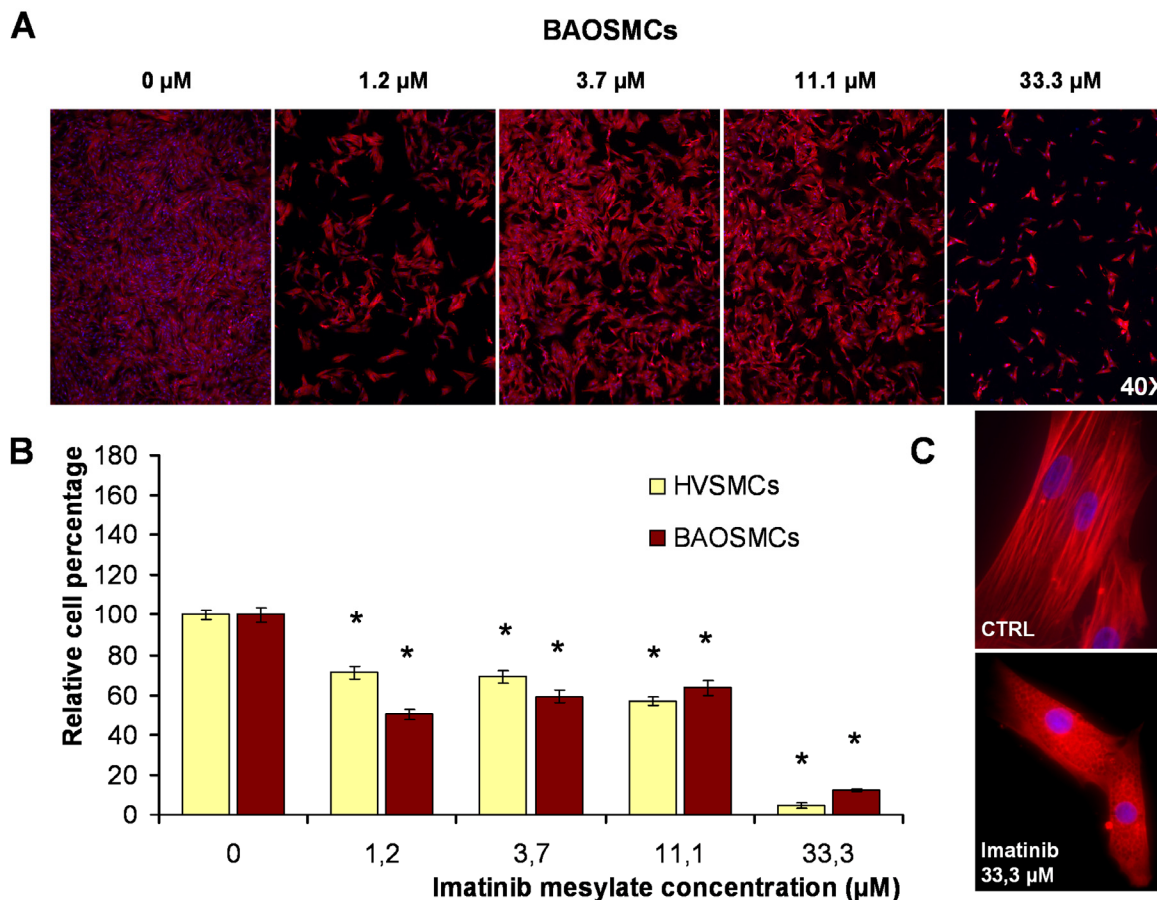


Figure 39. Effect of imatinib mesylate on smooth muscle cell proliferation. A) Immunofluorescence of BAOSMCs after 72 h of proliferation with various concentrations of imatinib mesylate. Anti- $\alpha$  actin antibody and Alexa 568-conjugated secondary antibody were used to label smooth muscle cells in red, while Hoechst 33342 was used to stain the nuclei in blue. B) Relative percentage of human and bovine muscle cells after 72 h of proliferation with various concentrations of imatinib mesylate, as determined by resazurin assay. \* = significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to an imatinib-free control, according to a Dunnett's test. N = 12 or more. C) Larger magnification of cells in A), where BAOSMCs were treated with a high dose of imatinib or a drug-free control.

## 6.2 Enhanced EC proliferation with low doses of imatinib mesylate

With prosthesis endothelialization as the ultimate goal, the drug used to inhibit smooth muscle cell proliferation must ideally not affect endothelial cell growth. For this reason, proliferation assays were also performed on human (HUVECs) and bovine (BAECs) endothelial cells (Figure 40). At concentrations ranging between 1.2 and 3.7  $\mu\text{M}$ , imatinib mesylate unexpectedly enhanced endothelial cell proliferation. This effect was more

pronounced with the BAECs, although it did remain significant for the HUVECs at 3.7  $\mu\text{M}$ . At higher concentrations, the drug lost its specificity and became toxic to the endothelial cells.

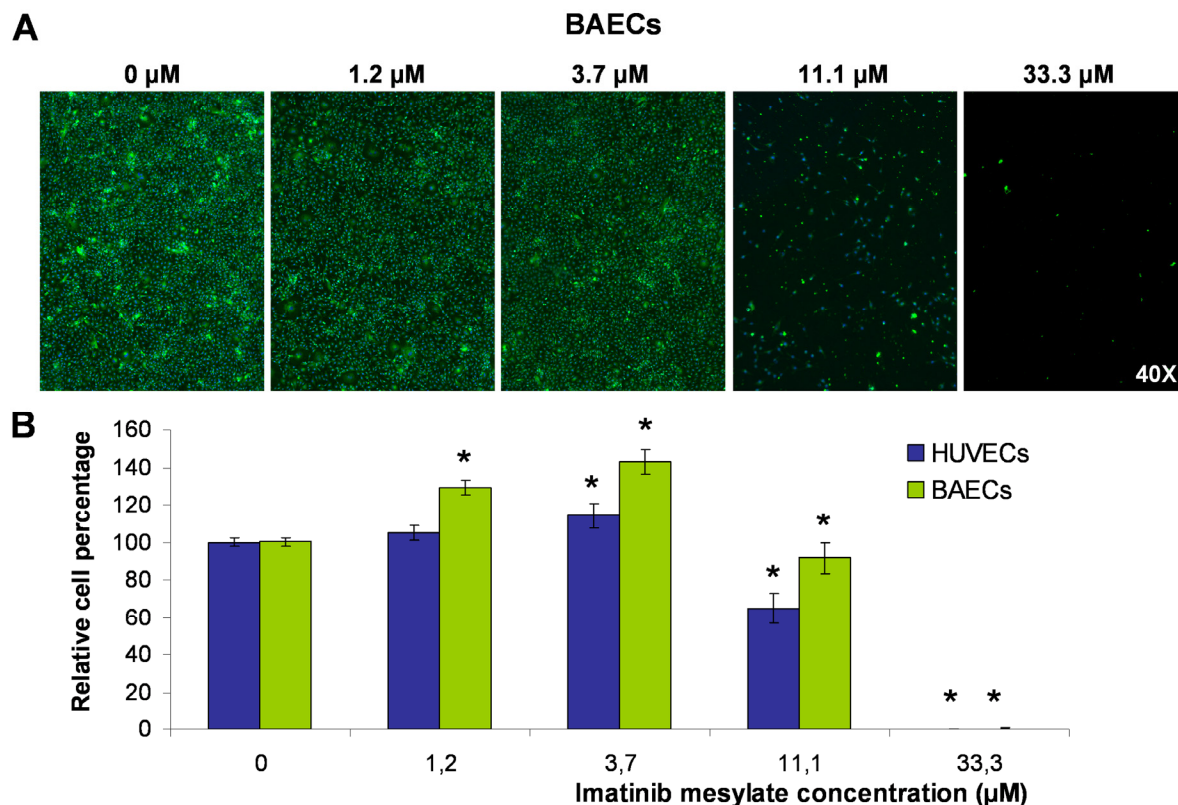


Figure 40. Effect of imatinib mesylate on endothelial cell proliferation. A) Immunofluorescence of BAECs after 72 h of proliferation with various concentrations of imatinib mesylate. Anti-Von Willebrand factor antibody was used with Alexa 488-conjugated secondary antibody to label endothelial cells in green, while Hoechst 33342 was used to stain the nuclei in blue. B) Relative percentage of human and bovine endothelial cells after 72 h of proliferation with various concentrations of imatinib mesylate, as determined by resazurin assay. \* = significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to a drug-free control, according to a Dunnett's test.  $n = 12$  or more.

## 6.2 The effects of imatinib are potentiated by vascular cell co-cultures

Endothelial and muscular cells are known to regulate each other [16, 194, 195, 211]. Because these interactions may influence the effect of imatinib mesylate, we also performed proliferation assays with co-cultures of BAECs and BAOSMCs (Figure 41). The



bovine cells were used because they were cultured in the same medium, whereas no appropriate culture medium was found to co-culture human endothelial and muscular cells. Without imatinib, the muscle cells appeared to grow faster than did their endothelial counterparts. However, with 1.2 to 11.1  $\mu\text{M}$  of imatinib mesylate, muscle cell proliferation was strongly inhibited, while endothelial cell growth was surprisingly enhanced. The BAECs appeared to be less sensitive to imatinib when they were co-cultured with BAOSMCs, as the decrease in cell numbers was observed only with 33.3  $\mu\text{M}$  and not with 11.1  $\mu\text{M}$  of the drug, as was observed with the monoculture.

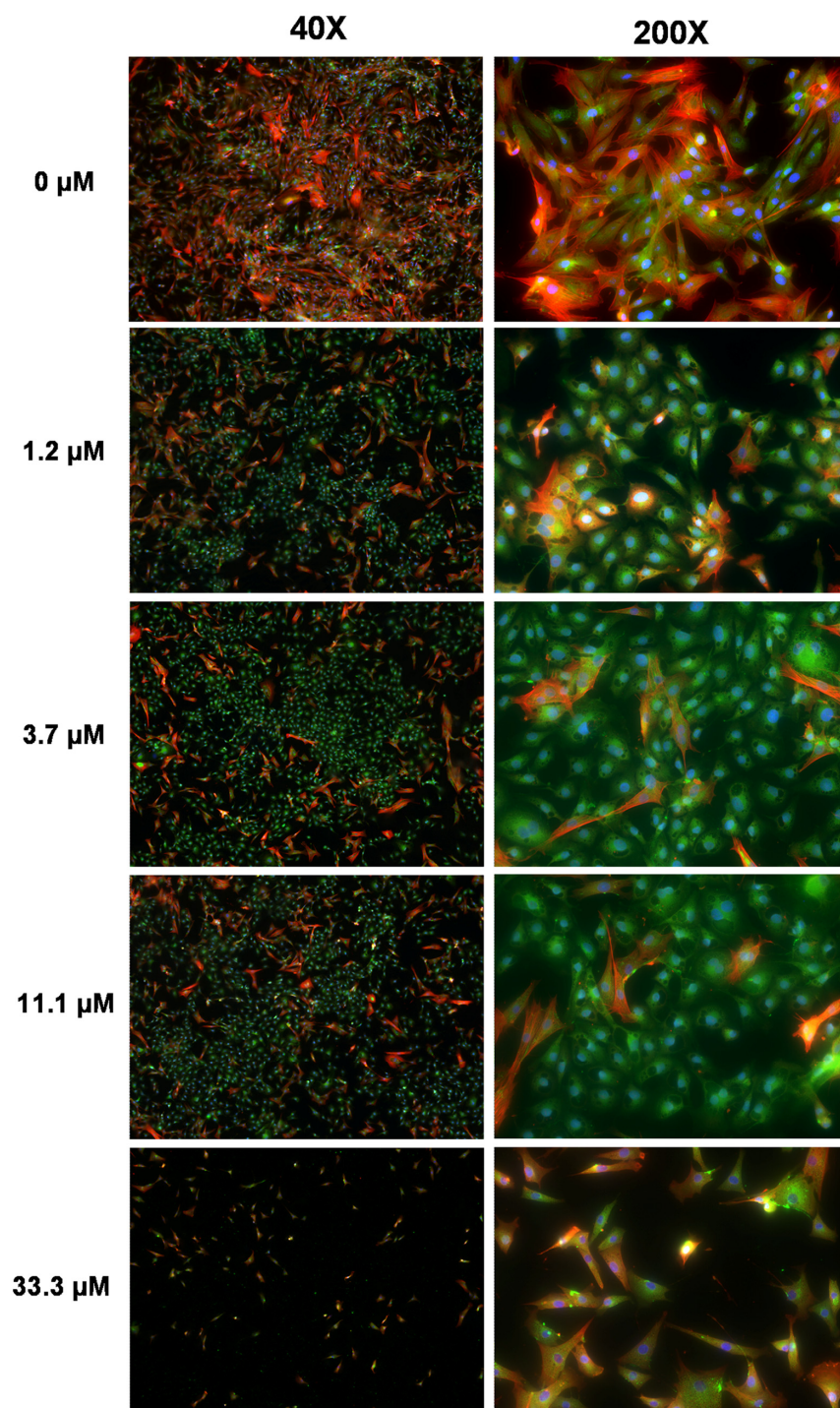


Figure 41. Fluorescence micrographs of BAECs and BAOSMCs after 72 h of co-culture with various concentrations of imatinib mesylate. Anti-Von Willebrand factor antibody was used with Alexa 488-conjugated secondary antibody to label endothelial cells in green. Anti-smooth muscle  $\alpha$ -actin antibody with Alexa 568-conjugated secondary antibody was used to label smooth muscle cells in red. Hoechst 33342 was used to label the nuclei in blue.

### 6.3 PCNA expression confirms the stimulating effect of imatinib on endothelial cells

Proliferative cell nuclear antigen (PCNA), a protein that is synthesized in the early G1 and S phases of the cell cycle, acts as a DNA sliding clamp for DNA polymerase  $\delta$  and is essential for chromosome replication [212]. In this study, we evaluated cell proliferation by measuring the percentage of PCNA-positive cells. As can be seen in Figure 42, the proliferation of BAOSMCs was much higher than that of BAECs in the absence of imatinib ( $93 \pm 1\%$  compared to  $73 \pm 1\%$  of proliferating cells). However, after 24 h with 1.2 and  $3.7 \mu\text{M}$  of imatinib mesylate, the percentage of proliferating BAECs increased to  $79 \pm 1\%$  and  $87 \pm 4\%$ , respectively, while the percentage of proliferating BAOSMCs decreased to  $72 \pm 5\%$  and  $63 \pm 8\%$ , respectively. These findings support the resazurin assay results in confirming the potential advantage of imatinib mesylate over other currently used drugs to inhibit intimal hyperplasia.

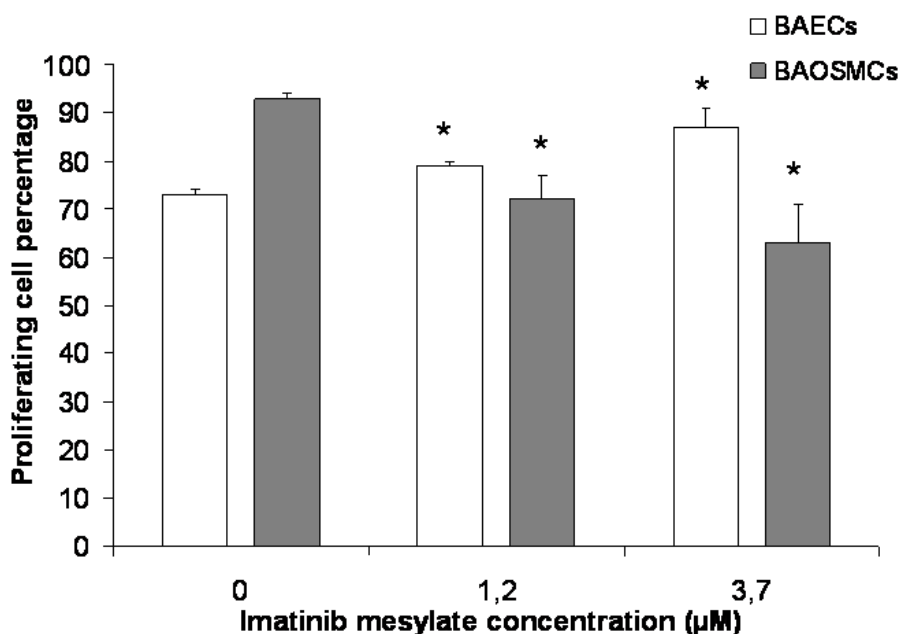


Figure 42. Proliferating cell percentage after 24 h of culture with or without imatinib mesylate. Anti-PCNA antibody was used with Alexa 488-conjugated secondary antibody to label the proliferating cells, while Hoechst 33342 was used to stain all of the nuclei. Micrographs were analysed with ImageJ software to calculate the total number of cells and the percentage of proliferating cells. At least 1700 cells per condition were counted. \* = significant difference ( $p < 0.01$ ) compared to a drug-free control, according to a Dunnett's test.

#### 6.4 Apoptosis is not accountable in the antiproliferative effect of imatinib on SMCs

To determine whether apoptosis also contributed to the decrease in SMCs, the expression of cleaved caspase 3 and PARP was verified by western blotting. In their cleaved form, these two proteins are late markers of apoptosis.

In the imatinib-free control and with 3.7  $\mu\text{M}$  of imatinib mesylate (the optimal concentration to inhibit SMCs and to stimulate ECs), no sign of apoptosis was found in either cell type (Figure 43). While the possibility of necrosis cannot be ruled out, we have shown here that low doses of imatinib mesylate inhibit SMC proliferation and enhance EC proliferation without causing apoptosis. Finally, a positive control was performed with 200 nM of paclitaxel which is known to induce apoptosis [213, 214]. This molecule effectively induced apoptosis in the BAECs but not in the BAOSMCs (Figure 43). Our study demonstrates that endothelial cells are more sensitive to drugs than are smooth muscle cells; a higher dose of paclitaxel may therefore be required to induce SMC apoptosis. The effect of high-dose imatinib mesylate on cell apoptosis was not studied here, although the proliferation assays did reveal considerable cell death in both the endothelial and the muscle cells in the presence of 33.3  $\mu\text{M}$  of imatinib (Figure 41).

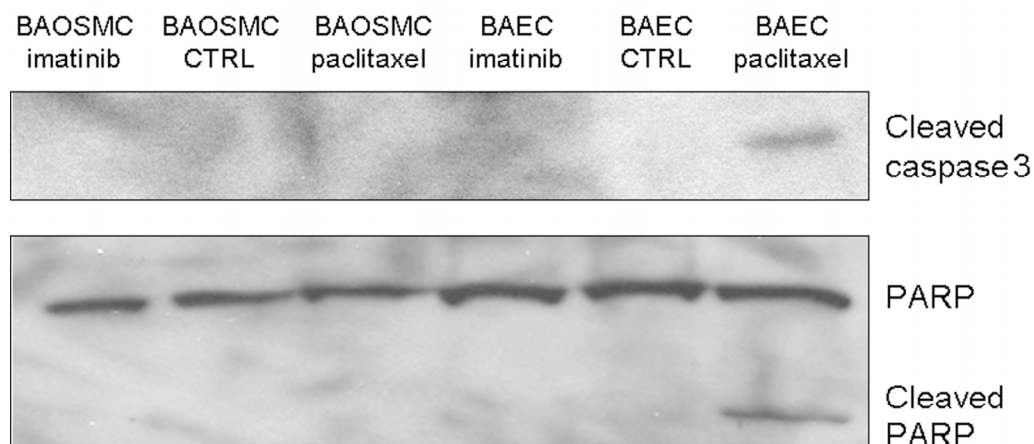


Figure 43. Representative western blot analyses of BAOSMC and BAEC extracts untreated, treated with 3.7  $\mu\text{M}$  imatinib mesylate, or treated with 200 nM paclitaxel. Antibody against cleaved caspase 3 and PARP was used to detect late apoptosis markers.

## 6. Discussion

Intimal hyperplasia is an important cause of failure of most surgical treatments of vascular diseases. This affection significantly decreases the patency of angioplasty, stenting, and bypass grafting with natural or synthetic vessels [192, 193]. Since these treatments remain the best option for number of patients, improving their patency could have a profound clinical impact by reducing complications and enhancing the active life of the biomaterial grafts. Intimal hyperplasia is mainly due to an endothelium injury in natural vessels or to the absence of endothelium in synthetic prostheses. These conditions lead to the migration and proliferation of SMCs, therefore forming an hyperplastic neo-intima. In order to inhibit intimal hyperplasia development, SMCs have to be specifically inhibited during the vascular healing following a surgical intervention and the endothelialization of prostheses.

In this study, we evaluated *in vitro* the potential of imatinib mesylate to inhibit SMC proliferation without harming the EC growth. We demonstrated the great advantage of imatinib mesylate over other SMCs inhibitor like paclitaxel and sirolimus since, at appropriate concentrations, imatinib mesylate enhances EC proliferation while specifically inhibiting SMCs. The resazurin proliferation assays demonstrated the dose dependant inhibitory potential of imatinib on SMCs and revealed its surprising promoting effect on EC proliferation. The imatinib-induced increase in EC proliferation, which has never been reported before, was confirmed by the PCNA proliferation assays. These experiments, combined with the western blotting of cleaved caspase-3 and PARP, confirmed that low dose of imatinib (3.7 $\mu$ M) really inhibit SMC proliferation and does not induce apoptosis. These results are highly promising, as optimal smooth muscle cell inhibition was obtained in the same concentration range as optimal endothelial cell proliferation.

Moreover, to evaluate the drug's activity in a scenario which more closely mimicked the *in vivo* competition between the two cell types, proliferation assays were also performed on co-cultures of smooth muscle and endothelial cells. The results of these assays are qualitative (immunofluorescence micrographs) as the resazurin assay did not allow differentiating the cell types. Nevertheless, the endothelial and smooth muscle cell co-cultures seemed to potentiate imatinib mesylate effects on each cell type. The ECs seemed

less sensitive to high dose of imatinib (11.1 $\mu$ M) while the SMCs inhibition appeared to be stronger for all doses when compared to their respective monoculture results. These in vitro results are very encouraging for further in vivo experiments.

Furthermore, imatinib beneficial effects are observed at low concentrations tested in this study (1.2 and 3.7 $\mu$ M). These concentrations are about a hundred times smaller than those used in cancer treatments, which significantly reduces the risk of deleterious side effects in patients. The IC<sub>50</sub> of imatinib on PDGF-R and c-Kit phosphorylation are between 0.1 and 0.5 $\mu$ M depending on the cell type and their possible mutations to these receptors [215-218]. According to the IC<sub>50</sub> of imatinib on PDGF-R and c-Kit, the SMC inhibition could probably be obtained with lower doses (0.5 to 1.0 $\mu$ M). However, the EC enhancement was shown to be higher at 3.7 $\mu$ M than at 1.2 $\mu$ M.

Clearly, aside from its known inhibition of the PDGF-R, c-Kit, and Bcr/abl proteins, the imatinib molecule showed some unspecific effects. The unexpected effect of imatinib on EC proliferation suggests the existence of other imatinib targets. Some studies reported an effect of imatinib on LCK and c-Fms receptor [217, 219]. However, these receptors can not explain the increased proliferation of EC exposed to imatinib. Since imatinib mesylate is most likely to inhibit than activate tyrosine kinase receptor, the enhancement in EC proliferation could be mediated through the inhibition of an inhibitory tyrosine kinase. At this point, the precise target for this mechanism of action of imatinib on endothelial cells remains open to speculation. However, because it enhances in vitro endothelialization, imatinib does have a tremendous advantage over the other smooth muscle cell inhibitors in countering intimal hyperplasia. Since the vascular healing should not be impaired by imatinib, the treatment could be shorter and hopefully lead to a complete healing of the endothelium which could therefore accomplish its functions.

In vivo experiments need to be performed to confirm the efficiency of imatinib to counter intimal hyperplasia and promote vascular healing. There are different models of intimal hyperplasia in rat and mouse that could be used [144, 200, 220, 221]. Furthermore, a systemic treatment could be compared to a local release of imatinib by a polymer wrapped around the injured artery. This latter approach has already been used to release paclitaxel

[222-225]. Obviously, a local treatment would be advantageous comparing to a systemic one since it considerably reduces the dosage and consequently, the undesirable side-effects.

Actually, there is no efficient treatment to prevent intimal hyperplasia after angioplasty and bypass grafting while paclitaxel- and sirolimus-eluting stents are used but lead to an increased occurrence of late thrombosis. In this context, the treatment with imatinib mesylate could greatly improve the patency of these revascularization procedures.

## **7. Conclusions**

According to our *in vitro* findings, imatinib mesylate appears to be a good candidate to counter intimal hyperplasia. This drug is particularly promising because it not only inhibits smooth muscle cell growth but also stimulates re-endothelialization by enhancing endothelial cell proliferation. This beneficial effect on two vascular cell types (simultaneous SMC inhibition and EC proliferation) at clinically relevant concentrations may prove to be tremendously advantageous in the clinical setting. In addition, imatinib mesylate has been used in cancer treatment since 2001, therefore its pharmacokinetic is well known and appropriate to either oral systemic or local treatments.

## **8. Acknowledgements**

The authors thank Dr. René C.-Gaudreault for his helpful input and Dr. François Marceau for providing the HVSMC. This study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (G.L.). K.V. acknowledges an NSERC graduate scholarship, and E.P. acknowledges a Junior II scholarship from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). Financial support from the Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CRCHUQ) and the Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels (CQMF) is also greatly acknowledged.

## Conclusions et Perspectives

La *perméabilité* à long terme des prothèses artérielles de polytétrafluoroéthylène (PTFE) expansé utilisées pour le remplacement d'artères de petit et moyen diamètres est de moins de 50% à 5 ans. Deux complications majeures expliquent ce piètre taux de succès: la thrombose et l'hyperplasie intimale. Dans cette étude, des stratégies originales visant à éviter ces complications ont été développées et évaluées *in vitro*.

### Favoriser la néo-endothélialisation

Tel que discuté à la section III du chapitre I, la thrombose survient suite au contact prolongé de la prothèse avec le sang, dû à un manque d'*hémocompatibilité* du matériau (ePTFE). Toutefois, exception faite de sa faible *compliance*, les propriétés chimiques et mécaniques du ePTFE sont très bien adaptées à la fonction de prothèse artérielle. Puisque très peu de matériaux résistent à la dégradation *in vivo* et que l'*hémocompatibilité* est une propriété de surface, nous avons cru avantageux de modifier uniquement la surface du PTFE afin d'améliorer son *hémocompatibilité* tout en conservant ses propriétés massiques.

Dans le corps humain, le seul tissu en contact direct avec le sang est l'*endothélium* qui tapisse l'intérieur de tous les vaisseaux et du cœur. Nous avons donc posé l'hypothèse que la présence d'un *endothélium* à l'intérieur des prothèses de ePTFE les rendrait hémocompatibles et diminuerait grandement les risques de thromboses. Les cellules endothéliales qui composent l'*endothélium* ont besoin du support et des signaux d'une matrice extracellulaire pour adhérer, survivre et proliférer; elles ne peuvent donc pas croître directement sur le PTFE. Dans cette étude, la fibronectine (FN), une glycoprotéine d'adhésion présente dans les matrices extracellulaires, a été utilisée afin de favoriser l'adhésion des cellules endothéliales sur le PTFE. La FN est une molécule souvent utilisée pour améliorer la biocompatibilité des matériaux [70, 72, 160, 164, 185, 226]. Cependant, nos travaux représentent une contribution originale puisque nous l'avons greffée de façon



covalente sur différents bras d'ancrage afin de prévenir sa désorption dans le flux sanguin. De plus, nous avons étudié l'effet de la stratégie de conjugaison sur l'activité biologique de la protéine. Bien que la relation entre la conformation et l'activité biologique de la FN soit connue depuis longtemps, aucune étude évaluant l'influence de la stratégie de conjugaison sur l'activité de la FN n'avait encore été réalisée [72, 160, 164, 226]. Il a été montré que la FN adsorbée sur le PTFE augmente significativement l'adhésion des BAECs sur cette surface. Par contre, dans le flux sanguin, la FN serait probablement désorbée rapidement. Pour remédier à ce problème, la FN a été greffée de façon covalente à la surface du PTFE. Les techniques et les résultats du greffage de la FN sur le PTFE et l'évaluation de son activité biologique sont présentés dans le premier article qui constitue le chapitre III. Le polymère inerte a d'abord été aminé par un plasma d'ammoniac puis des bras d'ancrage bifonctionnels ont été liés sur ces amines. L'autre extrémité des bras d'ancrage a été utilisée pour lier la FN. Deux bras d'ancrage différents ont été utilisés, à savoir l'anhydride glutarique (GA) et le sulfo-succinimidyle-4-(p-maleimidophenyl)butyrate SMPB, dans le but d'étudier l'influence du mode de greffage sur l'activité biologique de la FN. Le GA réagit avec une amine libre de la FN (la protéine possède une amine terminale ainsi qu'une multitude de lysines contenant une amine dans leur chaîne latérale) alors que le SMPB réagit avec un groupement thiol (disponible uniquement dans les cystéines qui ne forment pas de pont disulfure). La FN greffée sur le PTFE via ces deux bras d'ancrage augmente l'adhésion des cellules comparativement au PTFE vierge. Toutefois, le mode de greffage influence grandement l'activité biologique de la FN puisque l'adhésion cellulaire est environ deux fois plus importante lorsque la FN est greffée sur le GA que lorsqu'elle est greffée sur le SMPB.

Des dosages de la FN ainsi que des ELISA ont été faits afin de déterminer de quelle manière la méthode de greffage influence l'activité de la FN. La même quantité de FN a été mesurée sur le GA et sur le SMPB excluant donc la différence de concentration pour expliquer la différence d'activité. Les tests ELISA ont permis de découvrir que le site d'adhésion cellulaire (RGD) de la FN est plus disponible quand elle est greffée par le biais de GA plutôt que SMPB. Ce résultat suggère que la FN adopte une *conformation* différente sur chacun des bras d'ancrage.

Ces résultats sont très encourageants mais il faut toutefois tenir compte que tous les essais ont été faits sur des films de PTFE et non pas sur du téflon expansé (ePTFE). Même si la chimie de ces matériaux est la même, la microtexture est très différente et pourrait influencer le greffage et la *conformation* de la FN mais aussi l'adhésion et la survie des cellules. L'influence de la microtexture sur l'adhésion et la migration cellulaire est connue depuis longtemps sous le nom de « contact guidance ». Ce phénomène par lequel les cellules s'alignent et migrent sur un substrat, guidées par sa microstructure, a été décrit au début du 20<sup>e</sup> siècle [227, 228].

Le deuxième article, présenté au chapitre IV, confirme l'hypothèse que la technique de greffage influence la *conformation* prise par la FN. Une des contributions originales de cet article est l'utilisation de l'imagerie AFM afin de visualiser la FN greffée. La FN adsorbée a été imagée sur différents substrats mais à notre connaissance, la FN greffée de façon covalente n'avait encore jamais été imagée. Le substrat (PTFE) a été remplacé par une surface modèle dû à une incompatibilité inhérente à sa grande rugosité. En fait, il nous a été impossible d'imager la FN sur le PTFE puisque la taille de la protéine est du même ordre de grandeur que la rugosité de la surface. Des surfaces de verre ont donc été utilisées pour greffer la FN et l'imager par AFM. La validation du modèle a été effectuée par des tests d'adhésion cellulaire et des dosages de la FN. Puisque des résultats similaires à ceux sur le PTFE ont été obtenus, le modèle nous a semblé adéquat. Par contre, il n'en demeure pas moins un modèle et il faut être conscient de ses imperfections. Le verre a trois grandes différences avec le PTFE qui pourraient potentiellement affecter la *conformation* adoptée par la FN : la composition chimique, l'énergie de surface et la rugosité. Les expériences ont donc été menées de façon à pouvoir évaluer l'importance de ces propriétés. Les essais d'adhésion cellulaire ont montré que l'activité biologique de la FN greffée via le GA sur le PTFE et sur le verre est similaire et deux fois supérieure à celle de la FN greffée via le SMPB sur ces surfaces. Les différences d'énergie de surface et de rugosité entre le PTFE et le verre ne semblent donc pas déterminantes de l'activité biologique de la FN, et par le fait même, de sa *conformation*. De plus, des mesures d'angle de contact et de rugosité ont été prises sur le verre seul, le verre + GA, le verre + SMPB et toutes ces surfaces avec FN. Les résultats indiquent une différence de *conformation* entre la FN greffée sur le GA et celle

sur le SMPB. En effet, les surfaces verre + GA et verre + SMPB ont la même énergie de surface et la même rugosité, mais après le greffage d'une quantité égale de FN, des différences significatives ont été mesurées pour ces deux paramètres. Ces résultats suggèrent que les bras d'ancrage soient le facteur déterminant de la conformation par opposition aux propriétés de surface. L'imagerie AFM a été utilisée afin de confirmer la différence de *conformation* de la FN selon le bras d'ancrage utilisé. L'analyse approfondie des images AFM a permis de démontrer cette différence. Les molécules greffées sur le GA sont plus hautes et ont un plus grand diamètre que celles greffées sur le SMPB. Ce résultat semble tout à fait logique puisque la FN doit s'étaler pour exposer ses sites actifs et qu'elle est plus active sur le GA. De plus, il est clair que le GA peut potentiellement se lier à plusieurs sites (les lysines) de la FN et donc promouvoir son étalement, par opposition au SMPB qui ne peut réagir qu'avec quelques cystéines disponibles sur la protéine, minimisant ainsi son effet sur la réorganisation de la FN. Pour la première fois il a été démontré que la stratégie de conjugaison influence la conformation de la FN greffée et, par le fait même, son activité biologique. Notre étude a révélé l'importance de la stratégie de conjugaison pour ancrer des biomolécules en conformation active. Ces connaissances sont très importantes pour le développement de plusieurs applications telles les biocapteurs et les matériaux bioactifs. Les biocapteurs sont des dispositifs qui utilisent un élément biologique, une enzyme par exemple, pour transformer une réaction chimique en un signal électrique ou optique pouvant être analysé et interprété, dans le but de détecter et/ou doser des molécules. Le développement de tels dispositifs requiert souvent l'immobilisation de la biomolécule sur une surface, et ce, en conformation active. Par ailleurs, un matériau est bioactif lorsqu'il possède des propriétés biologiques ou des substances biologiquement actives dans un but curatif ou préventif. La prothèse de ePTFE avec de la FN greffée en est un exemple. La transformation des matériaux pour les rendre bioactifs est une approche très populaire dans le domaine des biomatériaux. On conçoit par exemple des matériaux favorisant la cicatrisation [229], la régénération nerveuse [230] ou osseuse [231] l'endothélialisation et la vascularisation [68, 71, 181]. Tous ces processus biologiques sont physiologiquement induits par des molécules biologiques, il est donc naturel de vouloir utiliser ces molécules pour conférer les propriétés désirées aux matériaux. Cependant, tel

que démontré dans notre étude, lorsqu'une biomolécule est immobilisée, il faut tenir compte que la stratégie de conjugaison peut influencer son activité biologique.

L'objectif de favoriser l'adhésion des cellules endothéliales *in vitro* sur du PTFE a été atteint. De plus, notre technique de greffage covalent de la FN présente le potentiel de former des surfaces beaucoup plus stables *in vivo* que les techniques d'adsorption traditionnelles. Toutefois, des données sur la prolifération et la survie des cellules à plus long terme sur le PTFE sont essentielles pour déterminer si le greffage de la FN via le GA sur le PTFE permet l'endothélialisation. Quoique ces expériences semblent relativement simples, il faut d'abord surmonter le problème de la stérilisation. En effet, si pour des essais d'adhésion de 10 minutes la stérilité des surfaces n'est pas primordiale, il en est autrement pour des essais de prolifération de plusieurs jours. La FN est reçue stérile et le PTFE vierge est facilement stérilisable par autoclave. Toutefois la stérilisation du PTFE après le greffage de la FN pose le problème de la dénaturation de la protéine. Deux solutions sont envisageables, à savoir faire toutes les modifications de surface dans un environnement stérile, ou stériliser le PTFE après le greffage des bras d'ancrage et de greffer la FN stérile par la suite. Cependant, la stabilité des bras d'ancrage à l'autoclave, à la stérilisation à l'oxyde d'éthylène ou à l'ozone n'a pas été vérifiée. Les connaissances actuelles de la chimie nous laissent croire que le GA devrait résister à la stérilisation sans trop de problème puisqu'il n'est pas activé. Au contraire, SMPB est beaucoup plus réactif et risque d'être plus difficile à stériliser. Heureusement, c'est la FN greffée sur le GA qui a la meilleure activité biologique.

Afin de poursuivre le travail commencé, les prochaines manipulations logiques seraient de vérifier l'*hémocompatibilité* des surfaces de PTFE greffés FN par rapport au PTFE vierge par le biais de test d'adhésion et d'agrégation plaquettaire, d'adhésion des leucocytes et la détermination de l'indice de thrombogénicité [123]. Suite à ces expérimentations, si les résultats sont favorables, la FN devra être greffée sur des prothèses de PTFE expansé afin de permettre des essais dans un bioréacteur ou même *in vivo*.

Puisque le but ultime de ces travaux est de développer une prothèse artérielle de PTFE expansé "améliorée" qui aurait un meilleur taux de perméabilité à long terme, les essais *in*

*vivo* sont essentiels. Il est intéressant de noter que les traitements par plasma d'ammoniac ont été effectués dans un réacteur à conformation cylindrique. Par conséquent, aucune adaptation de l'appareil ne sera nécessaire pour passer des films de PTFE aux prothèses de PTFE expansé. Ce réacteur a d'ailleurs déjà été utilisé pour traiter des prothèses de ePTFE dans le cadre d'un autre projet qui visait à implanter des prothèses artérielles chez le chien [123].

## Contrôler l'hyperplasie intimale

La deuxième complication qui a été étudiée dans cette thèse est l'hyperplasie intimale. Rappelons que cette affection est caractérisée par l'épaississement de l'intima dû à la prolifération des cellules musculaires et à leur production de matrice extracellulaire. Plusieurs facteurs expliquent l'activation des cellules musculaires lisses lors de l'implantation d'une prothèse synthétique. D'abord, l'*endothélium* de l'artère naturelle est endommagé et il est absent à l'intérieur de la prothèse, empêchant ainsi la régulation des cellules musculaires lisses par les cellules endothéliales. Ensuite, la différence de *compliance* entre la prothèse et l'artère naturelle entraîne des turbulences dans le flux sanguin, ce qui active les plaquettes qui libèrent du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), un facteur de croissance pour les cellules musculaires lisses. De plus, l'anastomose de la prothèse crée une blessure vasculaire qui entraîne l'augmentation du SCF (stem cell factor) et de l'expression de son récepteur, c-Kit, par les cellules musculaires lisses. Le SCF peut agir de façon autocrine sur les cellules musculaires lisses et stimuler leur prolifération et leur migration mais il recrute également des cellules progénitrices de la moelle osseuse qui une fois sur le site de la blessure, se différencient en cellules musculaires.

Puisqu'on ne souhaite pas modifier les propriétés massiques des prothèses de ePTFE, la *compliance* ne peut pas être adaptée et l'activation des plaquettes et leur sécrétion de PDGF est inévitable. Toutefois, le récepteur du PDGF peut être inhibé à la surface même des cellules musculaires. L'hypothèse de départ de ce deuxième objectif est que l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses, sans nuire à la croissance des cellules

endothéliales, pourrait empêcher le développement d'hyperplasie intinale. Suite à l'étude des différents inhibiteurs connus des cellules musculaires lisses et de leur spécificité, le mésylate d'imatinib a été sélectionné. Cette molécule est utilisée à titre d'anticancéreux depuis son approbation par la FDA en 2001, mais elle a l'avantage d'inhiber les récepteurs du PDGF et du SCF, tous deux impliqués dans la pathogénèse de l'hyperplasie intinale. Très peu de données étaient disponibles sur les effets *in vitro* de faibles doses d'imatinib sur les cellules musculaires et endothéliales.

L'objectif de départ qui était de développer et d'évaluer *in vitro* une stratégie pour contrer l'hyperplasie intinale a été atteint. Le mésylate d'imatinib s'est avéré efficace à faibles doses (1.2 à 3.7  $\mu\text{M}$ ) pour inhiber la croissance des cellules musculaires lisses (humaines et bovines) sans toutefois causer l'apoptose. De plus, à ces mêmes concentrations, nous avons démontré que le mésylate d'imatinib stimule la prolifération des cellules endothéliales (humaines et bovines). Cet effet de l'imatinib mésylate n'avait encore jamais été relaté mais il est très intéressant pour les applications dans le domaine cardiovasculaire notamment pour les prothèses et les *stents*. Le mécanisme par lequel le mésylate d'imatinib agit sur les cellules endothéliales est malheureusement inconnu mais l'activation du récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) par le médicament est une hypothèse plausible. La grande similarité entre les récepteurs du PDGF et du VEGF rend difficile le développement d'inhibiteurs spécifiques à l'un ou l'autre de ces récepteurs. Le mésylate d'imatinib serait donc un *antagoniste* du PDGF-R et un *agoniste* du VEGFR. Cet effet prétendu du mésylate d'imatinib sur le récepteur du VEGF ne serait pas du tout profitable pour le traitement des cancers puisque c'est un récepteur pro-angiogénique mais ce serait le scénario idéal pour inhiber l'hyperplasie intinale. Notons qu'en favorisant l'endothélialisation, le mésylate d'imatinib inhibe indirectement les cellules musculaires lisses et contribue à prévenir les thromboses. Les deux effets favorables de l'imatinib, soit d'inhiber les cellules musculaires lisses et de stimuler les cellules endothéliales, sont conservés en co-culture. Ce résultat est très encourageant puisque les co-cultures sont plus représentatives de la réalité observée *in vivo* que les monocultures; cependant, une étude *in vivo* est requise pour déterminer le potentiel réel du mésylate d'imatinib à inhiber l'hyperplasie intinale.

Il existe plusieurs modèles animaux d'hyperplasie intimale dont un chez la souris et un chez le rat qui pourraient être utilisés à un coût relativement bas. Dans le modèle de souris, l'hyperplasie est induite dans une artère fémorale avec un fil à ressort de 0.38mm de diamètre qui dénude et dilate l'artère; chez le rat, elle est induite dans une artère carotide par le gonflement d'un ballon d'angioplastie [225]. Ces modèles sont plus représentatifs de l'hyperplasie se développant dans les *stents* ou suite à une angioplastie que celle qui survient après l'implantation d'une prothèse synthétique. Il s'agirait néanmoins d'un bon point de départ pour une étude *in vivo*. Malheureusement, les animaux utilisables comme modèle d'hyperplasie intimale suite à l'implantation d'une prothèse synthétique doivent être beaucoup plus gros puisque les prothèses de petit et moyen diamètre ont 4 à 10 mm de diamètre interne. Les animaux les plus utilisés sont les chiens, les moutons, les cochons et les babouins [96, 138, 222, 232-235]. Évidemment, les coûts liés à l'utilisation de ces animaux sont beaucoup plus élevés et peuvent justifier des essais préliminaires avec des petits rongeurs.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses. Une fois l'efficacité du médicament démontrée *in vivo*, l'imatinib mésylate pourrait être utilisé comme traitement pour prévenir le développement d'hyperplasie intimale suite à une angioplastie, la pose d'un *stent* et l'implantation d'une prothèse artérielle. Il serait intéressant de développer un système à libération contrôlée pour le libérer localement. Même si le médicament peut être pris oralement, la libération contrôlée localement permet de réduire les doses nécessaires et donc les effets secondaires indésirables. La liste des effets secondaires indésirables du mésylate d'imatinib étant assez longue (nausées, œdèmes, crampes musculaires, diarrhées, vomissements, hémorragies, démangeaisons de la peau, maux de tête, fatigue, douleurs articulaires, indigestions, souffle court), on a tout intérêt à développer un système à libération contrôlé du médicament. Dans le cas des prothèses artérielles, la libération locale de médicaments est relativement complexe dû au flux sanguin. Ce dernier peut augmenter significativement la vitesse de relargage en plus de diluer rapidement le médicament. Une alternative à ce problème est d'insérer le dispositif à libération du médicament à l'extérieur de la prothèse afin qu'il soit protégé du flux sanguin. Une étude de diffusion du mésylate d'imatinib au travers le PTFE expansé devrait d'abord être effectuée pour s'assurer que le

médicament puisse traverser la prothèse et aller agir sur les cellules présentes à l'intérieur. Cette approche a déjà été utilisée pour libérer du paclitaxel au niveau des anastomoses des prothèses de ePTFE [222, 224]. Toutefois, le mésylate d'imatinib a l'immense avantage de ne pas inhiber, ni tuer les cellules endothéliales ce qui laisse espérer de bien meilleurs résultats à long terme. En effet, le paclitaxel, de par son effet sur les cellules endothéliales, ralentit la guérison et l'endothélialisation, ce qui augmente les risques de thromboses tardives.

La finalité de ce projet serait bien sûr la réunion de ces deux stratégies (la FN et l'imatinib) en une seule prothèse de PTFE expansé. L'intérieur de cette prothèse serait tapissé de FN greffée alors que l'extérieur serait recouvert d'un film de polymère à libération contrôlé de mésylate d'imatinib. Selon nos résultats *in vitro*, cette prothèse aurait le potentiel de favoriser l'endothélialisation et d'inhiber la croissance des cellules musculaires lisses. Ces effets bénéfiques diminueraient les risques de thromboses et d'hyperplasie intimale associés à l'implantation de prothèses artérielles. Beaucoup de travail reste à faire avant de commercialiser une telle prothèse de PTFE expansé mais les résultats de cette étude sont très encourageants. Par ailleurs, les connaissances que nous avons acquises dans ce projet sont transposables pour plusieurs autres applications. Par exemple, on pourrait envisager de greffer la FN, ou une autre biomolécule favorisant l'adhésion des cellules endothéliales, sur les *stents* afin d'améliorer leur biocompatibilité. L'ancrage covalent de biomolécules en conformation active est d'un grand intérêt pour le développement de systèmes de détection, qu'ils soient enzymatiques, à base d'acides nucléiques ou d'immunoglobulines. Cette technique peut également être utilisée afin de créer des surfaces proactives aux propriétés variées: anticoagulante, antiadhésive, pro adhésive, pro angiogénique, proliférative, etc. De même, le mésylate d'imatinib pourrait être une molécule de choix pour éviter la resténose dans les *stents* et suite à une angioplastie. En fait, il serait intéressant d'utiliser le mésylate d'imatinib pour des applications favorisant la croissance des cellules endothéliales au dépend des cellules musculaires lisses. On pourrait penser à l'utiliser pour sélectionner les cellules endothéliales dans un mélange avec des cellules musculaires. Pour le moment, contrer l'hyperplasie intimale et les cancers sont sans doute les meilleures applications du mésylate d'imatinib.



## Glossaire \*

- Agoniste*** : Molécule interagissant avec un récepteur membranaire et activant celui-ci. L'agoniste mime en général le message se liant habituellement avec le récepteur en question.
- Amphiphile*** : Molécule qui possède à la fois un groupe hydrophile et un groupe hydrophobe.
- Anastomose*** : Communication naturelle, pathologique ou artificielle entre deux conduits anatomiques (vaisseaux, nerfs, etc.). L'implantation d'une prothèse artérielle implique la formation de deux anastomoses artificielles, une proximale et une distale, qui sont les sutures entre le vaisseau naturel et la prothèse.
- Anévrisme*** : Cavité contenant du sang liquide ou coagulé, qui se développe sur le trajet d'une artère par dilation de ses parois et qui communique avec la lumière de cette artère. La rupture d'un anévrisme peut causer une hémorragie.
- Antagoniste*** : Substance se fixant sur les mêmes récepteurs cellulaires qu'une substance de référence, en empêchant partiellement ou totalement celle-ci de produire ses effets habituels.
- Anticorps*** : Protéine synthétisée par les plasmocytes en réponse à l'introduction dans l'organisme d'un antigène particulier, et qui est capable de se combiner avec cet antigène pour le neutraliser.
- Anticorps monoclonal*** : Anticorps homologues, strictement identiques, issus d'un même clone plasmocytaire, ayant donc tous la même classe (isotype), les mêmes allotypes, les mêmes idiotypes, la même spécificité fine pour l'antigène.
- Biocompatibilité*** : Propriété d'un matériau pouvant être en contact avec un tissu vivant sans causer d'effets indésirables locaux dans ce tissu ni d'effets systémiques dans l'organisme.
- Chimiotaxie*** : Mouvement orienté d'organismes mobiles ou de cellules individuelles, déclenché et entretenu par une substance chimique diffusant dans le milieu.
- Chirurgie endovasculaire*** : Technique chirurgicale profonde et peu effractive qui est pratiquée dans les vaisseaux sanguins majeurs, les artères et les organes internes du corps par cathétérisme ou fibroscopie.
- Compliance*** : Mesure de la souplesse et des possibilités de distension d'un réservoir élastique (par exemple, la vessie, les poumons, les vaisseaux sanguins), qui est exprimée par le rapport entre le volume du réservoir et la pression du liquide ou de l'air qu'il contient.
- Conformation*** : Configuration tridimensionnelle définitive qu'acquiert une protéine ou une molécule d'acide nucléique.
- Cytokine*** : Petite protéine très puissante sécrétée entre autre par les monocytes et les macrophages, responsable de la régulation de la réponse immunitaire et de la communication intercellulaire.
- Cytosquelette*** : Ensemble organisé des polymères biologiques qui confèrent l'essentiel des propriétés mécaniques aux cellules.

**Endoprothèse** : Tuteur métallique inclus dans un cylindre de polymère.

**Endothélium** : Type d'épithélium constitué d'une seule couche de cellules, qui recouvre la paroi interne du cœur, des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des cavités séreuses.

**Épithélium** : Tissu constitué d'une ou plusieurs couches de cellules collées les unes aux autres, sans espaces ni liquide interstitiels, qui recouvre et protège la surface externe du corps ainsi que ses cavités naturelles, ou qui forme la partie sécrétoire des glandes.

**Étirage** : Procédé d'allongement d'une feuille thermoplastique, d'un jonc ou d'un filament, pour réduire sa section droite initiale et/ou améliorer ses propriétés physiques par orientation.

**Extrusion** : Procédé selon lequel du plastique préalablement ramolli est forcé à travers une filière pour former une pièce en continu.

**Facteur von Willebrand** : Protéine présente dans la circulation sanguine qui est libérée par les plaquettes et les cellules endothéliales. Le facteur von Willebrand possède de multiples fonctions et présente une structure complexe de 20 à 50 sous-unités identiques liées les unes aux autres. Chaque sous-unité possède des points de contacts ou récepteurs permettant au facteur von Willebrand d'interagir avec les plaquettes d'une part et la paroi lésée des vaisseaux sanguins d'autre part. Un autre récepteur permet au facteur von Willebrand de lier et de protéger un important facteur de la coagulation sanguine, le facteur VIII.

**Fibrine** : Protéine insoluble, élément principal du caillot sanguin, formée à partir du fibrinogène (protéine plasmatique soluble) sous l'effet de la thrombine.

**Fibrinogène** : Facteur I de la coagulation. Protéine plasmatique soluble synthétisée dans le foie, qui sert de substrat à l'action de la thrombine qui la transforme en fibrine.

**Forces de cisaillement** : Force de tension de l'afflux sanguin agissant sur la paroi d'un vaisseau, d'une artère et qui augmente lors de la division de ceux-ci en deux embranchements ou plus.

**Frittage** : Traitement thermique par lequel les grains d'une poudre (minéral, argile, terre, céramique, verre, polymère, etc.), préalablement comprimés à froid dans un moule métallique, sont chauffés à une température inférieure au point de fusion du constituant principal du mélange, ce qui a pour conséquence de souder les grains ensemble pour former une masse solide tout en conservant la forme donnée au comprimé.

**Glycocalyx** : Couche glycoprotéique et glycolipidique localisée à la surface extracellulaire de la membrane plasmique et jouant des rôles divers : protection de la membrane, charge électrique de surface, intervention dans les phénomènes d'absorption par ses enzymes propres et dans la perméabilité cellulaire, contrôle des phénomènes de reconnaissance cellulaire par les antigènes de surface.

**Glycosaminoglycane** : Composés formés par la répétition d'une entité composée d'un ose aminé et d'un acide uronique (ou d'un ose). L'acide hyaluronique est le seul glycosaminoglycane non sulfaté. Les autres composés qui diffèrent par la nature des acides uroniques ou des osamines sont tous sulfatés : acide chondroïtine 4-sulfate, acide chondroïtine 6-sulfate, dermatane sulfaté, kératane sulfaté, héparane

sulfate et héparine. La plupart des glycosaminoglycanes sont fixés par liaison covalente à une protéine pour donner un protéoglycane; de nombreux protéoglycanes peuvent se fixer par liaison non covalente à une molécule d'acide hyaluronique.

**Hémocompatibilité** : Propriété d'un matériau pouvant être en contact avec le sang pour une période cliniquement significative sans être dégradé et sans causer l'altération des éléments sanguins ou des constituants plasmatiques.

**Intégrine** : Grande famille de protéines hétérodimériques transmembranaires impliquées dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire ou à la surface d'autres cellules.

**Ischémique**: Voir ischémie.

**Ischémie** : Arrêt ou diminution de l'apport sanguin artériel dans un tissu ou un organe. Une ischémie prolongée entraîne l'hypoxie (diminution de l'oxygène) des tissus touchés et peut causer des dommages permanents.

**Membrane basale** : Mince couche de matrice extracellulaire spécialisée séparant l'endothélium du tissu conjonctif sous jacent.

**Morbidité** : Au sein d'une population déterminée, nombre de personnes malades ou de cas de maladie enregistrés à un moment donné ou pendant une période déterminée. Elle peut être exprimée soit en fonction des cas nouveaux (incidence), soit de l'ensemble des cas, anciens et nouveaux (prévalence).

**Nombre de Reynolds (Re)**: Nombre sans dimensions exprimant le rapport entre les forces d'inertie et les forces de viscosité d'un écoulement.

**Perméabilité** : Le terme perméabilité peut être utilisé dans deux sens, soit la propriété des corps, parois ou membranes qui, situées entre deux structures, se laissent traverser par un fluide, soit le sens de liberté d'un canal. La perméabilité d'une prothèse se rapporte à la liberté de sa lumière.

**Pinocytose** : Absorption par une cellule de gouttelettes de liquide du milieu extracellulaire par invagination de la membrane plasmique et formation d'endosomes.

**Plasticité** : Propriété que possède un corps de conserver de façon permanente des modifications dimensionnelles après suppression de la contrainte qui les a provoquées.

**Prostacyclines (PGI<sub>2</sub>)**: Dérivé de l'acide arachidonique de structure voisine de celle des prostaglandines. La prostacycline PGI<sub>2</sub> est l'antiagrégant plaquettaire le plus actif actuellement connu. C'est aussi un puissant vasodilatateur.

**Proto-oncogène** : Gène normal qui encode une protéine généralement impliquée dans la régulation de la croissance ou de la différenciation cellulaire qui peut être muté en oncogène favorisant la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses.

**Resténose**: Rétrécissement de 50% ou plus de la lumière d'une artère suite à une intervention chirurgicale visant à rétablir la circulation sanguine normale (pose d'un tuteur ou d'une prothèse, angioplastie).

**Rhéologie du sang** : Déformation et écoulement des globules rouges et blancs dans la circulation sous l'influence des contraintes qui leurs sont appliquées.

**Stent** : voir Tuteur.

*Sténosé* : Qui se rapporte à l'étranglement ou au rétrécissement anormal permanent du calibre d'un canal, d'un orifice ou d'un organe creux (par exemple, une artère sténosée a un diamètre interne réduit pouvant rendre la circulation sanguine difficile).

*Thromboxane A<sub>2</sub>* : Forme active du thromboxane induisant activement l'agrégation et la dégranulation des plaquettes sanguines, et possédant une activité vasoconstrictrice. Très instable, cette forme est rapidement hydrolysée en thromboxane B<sub>2</sub>, inactive.

*Tuteur (stent)* : Petit treillis cylindrique flexible, généralement métallique, que l'on implante dans une artère pour maintenir la paroi du vaisseau et assurer autant que possible l'intégrité du diamètre de sa lumière.

\* Les définitions de ce glossaire proviennent en majorité du grand dictionnaire terminologique de l'office québécois de la langue française (<http://w3.granddictionnaire.com>) et de l'encyclopédie libre Wikipedia (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Accueil>)

## Références

1. Le nouveau visage des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux au Canada: Fondation des maladies du cœur du Canada (Statistique Canada); 1999 octobre.
2. Mortalité : liste sommaire des causes. Données de 2000 à 2005: Statistiques Canada; 2005. Report No.: 84F0209X.
3. Moneta, G.L., Porter, J.M. Arterial substitutes in peripheral vascular surgery: a review. *J Long Term Eff Med Implants* 1995;5:47-67.
4. Sipehia, R., Liszkowski, M., Lu, A. In vivo evaluation of ammonia plasma modified ePTFE grafts for small diameter blood vessels replacement. A preliminary report. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2001;42:537-42.
5. Swedberg, S.H., Brown, B.G., Sigley, R., Wight, T.N., Gordon, D., Nicholls, S.C. Intimal fibromuscular hyperplasia at the venous anastomosis of PTFE grafts in hemodialysis patients. Clinical, immunocytochemical, light and electron microscopic assessment. *Circulation* 1989;80:1726-36.
6. Anatomie et fibromyalgie. 01/07/2007 [cited; Available from: [www.fibromyalgiesos.com/FM/anatomie.html](http://www.fibromyalgiesos.com/FM/anatomie.html)].
7. Tortora, G.J., Grabowsky, S.R. Principes d'anatomie et de physiologie. Edition Renouveau Pédagogique Inc. ed. Québec: John Wiley & Sons Inc.; 2001.
8. Laliberté, A. Hémostase. Le Griffon d'Argile ed. Québec; 1999.
9. Eckert, R., Randall, D., Burggren, W., French, K. *Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. Fourth ed. New-York: W.H. Freeman and Company; 1997.
10. Collet, J.P., Choussat, R., Montalescot, G. [Platelet aggregation and antiplatelet agents in acute coronary syndromes]. *Med Sci (Paris)* 2004;20:291-7.
11. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., *et al.* *Molecular Cell Biology*. Fifth ed. New-York: Sara Tenney; 2003.
12. Génétique. 2007 [cited; Available from: [www.edu.upmc.fr/.../applications/indirecte.html](http://www.edu.upmc.fr/.../applications/indirecte.html)].
13. Owens, J.M. Biology for Engineers I /Blood pressure in circulatory system 01/09/06 [cited 2007; Available from: [http://www.agen.ufl.edu/~chyn/age2062/lect/lect\\_20/30\\_12.GIF](http://www.agen.ufl.edu/~chyn/age2062/lect/lect_20/30_12.GIF)].
14. Fox, S.I. *Human Physiology* 4th: Brown Publishers.
15. Berthon, O. La circulation veineuse 2003. 14/05/2003 [cited 2006; Available from: [http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-circulation-veineuse\\_231/c3/221/p2/](http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-circulation-veineuse_231/c3/221/p2/)].
16. Sumpio, B.E., Riley, J.T., Dardik, A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:1508-12.
17. Williamson, M.R., Shuttleworth, A., Canfield, A.E., Black, R.A., Kielty, C.M. The role of endothelial cell attachment to elastic fibre molecules in the enhancement of monolayer formation and retention, and the inhibition of smooth muscle cell recruitment. *Biomaterials* 2007;28:5307-18.
18. Owens, J.M. Biology for Engineers I / Filtration across capillary walls. 01/09/06 [cited 2007; Available from: [http://www.agen.ufl.edu/~chyn/age2062/lect/lect\\_20/30\\_17.GIF](http://www.agen.ufl.edu/~chyn/age2062/lect/lect_20/30_17.GIF)].

19. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
20. Cowles, R.A. Arteriosclerosis of the extremities 2008. 20 October 2008 [cited 2008; A.D.A.M., Inc. :[Available from: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/18077.htm>
21. Meddahi-Pelle, A., Bataille, I., Subra, P., Letourneur, D. [Vascular biomaterials : From biomedical engineering to tissue engineering]. *Med Sci (Paris)* 2004;20:679-84.
22. technologies, S.d.é.d. Échographie-Doppler dans l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs: Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé; 2002 Juin.
23. Caplice, N.M. The Artificial Artery. *Curr Interv Cardiol Rep* 2000;2:7-10.
24. Vara, D.S., Salacinski, H.J., Kannan, R.Y., Bordenave, L., Hamilton, G., Seifalian, A.M. Cardiovascular tissue engineering: state of the art; *Ingenierie tissulaire appliqué aux vaisseaux sanguins : état de l'art. Pathologie Biologie* 2004;1-14.
25. Gandelman, G. Coronary artery balloon angioplasty - series: Procedure, part 3 and 4. 2007. [cited; A.D.A.M., Inc.: [Available from: [http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/presentations/100160\\_5.htm](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/presentations/100160_5.htm)
26. Cowles, R.A. Heart bypass surgery - series: Procedure, part 3 2008. 31 October 2008 [cited; A.D.A.M., Inc.: [Available from: [http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/presentations/100190\\_5.htm](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/presentations/100190_5.htm)
27. Society of Interventional Radiology. 2008. [cited; Available from: <http://www.sirweb.org/patients/abdominal-aortic-aneurysms/>
28. Salacinski, H.J., Goldner, S., Giudiceandrea, A., Hamilton, G., Seifalian, A.M., Edwards, A., *et al.* The mechanical behavior of vascular grafts: a review. *J Biomater Appl* 2001;15:241-78.
29. Seifalian, A.M., Tiwari, A., Hamilton, G., Salacinski, H.J. Improving the clinical patency of prosthetic vascular and coronary bypass grafts: the role of seeding and tissue engineering. *Artif Organs* 2002;26:307-20.
30. Dee, K.C., Puleo, D.A., Bizios, R. *An Introduction To Tissue-Biomaterial Interaction*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.; 2002.
31. Harrison, J.H. Synthetic materials as vascular prostheses. II. A comparative study of nylon, dacron, orlon, ivalon sponge and teflon in large blood vessels with tensile strength studies. *Am J Surg* 1958;95:16-24.
32. Kannan, R.Y., Salacinski, H.J., Butler, P.E., Hamilton, G., Seifalian, A.M. Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;74:570-81.
33. Campbell, C.D., Goldfarb, D., Roe, R. A small arterial substitute: expanded microporous polytetrafluoroethylene: patency versus porosity. *Ann Surg* 1975;182:138-43.
34. Bos, G.W., Poot, A.A., Beugeling, T., van Aken, W.G., Feijen, J. Small-diameter vascular graft prostheses: current status. *Arch Physiol Biochem* 1998;106:100-15.
35. Prager, M., Polterauer, P., Bohmig, H.J., Wagner, O., Fugl, A., Kretschmer, G., *et al.* Collagen versus gelatin-coated Dacron versus stretch polytetrafluoroethylene in abdominal aortic bifurcation graft surgery: results of a seven-year prospective, randomized multicenter trial. *Surgery* 2001;130:408-14.

36. Klinkert, P., Post, P.N., Breslau, P.J., van Bockel, J.H. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;27:357-62.
37. Pereira, C.E., Albers, M., Romiti, M., Brochado-Neto, F.C., Pereira, C.A. Meta-analysis of femoropopliteal bypass grafts for lower extremity arterial insufficiency. *J Vasc Surg* 2006;44:510-517.
38. Gumpenberger, T., Heitz, J., Bauerle, D., Kahr, H., Graz, I., Romanin, C., *et al.* Adhesion and proliferation of human endothelial cells on photochemically modified polytetrafluoroethylene. *Biomaterials* 2003;24:5139-44.
39. Berliner, S.D. Clinical experience with an inlay expanded polytetrafluoroethylene soft tissue patch as an adjunct in inguinal hernia repair. *Surg Gynecol Obstet* 1993;176:323-6.
40. Maas, C.S., Gnepp, D.R., Bumpous, J. Expanded polytetrafluoroethylene (Gore-Tex soft-tissue patch) in facial augmentation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119:1008-14.
41. Erdoes, L.S., Berman, S.S., Bernhard, V.M., Mulcahy, M., Hunter, G.C. Clinical and CT evaluation of a new stretch polytetrafluoroethylene aortic graft. *Ann Vasc Surg* 1995;9:441-7.
42. Charbit, Y., Hitzig, C., Bolla, M., Bitton, C., Bertrand, M.F. Comparative study of physical properties of three suture materials: silk, e-PTFE (Gore-Tex), and PLA/PGA (Vicryl). *Biomed Instrum Technol* 1999;33:71-5.
43. Miloro, M., Halkias, L.E., Mallery, S., Travers, S., Rashid, R.G. Low-level laser effect on neural regeneration in Gore-Tex tubes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:27-34.
44. Tseng, D.Y., Edelman, E.R. Effects of amide and amine plasma-treated ePTFE vascular grafts on endothelial cell lining in an artificial circulatory system. *J Biomed Mater Res* 1998;42:188-98.
45. Greenwald, S.E., Berry, C.L. Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties. *J Pathol* 2000;190:292-9.
46. Berger, K., Sauvage, L.R., Rao, A.M., Wood, S.J. Healing of arterial prostheses in man: its incompleteness. *Ann Surg* 1972;175:118-27.
47. Falkenback, D., Lundberg, F., Ribbe, E., Ljungh, A. Exposure of plasma proteins on Dacron and ePTFE vascular graft material in a perfusion model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19:468-75.
48. Paulsson, M., Ljungh, A., Wadstrom, T. Rapid identification of fibronectin, vitronectin, laminin, and collagen cell surface binding proteins on coagulase-negative staphylococci by particle agglutination assays. *J Clin Microbiol* 1992;30:2006-12.
49. Pitt, W.G., Cooper, S.L. FTIR-ATR studies of the effect of shear rate upon albumin adsorption onto polyurethaneurea. *Biomaterials* 1986;7:340-7.
50. Fabrizio-Homan, D.J., Cooper, S.L. Competitive adsorption of vitronectin with albumin, fibrinogen, and fibronectin on polymeric biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1991;25:953-71.
51. Tai, N.R., Salacinski, H.J., Edwards, A., Hamilton, G., Seifalian, A.M. Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. *Br J Surg* 2000;87:1516-24.
52. Martin, K.A., Merenick, B.L., Ding, M., Fetalvero, K.M., Rzcudlo, E.M., Kozul, C.D., *et al.* Rapamycin Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation

- through Insulin Receptor Substrate-1/Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt2 Feedback Signaling. *J Biol Chem* 2007;282:36112-36120.
53. Schwartz, S.M., Campbell, G.R., Campbell, J.H. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res* 1986;58:427-44.
  54. Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., *et al.* Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002;8:403-9.
  55. Simper, D., Stalboerger, P.G., Panetta, C.J., Wang, S., Caplice, N.M. Smooth Muscle Progenitor Cells in Human Blood. *Circulation* 2002;106:1199-1204.
  56. Wang, C.-H., Anderson, N., Li, S.-H., Szmítko, P.E., Cherng, W.-J., Fedak, P.W.M., *et al.* Stem Cell Factor Deficiency Is Vasculoprotective: Unraveling a New Therapeutic Potential of Imatinib Mesylate. *Circ Res* 2006;99:617-625.
  57. Hollenbeck, S.T., Sakakibara, K., Faries, P.L., Workhu, B., Liu, B., Kent, K.C. Stem cell factor and c-kit are expressed by and may affect vascular SMCs through an autocrine pathway. *Journal of Surgical Research* 2004;120:288-294.
  58. Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N.R., *et al.* Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002;109:625-37.
  59. Miyamoto, T., Sasaguri, Y., Sasaguri, T., Azakami, S., Yasukawa, H., Kato, S., *et al.* Expression of stem cell factor in human aortic endothelial and smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1997;129:207-213.
  60. Taylor, M.L., Metcalfe, D.D. Kit signal transduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000;14:517-35.
  61. Roy-Chaudhury, P., Kelly, B.S., Miller, M.A., Reaves, A., Armstrong, J., Nanayakkara, N., *et al.* Venous neointimal hyperplasia in polytetrafluoroethylene dialysis grafts. *Kidney Int* 2001;59:2325-34.
  62. Ruiz, M. Cell membrane detailed diagram. 2007. 31 jan 2007 [cited; Available from: [http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Cell\\_membrane\\_detailed\\_diagram.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Cell_membrane_detailed_diagram.svg)
  63. Davis, G.E., Senger, D.R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 2005;97:1093-107.
  64. Rice, J., Courter, D.L., Giachelli, C.M., Scatena, M. Molecular mediators of alphavbeta3-induced endothelial cell survival. *J Vasc Res* 2006;43:422-36.
  65. Hynes, R.O. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol* 1999;9:M33-7.
  66. Hynes, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673-87.
  67. Schwartz, M.A., Stone, A.L., Greer, K.A., Hoying, J.B., Williams, S.K. Gene expression in tissue associated with extracellular matrix modified ePTFE. *J Biomed Mater Res A* 2005;73:30-8.
  68. Kidd, K.R., Dal Ponte, D., Stone, A.L., Hoying, J.B., Nagle, R.B., Williams, S.K. Stimulated endothelial cell adhesion and angiogenesis with laminin-5 modification of expanded polytetrafluoroethylene. *Tissue Eng* 2005;11:1379-91.
  69. Lee, M.H., Ducheyne, P., Lynch, L., Boettiger, D., Composto, R.J. Effect of biomaterial surface properties on fibronectin-alpha(5)beta(1) integrin interaction and cellular attachment. *Biomaterials* 2006;27:1907-1916.



70. Grainger, D.W., Pavon-Djavid, G., Migonney, V., Josefowicz, M. Assessment of fibronectin conformation adsorbed to polytetrafluoroethylene surfaces from serum protein mixtures and correlation to support of cell attachment in culture. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003;14:973-88.
71. Lu, A., Sipehia, R. Antithrombotic and fibrinolytic system of human endothelial cells seeded on PTFE: the effects of surface modification of PTFE by ammonia plasma treatment and ECM protein coatings. *Biomaterials* 2001;22:1439-46.
72. Bergkvist, M., Carlsson, J., Oscarsson, S. Surface-dependent conformations of human plasma fibronectin adsorbed to silica, mica, and hydrophobic surfaces, studied with use of Atomic Force Microscopy. *J Biomed Mater Res* 2003;64A:349-56.
73. Jönsson, U., Ivarsson, B., Lundström, I., Berghem, L. Adsorption behavior of fibronectin on well-characterized silica surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 1982;90:148-163.
74. Grinnell, F., Feld, M.K. Adsorption characteristics of plasma fibronectin in relationship to biological activity. *J Biomed Mater Res* 1981;15:363-81.
75. Lévesque, S., Thibault, J., Castonguay, M., Gaudreault, R.C., Laroche, G. Modification of lipid transport through a microporous PTFE membrane wall grafted with poly(ethylene glycol). *Colloids and Surfaces* 2002;25:205-217.
76. Deible, C.R., Beckman, E.J., Russell, A.J., Wagner, W.R. Creating molecular barriers to acute platelet deposition on damaged arteries with reactive polyethylene glycol. *J Biomed Mater Res* 1998;41:251-6.
77. Deible, C.R., Petrosko, P., Johnson, P.C., Beckman, E.J., Russell, A.J., Wagner, W.R. Molecular barriers to biomaterial thrombosis by modification of surface proteins with polyethylene glycol. *Biomaterials* 1998;19:1885-93.
78. Deible, C.R., Petrosko, P., Johnson, P.C., Beckman, E.J., Russell, A.J., Wagner, W.R. Molecular barriers to biomaterial thrombosis by modification of surface proteins with polyethylene glycol. *Biomaterials* 1999;20:101-9.
79. Zhang, Q., Wang, C., Babukutty, Y., Ohyama, T., Kogoma, M., Kodama, M. Biocompatibility evaluation of ePTFE membrane modified with PEG in atmospheric pressure glow discharge. *J Biomed Mater Res* 2002;60:502-9.
80. Chupa, J.M., Foster, A.M., Sumner, S.R., Madihally, S.V., Matthew, H.W. Vascular cell responses to polysaccharide materials: in vitro and in vivo evaluations. *Biomaterials* 2000;21:2315-22.
81. Andrews, W.E., Hassinger, J.T., Blair, E., Mackay, A.G. Prevention of early failure in prosthetic arterial grafts: evaluation of dextran-70. *Surgery* 1969;66:535-9.
82. Machy, D., Carteron, P., Jozefonvicz, J. A new vascular polyester prosthesis impregnated with cross-linked dextran. *J Biomater Sci Polym Ed* 2002;13:963-75.
83. Campbell, E.J., O'Byrne, V., Stratford, P.W., Quirk, I., Vick, T.A., Wiles, M.C., *et al.* Biocompatible surfaces using methacryloylphosphorylcholine laurylmethacrylate copolymer. *Asaio J* 1994;40:M853-7.
84. Chen, C., Ofenloch, J.C., Yianni, Y.P., Hanson, S.R., Lumsden, A.B. Phosphorylcholine coating of ePTFE reduces platelet deposition and neointimal hyperplasia in arteriovenous grafts. *J Surg Res* 1998;77:119-25.
85. Hayward, J.A., Chapman, D. Biomembrane surfaces as models for polymer design: the potential for haemocompatibility. *Biomaterials* 1984;5:135-42.

86. Ishihara, K., Hanyuda, H., Nakabayashi, N. Synthesis of phospholipid polymers having a urethane bond in the side chain as coating material on segmented polyurethane and their platelet adhesion-resistant properties. *Biomaterials* 1995;16:873-9.
87. Iwasaki, Y., Nakabayashi, N., Nakatani, M., Mihara, T., Kurita, K., Ishihara, K. Competitive adsorption between phospholipid and plasma protein on a phospholipid polymer surface. *J Biomater Sci Polym Ed* 1999;10:513-29.
88. Ishihara, K., Oshida, H., Endo, Y., Ueda, T., Watanabe, A., Nakabayashi, N. Hemocompatibility of human whole blood on polymers with a phospholipid polar group and its mechanism. *J Biomed Mater Res* 1992;26:1543-52.
89. Iwasaki, Y., Ishihara, K., Nakabayashi, N., Khang, G., Jeon, J.H., Lee, J.W., *et al.* Platelet adhesion on the gradient surfaces grafted with phospholipid polymer. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9:801-16.
90. Baumann, H., Keller, R. Which glycosaminoglycans are suitable for antithrombogenic or athrombogenic coatings of biomaterials? Part II: Covalently immobilized endothelial cell surface heparan sulfate (ESHS) and heparin (HE) on synthetic polymers and results of animal experiments. *Semin Thromb Hemost* 1997;23:215-23.
91. Ritter, E.F., Kim, Y.B., Reischl, H.P., Serafin, D., Rudner, A.M., Klitzman, B. Heparin coating of vascular prostheses reduces thromboemboli. *Surgery* 1997;122:888-92.
92. Sefton, M.V., Sawyer, A., Gorbet, M., Black, J.P., Cheng, E., Gemmell, C., *et al.* Does surface chemistry affect thrombogenicity of surface modified polymers? *J Biomed Mater Res* 2001;55:447-59.
93. Guidoin, R., Marois, Y., Deng, X., Chakfe, N., Marois, M., Roy, R., *et al.* Can collagen impregnated polyester arterial prostheses be recommended as small diameter blood conduits? *Asaio J* 1996;42:974-83.
94. Vohra, R., Thomson, G.J., Carr, H.M., Sharma, H., Walker, M.G. Comparison of different vascular prostheses and matrices in relation to endothelial seeding. *Br J Surg* 1991;78:417-20.
95. Walluscheck, K.P., Steinhoff, G., Kelm, S., Haverich, A. Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;12:321-30.
96. Laredo, J., Xue, L., Husak, V.A., Ellinger, J., Greisler, H.P. Silyl-heparin adsorption improves the in vivo thromboresistance of carbon-coated polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Am J Surg* 2003;186:556-60.
97. Mantovani, D., Castonguay, M., Pageau, J.F., Fiset, M., Laroche, G. Ammonia RF-plasma treatment of tubular ePTFE vascular prostheses. *Plasmas and Polymers* 1999;4:207-228.
98. Pu, F.R., Williams, R.L., Markkula, T.K., Hunt, J.A. Expression of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules on monocyte adhesion to human endothelial cells on plasma treated PET and PTFE in vitro. *Biomaterials* 2002;23:4705-18.
99. Heitz, J., Svorcik, V., Bacakova, L., Rockova, K., Ratajova, E., Gumpenberger, T., *et al.* Cell adhesion on polytetrafluoroethylene modified by UV-irradiation in an ammonia atmosphere. *J Biomed Mater Res A* 2003;67:130-7.

100. Mikulikova, R., Moritz, S., Gumpenberger, T., Olbrich, M., Romanin, C., Bacakova, L., *et al.* Cell microarrays on photochemically modified polytetrafluoroethylene. *Biomaterials* 2005;26:5572-80.
101. Chevallier, P., Castonguay, M., Turgeon, S., Dubrulle, N., Mantovani, D., McBreen, P.H., *et al.* Ammonia RF-plasma on PTFE surfaces: chemical characterization of the species created on the surface by vapor-phase chemical derivatization. *J Phys Chem B* 2001;105:12490-12497.
102. Sipehia, R., Martucci, G., Lipscombe, J. Transplantation of human endothelial cell monolayer on artificial vascular prosthesis: the effect of growth-support surface chemistry, cell seeding density, ECM protein coating, and growth factors. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1996;24:51-63.
103. Chen, M., Zamora, P.O., Som, P., Pena, L.A., Osaki, S. Cell attachment and biocompatibility of polytetrafluoroethylene (PTFE) treated with glow-discharge plasma of mixed ammonia and oxygen. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003;14:917-35.
104. Dekker, A., Reitsma, K., Beugeling, T., Bantjes, A., Feijen, J., van Aken, W.G. Adhesion of endothelial cells and adsorption of serum proteins on gas plasma-treated polytetrafluoroethylene. *Biomaterials* 1991;12:130-8.
105. Risau, W., Lemmon, V. Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Biol* 1988;125:441-50.
106. Sottile, J., Hocking, D.C. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell* 2002;13:3546-59.
107. Velling, T., Risteli, J., Wennerberg, K., Mosher, D.F., Johansson, S. Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1. *J Biol Chem* 2002;277:37377-81.
108. Chung, C.Y., Erickson, H.P. Glycosaminoglycans modulate fibronectin matrix assembly and are essential for matrix incorporation of tenascin-C. *J Cell Sci* 1997;110 ( Pt 12):1413-9.
109. Roman, J., McDonald, J.A. Fibulin's organization into the extracellular matrix of fetal lung fibroblasts is dependent on fibronectin matrix assembly. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8:538-45.
110. Pereira, M., Rybarczyk, B.J., Odrliin, T.M., Hocking, D.C., Sottile, J., Simpson-Haidaris, P.J. The incorporation of fibrinogen into extracellular matrix is dependent on active assembly of a fibronectin matrix. *J Cell Sci* 2002;115:609-17.
111. Hynes, R.O., Zhao, Q. The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol* 2000;150:F89-96.
112. Whittaker, C.A., Bergeron, K.F., Whittle, J., Brandhorst, B.P., Burke, R.D., Hynes, R.O. The echinoderm adhesome. *Dev Biol* 2006;300:252-66.
113. Ingham, K.C. Molecular Interaction of Fibronectin. 2003. mai 2005 [cited 2003; Available from: <http://home.comcast.net/~kennethingham/newsite/index.htm>
114. Miyamoto, S., Katz, B.Z., Lafrenie, R.M., Yamada, K.M. Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1998;857:119-29.
115. Ingham, K.C. Molecular Interaction of Fibronectin. May 2005 [cited 2005; Available from: <http://home.comcast.net/~kennethingham/newsite/index.htm>
116. Schwartz, M.A., Schaller, M.D., Ginsberg, M.H. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:549-99.

117. Wu, C. Roles of integrins in fibronectin matrix assembly. *Histol Histopathol* 1997;12:233-40.
118. Giancotti, F.G., Ruoslahti, E. Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028-32.
119. Koenig, A.L., Gambillara, V., Grainger, D.W. Correlating fibronectin adsorption with endothelial cell adhesion and signaling on polymer substrates. *J Biomed Mater Res A* 2003;64:20-37.
120. Erickson, H.P., Carrell, N.A. Fibronectin in extended and compact conformations. Electron microscopy and sedimentation analysis. *J Biol Chem* 1983;258:14539-44.
121. Johnson, K.J., Sage, H., Briscoe, G., Erickson, H.P. The compact conformation of fibronectin is determined by intramolecular ionic interactions. *J Biol Chem* 1999;274:15473-9.
122. Williams, E.C., Janmey, P.A., Ferry, J.D., Mosher, D.F. Conformational states of fibronectin. Effects of pH, ionic strength, and collagen binding. *J Biol Chem* 1982;257:14973-8.
123. Chevallier, P., Janvier, R., Mantovani, D., Laroche, G. In vitro biological performances of phosphorylcholine-grafted ePTFE prostheses through RFGD plasma techniques. *Macromol Biosci* 2005;5:829-39.
124. Gauvreau, V., Chevallier, P., Vallieres, K., Petitclerc, E., Gaudreault, R.C., Laroche, G. Engineering Surfaces for Bioconjugation: Developing Strategies and Quantifying the Extent of the Reactions. *Bioconjug Chem* 2004;15:1146-1156.
125. Esquivel, C.O., Bjorck, C.G., Bergentz, S.E., Bergqvist, D., Larsson, R., Carson, S.N., *et al.* Reduced thrombogenic characteristics of expanded polytetrafluoroethylene and polyurethane arterial grafts after heparin bonding. *Surgery* 1984;95:102-7.
126. Salacinski, H.J., Odlyha, M., Hamilton, G., Seifalian, A.M. Thermo-mechanical analysis of a compliant poly(carbonate-urea)urethane after exposure to hydrolytic, oxidative, peroxidative and biological solutions. *Biomaterials* 2002;23:2231-40.
127. Zhang, Z., Marois, Y., Guidoin, R.G., Bull, P., Marois, M., How, T., *et al.* Vascugraft polyurethane arterial prosthesis as femoro-popliteal and femoro-peroneal bypasses in humans: pathological, structural and chemical analyses of four excised grafts. *Biomaterials* 1997;18:113-24.
128. Walpoth, B.H., Pavlicek, M., Celik, B., Nicolaus, B., Schaffner, T., Althaus, U., *et al.* Prevention of neointimal proliferation by immunosuppression in synthetic vascular grafts. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;19:487-92.
129. Harada, M., Takenaka, H., Ikenaga, S., Zhang, H., Zempo, N., Esato, K., *et al.* Hepatocyte growth factor prevents intimal hyperplasia in rabbit carotid expanded polytetrafluoroethylene grafting. *J Vasc Surg* 2002;35:786-91.
130. Hayashi, K., Nakamura, S., Morishita, R., Moriguchi, A., Aoki, M., Matsumoto, K., *et al.* In vivo transfer of human hepatocyte growth factor gene accelerates re-endothelialization and inhibits neointimal formation after balloon injury in rat model. *Gene Ther* 2000;7:1664-71.
131. Ohkawara, N., Ueda, H., Shinozaki, S., Kitajima, T., Ito, Y., Asaoka, H., *et al.* Hepatocyte growth factor fusion protein having collagen-binding activity (CBD-HGF) accelerates re-endothelialization and intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *J Atheroscler Thromb* 2007;14:185-91.

132. Hofmann, W.J., Kopp, M., Sedlmayer, F., Trubel, W., Kogelnik, H.D., Magometschnigg, H. External beam radiation for prevention of intimal hyperplasia in peripheral arterial bypasses. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:1180-3.
133. van Tongeren, R.B., Levendag, P.C., Coen, V.L., Schmitz, P.I., Gescher, F.M., Vernhout, R.M., *et al.* External beam radiation therapy to prevent anastomotic intimal hyperplasia in prosthetic arteriovenous fistulas: results of a randomized trial. *Radiother Oncol* 2003;69:73-7.
134. Ducasse, E., Cosset, J.M., Eschwege, F., Creusy, C., Chevalier, J., Puppink, P., *et al.* External beam ionizing radiation for inhibition of myointimal hyperplasia after dilatation and anastomoses: experimental models and results. *Ann Vasc Surg* 2004;18:108-14.
135. Soni, A.B., Illig, K.A., Sternbach, Y., Anthony, P., Jacob, P., Reddy, G., *et al.* Benefits of external beam irradiation for peripheral arterial bypass: preliminary report on a phase I study. *International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics* 2002;54:1174-1179.
136. Oh, Y.-T., Kim, H.-S., Chun, M., Kang, H., Yoon, M.-H., Kim, J.-S., *et al.* The effect of external electron beam on neointima in rat carotid artery injury model. *International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics* 1999;44:643-648.
137. Wang, Y., Bai, Y., Qin, L., Zhang, P., Yi, T., Teesdale, S.A., *et al.* Interferon- $\gamma$  Induces Human Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Intimal Expansion by Phosphatidylinositol 3-Kinase Dependent Mammalian Target of Rapamycin Raptor Complex 1 Activation. *Circ Res* 2007;101:560-569.
138. Cagiannos, C., Abul-Khoudoud, O.R., DeRijk, W., Shell Iv, D.H., Jennings, L.K., Tolley, E.A., *et al.* Rapamycin-coated expanded polytetrafluoroethylene bypass grafts exhibit decreased anastomotic neointimal hyperplasia in a porcine model. *Journal of Vascular Surgery* 2005;42:980-988.
139. Lehle, K., Schreml, S., Kunz-Schughart, L.A., Rupprecht, L., Birnbaum, D.E., Schmid, C., *et al.* mTOR Inhibitors and Calcineurin Inhibitors Do Not Affect Adhesion Molecule Expression of Human Macro- and Microvascular Endothelial Cells. *J Vasc Res* 2008;45:333-342.
140. Duda, S.H., Poerner, T.C., Wiesinger, B., Rundback, J.H., Tepe, G., Wiskirchen, J., *et al.* Drug-eluting stents: potential applications for peripheral arterial occlusive disease. *J Vasc Interv Radiol* 2003;14:291-301.
141. Dordunoo, S.K., Burt, H.M. Solubility and stability of taxol: effects of buffers and cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* 1996;133:191-201.
142. Kraitzer, A., Kloog, Y., Zilberman, M. Approaches for prevention of restenosis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;85:583-603.
143. Ebos, J.M., Tran, J., Master, Z., Dumont, D., Melo, J.V., Buchdunger, E., *et al.* Imatinib mesylate (STI-571) reduces Bcr-Abl-mediated vascular endothelial growth factor secretion in chronic myelogenous leukemia. *Mol Cancer Res* 2002;1:89-95.
144. Leppanen, O., Rutanen, J., Hiltunen, M.O., Rissanen, T.T., Turunen, M.P., Sjoblom, T., *et al.* Oral Imatinib Mesylate (STI571/Gleevec) Improves the Efficacy of Local Intravascular Vascular Endothelial Growth Factor-C Gene Transfer in Reducing Neointimal Growth in Hypercholesterolemic Rabbits. *Circulation* 2004;109:1140-6.
145. Lin, B., Podar, K., Gupta, D., Tai, Y.T., Li, S., Weller, E., *et al.* The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584

- inhibits growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer Res* 2002;62:5019-26.
146. Chapman, T.M., Goa, K.L. Cilostazol: a review of its use in intermittent claudication. *Am J Cardiovasc Drugs* 2003;3:117-38.
  147. Favot, L., Keravis, T., Holl, V., Le Bec, A., Lugnier, C. VEGF-induced HUVEC migration and proliferation are decreased by PDE2 and PDE4 inhibitors. *Thromb Haemost* 2003;90:334-43.
  148. Leitman, D.C., Fiscus, R.R., Murad, F. Forskolin, phosphodiesterase inhibitors, and cyclic AMP analogs inhibit proliferation of cultured bovine aortic endothelial cells. *J Cell Physiol* 1986;127:237-43.
  149. Dichtl, W., Dulak, J., Frick, M., Alber, H.F., Schwarzacher, S.P., Ares, M.P., *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:58-63.
  150. Mattingly, R.R., Gibbs, R.A., Menard, R.E., Reiners, J.J., Jr. Potent suppression of proliferation of a10 vascular smooth muscle cells by combined treatment with lovastatin and 3-allylfarnesol, an inhibitor of protein farnesyltransferase. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:74-81.
  151. Yu, Z., Xu, F., Huse, L.M., Morisseau, C., Draper, A.J., Newman, J.W., *et al.* Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res* 2000;87:992-8.
  152. Davis, B.B., Thompson, D.A., Howard, L.L., Morisseau, C., Hammock, B.D., Weiss, R.H. Inhibitors of soluble epoxide hydrolase attenuate vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2222-7.
  153. Kaji, T., Fujiwara, Y., Hamada, C., Yamamoto, C., Shimada, S., Lee, J.B., *et al.* Inhibition of cultured bovine aortic endothelial cell proliferation by sodium spirulan, a new sulfated polysaccharide isolated from *Spirulina platensis*. *Planta Med* 2002;68:505-9.
  154. Kaji, T., Okabe, M., Shimada, S., Yamamoto, C., Fujiwara, Y., Lee, J.B., *et al.* Sodium spirulan as a potent inhibitor of arterial smooth muscle cell proliferation in vitro. *Life Sci* 2004;74:2431-9.
  155. Miettinen, M., Sarlomo-Rikala, M., Lasota, J. KIT expression in angiosarcomas and fetal endothelial cells: lack of mutations of exon 11 and exon 17 of C-kit. *Mod Pathol* 2000;13:536-41.
  156. Duensing, A., Heinrich, M.C., Fletcher, C.D., Fletcher, J.A. Biology of gastrointestinal stromal tumors: KIT mutations and beyond. *Cancer Invest* 2004;22:106-16.
  157. Brash, J.L. Exploiting the current paradigm of blood-material interactions for the rational design of blood-compatible materials. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000;11:1135-46.
  158. Courtney, J.M., Lamba, N.M., Sundaram, S., Forbes, C.D. Biomaterials for blood-contacting applications. *Biomaterials* 1994;15:737-44.
  159. Vroman, L. The importance of surfaces in contact phase reactions. *Semin Thromb Hemost* 1987;13:79-85.
  160. Garcia, A.J., Vega, M.D., Boettiger, D. Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. *Mol Biol Cell* 1999;10:785-98.

161. Crombez, M., Chevallier, P., Gaudreault, R.C., Petitclerc, E., Mantovani, D., Laroche, G. Improving arterial prosthesis neo-endothelialization: application of a proactive VEGF construct onto PTFE surfaces. *Biomaterials* 2005;26:7402-9.
162. Zarge, J.I., Gosselin, C., Huang, P., Vorp, D.A., Severyn, D.A., Greisler, H.P. Platelet deposition on ePTFE grafts coated with fibrin glue with or without FGF-1 and heparin. *J Surg Res* 1997;67:4-8.
163. Randone, B., Cavallaro, G., Polistena, A., Cucina, A., Coluccia, P., Graziano, P., *et al.* Dual role of VEGF in pretreated experimental ePTFE arterial grafts. *J Surg Res* 2005;127:70-9.
164. Kowalczyńska, H.M., Nowak-Wyrzykowska, M., Dobkowski, J., Kolos, R., Kaminski, J., Makowska-Cynka, A., *et al.* Adsorption characteristics of human plasma fibronectin in relationship to cell adhesion. *J Biomed Mater Res* 2002;61:260-9.
165. Keselowsky, B.G., Collard, D.M., Garcia, A.J. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res A* 2003;66:247-59.
166. Allen, L.T., Tosetto, M., Miller, I.S., O'Connor D, P., Penney, S.C., Lynch, I., *et al.* Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interaction. *Biomaterials* 2006;27:3096-3108.
167. Chen, H., Chen, Y., Sheardown, H., Brook, M.A. Immobilization of heparin on a silicone surface through a heterobifunctional PEG spacer. *Biomaterials* 2005;26:7418-24.
168. Rozkiewicz, D.I., Kraan, Y., Werten, M.W., de Wolf, F.A., Subramaniam, V., Ravoo, B.J., *et al.* Covalent Microcontact Printing of Proteins for Cell Patterning. *Chemistry* 2006;
169. Longo, L., Vasapollo, G., Guascito, M.R., Malitesta, C. New insights from X-ray photoelectron spectroscopy into the chemistry of covalent enzyme immobilization, with glutamate dehydrogenase (GDH) on silicon dioxide as an example. *Anal Bioanal Chem* 2006;385:146-152.
170. Castner, D.G., Ratner, B.D. Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surface Science* 2002;500:28-60.
171. Jung, A., Berlin, P., Wolters, B. Biomolecule-compatible support structures for biomolecule coupling to physical measuring principle surfaces. *IEE Proc Nanobiotechnol* 2004;151:87-94.
172. Sharma, S.K., Sehgal, N., Kumar, A. Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics* 2003;3:307-316.
173. Stayton, P.S., El-Sayed, M.E.H., Murthy, N., Bulmus, V., Lackey, C., Cheung, C., *et al.* 'Smart' delivery systems for biomolecular therapeutics. *Orthodontics & Craniofacial Research* 2005;8:219-225.
174. Larsen, C.C., Kligman, F., Kottke-Marchant, K., Marchant, R.E. The effect of RGD fluorosurfactant polymer modification of ePTFE on endothelial cell adhesion, growth, and function. *Biomaterials* 2006;27:4846-55.
175. Gagne, L., Rivera, G., Laroche, G. Micropatterning with aerosols: application for biomaterials. *Biomaterials* 2006;27:5430-9.
176. Bora, U., Sharma, P., Kannan, K., Nahar, P. Photoreactive cellulose membrane-A novel matrix for covalent immobilization of biomolecules. *J Biotechnol* 2006;

177. Ngankam, A.P., Mao, G., Van Tassel, P.R. Fibronectin adsorption onto polyelectrolyte multilayer films. *Langmuir* 2004;20:3362-70.
178. Rozkiewicz, D.I., Kraan, Y., Werten, M.W., de Wolf, F.A., Subramaniam, V., Ravoo, B.J., *et al.* Covalent Microcontact Printing of Proteins for Cell Patterning. *Chemistry* 2006;12:6290-6297.
179. Redick, S.D., Settles, D.L., Briscoe, G., Erickson, H.P. Defining fibronectin's cell adhesion synergy site by site-directed mutagenesis. *J Cell Biol* 2000;149:521-7.
180. Keselowsky, B.G., Garcia, A.J. Quantitative methods for analysis of integrin binding and focal adhesion formation on biomaterial surfaces. *Biomaterials* 2005;26:413-8.
181. Vallieres, K., Petitclerc, E., Laroche, G. Covalent Grafting of Fibronectin onto Plasma-Treated PTFE: Influence of the Conjugation Strategy on Fibronectin Biological Activity. *Macromol Biosci* 2007;7:738-745.
182. Wang, M., Liechti, K.M., Wang, Q., White, J.M. Self-assembled silane monolayers: fabrication with nanoscale uniformity. *Langmuir* 2005;21:1848-57.
183. Veisoh, M., Zareie, M.H., Zhang, M. Highly Selective Protein Patterning on Gold-Silicon Substrates for Biosensor Applications. *Langmuir* 2002;18:6671-6678.
184. Stile, R.A., Barber, T.A., Castner, D.G., Healy, K.E. Sequential robust design methodology and X-ray photoelectron spectroscopy to analyze the grafting of hyaluronic acid to glass substrates. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002;61:391-398.
185. Garcia, A.J., Ducheyne, P., Boettiger, D. Cell Adhesion Strength Increases Linearly with Adsorbed Fibronectin Surface Density. *Tissue Engineering* 1997;3:197-206.
186. Zhang, Y., Chai, C., Jiang, X.S., Teoh, S.H., Leong, K.W. Fibronectin immobilized by covalent conjugation or physical adsorption shows different bioactivity on aminated-PET. *Materials Science and Engineering: C* 2007;27:213-219.
187. Zhang, Z., Yoo, R., Wells, M., Beebe, T.P., Jr., Biran, R., Tresco, P. Neurite outgrowth on well-characterized surfaces: preparation and characterization of chemically and spatially controlled fibronectin and RGD substrates with good bioactivity. *Biomaterials* 2005;26:47-61.
188. Jung, Y.C., Bhushan, B. Contact angle, adhesion and friction properties of micro- and nanopatterned polymers for superhydrophobicity. *Nanotechnology* 2006;17:4970-4980.
189. MacDonald, D.E., Markovic, B., Allen, M., Somasundaran, P., Boskey, A.L. Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials. *J Biomed Mater Res* 1998;41:120-30.
190. Skorstengaard, K., Jensen, M.S., Sahl, P., Petersen, T.E., Magnusson, S. Complete primary structure of bovine plasma fibronectin. *Eur J Biochem* 1986;161:441-53.
191. Majors, A.K., Sengupta, S., Willard, B., Kinter, M.T., Pyeritz, R.E., Jacobsen, D.W. Homocysteine Binds to Human Plasma Fibronectin and Inhibits Its Interaction With Fibrin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1354-1359.
192. Bhoday, J., De Silva, S., Xu, Q. The Molecular Mechanisms of Vascular Restenosis: Which Genes are Crucial? *Current Vascular Pharmacology* 2006;4:269-275.
193. Vamvakopoulos, J.E., Petrov, L., Aavik, S., Lehti, S., Aavik, E., Hayry, P. Synergistic suppression of rat neointimal hyperplasia by rapamycin and imatinib



- mesylate: implications for the prevention of accelerated arteriosclerosis. *J Vasc Res* 2006;43:184-92.
194. McCormick, C., Wadsworth, R.M., Jones, R.L., Kennedy, S. Prostacyclin analogues: the next drug-eluting stent? *Biochem Soc Trans* 2007;35:910-1.
  195. Popowich, D.A., Varu, V., Kibbe, M.R. Nitric oxide: what a vascular surgeon needs to know. *Vascular* 2007;15:324-35.
  196. Gauvreau, V., Laroche, G. Micropattern printing of adhesion, spreading, and migration peptides on poly(tetrafluoroethylene) films to promote endothelialization. *Bioconjug Chem* 2005;16:1088-97.
  197. Vallieres, K., Chevallier, P., Sarra-Bournet, C., Turgeon, S., Laroche, G. AFM imaging of immobilized fibronectin: does the surface conjugation scheme affect the protein orientation/conformation? *Langmuir* 2007;23:9745-51.
  198. Clowes, A.W., Reidy, M.A., Clowes, M.M. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983;49:327-33.
  199. Reidy, M.A. A reassessment of endothelial injury and arterial lesion formation. *Lab Invest* 1985;53:513-20.
  200. Wang, C.-H., Verma, S., Hsieh, I.C., Hung, A., Cheng, T.-T., Wang, S.-Y., *et al.* Stem Cell Factor Attenuates Vascular Smooth Muscle Apoptosis and Increases Intimal Hyperplasia After Vascular Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:540-547.
  201. Moses, J.W., Leon, M.B., Popma, J.J., Fitzgerald, P.J., Holmes, D.R., O'Shaughnessy, C., *et al.* Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med* 2003;349:1315-23.
  202. Stone, G.W., Ellis, S.G., Cox, D.A., Hermiller, J., O'Shaughnessy, C., Mann, J.T., *et al.* A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2004;350:221-31.
  203. Suzuki, T., Kopia, G., Hayashi, S., Bailey, L.R., Llanos, G., Wilensky, R., *et al.* Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation* 2001;104:1188-93.
  204. Camenzind, E., Steg, P.G., Wijns, W. Stent thrombosis late after implantation of first-generation drug-eluting stents: a cause for concern. *Circulation* 2007;115:1440-55; discussion 1455.
  205. Pfisterer, M., Brunner-La Rocca, H.P., Buser, P.T., Rickenbacher, P., Hunziker, P., Mueller, C., *et al.* Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:2584-91.
  206. Roy, P., Bonello, L., de Labriolle, A., Okabe, T., Pinto Slottow, T.L., Steinberg, D.H., *et al.* Two-Year Outcome of Patients Treated With Sirolimus- Versus Paclitaxel-Eluting Stents in an Unselected Population With Coronary Artery Disease (from the REWARDS Registry). *The American Journal of Cardiology* 2008;102:292-297.
  207. Radford, I.R. Imatinib. Novartis. *Curr Opin Investig Drugs* 2002;3:492-9.
  208. Kim, R., Emi, M., Arihiro, K., Tanabe, K., Uchida, Y., Toge, T. Chemosensitization by STI571 targeting the platelet-derived growth factor/platelet-derived growth factor receptor-signaling pathway in the tumor progression and angiogenesis of gastric carcinoma. *Cancer* 2005;103:1800-9.

209. Kvasnicka, H.M., Thiele, J., Staib, P., Schmitt-Graeff, A., Griesshammer, M., Klose, J., *et al.* Reversal of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia following imatinib mesylate (STI571) therapy. *Blood* 2004;103:3549-51.
210. Banai, S., Chorny, M., Gertz, S.D., Fishbein, I., Gao, J., Perez, L., *et al.* Locally delivered nanoencapsulated tyrphostin (AGL-2043) reduces neointima formation in balloon-injured rat carotid and stented porcine coronary arteries. *Biomaterials* 2005;26:451-461.
211. Vouyouka, A.G., Jiang, Y., Basson, M.D. Pressure alters endothelial effects upon vascular smooth muscle cells by decreasing smooth muscle cell proliferation and increasing smooth muscle cell apoptosis. *Surgery* 2004;136:282-290.
212. Tsurimoto, T. PCNA binding proteins. *Front Biosci* 1999;4:D849-58.
213. Cai, J., Zheng, T., Masood, R., Smith, D.L., Hinton, D.R., Kim, C.N., *et al.* Paclitaxel Induces Apoptosis in AIDS-Related Kaposi's Sarcoma Cells. *Sarcoma* 2000;4:37-45.
214. Pei-Chun Liao, S.-K.T.C.-H.L.H.-K.J. Involvement of endoplasmic reticulum in paclitaxel-induced apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry* 2008;104:1509-1523.
215. Basciani, S., Brama, M., Mariani, S., De Luca, G., Arizzi, M., Vesci, L., *et al.* Imatinib Mesylate Inhibits Leydig Cell Tumor Growth: Evidence for In vitro and In vivo Activity. *Cancer Res* 2005;65:1897-1903.
216. Mahboobi, S., Sellmer, A., Eswayah, A., Elz, S., Uecker, A., Böhmer, F.-D. Inhibition of PDGFR tyrosine kinase activity by a series of novel N-(3-(4-(pyridin-3-yl)-1H-imidazol-2-ylamino)phenyl)amides - A SAR study on the bioisosterism of pyrimidine and imidazole. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2008;43:1444-1453.
217. Dewar, A.L., Cambareri, A.C., Zannettino, A.C., Miller, B.L., Doherty, K.V., Hughes, T.P., *et al.* Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. *Blood* 2005;105:3127-32.
218. Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996;2:561-6.
219. Fabian, M.A., Biggs, W.H., 3rd, Treiber, D.K., Atteridge, C.E., Azimioara, M.D., Benedetti, M.G., *et al.* A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* 2005;23:329-36.
220. Asahara, T., Bauters, C., Pastore, C., Kearney, M., Rossow, S., Bunting, S., *et al.* Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 1995;91:2793-801.
221. Golomb, G., Fishbein, I., Banai, S., Mishaly, D., Moscovitz, D., Gertz, S.D., *et al.* Controlled delivery of a tyrphostin inhibits intimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model. *Atherosclerosis* 1996;125:171-182.
222. Kohler, T.R., Toleikis, P.M., Gravett, D.M., Avelar, R.L. Inhibition of neointimal hyperplasia in a sheep model of dialysis access failure with the bioabsorbable Vascular Wrap paclitaxel-eluting mesh. *Journal of Vascular Surgery* 2007;45:1029-1038.e3.

223. Masaki, T., Rathi, R., Zentner, G., Leyboldt, J.K., Mohammad, S.F., Burns, G.L., *et al.* Inhibition of neointimal hyperplasia in vascular grafts by sustained perivascular delivery of paclitaxel. *Kidney Int* 2004;66:2061-9.
224. Mátyás, L., Berry, M., Menyhei, G., Tamás, L., Acsády, G., Cuypers, P., *et al.* The Safety and Efficacy of a Paclitaxel-eluting Wrap for Preventing Peripheral Bypass Graft Stenosis: A 2-Year Controlled Randomized Prospective Clinical Study. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2008;35:715-722.
225. Signore, P.E., Machan, L.S., Jackson, J.K., Burt, H., Bromley, P., Wilson, J.E., *et al.* Complete Inhibition of Intimal Hyperplasia by Perivascular Delivery of Paclitaxel in Balloon-injured Rat Carotid Arteries. *J Vasc Interv Radiol* 2001;12:79-88.
226. Garcia, A.J., Ducheyne, P., Boettiger, D. Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *J Biomed Mater Res* 1998;40:48-56.
227. Uttayarat, P., Chen, M., Li, M., Allen, F.D., Composto, R.J., Lelkes, P.I. Microtopography and flow modulate the direction of endothelial cell migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H1027-1035.
228. Walboomers, X.F., Jansen, J.A. Cell and tissue behavior on micro-grooved surfaces. *Odontology* 2001;89:0002-0011.
229. Boateng, J.S., Matthews, K.H., Stevens, H.N., Eccleston, G.M. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci* 2008;97:2892-923.
230. Kikuno, N., Kawamoto, K., Hirata, H., Vejdani, K., Kawakami, K., Fandel, T., *et al.* Nerve growth factor combined with vascular endothelial growth factor enhances regeneration of bladder acellular matrix graft in spinal cord injury-induced neurogenic rat bladder. *BJU Int* 2008;
231. DeCarlo, A.A., Whitelock, J.M. The role of heparan sulfate and perlecan in bone-regenerative procedures. *J Dent Res* 2006;85:122-32.
232. Golden, M.A., Hanson, S.R., Kirkman, T.R., Schneider, P.A., Clowes, A.W. Healing of polytetrafluoroethylene arterial grafts is influenced by graft porosity. *J Vasc Surg* 1990;11:838-44; discussion 845.
233. Golden, M.A., Au, Y.P., Kenagy, R.D., Clowes, A.W. Growth factor gene expression by intimal cells in healing polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg* 1990;11:580-5.
234. Geary, R.L., Koyama, N., Wang, T.W., Vergel, S., Clowes, A.W. Failure of Heparin to Inhibit Intimal Hyperplasia in Injured Baboon Arteries : The Role of Heparin-Sensitive and -Insensitive Pathways in the Stimulation of Smooth Muscle Cell Migration and Proliferation. *Circulation* 1995;91:2972-2981.
235. Shimada, T., Nishibe, T., Miura, H., Hazama, K., Kato, H., Kudo, F., *et al.* Improved healing of small-caliber, long-fibril expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts by covalent bonding of fibronectin. *Surg Today* 2004;34:1025-30.