



Étude et amélioration des propriétés mécaniques de structures d'échafaudage à base de collagène pour la régénération du tissu vasculaire

Thèse

Sébastien Meghezi

Doctorat en génie des matériaux et de la métallurgie
Philosophiæ doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Sébastien Meghezi, 2015

Résumé

Recréer des tissus en laboratoire pour remplacer ou améliorer la fonctionnalité d'un organe défaillant, ou créer un tissu modèle pour tester de nouveaux médicaments comme alternative aux expérimentations animales, n'est plus aujourd'hui du domaine de la science fiction. L'ingénierie tissulaire vasculaire s'appuie sur la capacité des cellules à régénérer un néo-tissu lorsque placées dans des conditions de culture appropriées. Face au manque de vaisseaux sanguins autologues lors de pontages coronariens ou périphériques, elle apporte un nouvel espoir de plus en plus concret quant à la création de substituts en laboratoire pour le remplacement de vaisseaux sanguins de petit diamètre (< 6 mm). L'approche adoptée dans le cadre de cette thèse consiste à utiliser une protéine naturelle, le collagène, comme support de la croissance des cellules vasculaires, acteurs majeurs de la régénération tissulaire. Cependant, en dépit des grandes performances biologiques du collagène (reconstitué en laboratoire), son utilisation est limitée par un manque de propriétés mécaniques. L'objectif de cette thèse est de renforcer les structures de collagène supportant les cellules, afin de pouvoir soumettre ces dernières à des stimulations mécaniques et biochimiques requises pour la maturation du tissu en croissance et appliquées dans un bioréacteur "dynamique".

Dans un contexte où aucune norme de caractérisation mécanique des hydrogels n'existe, cette thèse a permis de définir les conditions les plus appropriées pour évaluer les comportements mécanique et viscoélastique des échafaudages de collagène seuls : ils doivent être testés dans un environnement pseudo-physiologique (bain de PBS à 37°C) sans préconditionnement mécanique, et mesurés en relaxation de contrainte, qui permet notamment d'accéder au module élastique, paramètre important lorsqu'un matériau subit des sollicitations mécaniques cycliques. Par la suite, et après avoir montré les effets modérés d'un agent de réticulation physique (exposition aux UVs), le développement d'un bioréacteur dit « statique » a permis de mettre en évidence le fort potentiel des cellules musculaires lisses à renforcer les structures tubulaires de collagène lors d'une période de culture statique. Les résultats des techniques de caractérisation mécanique spécifiquement développées et des techniques d'imagerie microscopique montrent qu'à l'issue de cette culture la réorganisation des cellules ainsi que des fibrilles de collagène s'accompagnent d'un remarquable renforcement mécanique et viscoélastique de la construction artérielle, prête à être placée dans un bioréacteur dynamique. Dans la perspective de la régénération tissulaire, outre l'importance de la relation structure-propriété et des interactions cellules-matrice extracellulaire, ce projet souligne le rôle primordial de la culture en conditions statiques avant la culture dans un bioréacteur dynamique.

Abstract

Designing biological tissues in laboratory in order to replace or improve the functionality of a failing organ, or create a tissue which could be a model to test new medicinal formulations as alternative to animal experiments, is no longer a dream and is worth being considered. Tissue engineering is based on the ability of cells to regenerate a neo-tissue when cultured in adequate culture conditions. To address the lack of autologous blood vessels for peripheral or coronary bypass, vascular tissue engineering brings new hopes in creating substitutes *in vitro* in order to replace small diameter blood vessels (< 6 mm). The scientific approach of this thesis work consists in using a natural protein, collagen, as a scaffold to make the vascular cells proliferate. The main objective of this thesis is to reinforce the collagen structures supporting cells, in order to be able to mechanically and biochemically stimulate them during the maturation of the growing tissue in a "dynamic" bioreactor.

It is noteworthy to point out that there is no standard method to mechanically characterize hydrogels. This thesis work managed to define the most adequate conditions to estimate the mechanical and the viscoelastic properties of collagen scaffolds: they must be tested in a pseudo-physiological environment (PBS bath at 37°C) without mechanical preconditioning and measured in stress relaxation, which gives the elastic modulus, an important parameter to consider when a material is subjected to cyclic mechanical stimulation. Then, after having shown relative effects of a physical reticulation agent (UVs exposure), the development of a "static" bioreactor showed the high potential of smooth muscle cells to reinforce the tubular collagen structure during a static culture period. The results of the mechanical characterization techniques specifically developed for this project, and microscopic imaging techniques, show that at the end of this culture period, the reorganization of the cells and of the collagen fibrils leads to a noteworthy mechanical and viscoelastic reinforcement of the vascular construct, mature enough to be put in place in a dynamic bioreactor. In the perspective of tissue regeneration, and considering the importance of the structure-properties relations and cells-extracellular matrix interactions, this thesis project establishes the important role of the static culture period preceding the culture period in the dynamic bioreactor.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xiii
Nomenclature, sigles et glossaire	xix
Nomenclature	xix
Sigles	xix
Glossaire	xx
Remerciements	xxvii
Avant-propos	xxxii
Introduction	1
0.1 Le système vasculaire et ses pathologies	1
0.2 Les solutions cliniques aux pathologies vasculaires	4
0.2.1 Le pontage artériel à l'aide de substituts biologiques	4
0.2.2 Les prothèses synthétiques	7
0.2.3 Angioplastie et tuteurs artériels	7
0.3 Problématique générale	9
0.4 Les différentes voies de recherche actuelle	9
0.4.1 Amélioration des propriétés biologiques et mécaniques des matériaux synthétiques	9
0.4.2 La médecine régénératrice et le génie tissulaire vasculaire	12
0.5 Les structures de collagène en tant que support de la régénération tissulaire	23
0.5.1 Composition et fonction de la matrice extracellulaire : Importance du collagène	23
0.5.2 Structure et organisation supramoléculaire du collagène	23
0.5.3 Les réactions <i>in vivo</i> au collagène	27
0.5.4 Des performances mécaniques limitées pour le génie tissulaire	28
0.5.5 Les techniques de renforcement mécanique du collagène : état de la littérature	33

0.6	Problématique spécifique au projet doctoral	38
0.7	Description de la stratégie adoptée dans le cadre de cette thèse	38
1	Importance d'un environnement contrôlé lors de la caractérisation mécanique des gels de collagène : Effet des réticulations UV	53
1.1	Résumé	54
1.2	Abstract	55
1.3	Keywords	55
1.4	Introduction	56
1.5	Experimental Part	57
1.5.1	Sample Preparation.	57
1.5.2	Chemical Characterization.	57
1.5.3	Mechanical Characterization.	58
1.6	Results and Discussion	59
1.7	Conclusion	61
1.8	Acknowledgements	62
2	Effets des conditions expérimentales sur les propriétés élastiques et viscoélastiques des gels de collagène	63
2.1	Résumé	64
2.2	Abstract	64
2.3	Introduction	65
2.4	Materials and Methods	67
2.4.1	Sample Preparation	67
2.4.2	Mechanical Characterization	67
2.4.3	Stress Relaxation Tests	68
2.4.4	Design of Experiment and Statistical Analysis	69
2.5	Results and Discussion	71
2.5.1	Mechanical Characterization	71
2.5.2	Stress Relaxation Test	72
2.6	Conclusion	79
2.7	Acknowledgements	79
3	Développement de méthodes de fabrication et de caractérisation de structures de collagène tubulaires cellularisées	81
3.1	Résumé	82
3.2	Short abstract	83
3.3	Long abstract	83
3.4	Keywords	83
3.5	Introduction	84
3.6	Protocol	85
3.7	Representative results	96
3.8	Discussion	99
3.9	Supplementary videos	101
3.10	Disclosures	102
3.11	Acknowledgements	102
4	Renforcement et réorganisation des structures de collagène par remodelage cellulaire	103

4.1	Résumé	104
4.2	Abstract	105
4.3	Introduction	105
4.4	Materials and Methods	107
4.5	Results	111
4.6	Discussion	115
4.7	Conclusion	119
4.8	Acknowledgements	120
5	Discussion Générale	121
5.1	Les gels de collagène en tant qu'échafaudages pour le génie tissulaire vasculaire .	121
5.2	Développement de techniques de mise en forme et de caractérisation spécifiques aux gels de collagène	123
5.3	Propriétés mécaniques et viscoélastiques des échafaudages de collagène	125
5.3.1	Origine du comportement viscoélastique du collagène	125
5.3.2	Influence de l'environnement sur les propriétés viscoélastiques	126
5.3.3	Renforcement des propriétés mécaniques par les UVs	129
5.4	Renforcement des gels de collagène par remodelage cellulaire	129
5.4.1	Réorganisation de la matrice lors du remodelage	130
5.4.2	Importance de l'anisotropie dans le développement d'un modèle de tissu biologique	131
5.5	Limites et perspectives : vers un modèle plus proche des vaisseaux sanguins naturels	134
5.5.1	Caractérisation plus approfondie de la construction vasculaire	134
5.5.2	Organisation : apport de la stimulation mécanique dynamique	135
5.5.3	Renforcement par des structures multicouches	135
5.5.4	Élasticité : incorporation d'élastine	136
5.5.5	Fonction : ajout d'autres types cellulaires	136
5.5.6	Réduction du temps d'obtention	137
	Conclusion	139
	Bibliographie	141
A	Protocole d'extraction du collagène des tendons de queue de rats et reconstitution en laboratoire	175
A.1	Des tendons de queue de rats aux éponges de collagène	176
A.2	Des éponges aux solutions de collagène	176
A.3	Des solutions aux gels de collagène	176
B	Publications Scientifiques	179
C	Communications Scientifiques	181
C.1	Présentations internationales	181
C.2	Présentations nationales	181
C.3	Présentations provinciales	182
D	Activités complémentaires à la formation doctorale	183

Liste des tableaux

0.1	Les substituts vasculaires utilisés en clinique en fonction de la localisation de la pathologie. Les prothèses biosynthétiques combinent une prothèse et l'implantation de cellules (adapté de (Chlupác et al., 2009)).	8
0.2	Cahier des charges des propriétés d'un substitut vasculaire idéal créé par génie tissulaire. Adapté de (Lee et al., 2001a). Pour information, le module élastique des artères humaines est \approx de 1 MPa (Berglund et al., 2003), la pression à la rupture et la compliance de la veine saphène humaine sont respectivement \approx 1500-2000 mmHg et \approx 0,7-1,5 %/mmHg (L'Heureux et al., 2006).	13
0.3	Applications biomédicales des différentes formes du collagène (Fujioka et al., 1998).	29
0.4	Potentiel du collagène pour son utilisation en génie tissulaire.	33
2.1	Example of various environments of mechanical characterization of collagen materials and tissues encountered in the literature. RT : room temperature ; σ_{max} : maximal stress reached ; σ_{UTS} : stress at rupture ; ϵ_{UTS} : strain at rupture, ϵ_{max} : maximal strain reached.	66
2.2	Design of the experiments. A complete factorial experiment was used to estimate the effects of temperature (T, 23 or 37°C), hydration (in a phosphate-buffered saline solution : PBS or without : no PBS) and mechanical preconditioning (C, with : PC or without : no PC) on the mechanical and viscoelastic properties of collagen gels.	70
3.1	Rapid contraction of construct diameter during the static maturation. Wall thickness of the constructs and the contraction rate as a function of time of static culture. Contraction was measured by determining the external diameter of the tubular constructs with a scanning laser interferometer (Series 183B, LaserMike 136). After 24 h, the constructs contracted to 57 ± 2 % of their molded dimensions. Data are expressed as <i>mean</i> \pm <i>SD</i> (n = 3). The presence and the activity of living smooth muscle cells was the only responsible for such major changes.	97
5.1	Tableau présentant l'effet qualitatif d'un environnement pseudo-physiologique sur les principaux paramètres reliés à la viscoélasticité des gels de collagène, à savoir la viscosité η , le module visqueux E_V , le module élastique E_E et le temps de relaxation τ . Les facteurs environnementaux étudiés sont la température (T), l'état d'hydratation (H, en présence ou en l'absence de PBS) et le conditionnement mécanique (C, avec ou sans pré-conditionnement mécanique). I désigne la force ionique.	128
5.2	Contrainte circonférentielle appliquée à la paroi de la construction artérielle en fonction de la pression interne appliquée p_{int} et du temps de culture statique.	134

A.1 Protocole de préparation des gels de collagène. La proportion de chaque composant est exprimée en pourcentage du volume final de gel à préparer. Le DMEM 1X (Dulbecco's Modified Eagle Medium Sigma Aldrich Inc. St.Louis, Mo, USA) correspond au milieu de culture standard de base. Le milieu complet correspond au DMEM complété par 10 % de sérum fœtal bovin (Gibco-Invitrogen, Grand Island, N.Y., USA), 10 % de sérum de porc (Gibco-Invitrogen, Auckland, N.Z.), et 1 % de pennisilin-streptomycin (PenStrep, 10 000 U penicillin + 10 000 μ g streptomycin par mL, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). 177

Liste des figures

0.1	Schéma de la composition des différentes tuniques constituant la paroi des vaisseaux sanguins (Tortora and Grabowski, 2001).	3
0.2	Schéma de l'organisation spatiale du collagène dans le tissu : de la molécule de tropocollagène (a) à la fibre de collagène (b). L'arrangement des molécules de tropocollagène en fibrilles est à l'origine de la bande périodique D observable en microscopie électronique (Vogel and Venugopalan, 2003).	25
0.3	Réactions chimiques impliquées dans les liaisons intra- et inter-moléculaires dans le collagène. Adapté de (Voët, 2005).	26
0.4	Courbes typiques de contrainte-déformation de tendon de queue de souris et d'os. La surface grisée claire correspond à l'énergie élastique par unité de volume emmagasinée lors du test. La partie grisée foncée correspond à l'énergie dissipée par unité de volume lors du test et après la limite d'élasticité (adapté de (Fratzl, 2008a).	30
0.5	Stratégie de génie tissulaire vasculaire basée sur les échafaudages naturels. (1) Des cellules autologues sont prélevées chez le patient alors qu'(2) un échafaudage est préparé en laboratoire. (3) Les cellules sont ensuite mélangées directement avec l'échafaudage afin de créer une construction (échafaudage + cellules) vasculaire tubulaire. (4) Finalement, la maturation de la construction se poursuit et est stimulée par des signaux biologiques et mécaniques dans un bioréacteur dynamique (Couet et al., 2011b).	39
0.6	Protocole de préparation des gels de collagène pour les tests mécaniques réalisés dans un environnement pseudo-physiologique (Chapitres 1 et 2).	42
0.7	Courbe typique de l'évolution de la turbidité d'une solution de collagène en fonction du temps (durée de la phase de latence t_{lag} , temps avant d'atteinte du plateau t_p , et durée de la phase de croissance t_g) (Kuo et al., 2005).	44
0.8	Schéma explicatif d'un test de traction effectué sur des gels de collagène en forme d'anneau dans les Chapitres 1 et 2. Les anneaux de collagène sont étirés à une vitesse de déformation de $5 \%.s^{-1}$ jusqu'à la rupture. Le module linéaire E_L correspond à la pente de la partie linéaire de la courbe contrainte-déformation. l_0 et l_R correspondent respectivement à l'allongement initial et à la rupture.	45

0.9	Schéma explicatif d'un test de relaxation de contrainte effectué dans le cadre de cette étude sur des gels de collagène en forme d'anneau dans les Chapitres 1 et 4 . Le graphique du haut montre l'évolution de la déformation en fonction du temps alors que le graphique du bas montre l'évolution de la contrainte en fonction du temps. À l'étape A), l'échantillon subit une déformation de 10 % à une vitesse de $5 \%.s^{-1}$. On mesure alors une augmentation de la contrainte due à la réaction de l'échantillon. La déformation est illustrée à l'aide des médaillons présents dans le haut de la figure. Ensuite, à l'étape B), la contrainte diminue, correspondant à la dissipation de la partie visqueuse du matériau, jusqu'à atteindre un plateau. À cet état d'équilibre, la contrainte est désormais indépendante du temps, correspondant ainsi au comportement élastique du matériau. La valeur de cette contrainte permet de calculer le module élastique.	47
0.10	Schéma expliquant la mise en forme des constructions artérielles (collagène + cellules) et leur préparation pour les tests mécaniques dans les directions circonférentielle et longitudinale réalisés dans le Chapitre 4 ou leur stimulation dynamique dans un bioréacteur à perfusion.	49
0.11	Organigramme présentant la démarche scientifique adoptée dans cette thèse.	51
1.1	Photography of the experimental set-up used for the mechanical characterization of a collagen gel placed in a pseudo-physiological environment (PBS, 37°C).	59
1.2	Enzymatic degradation of collagen gels as a function of time and the UV-irradiation (n = 6).	60
1.3	Crosslink density of collagen gels calculated from their swelling ratio as a function of UV irradiation (n = 3).	61
1.4	Results of the mechanical tensile tests on collagen gels as a function of the environment in which the tests have been performed in the air or in the pseudo-physiological environment (PPE) and the UV irradiation (254 nm, $20 J/cm^2$) in terms of a) linear modulus and b) strain at rupture (n = 3).	62
2.1	Experimental setup for tensile and relaxation tests on collagen gels. White marks were applied on the gels in order to observe the strain of the sample during testing.	68
2.2	Example of a stress-strain curve obtained from a tensile test on a preconditioned collagen gel (10 cycles of loading and unloading) in air at 23°C. Linear modulus was calculated from the slope of the linear regression. The linear regression was determined by successively adding points in data in the left direction (starting from the point at rupture) as long as the squared R was > 0.990.	69
2.3	Example of a curve obtained from a stress relaxation test on a preconditioned collagen gel in air at 23°C.	70
2.4	Tensile linear modulus of ring-shaped collagen gels as a function of temperature (experiments performed either at 23°C or 37°C), hydration (either with or without a PBS solution), and mechanical preconditioning (either with or without mechanical preconditioning PC). Values are expressed as mean \pm standard error. Significance : *P < 0.05 ; **P < 0.01 ; ***P < 0.001.	71
2.5	Viscoelastic model constituted of a spring associated in parallel with two Maxwell elements. A tensile force \vec{F} is applied to this model. E_{EL} , η_i , and E_i are, respectively, the elastic modulus, the viscosity, and the relaxation moduli associated with the model.	73

2.6	Proposed molecular mechanism involved during the collagen gel stretching when applying a tensile load F . Four regions can be identified : (A) « toe region » (low strains), (B) « heel region » (nonlinear region), (C) linear region (small arrows symbolize friction), and (D) rupture of the gel.	74
2.7	Viscosities of ring-shaped collagen gels as a function of temperature (experiments performed either at 23°C or 37°C), hydration (either with or without a PBS solution), and mechanical preconditioning (either with or without mechanical preconditioning PC). Viscosities η_1 and η_2 are extracted from the first and the second term of the second-decay exponential regression of stress-strain relaxation curves obtained on collagen gels. Values are expressed as mean \pm standard error. Significance : *P < 0.05 ; **P < 0.01 ; ***P < 0.001.	75
2.8	Relaxation times of ring-shaped collagen gels as a function of temperature (experiments performed either at 23°C or 37°C), hydration (either with or without a PBS solution), and mechanical preconditioning (either with or without mechanical preconditioning PC). τ_1 and τ_2 are the relaxation times of the gels considered in the viscoelastic model. Values are expressed as mean \pm standard error. Significance : *P < 0.05 ; **P < 0.01 ; ***P < 0.001.	77
2.9	Relaxation moduli of ring-shaped collagen gels as a function of temperature (experiments performed either at 23°C or 37°C), hydration (either with or without a PBS solution), and mechanical preconditioning (either with or without mechanical preconditioning PC). E_{EL} , E_1 , and E_2 are, respectively, the elastic and the viscous moduli of the gels considered in the viscoelastic model. The sum of all 3 moduli is the instantaneous linear modulus $E_R(0)$ at a strain of 10 %. Values are expressed as mean \pm standard error. Significance : *P < 0.05 ; **P < 0.01 ; ***P < 0.001.	78
3.1	Components of the static bioreactor. The static bioreactor consisted of a modified 50 mL centrifuge tube (A) and a mandrel-equipped cap (B). The tube served as medium reservoir, and was equipped with a port for a 0.22 μm filter, for the gas exchange, and a septum, for the medium sampling and changing. A mandrel present in the ventilated cap allowed the fabrication of constructs in tubular shape. The gauze-grips (C) were designed and fabricated to support the gelation of the constructs over the mandrel. Moreover, these grips allowed the constructs to be handled after the static maturation and to be fixed to the mechanical apparatus. The external diameter of the mandrel was 4.7 mm.	85
3.2	Assembling of the static bioreactor. Assembling phases of the bioreactor before the sterilization. The gauze-grips were mounted on the mandrel (A) at a fixed distance. A mold was inserted (B) and tightly fixed to the silicone stopper (C). The external diameter of the mandrel was 4.7 mm.	87
3.3	Fabrication of the constructs in sterile conditions. The cells and collagen mixture was poured into the housing-mold complex (A), and let gel for 1 h at room temperature (B). Afterwards, the mold was removed (C), the static bioreactor was assembled (D) and transferred inside a reservoir for the static maturation of the construct in incubator ($T = 37^\circ C$, 5 % CO_2 , 100 % humidity). The external diameter of the mandrel was 4.7 mm.	89

3.4	Measurement of the thickness/external diameter of the constructs. A laser scanning interferometer was used to perform the measurement of the external diameters of the constructs. The construct was placed into the pathway of the laser beam and generated a shadow. The width of the shadow, corresponding to the external diameter of the construct, was then measured and displayed on the screen.	90
3.5	Morphological appearance of the harvested construct. (A) Right after gelation and (B) after cells-driven remodeling during static maturation for 2 weeks.	91
3.6	Experimental set-up for mechanical characterizations. It consisted of the micromechanical tester equipped with a 5 or 10 N load cell and a bath containing PBS at 37°C to keep the samples in pseudo-physiological conditions.	92
3.7	Sample preparation for mechanical characterizations. Sample harvesting (A) and preparation (B) for fatigue tests performed in the longitudinal and the circumferential directions (C). The external diameter of the mandrel was 4.7 mm.	93
3.8	Rotating-wall bioreactor. (A) The tubular constructs were assembled in the center of the reservoir with the help of c-shaped silicone support. Both of the extremities of the construct were closed to avoid any leakage of the HUVECs solution. (B) The constructs were cultured in incubator (T = 37°C, 5 % CO ₂ , 100 % humidity) in rotation at 4.02x10 ⁻⁵ g force for 2 days.	95
3.9	Mechanical characterizations. Results of fatigue tests performed on constructs in longitudinal (A) and circumferential (B) directions after cell-driven remodeling.	98
3.10	Metabolic activity of SMCs within the collagen gels. Measurements of glucose consumption rate and lactate production rate were performed with the blood gas analyzer every 2 days, after the culture medium changing. Fresh culture medium was used as a baseline level for the glucose and lactate concentrations measurements.	99
3.11	Lumen endothelialization. Histological images of the radial cross-sections of tubular constructs. Masson's Trichome staining of tubular constructs cultured statically for 1 week (A) and 2 weeks (B). H & E staining of a tubular construct (C).	99
4.1	Schematic representation of the experimental set-up for static culture. The arterial construct is obtained through the mixture of a collagen solution, culture medium, and buffers solution together with SMCs (A). The mixture is then poured in a tubular mould and let gel at room temperature (B). After gelation, the arterial construct is immersed in the static bioreactor containing culture medium and equipped with filters and septum respectively for gas exchange and medium sampling (C). This system is placed inside an incubator (5 % CO ₂ , 100 % humidity and 37°C) for a period of static culture of one or two weeks (no external dynamic mechanical stimulations are applied).	108
4.2	Schematic representation of the experimental set-up for stress relaxation tests. After a period of static culture (A), samples were either tested on rings for circumferential tests or directly on tubes for longitudinal tests (B). Stress relaxations tests were performed in a thermoregulated bath containing PBS at 37°C adapted to an Instron 5848 MicroTester, which was equipped with specific grips (C).	110
4.3	Collagen gel contraction as a function of time of culture of smooth muscle cells. The static bioreactor was placed inside the incubator. A non-contact technique allowed the measurement of the external diameter of the arterial construct throughout the period of static culture (one or two weeks). Collagen gel contraction was visualized with a digital camera.	112

4.4	Effect of one-week static culture on the overall organization of SMC and the collagen matrix. A) to D) are schematic representations of a cells-populated collagen gel scaffold processed for microscopic observations. A), E), and I) correspond to the arterial construct at the beginning of the static culture, right after gelation. After contraction during a period of static culture, the arterial construct was either cut into rings for SEM observations of the lumen side (I) to M) with graded magnifications) or into half-rings to observe the wall with histological staining (E) to H) with graded magnifications), in which collagen is colored in green-blue, cytoplasm and nuclei of SMCs are respectively colored in red and in dark brown. Both SEM and histological images reveal how static culture generates an anisotropic material with a specific orientation of cells and collagen fibrils out of an initial isotropic material.	114
4.5	Relative metabolic activity of the arterial construct as a function of time of static culture. Reference is the metabolic activity of the arterial construct, right after gelation (day 1 of static culture). CTRL corresponds to the collagen gel scaffolds statically cultured for two weeks. Results show no difference in the metabolic activity throughout the culture.	115
4.6	Typical values of stress obtained during circumferential incremental stress relaxation tests (red curve). Arterial constructs, cultured statically for one week, were stretched to 10 % strain at a rate of 5 %. s^{-1} and hold at this value. Stress relaxation was recorded for 600 s. The same procedure was performed at each subsequent 10 % strain until failure. The green curve corresponds to the stress-time projection, the blue curve to the stress-strain projection and the black curve to the strain-time projection.	116
4.7	Elastic and viscous moduli of the arterial construct as a function of time of culture. CTRL corresponds to the collagen gel scaffold statically cultured for two weeks. Stress relaxation tests were performed on the samples either in the circumferential or in the longitudinal directions.	117
5.1	Participation à la conception et au développement d'un bioréacteur à perfusion pour la régénération du tissu vasculaire (Plus d'information en vidéo).	135
5.2	Image d'une matrice de collagène remodelée par les cellules et placée dans le bioréacteur à perfusion.	136

Nomenclature, sigles et glossaire

Nomenclature

A_R : Absorbance relative / *Relative absorbance*

$\bar{\nu}$: Densité de réticulation / *Crosslink density*

E_{EL} : Module élastique / *Elastic modulus*

E_L : Module linéaire / *Linear modulus*

ε_R : Déformation à la rupture / *Strain at rupture*

η : Viscosité / *Viscosity*

E_V : Module visqueux / *Viscous modulus*

E_{VEL} : Module viscoélastique / *Viscoelastic modulus*

l_0 : Allongement initial / *Initial displacement*

Q : Taux de gonflement / *Swelling ratio*

l_R : Allongement à la rupture / *Displacement at rupture*

σ_{EL} : Contrainte élastique / *Elastic stress*

σ_{VEL} : Contrainte viscoélastique / *Viscoelastic stress*

σ_V : Contrainte visqueuse / *Viscous stress*

τ : Temps de relaxation / *Relaxation time*

Sigles

CE / EC : cellule endothéliale / *endothelial cell*

CML / SMC : cellule musculaire lisse / *smooth muscle cell*

CMLp / pSMC : cellule musculaire lisse de porc / *porcine smooth muscle cell*

FB / FB : fibroblaste / *fibroblaste*

GTV / VTE : génie tissulaire vasculaire / *vascular tissue engineering*

ICP / PCI : intervention coronarienne percutanée / *percutaneous coronary intervention*

MEC / ECM : matrice extracellulaire / *extracellular matrix*

PBS / PBS : solution saline tamponnée à base de phosphate / *phosphate buffered saline solution*

PGA / PGA : poly(acide glycolique) / *poly(glycolic acid)*

PLLA / PLLA : poly(acide lactique-L) / *poly(L-lactic acid)*

Glossaire

Le présent glossaire vise à donner des définitions succinctes de termes biomédicaux utilisés dans la thèse sans avoir été définis au préalable. Les définitions ont été recueillies à partir du grand dictionnaire terminologique de l'Office québécois de la langue française [OQLF] ou à partir du dictionnaire médical en ligne de l'Académie nationale de Médecine - version 2015 [Académie nationale de Médecine], sauf mention contraire.

Allergène : Anticorps capable de fixer le complément sur le complexe que cet anticorps a formé avec l'antigène. Pour certains auteurs le terme allergène est synonyme d'antigène, pour d'autres un antigène est un corps qui provoque naturellement la formation d'anticorps et des réactions allergiques, ou encore, toute substance étrangère qui modifie la manière de réagir lors de contacts répétés. [OQLF]

Allogreffe : Transfert de cellules, d'un tissu ou d'un organe entre deux individus qui appartiennent à la même espèce, mais qui sont génétiquement différents (ou homogreffe ou greffe homologue. [OQLF]

Anastomose : Communication naturelle, pathologique ou artificielle entre deux conduits anatomiques (vaisseaux, nerfs, etc.). [OQLF]

Anévrisme : Cavité contenant du sang liquide ou coagulé, qui se développe sur le trajet d'une artère par dilatation de ses parois et qui communique avec la lumière de cette artère. [OQLF]

Artériosclérose : Atteinte des parois artérielles caractérisée par un épaississement, un durcissement et une perte d'élasticité. Autrefois, ce terme était employé de façon générale pour désigner indifféremment plusieurs maladies artérielles chroniques dégénératives qui ont été isolées depuis : l'athérosclérose (terme avec lequel il ne doit pas être confondu), la médiacalcosse et l'artériolosclérose. Au sens restrictif actuel, ce terme désigne la variété de sclérose artérielle qui touche surtout la tunique moyenne (et parfois aussi la tunique interne) des artères, principalement des artères musculaires et rénales. Cependant, on l'emploie souvent de façon générique pour désigner l'atteinte des artères de

toute taille. [OQLF]

Athérosclérose : Maladie de la paroi artérielle caractérisée par une accumulation de lipides, de glucides complexes, de sang, de produits sanguins et de dépôts calcaires. [OQLF]

Autogreffe : Transfert de cellules, d'un tissu ou d'un organe d'un point à un autre d'un même individu (ou greffe autologue). [OQLF]

Cardiopathie ischémique : Affection cardiaque secondaire à une réduction de l'irrigation d'une partie du myocarde, le plus souvent par lésions athéromateuses des artères coronaires. [Académie nationale de Médecine]

Compliance : Mesure de la souplesse et des possibilités de distension d'un réservoir élastique (par exemple, de la vessie, des poumons ou des 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. [OQLF]

Construction : En génie tissulaire, le terme de construction désigne l'association entre les cellules du tissu à régénérer et un échafaudage servant de support à la culture tridimensionnelle des dites cellules. [définition de l'auteur]

Diastole : Période de la révolution cardiaque au cours de laquelle les cavités du cœur se remplissent de sang. [OQLF]

Hémodialyse : Technique d'épuration extrarénale faisant appel à des appareils de dialyse fonctionnant sur circulation extracorporelle et appelés hémodialyseurs. [OQLF]

Hyperplasie : Croissance du volume d'un organe causé par une augmentation du nombre des cellules dont sont constitués ses tissus. [OQLF]

Immunité à médiation cellulaire : Propriété que possède un organisme de se défendre contre un agent pathogène. L'immunité à médiation cellulaire est une manifestation d'une immunité spécifique qui n'est pas attribuable aux anticorps présents dans le sang mais est le résultat de l'action de certaines cellules réagissant directement avec un antigène et qui ont besoin de la coopération de cellules macrophages pour réaliser les effets. [OQLF]

Immunité à médiation humorale : Immunité s'appuyant principalement sur la présence d'anticorps spécifiques circulant dans le sérum, la lymphe et les liquides tissulaires de l'organisme. L'immunité humorale doit son nom au fait qu'elle soit due à des substances présentes dans les liquides de l'organisme, anciennement appelés humeurs. [OQLF]

Ischémie : Diminution ou arrêt de la circulation et donc de l'apport sanguin dans un territoire tissulaire ou un organe. [Académie nationale de Médecine]

Pontage : Déviation de la circulation artérielle afin d'assurer la réunion de deux vaisseaux sanguins à l'aide d'une anastomose issue d'une greffe ou faite de matière synthétique, dans le but de contourner

une région sténosée ou, de façon temporaire, de contourner un secteur artériel sur lequel est pratiquée une intervention chirurgicale. [OQLF]

Systole : Période de la révolution cardiaque au cours de laquelle les cavités du cœur se contractent, entraînant ainsi l'éjection du sang. Ce terme désigne aussi la contraction elle-même. Cette contraction commence par la contraction simultanée des deux oreillettes (systole auriculaire), suivie de celle des deux ventricules (systole ventriculaire). [OQLF]

Thrombose : Formation d'un caillot dans un vaisseau sanguin ou dans une des cavités du cœur. [OQLF]

Xénogreffe : Transfert de cellules, d'un tissu ou d'un organe entre deux individus qui appartiennent à des espèces différentes (ou hétérogreffe ou greffe hétérologue). [OQLF]

*À ma famille,
Qui a forgé ma personnalité, qui
m'a encouragé dans ma passion et à
qui je dois ma persévérance et le
goût du travail bien fait.*

L'imagination est plus importante
que le savoir.

Albert Einstein

Remerciements

Je remercie mon directeur de thèse, professeur Diego Mantovani, qui m'a permis de réaliser ce projet au sein de son laboratoire. Comme il aime à le dire et à raison, une thèse ne doit pas se restreindre à une accumulation de résultats de travaux scientifiques, il est important de pouvoir valoriser les aptitudes autres que scientifiques qu'on a pu développer au cours de cette formation. À cet égard, je le remercie car il m'a offert de nombreuses opportunités dans le cadre de ma thèse : enseigner, encadrer des étudiants, participer à des congrès nationaux et internationaux, travailler sur plusieurs projets et collaborer avec d'autres équipes de recherche. Je le remercie pour la liberté qu'il m'a accordée pour mener mon projet et les moyens qu'il a mis à ma disposition.

Je tiens à remercier les membres du jury d'évaluation de ma thèse : professeur Hendra Hermawan pour avoir tenu la présidence de ce jury ainsi que les professeurs Gaétan Laroche, Jean Ruel et Nicolas L'Heureux. Je les remercie pour le temps qu'ils ont consacré à corriger ma thèse et pour la pertinence de leurs commentaires qui m'ont permis d'améliorer le contenu et la forme de ce manuscrit.

Je remercie les organismes subventionnaires : le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC), la Fondation Canadienne pour l'Innovation (FCI), le Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologie (FRQNT) le Ministère des Relations Internationales et de la Francophonie - Québec (MRIF) pour le financement de ce projet, l'Association des Étudiantes et des Étudiants de l'Université Laval Inscrits aux Études Supérieures (AELIÉS) et le bureau des bourses et de l'aide financière de l'Université Laval pour leur participation aux frais de déplacement lors des congrès.

Je n'ai jamais autant aimé la recherche que lorsque j'ai été amené à échanger des idées, à discuter sur des problématiques scientifiques. À mon sens, la recherche ne peut se faire seul de manière efficace. C'est pourquoi je remercie vivement les professionnels de recherche¹ et mes collègues étudiants de l'Institut des Biomatériaux du Québec à l'hôpital Saint-François d'Assise², mes collègues

1. Pascale Chevallier, Marie-France Côté, Bernard Drouin, Andrée-Anne Guay-Bégin, Jacques Lacroix, Jean Lagueux, Lucie Lévesque, Daniel Marcotte, Stéphane Turgeon.

2. Matteo Achilli, Mariana Agostini de Moraes, Livia Angeloni, Farid Anooshehpour, Ibrahim Bilhem, Oleksander Bondarenko, Nina Bono, Michel Bocourt Povea, Jonathan Brassard, Michaël Byad, Maxime Cloutier, Frédéric Couët, Luc Faucher, Giovana Genevro, Servaas Holvoet, Ludivine Hugoni, Ramiro Irastorza, Martin Jamilis, Olivier Lesage, Audrey Lainé, Myriam Laprise-Pelletier, Morgane Laurent, Caroline Loy, Mathieu Maisani, Yves Marois, Maryam Mavadat, Éléonore Michel, Vanessa Montañó Machado, Afghany Mostavan, Essowè Mouzou, Carlo Paternoster, Daniele Pezzoli, Agung Purnama, Alejandra Reyna de Valencia, Dario Rojas, Érica Rosella, Gad Sabbatier, Dawit Seifu, Ranna Tolouei, Julien

étudiants³ et les secrétaires⁴ du département du génie des mines, des matériaux et de la métallurgie de l'Université Laval. Ils m'ont épaulé et étaient disponibles pour échanger sur des questions diverses de physique, de chimie et de biologie, mais également sur des sujets variés de la vie quotidienne, souvent propices à la rigolade. En effet, l'ambiance chaleureuse de notre laboratoire est telle qu'il est difficile, voire impossible, de définir une frontière précise entre collègues et amis. Mes collègues sont mes amis et nombre de mes amis sont également mes collègues. Également, je remercie les amis du Québec rencontrés hors du laboratoire⁵. Toutes ces personnes, originaires à la fois du Québec et de nombreux autres pays du monde, sont des gens formidables auprès de qui je me suis beaucoup enrichi de par leur culture et leur personnalité. Bien entendu, je ne saurais oublier mes amis de France⁶; à chaque fois que je les revois, c'est comme si je ne les avais jamais quittés et je suis fier de pouvoir compter sur leur amitié indéfectible.

Je remercie mes familles de France⁷ et d'Algérie⁸ qui m'ont toujours accueilli les bras ouverts et qui sont à l'origine de cette double culture que je chéris et revendique. Ma plus grande gratitude revient à ma famille la plus proche, la famille de cœur, sans laquelle à mes côtés rien de tout cela n'aurait été possible et je ne saurais trouver les mots justes pour leur témoigner toute ma reconnaissance et leur exprimer à quel point ils me sont chers. Certes, plusieurs milliers de kilomètres nous séparent mais mon cœur a toujours été avec eux et nos liens n'ont jamais été aussi forts. Ainsi, je tiens à remercier ma grand-mère Ima Tassadit pour la gentillesse et l'amour qu'elle m'a donnés. Elle est la personne la plus gentille que je connaisse. J'aurais aimé pouvoir la côtoyer plus mais je pense souvent à elle. Je remercie également ma sœur Djamilia et mon frère Sofiane. Malgré l'expérience positive que je retiens de mon expatriation, je ne peux nier que le fait d'avoir dû les quitter a été extrêmement difficile. En tant que grand frère, j'aurais tellement aimé pouvoir les voir grandir. Je n'ai pu être présent au quotidien mais je suis réellement fier de ce qu'ils sont, de ce qu'ils ont accompli et de ce qu'ils accomplissent au quotidien. Je remercie tout particulièrement mes parents pour l'éducation, les valeurs, la persévérance et le goût du travail bien fait qu'ils m'ont inculqués, ainsi que le soutien moral dont ils ont fait preuve dans toutes mes entreprises. Je leur dédie donc ce travail du plus profond de mon cœur. Pour finir en beauté et avec des beautés, je remercie les deux rayons de soleil de ma vie : Marie et Camille ! Ma rencontre avec Marie a en effet ensoleillé ma vie et l'arrivée de Camille, cadeau du ciel et fruit de

Vallade, Juliana Vaz, Nathalie Vo Than To, Raquel Weska.

3. Kamran Azari Dorcheh, François Chevarin et Lucie Coudert, Majid Heidari, Ramzi Ishak, Mousa Javidani, Behzad Majidi, Geoffroy Rouget, Maryam Sadeghi.

4. Ginette Cadieux, Martine Demers, Karine Fortin et Andrée Lord.

5. Julie Ann, Eren Ayata, la famille Bocourt Povea (Michel, Betty et Nathalie), la famille Chevallier-Dubus (Pascale, Sébastien et Émilie), Laetitia Coudert, la famille Couët (Frédéric, Julie, Émilie et Marianne), Soudeh Fakhari Terhani, Rémi Gosselin, la famille Gouverneur - Villeneuve (Yves, Catherine, Esteban, Romeo, Jolan et la petite à venir), Omid Kamali, Audrey Moffet, la famille Pezzoli (Daniele, Laura et Lucia), Anna Prokopowicz, la famille Sabbatier-Boucand (Gad, Laurence et Liam), la famille Turgeon-Lévesque (Stéphane, Isabelle et Arielle), Benjamin Zarka.

6. Zoubida Benabdelouahed, Marcos Gonçalves, Soufiane Hakam, Frédéric Lopes.

7. La famille Divay (Ghislaine, Pascal et leurs enfants), la famille Jégnot (Chantal, Michel et leurs enfants), la famille Leroy (Joëlle et Robert) et la famille Papin (Gérard, Françoise, leurs enfants, Denis et Yvan Papin).

8. La famille Aerrane (Akli, Zahia, Mohand, Lila, Mehdi), la famille Djaoud (Moh Saïd, Zakia, Smaïl, Brahim, Samir), Mohand Imoumenacène (Boulangé), la famille Meghezi (Arezki, Bahia, Anissa, Hamel, Lydia, Ouissem), Ahmed Meghzi, la famille Meghzi (Mohouche, Fariza et Lucas), Brahim Meghzi, Djamel Meghzi et sa famille.

notre amour, ne l'a que plus embelli. Deux mots pouvant en résumer cent, je suis juste chanceux et heureux de les avoir auprès de moi !

Sébastien Meghezi

Avant-propos

En l'espace d'un siècle, l'espérance de vie moyenne de l'humanité a progressé de plus de 30 ans. De cette tendance heureuse et bienvenue découle une question incontournable : comment jumeler ce vieillissement, s'accompagnant fatalement d'une recrudescence des maladies, à un maintien, voire à une amélioration, de la qualité de vie de la population ? Ainsi, les maladies cardiovasculaires restent un fléau responsable de près d'un tiers des décès dans le monde. Lorsque la prévention et la prise de médicaments ne suffisent pas, le recours à la chirurgie devient inévitable. Pour les vaisseaux sanguins de gros diamètre (> 6 mm), la mise en place de tuteurs artériels (chirurgie non invasive) et la pose de prothèses synthétiques (chirurgie invasive) sont des techniques de routine. Cependant des problèmes persistent pour les vaisseaux sanguins de petit diamètre (< 6 mm) lorsqu'aucun greffon autologue n'est disponible. Ce projet doctoral s'inscrit donc dans ce contexte : le but ultime serait de pouvoir fabriquer des vaisseaux sanguins de petit calibre en appliquant les principes du génie tissulaire. Au-delà de cela, ce projet s'inscrit également dans l'optique de "la règle des 3 R" élaborée en Amérique du Nord et en Europe en 1959 (Réduction du nombre d'animaux, Raffinement des méthodologies utilisées, Remplacer les modèles animaux) en proposant une méthode de développement de modèles de tissus biologiques en alternative aux modèles animaux et artificiels, qui sont des modèles qui restent éloignés de la réalité des vaisseaux sanguins humains défaillants.

En introduction de cette thèse, une revue de littérature sur les différentes approches du génie tissulaire vasculaire (GTV), et sur les principales techniques de renforcement des structures de collagène est présentée. Cette introduction se termine par une description détaillée de la démarche scientifique adoptée lors de ce projet. Ainsi, il est très vite devenu nécessaire de définir en amont les méthodologies de caractérisation mécanique et viscoélastique des échafaudages de collagène seuls. Dans cette optique, l'effet sur les propriétés mécaniques et viscoélastiques de l'environnement dans lesquels les tests sont effectués ainsi que l'apport des traitements UV dans le renfort des structures de collagène sont évalués dans les chapitres 1 et 2. Par la suite, le chapitre 3 présente les techniques de fabrication et de mise en forme de structures tubulaires de collagèneensemencées de cellules, les techniques de caractérisation mécanique et viscoélastique adaptées à la configuration tubulaire et les protocoles associés. Dans le chapitre 4, ces techniques sont appliquées à l'évaluation du renfort mécanique des structures de collagène par remodelage cellulaire.

Chacun de ces chapitres a abouti à la publication d'un article scientifique présenté dans cette thèse. En

tant que premier auteur de ces articles, je suis l'instigateur principal de la conception des dispositifs expérimentaux, de la conception et de la mise en place des méthodologies et des protocoles associés, de la réalisation des expériences en elles-mêmes, de l'analyse des résultats et de leur interprétation, de la rédaction et de la finalisation du processus de publication. En tant que dernier auteur de ces articles et à titre d'encadrant de mes travaux de recherche, le professeur Diego Mantovani m'a conseillé et guidé tout au long de cette thèse et a, plus spécifiquement, révisé et finalisé la publication des articles précédemment mentionnés. La contribution des co-auteurs est la suivante :

Chapitre 1 : *Why Mechanical Properties of Collagen Scaffolds Should Be Tested in a Pseudo-Physiological Environment ?*

Auteurs : Meghezi S., Chevallier P. & Mantovani D.

Journal : Advanced Materials Research, publié (2011).

Lors de la rédaction de cet article, Pascale Chevallier m'a conseillé dans la structure et la cohérence de l'article.

Chapitre 2 : *Effects of a pseudophysiological environment on the elastic and viscoelastic properties of collagen gels.*

Auteurs : Meghezi S., Couet F., Chevallier P. & Mantovani D.

Journal : International journal of biomaterials, publié (2012).

Frédéric Couët a participé à l'analyse statistique des résultats et à la révision de l'article. Lors de la rédaction de cet article, Pascale Chevallier m'a conseillé dans la structure et la cohérence de l'article.

Chapitre 3 : *Engineering 3D Cellularized Collagen Gels for Vascular Tissue Regeneration., In Press (2014).*

Auteurs : Meghezi S., Seifu D. G., Bono N., Unsworth L., Mequanint K. & Mantovani D.

Journal : Journal of visualized experiments : JoVE, sous presse (2014).

La rédaction de cet article est le fruit d'un travail collectif et concerté entre Dawit G. Seifu (stagiaire postdoctoral), Nina Bono (étudiante au doctorat) et moi-même. Les figures ont été réalisées conjointement par Nina Bono et moi-même. Tous les co-auteurs ont participé à la révision de cet article.

Chapitre 4 : *Smooth Muscle Cells Remodeling of Collagen Scaffolds Yields Improved Anisotropic Mechanical Properties.*

Auteurs : Meghezi S., Seifu D. G. & Mantovani D.

Journal : en cours de publication (2015).

Dawit G. Seifu a participé à la réalisation des mesures du diamètre externe des échafaudages lors de la culture et ce en conditions stériles, ainsi qu'à la révision de l'article.

De par mon implication dans des projets découlant directement du mien ou dans des projets connexes, j'ai également contribué à la rédaction d'articles sur lesquels j'apparais en second auteur (Annexes B). Il est à noter que les expériences relatives à ces publications sont achevées. De plus, j'ai eu l'opportunité de présenter à des pairs dans les domaines des biomatériaux, du génie tissulaire et de la biomécanique des tissus biologiques, les résultats de mes travaux de recherche dans plusieurs confé-

rences internationales, nationales et locales (Annexes C). Finalement, je me suis toujours attaché à m'impliquer dans la vie étudiante et scientifique de mon laboratoire, dans le souci constant d'entretenir et de partager avec mes collègues et amis une passion commune pour la science. C'est pourquoi, je me suis investi tout au long de mon doctorat, dans l'organisation d'évènements scientifiques et dans la gestion d'associations étudiantes jusqu'à être président et co-fondateur du chapitre étudiants de Québec de la Société Canadienne des Biomatériaux (Annexes D).

En plus de sa renommée internationale dans les domaines de la mise en forme et de la fonctionnalisation de surface des matériaux, le Laboratoire de Biomatériaux et de Bioingénierie (LBB) a développé une expertise dans l'extraction et la reconstitution du collagène. De par le caractère multidisciplinaire du génie tissulaire et de l'équipe avec laquelle j'ai travaillé (et notamment avec les stagiaires), j'ai pu également élargir mon champ d'expertise (initialement centrée sur la chimie-physique des matériaux avec une spécialisation en caractérisation des matériaux polymères). Ainsi, j'ai appris les bonnes pratiques en salle de culture cellulaire, à caractériser la prolifération et l'activité métabolique des cellules et les techniques d'imagerie de ces dernières. Cependant, au début de ce projet doctoral, peu de techniques de caractérisation mécanique et biologique des structures de collagène étaient mises en place. Ainsi, ce projet doctoral a nécessité le développement de systèmes de caractérisation mécanique et biologique de structures vasculaires et la mise au point des protocoles associés. Par exemple, des systèmes d'accroche spécifiques ont été conçus pour ces gels de collagène hautement hydratés et pour la réalisation de tests mécaniques non conventionnels sur des structures en forme d'anneau et de forme tubulaire. En conséquence, l'expertise que j'ai acquise en caractérisation mécanique m'a permis de tester les propriétés de nombreux types de matériaux pour mes collègues (textiles, polymères naturels ou synthétiques, des composés métalliques fins, des tissus naturels durs et mous). De plus, afin de soumettre ces structures vasculaires à une stimulation mécanique pendant la croissance, j'ai contribué à la conception et au contrôle d'un bioréacteur dynamique. Finalement, il m'a été donné l'opportunité d'enseigner dans le cours de Matériaux pour l'ingénieur du département du génie des mines des matériaux et de la métallurgie.

Introduction

0.1 Le système vasculaire et ses pathologies

Le système cardiovasculaire est constitué du cœur, du sang et des vaisseaux sanguins. Le cœur est un organe musculaire assurant, par des contractions automatiques et rythmées, la circulation sanguine dans deux circuits : la circulation systémique et la circulation pulmonaire. Un système de circulation propre au cœur sert à irriguer ce muscle : c'est le système coronarien. Le moindre dommage porté à ce système peut provoquer une altération du fonctionnement du cœur et mener à la mort de l'organisme. Le sang oxygéné est distribué depuis le ventricule gauche du cœur vers tous les organes du corps par l'intermédiaire des artères systémiques et, suite à l'échange gazeux, le sang désoxygéné est ramené dans l'oreillette droite par les veines systémiques (circulation systémique). La circulation pulmonaire quant à elle, et grâce aux alvéoles pulmonaires, a pour fonction de réoxygéner le sang veineux arrivant de l'artère pulmonaire et de renvoyer le sang oxygéné au cœur par la veine pulmonaire.

Ces deux circulations sont assurées par un système complexe de vaisseaux sanguins. On distingue cinq types de vaisseaux sanguins dont la fonctionnalité, la taille et la composition sont étroitement liées à leur localisation par rapport au cœur : les artères élastiques, les artères musculaires, les artérioles, les capillaires et les veines. La paroi d'une artère ou d'une veine comprend trois couches ou tuniques (Figure 0.1, (Tortora and Grabowski, 2001)). La tunique externe (*adventitia*), composée de tissu conjonctif, contient des fibroblastes (FBs), des fibres de collagène de type I et quelques fibres élastiques qui permettent aux vaisseaux de s'étirer tout en empêchant une dilatation excessive des veines et des artères. Cette couche sert d'ancrage au tissu conjonctif environnant. En outre, la tunique externe des artères élastiques peut comporter des neurofibres et de minuscules vaisseaux sanguins (*vasa vasorum*). La tunique moyenne (*media*) se compose de cellules musculaires lisses (CMLs), orientées dans la direction circonférentielle, d'élastine, de collagène de type I, III et V, et de protéoglycanes. Elle assure la vasomotricité du vaisseau sanguin (contraction ou relaxation de la paroi vasculaire en fonction de la pression et du débit sanguins). Enfin, la tunique interne (*intima*) est constituée de collagène de type IV, de fibronectine, de laminine et d'un endothélium, une variété d'épithélium pavimenteux qui empêche l'adhésion des globules rouges (hématies ou érythrocytes), des globules blancs (leucocytes) et des plaquettes (thrombocytes). Les cellules endothéliales (CEs) y sont orientées dans la direction du flux sanguin.

Proches du cœur, les artères élastiques ou vaisseaux de conduction, telles que l'aorte et l'artère pulmonaire, ainsi que leurs ramifications, reçoivent le sang directement du cœur avec une pression forte. Ces artères, qui doivent être plus résistantes, ont une *media* épaisse contenant beaucoup de fibres élastiques et présentent un grand diamètre. Le caractère élastique de ces vaisseaux est essentiel pour pouvoir s'étirer et emmagasiner de l'énergie due à la forte pression sanguine lors de la systole. De plus, les parois artérielles doivent pouvoir restaurer cette énergie pour maintenir la pression relativement constante même lorsque les ventricules sont au repos (diastole).

Un peu plus loin du cœur, les artères musculaires distribuent le sang oxygéné dans tout le corps (ex. les artères coronariennes, radiales, fémorales et tibiales). Tout comme les artères élastiques, les artères musculaires possèdent également les trois tuniques mais elles contiennent moins de fibres élastiques et beaucoup plus de CMLs qui sont responsables de leur importante vasomotricité. Leur *media* est limitée de part et d'autre par une lamelle élastique appelée limitante élastique interne et limitante élastique externe (moins épaisse que l'interne).

En périphérie du corps, les artérioles, ou vaisseaux de résistance, sont les plus petites artères (diamètre compris entre 100 et 300 μm) qui délivrent le sang aux capillaires. Elles possèdent également les trois tuniques mais leur *media* ne contient que quelques CMLs et quelques fibres élastiques. Elles contrôlent la pression et le débit sanguins de par leur forte vasomotricité. La résistance à l'écoulement qu'elles induisent aide les parois artérielles à s'étirer sous l'effet des contractions du cœur.

Les capillaires sont les plus petits vaisseaux sanguins (5 à 10 μm de diamètre). Ils ne possèdent qu'une tunique constituée d'une seule couche de CE reposant sur une lame basale. Ils sont le principal lieu des échanges avec le liquide interstitiel. Il est intéressant de noter la présence de péricytes au niveau de la lame basale de l'endothélium des vaisseaux sanguins de petits diamètres tels que les artérioles, les capillaires et les veinules. De par leur capacité contractile, les péricytes régulent le débit sanguin au niveau des capillaires et des veinules post-capillaires et sont ainsi des acteurs majeurs de la régulation métabolique. De plus, outre leur rôle important dans le processus d'angiogenèse, ces cellules auraient la capacité de se différencier en adipocytes, en ostéocytes, en chondrocytes et en myocytes selon leur localisation. Finalement, il a été montré qu'elles pouvaient se différencier en macrophages, en FBs et en CMLs (Thiriet, 2011).

Enfin, les veines possèdent également les trois tuniques. Du fait de la faible pression lors du retour sanguin vers le cœur, leur paroi vasculaire est fine et extensible, leur diamètre interne est élevé pour pouvoir conduire un volume important de sang. Pour éviter le reflux sanguin dans ce système à basse pression, les veines sont équipées de valvules (Figure 0.1, (Tortora and Grabowski, 2001)).

L'appareil cardiovasculaire est donc constitué par un réseau de conduits ô combien complexe et performant. Toutefois, les dysfonctionnements de ce système sont une cause majeure de mortalité dans le monde. Ainsi, en 2012, sur les 56 millions de décès de par le monde, 17,5 millions ont été causés par des pathologies affectant le système circulatoire, représentant 31 % de la mortalité mondiale (World Health Organization, 2014). En 2010, environ 8,5 millions d'américains âgés de plus de 40 ans

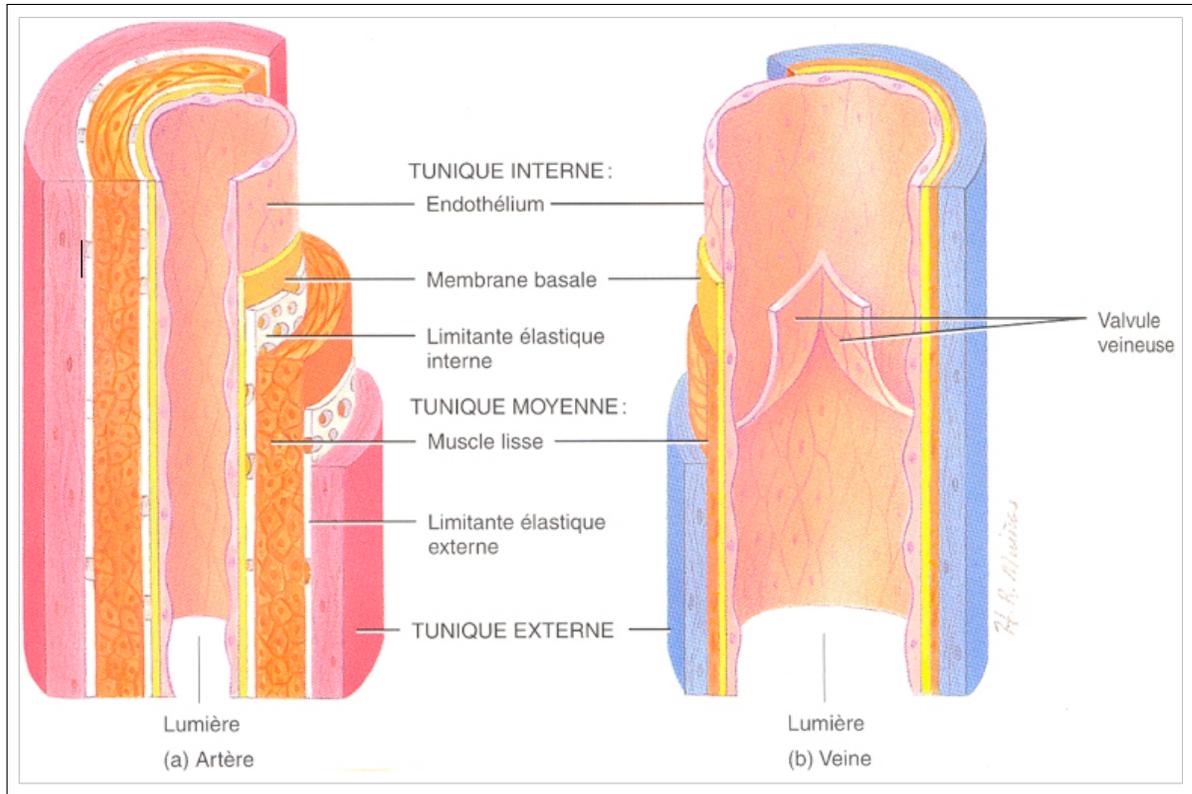


FIGURE 0.1 – Schéma de la composition des différentes tuniques constituant la paroi des vaisseaux sanguins (Tortora and Grabowski, 2001).

souffraient d'une maladie vasculaire périphérique (Go et al., 2013) et les coûts directs et indirects attribués aux maladies cardiovasculaires furent estimés à 503,2 milliards de dollars rien qu'aux États-Unis (Lloyd-Jones et al., 2010). À l'origine de la plupart des maladies vasculaires, l'athérosclérose est une réaction inflammatoire chronique en réponse à une agression au niveau de l'endothélium des artères de moyenne et de grande dimension et de certaines artères musculaires, en particulier les coronaires. Elle se caractérise par l'accumulation de lipides, de glucides complexes, de sang, de produits sanguins et d'éléments fibreux dans des lésions de la paroi interne de ces vaisseaux sanguins, rétrécissant leur lumière. Ce processus implique la mobilisation de macrophages riches en cholestérol (cellules spumeuses), l'accumulation de CMLs et de débris riches en lipides. Cette masse fibreuse ou plaque d'athérome peut encore évoluer par calcification ou ulcération de la surface luminale ou encore par hémorragie à partir de petits vaisseaux sanguins provenant de la *media* et progressant vers la lésion. La masse fibreuse peut croître ainsi jusqu'à occulter toute la lumière du vaisseau mais la complication clinique la plus fréquente est l'oblitération totale de la lumière suite à la présence d'un thrombus. Souvent ce thrombus provient de l'érosion ou de la rupture d'une plaque d'athérome (Ross, 1993; Lusis, 2000). En conséquence, sans en être l'unique cause, l'athérosclérose peut être associée à plusieurs autres complications et notamment aux infarctus du myocarde, aux accidents vasculaires cérébraux et aux thromboses des membres inférieurs et supérieurs. Les troubles du système circulatoire restent

toujours une cause majeure de santé publique même si les importants progrès techniques dans les traitements de ces maladies (présentés dans la Section 0.2) ont permis de diminuer considérablement leur prévalence ([Statistics Canada, 2011](#)).

0.2 Les solutions cliniques aux pathologies vasculaires

En guise de premier traitement de ces maladies, les médecins préconisent de suivre un régime alimentaire hypocholestérolémiant combiné à une activité physique régulière. Ensuite, le traitement par des médicaments permet de diminuer le taux de cholestérol, la pression sanguine ainsi que la propension du sang à coaguler. Finalement, des interventions chirurgicales sont nécessaires pour le traitement de maladies à un stade plus avancé. Pour illustrer ces pratiques, la présente section traitera, en tant que principal exemple, de la coronaropathie car elle est la plus fréquente des maladies cardiovasculaires. En effet, en 2009 aux États-Unis, elle était responsable de 49 % des décès attribuables à des maladies cardiovasculaires ([Go et al., 2013](#)). L'oblitération ou le rétrécissement des artères coronaires peut être traitée par pontage artériel à l'aide d'un greffon biologique ou synthétique ou par intervention coronarienne percutanée (ICP).

0.2.1 Le pontage artériel à l'aide de substituts biologiques

Le pontage artériel est le traitement le plus couramment pratiqué pour la revascularisation des artères coronariennes ou pour traiter les maladies vasculaires périphériques. Cette technique consiste à contourner l'obstacle que constitue la thrombose ou la sténose à l'aide d'un conduit biologique ou synthétique. La mise au point de cette technique chirurgicale est le résultat d'une longue série de développements depuis la maîtrise des techniques de suture à la compréhension des phénomènes physiques et biochimiques impliqués lors des transplantations en passant par le développement des matériaux utilisés pour la suture ou le greffon. Dans ces différentes étapes, le célèbre chirurgien chercheur Alexis Carrel a eu une influence majeure. Ses travaux sur les techniques d'anastomose, et leur application dans la transplantation de vaisseaux sanguins et d'organes entiers lui ont valu le prix Nobel en Physiologie ou Médecine en 1912 ([Carrel, 1902](#); [Carrel and Guthrie, 1906](#); [Carrel and Lindbergh, 1938](#); [Nobel Media AB, 2014](#)).

Parallèlement, Goyanes fut le premier à implanter en 1906 un greffon autologue chez l'humain, en l'occurrence une veine poplitée autologue pour le traitement d'un anévrisme de l'artère poplitée ([Goyanes, 1906](#)). Le vaisseau sanguin naturel, secondaire et autologue apparaît alors comme le substitut vasculaire de premier choix. Ainsi, depuis les années 50, la veine saphène autologue est utilisée en tant que greffon pour pontage artériel. Elle présente une très bonne fonctionnalité à court terme ; environ 85 % à 90 % des greffons veineux restent fonctionnels un an après un pontage coronarien. Par contre, sa performance à long terme est médiocre avec seulement la moitié des greffons veineux encore fonctionnels après dix ans d'implantation ([Khot, 2004](#); [Shah et al., 2005](#); [Collins et al., 2008](#); [Desai et al., 2004](#)). À titre d'exemple, dans le cadre d'un pontage artériel fémoro-poplitée au dessus

du genou, les taux de succès d'une veine saphène autologue après 5 ans d'implantation sont compris entre 60 % et 80 % (Johnson and Lee, 2000). Malgré cela, encore actuellement, les études cliniques de la performance des greffons vasculaires en cours de développement utilisent toujours la veine saphène comme référence (Konig et al., 2009).

Pour contourner le fort taux d'échec des conduits veineux à long terme, Carpentier *et al.* ont introduit l'utilisation de l'artère radiale pour la revascularisation du myocarde (Carpentier et al., 1973). Dès lors, les conduits artériels de substitution, notamment les artères mammaires internes, les artères thoraciques et l'artère radiale (Beghi et al., 2002), ont gagné en popularité lors des procédures de pontage des artères coronariennes du fait de leur plus grande accessibilité, de leurs dimensions plus proches de celles des coronaires, de leur longueur et de leur plus faible propension à l'hyperplasie intimale (Harskamp et al., 2013; Bhan et al., 1999; Hayward and Buxton, 2013). En revanche, pour le traitement des vaisseaux périphériques, la veine saphène reste le matériau le plus utilisé.

L'utilisation de ces vaisseaux autologues est toutefois limitée et ce, à plusieurs égards. Tout d'abord, comme mentionné précédemment, ils sont susceptibles à l'athérosclérose et à l'hyperplasie intimale, qui peuvent se compliquer par des ulcérations, de la calcification, de la dilatation ou de la formation d'anévrisme et de thrombose (Sarjeant and Rabinovitch, 2002). La pathophysiologie des greffons pendant le premier mois post-opératoire est principalement liée à une thrombose résultant d'un traumatisme chirurgical ou à l'écoulement hémodynamique altéré qui endommage l'endothélium et réduit sa fonctionnalité (Schussheim and Fuster, 1998). Il s'avère que la manipulation et l'implantation des greffons peuvent engendrer une réponse inflammatoire s'accompagnant de l'adhésion de plaquettes et de leucocytes, ce qui peut mener à la thrombose et à l'occlusion prématurée des greffons (Eslami et al., 2001; Jeremy et al., 1997). Puis, lors d'un pontage artériel à l'aide d'un conduit veineux, le processus critique de remodelage de la paroi vasculaire des greffons en réponse à la circulation artérielle est également un important déterminant du temps de fonctionnalité du substitut vasculaire (Conte, 2007). Effectivement, après l'implantation et le rétablissement de la circulation sanguine, les greffons veineux sont immédiatement soumis aux pressions pulsatiles artérielles plus intenses (environ 100 mmHg au lieu d'environ 10 mmHg) et aux déformations associées plus importantes. De plus, le changement de débit sanguin engendre une importante contrainte de cisaillement longitudinale sur les parois vasculaires (Dobrin et al., 1989; Powell and Gosling, 1998). Ainsi, par un processus de compensation, l'*intima* devient hyperplastique et forme ce qu'on appelle une *neointima* (Jeremy et al., 1997). Cette *neointima* s'apparente à une combinaison des couches médiane et intimale d'une artère normale et est principalement composée de CMLs (Dilley, 1988). Ces dernières sécrètent alors des cytokines et des agents proinflammatoires qui créent un environnement hautement athérogénique et entraînent le développement accéléré d'une plaque d'athérome. Parallèlement, les CE prolifèrent et migrent de sorte à réparer l'endothélium endommagé. Ce processus prend une à deux semaines (Zwolak et al., 1987; Ehsan et al., 2002). La *neointima* continue de s'épaissir lors des 4 à 12 mois qui suivent de par la prolifération des CMLs, de la production de collagène et d'agents protéolytiques (Wong et al., 2008; Owens et al., 2006). À côté de cela, des facteurs additionnels peuvent être à l'origine de l'échec

d'un greffon tels que des anomalies veineuses préexistantes, la distension des veines, l'ischémie de la paroi vasculaire (de par son épaissement et l'absence de vasa vasorum) ou encore des facteurs techniques ou physiques tels que le faible débit, la différence de diamètre entre le greffon et l'artère du patient malade ou encore des irrégularités au niveau des anastomoses provoquant des turbulences de l'écoulement sanguin. À tous ces facteurs limitants, vient s'ajouter le fait que de nombreux patients, du fait de leur âge et de leur maladie à un stade avancé, ne possèdent plus de veines ou d'artères autologues saines disponibles à cause de précédentes ponctions, de phlébites, de varices, d'hypoplasies ou d'incompatibilité en termes de dimensions (Taylor et al., 1990, 1987; Hölzenbein et al., 1996).

L'absence de substituts autologues adéquats a poussé les chercheurs à trouver des alternatives en orientant leurs recherches vers les allogreffes, les xéno-greffes et les greffons synthétiques. Dès 1948, Gross *et al.* ont introduit l'utilisation des allogreffes conservées au frais ou cryoconservées suite à leur décellularisation et fixation (Gross et al., 1948). Cette stratégie a été rapidement abandonnée à cause de leur conservation difficile, de leur détérioration à long terme, de la formation d'anévrismes et de l'avènement des prothèses synthétiques (Chlupáč et al., 2009). Ces greffons ont été réintroduits bien plus tard pour le remplacement de prothèses aortiques infectées (Kieffer et al., 2004), la revascularisation des extrémités inférieures (Dardik et al., 2002; Fahner et al., 2006; Matia et al., 2007) ou pour la revascularisation d'organes transplantés (Matia et al., 2008). Cependant, les allogreffes ne sont pas aujourd'hui utilisées de manière routinière mais principalement dans des situations critiques nécessitant l'amputation d'une jambe, lorsqu'une nouvelle chirurgie est nécessaire ou dans le cas d'une zone infectée. Elles doivent souvent être renforcées à l'extérieur pour éviter la formation d'anévrisme. Des études montrent alors une fonctionnalité intéressante de ces conduits, notamment lorsque les veines ombilicales humaines préservées et renforcées sont comparées au ePTFE (Johnson and Lee, 2000). Pour ce qui est de l'utilisation des xéno-greffes, on peut noter que Rosenberg *et al.* proposèrent l'utilisation d'une artère d'origine bovine dès 1966 (Rosenberg et al., 1966). La plupart des études cliniques de ces greffons vasculaires les impliquent en tant qu'accès pour hémodialyse (shunt artérioveineux dans l'avant-bras entre l'artère humérale et la veine axillaire) (Schmidt and Baier, 2000). Les artères carotides bovines (Hurt et al., 1983) et les urètres bovines décellularisées implantées chez l'homme ont donné des résultats très mitigés (Chemla and Morsy, 2009). Par contre, l'implantation des veines mésentériques bovines réticulées au glutaraldéhyde a généré une importante réduction des taux d'infection, de thrombose et de réintervention chirurgicale (Katzman et al., 2005). Malgré des résultats encourageants, l'utilisation en clinique de ces greffons d'origine allogénique ou xéno-génique reste restreinte à cause de leur durabilité limitée de par leur calcification et leur propension à développer des anévrismes, voire des ruptures. Face à ces difficultés et à la complexité de la conservation de ces matériaux biologiques, les chercheurs ont également exploré le potentiel des matériaux synthétiques en tant que substituts vasculaires.

0.2.2 Les prothèses synthétiques

Lors du traitement d'une pathologie coronarienne ou vasculaire et dès lors que l'autogreffe s'avère impossible pour les raisons mentionnées précédemment, l'implantation d'une prothèse synthétique reste la seule alternative. Dès 1952, Voorhees *et al.* envisagèrent de traiter chirurgicalement l'athérosclérose en remplaçant les vaisseaux sanguins malades par des constructions synthétiques (Voorhees *et al.*, 1952). Ceci aboutit à l'utilisation répandue en chirurgie cardiovasculaire du Dacron® (polyéthylène téréphtalate (PET), breveté en 1950) et du Teflon® (polytetrafluoroéthylène expansé (ePTFE), breveté en 1969). Le choix s'est porté sur ces matériaux essentiellement pour leur inertie chimique reconnue. L'opinion générale des chercheurs était qu'il fallait utiliser des matériaux interagissant le moins possible avec l'organisme. Plus d'une cinquantaine d'années plus tard, globalement les mêmes matériaux sont utilisés. Cependant, lors de pontages artériels, les prothèses de Teflon® montrent rapidement un taux d'échec de 45 % après 6 mois d'implantation en position fémorotibiale (Sayers *et al.*, 1998). L'espérance de fonctionnalité d'une prothèse en Teflon® remplaçant une aorte est de 91 à 95 % après 5 ans d'implantation (Friedman *et al.*, 1995; Prager *et al.*, 2001), et passe à 45 % lors d'un pontage fémoropopliteal (Green *et al.*, 2000). La première prothèse en Dacron® fut fabriquée en 1957. Le taux de succès d'une prothèse en Dacron® utilisée dans le pontage de l'artère fémorale après 10 ans d'implantation est de 56 % chez de jeunes patients atteints d'une athérosclérose précoce (Jackson *et al.*, 2004). En pratique, les prothèses synthétiques sont efficaces pour le remplacement des vaisseaux de calibre important (diamètre > 6 mm), mais elles montrent leur limite en tant que substitut de vaisseaux sanguins de faible diamètre (< 6 mm) (Hoerstrup, 2001). Les principales causes de ces échecs résident dans leur fort caractère thrombogène et dans l'hyperplasie intimale pouvant se développer dans les 2-24 mois suivant l'implantation. Le fort caractère thrombogène s'explique par l'absence d'un endothélium dans le *lumen* de la prothèse même après implantation (Berger *et al.*, 1972). L'hyperplasie intimale est un processus adaptatif du tissu sous-endothélial aux différents changements locaux générés par la mise en place de la prothèse et qui se traduit par la prolifération et la migration des CMLs depuis la *media* vers l'*intima* et la synthèse de matrice extracellulaire (MEC). L'étiologie de l'hyperplasie intimale est multi-factorielle et peut être causée, entre autres, par le traumatisme chirurgical, la perturbation de l'écoulement sanguin au niveau de l'anastomose, par un diamètre et une compliance de ces vaisseaux artificiels de faible calibre différents de ceux du vaisseau naturel à remplacer (Couet *et al.*, 2007).

Le Tableau 0.1 propose un récapitulatif non exhaustif des prothèses utilisées en clinique et montre comment la localisation de la pathologie peut influencer le type de prothèse utilisée par le chirurgien.

0.2.3 Angioplastie et tuteurs artériels

Depuis les années 90, l'angioplastie coronarienne associée à la mise en place d'un tuteur ou extenseur coronarien (stent) est un procédé couramment utilisé afin de rouvrir une artère obstruée. Le tuteur artériel est une endoprothèse de forme tubulaire constituée par une petite maille souvent métallique. Cette endoprothèse entourant un ballon est mise en place à l'aide d'un cathéter dans la zone d'obstruction,

	Localisation				
	Artères de grand calibre (≥ 8 mm)	Artères de moyen calibre (6-8 mm)	Artères de petit calibre (≤ 6 mm)	Reconstruction veineuse	Accès vasculaire pour hémodialyse
Priorité dans le choix du substitut vasculaire	Aorte, crosse et arc aortiques, artères iliaque et fémorales	Carotide, artère subclaviaire, artère fémorale commune, artères viscérales et les artères au-dessus du genou	Les coronaires, les artères sous le genou, les artères tibiales et péronières	Les veines caves supérieure et inférieure, les veines ilico-fémorales, les veines portes et viscérales	Surtout dans les extrémités des membres supérieurs
1 ^{er} choix	Prothèse (PET, ePTFE)	Prothèse ou autogreffe (équivalents)	Autogreffe veineuse ou artérielle	Grefe de veine saphène spiralée, autogreffe veineuse profonde	Fistule artérioveineuse native
2 ^e choix	Allogreffe, autogreffe veineuse profonde	Prothèse ou autogreffe	Composite greffon synthétique et veine autologue (de longueur insuffisante), interposition des veines (de longueur insuffisante), prothèses synthétiques (PET ou ePTFE), allogreffes, prothèses biosynthétiques	Allogreffe, ePTFE, PET	ePTFE, PU, xenogreffe, substituts créés par génie tissulaire (essais cliniques en cours)

Tableau 0.1 – Les substituts vasculaires utilisés en clinique en fonction de la localisation de la pathologie. Les prothèses biosynthétiques combinent une prothèse et l'implantation de cellules (adapté de (Chlupác et al., 2009)).

puis le ballon est dilaté déployant le stent sur les parois artérielles. Cette technique permet de rétablir le flux sanguin dans le vaisseau malade, lui apporte un soutien mécanique et diminue la probabilité de réocclusion. Cependant, la resténose chez 20 % des patients dans les 6 premiers mois et la libération d'éléments toxiques par oxydation métallique sont les limitations de cette technique. Pour pallier ces difficultés, plusieurs stratégies sont actuellement étudiées. Les principales sont le recouvrement des tuteurs par une couche de polymères antioxydante permettant d'améliorer l'hémocompatibilité, voire même de créer des dispositifs à relargage de médicaments, et la réalisation de stents biodégradables (Lewis et al., 2007; Tatoulian et al., 2007; Hermawan et al., 2007).

0.3 Problématique générale

Sans alternative au manque de greffons autologues et avec les limitations des prothèses synthétiques, les chirurgiens vasculaires font face au quotidien à **un besoin urgent de substituts de vaisseaux sanguins de faible calibre (diamètre < 6 mm)** pour des patients atteints d'une pathologie des artères coronariennes ou des vaisseaux périphériques. Le Laboratoire de Biomatériaux et de Bioingénierie étudie des solutions permanentes dans le traitement des maladies cardiovasculaires (contrairement à la solution temporaire apportée par les prothèses actuelles) en proposant des substituts totalement biologiques construits essentiellement par les cellules vasculaires supportées par des structures à base de collagène. Placées dans un environnement adéquat, les cellules dégraderont la matrice de collagène et produiront une nouvelle matrice extracellulaire, c'est-à-dire un tissu régénéré en laboratoire. Ces substituts devront avoir des fonctionnalités proches de celles du tissu vasculaire naturel et devront à terme pouvoir servir de modèles pour l'étude des pathologies vasculaires et l'essai de traitements thérapeutiques.

0.4 Les différentes voies de recherche actuelle

0.4.1 Amélioration des propriétés biologiques et mécaniques des matériaux synthétiques

Au cours des années 70, l'opinion générale des chercheurs change progressivement et l'idée selon laquelle les matériaux utilisés ne doivent plus être inertes commence à s'imposer ; bien au contraire, ils doivent interagir avec le corps de manière contrôlée et ciblée pour favoriser leur intégration à l'organisme. Des pionniers tels que Mansfield et Sauvage (Mansfield et al., 1975), Herring (Herring et al., 1979) et Graham (Graham, 1980) ont posé les bases d'une réflexion menant au concept d'endothélialisation des prothèses synthétiques avec des CE autologues, puis plus tard aux principes du génie tissulaire. Ce concept présente l'avantage d'améliorer l'hémocompatibilité de ces prothèses et de contourner en partie le problème de réponse immunitaire. Ces chercheurs préfigurent un nouveau mouvement de pensée selon laquelle la prothèse artérielle doit être en complète interaction et synergie avec l'organisme de l'hôte et non plus rester inerte chimiquement.

Les premiers essais réalisés utilisaient la méthode d'endothélialisation dite en "une étape" dans laquelle les CEs étaient extraites du tissu veineux et directement implantées sans culture préalable. Ainsi, en 1978, Herring *et al.* ont ensemencé la lumière de greffons vasculaires synthétiques avec des CEs afin d'en améliorer la fonctionnalité (Herring *et al.*, 1978). Cependant, contrairement aux expériences en laboratoire et aux études sur les modèles animaux, cette approche s'est révélée être un échec au niveau clinique (Herring *et al.*, 1984) essentiellement à cause du faible nombre de cellules disponibles. Ensuite, des techniques d'extraction de masse de CEs depuis le tissu adipeux ont été mises au point (Williams, 1998) en alternative aux précédentes extractions depuis les veines sous-cutanées qui ne permettaient que de petites biopsies (Zilla *et al.*, 1990, 1989a, 1994b). Ainsi, dans la seconde moitié des années 80, suffisamment de données expérimentales furent accumulées pour justifier le lancement de 3 études cliniques indépendantes (Zilla *et al.*, 1994a; Leseche *et al.*, 1995; Magometschnigg *et al.*, 1992). De plus, l'utilisation de la technique d'"endothélialisation en deux étapes" a permis d'améliorer nettement les résultats cliniques (Zilla *et al.*, 1994a; Magometschnigg *et al.*, 1992; Deutsch *et al.*, 1999; Meinhart *et al.*, 1997), les échantillons explantés présentant un endothélium confluent dans leur région médiane et ce, des années après l'implantation. Pour réaliser ce type d'endothélialisation, les CEs sont d'abord extraites et mises en culture pendant 2-4 semaines afin d'obtenir un nombre suffisamment élevé de cellules. Ensuite, l'endothélialisation se fait en conditions contrôlées pendant quelques heures puis ces prothèses sont implantées dans l'organisme du patient. En 1987, Zilla *et al.* ont utilisé cette technique pour créer un endothélium humain autologue sur des prothèses en ePTFE de petit calibre préalablement traitées à la fibrine. Ils ont ainsi montré que 65 % des prothèses traitées restaient fonctionnelles après 9 ans d'implantation contre seulement 16 % pour les prothèses non traitées (Deutsch *et al.*, 1999). Les travaux de l'équipe de Peter Zilla établirent donc la nécessité de fournir une MEC aux CEs et de les cultiver *in vitro* afin d'obtenir un endothélium *in vivo*. Après plus de 20 ans d'utilisation clinique, cette approche met en évidence le rôle essentiel de l'endothélialisation pour améliorer la performance clinique des prothèses synthétiques (Deutsch *et al.*, 2009).

D'autres approches ont été étudiées afin d'améliorer l'hémocompatibilité et de réduire l'hyperplasie intimale des prothèses synthétiques. Une première approche consiste à fonctionnaliser la surface luminale avec des molécules aux propriétés anticoagulantes telles que le polyéthylène glycol, la phosphorylcholine, le chitosane, le dextrane ou encore l'héparine qui vont inhiber l'adhésion de protéines plasmatiques responsables de la formation de caillots sanguins. C'est ainsi que l'héparine a été utilisée cliniquement pour traiter les phénomènes de thrombose. L'héparine est un mélange de polysaccharides sulfatés ayant des propriétés anticoagulantes qui inhibe la thrombine et les facteurs IX, X, XI et XII activés. Son utilisation clinique a également mis en évidence son effet inhibiteur de la prolifération des CMLs (Letourneur *et al.*, 1995). La méthode de fonctionnalisation à l'héparine de la surface luminale ayant rencontré le plus de succès d'un point de vue clinique est la Carmeda BioActive Surface (CBAS ; W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, Arizona) (Matheve, 1996; Riesenfeld *et al.*, 1995). Cette méthode permet de greffer la molécule de manière covalente tout en offrant à son site actif la possibilité de se lier à l'antithrombine III, assurant ainsi sa bioactivité (Riesenfeld *et al.*, 1995).

Les études ont montré que ce type de fonctionnalisation aboutit à une diminution de la déposition de plaquettes, une réponse inflammatoire réduite (Fukutomi et al., 1996; Borowiec et al., 1992) et une réduction du caractère thrombogène (Serruys et al., 1996, 1998). Ainsi, le Gore Propaten® (W. L. Gore & Associates, Inc, Flagstaff, Ariz) est un substitut vasculaire en ePTFE introduit en 2006 en tant qu'accès pour hémodialyse et dont la lumière a été fonctionnalisée avec de l'héparine par cette technique. Les implantations dans les modèles animaux et les études cliniques ont mis en évidence une meilleure performance de ces prothèses par rapport aux prothèses en Teflon® standard avec des taux de succès comparables à ceux des greffons autologues chez l'homme (Daenens et al., 2009; Hugel et al., 2009; Lösel-Sadée and Alefelder, 2009; Pulli et al., 2010; Heyligers et al., 2006). Davidson *et al.* ont publié en 2009 les premiers résultats d'une étude clinique non-randomisée portant sur l'utilisation de substituts en e-PTFE fonctionnalisés à l'héparine en tant qu'accès pour hémodialyse. Après un an d'implantation, 78 % de ces prothèses fonctionnalisées ne présentaient pas de caillot sanguin, contre seulement 58 % des prothèses non traitées (Davidson et al., 2009). Ces premiers résultats mettent donc en évidence les bénéfices cliniques de cette fonctionnalisation à l'héparine en terme de thromborésistance, de réduction d'adhésion des plaquettes et de réponse inflammatoire aux prothèses (Lin et al., 2004; Fukutomi et al., 1996).

Une seconde approche est celle qui consiste à faire adhérer des molécules bioactives telles que le collagène, la laminine ou la fibronectine (Vallières et al., 2007) ou encore des séquences peptidiques qui vont favoriser l'adhésion et la prolifération des CEs (Hoesli et al., 2014; Boivin et al., 2013). Ces techniques nécessitent un traitement de surface spécifique des prothèses (Sarra-Bournet et al., 2006).

Finalement, parallèlement à ces stratégies d'amélioration des propriétés biologiques des prothèses synthétiques, des efforts de recherche d'optimisation des propriétés mécaniques ont été développées ces dernières années. Ainsi, les prothèses synthétiques en copolymères de polyuréthane montrent des propriétés élastiques très intéressantes. L'implantation de ces prothèses a mis en évidence leur facilité d'utilisation et de suture, un très bon processus de cicatrisation et la présence de CEs dans la lumière lorsque le flux sanguin est faible. L'utilisation de ces prothèses en tant qu'accès pour hémodialyse a fait l'objet d'une étude clinique avec des résultats positifs, 66.7 % des prothèses restant fonctionnelles au bout d'un an d'implantation (Wiese et al., 2003). Cependant, des tests cliniques plus approfondis, lors de pontages de vaisseaux périphériques, sont nécessaires pour confirmer cette étude (Chlupáč et al., 2009).

Ces décennies de travaux de recherche ont permis d'augmenter la performance des prothèses synthétiques et ce, de manière significative. Néanmoins, les propriétés biologiques ou mécaniques de ces structures sont loin de reproduire celles des tissus naturels. Par conséquent, la notion selon laquelle le substitut idéal de vaisseau sanguin devrait avoir une structure la plus proche possible de celle du vaisseau naturel, avoir la capacité d'interagir totalement avec l'organisme, voire même la capacité de s'intégrer complètement à ce dernier, devient un critère primordial constituant la clé de voute des travaux en génie tissulaire.

0.4.2 La médecine régénératrice et le génie tissulaire vasculaire

Le génie tissulaire est une science interdisciplinaire relativement jeune qui consiste à appliquer les principes et les méthodes d'ingénierie et des sciences de la vie afin de développer des substituts biologiques qui restaurent, maintiennent et/ou améliorent la fonction des tissus naturels (Campbell and Campbell, 2007; Vara et al., 2005; Zhang et al., 2007; Ratcliffe, 2000). Le génie tissulaire vasculaire vise en particulier à la construction d'un vaisseau sanguin présentant les propriétés biologiques et mécaniques proches de celles du vaisseau naturel. Cette démarche doit alors aboutir à l'élaboration d'un tissu vivant qui puisse interagir et s'adapter à son environnement biologique et qui ait la capacité de s'auto-régénérer et de s'auto-réparer. Bref, ceci revient à dire que le tissu régénéré doit avoir la capacité de s'intégrer complètement dans l'organisme hôte. La prolifération tridimensionnelle des cellules recréant une MEC, en présence ou en l'absence d'un support, est un dénominateur commun à tous les travaux de génie tissulaire. Les caractéristiques recherchées pour un tel biomatériau sont présentées dans le Tableau 0.2 (Mitchell and Niklason, 2003; Campbell and Campbell, 2007; Catto et al., 2014).

Sans avoir la prétention de présenter une revue de littérature exhaustive dans un domaine de recherche extrêmement prolifique, la suite de cette section décrit quelques travaux marquants dans le domaine du génie tissulaire vasculaire.

Utilisation de la réaction face à un corps étranger en génie tissulaire

Toute implantation d'un dispositif médical dans un organisme provoque un certain degré de traumatisme à l'organisme hôte qui répondra face à la présence de ce corps étranger. Campbell *et al.* en 1999 ont mis à profit ces processus de réaction inflammatoire et de cicatrisation pour produire un greffon artériel autologue totalement biologique (Campbell et al., 1999). Pour cela, ils ont placé un tube de Silastic® (silicone) dans la cavité péritonéale de rats et de lapins, utilisant ainsi l'organisme hôte comme un bioréacteur. Un phénomène d'encapsulation fut observé autour de la prothèse 2 ou 3 semaines après l'implantation. La capsule fibreuse était composée de couches de myofibroblastes, de matrice de collagène et d'une couche de mésothélium. Au bout de ces 2 semaines, l'échantillon a été récupéré, la matrice a été dissociée du tube de Silastic® et transplantée en tant que greffon en position aortique ou au niveau de la carotide. La matrice tubulaire résultante fut alors retournée dans le but d'exposer le mésothélium au flux sanguin et d'obtenir ainsi une structure encore plus similaire aux vaisseaux naturels. La transplantation a été menée pendant 4 semaines aboutissant à des structures contenant des lamelles élastiques identifiables et des propriétés de vasoconstriction (Campbell et al., 1999). Ces structures ont montré des pressions à la rupture de 2500 mmHg (Chue et al., 2004). Pour référence, les veines saphènes humaines présentent une pression à la rupture de ≈ 2000 mmHg alors que les valeurs de pression à la rupture des artères peut aller au-delà de 3000 mmHg (Lamm et al., 2001; Konig et al., 2009). Cette technique est très intéressante de par le temps de culture relativement court et le fait qu'elle produit un tissu autologue. Cependant, les principales limitations de cette technique sont la nécessité d'intervention chirurgicale à 2 reprises au minimum, la possible adhésion du tube de Silastic® à la paroi péritonéale, et le manque de données cliniques relatives à l'implantation

Propriétés	Caractéristiques
Biocompatibilité	<ul style="list-style-type: none"> - Non-cytotoxique. - Non-immunogène, -carcinogène ou -allergène. - Caractère non-thrombogène même lors du remplacement de vaisseaux ayant un faible débit sanguin : nécessité d'un endothélium confluent, quiescent et fonctionnel. - Faible risque d'infection.
Propriétés mécaniques	<ul style="list-style-type: none"> - Propriétés mécaniques et viscoélastiques similaires à celles des artères naturelles qui seront remplacées : <p>Rigidité, élasticité, résistance à la traction, compliance, pression à la rupture.</p>
Fonctionnalité	<ul style="list-style-type: none"> - Vasoactivité (réponse adéquate aux stimuli chimiques, mécaniques et électriques) : nécessité d'une couche médiane contenant des CMLs avec un phénotype contractile. - CMLs et MEC organisées de manière similaire à celle du tissu vasculaire à remplacer. - Implantable chez l'enfant (taille qui évolue avec celle de l'enfant).
Manufacturabilité	<ul style="list-style-type: none"> - Propriétés précédemment citées stables dans le temps. - Disponible sous différentes formes et tailles pour pouvoir remplacer une large gamme de vaisseaux cardiaques et périphériques. - Suture facile à réaliser résultant en un minimum de points et de voies d'hémorragie suite à l'implantation. - Facile à manipuler en milieu hospitalier. - Faible coût de production (source abondante et renouvelable pour le matériau de base, faibles coûts de mise en forme et de traitement, temps de production minimum). - Reproductibilité du processus de production en structures tridimensionnelles.

Tableau 0.2 – Cahier des charges des propriétés d'un substitut vasculaire idéal créé par génie tissulaire. Adapté de (Lee et al., 2001a).

Pour information, le module élastique des artères humaines est \approx de 1 MPa (Berglund et al., 2003), la pression à la rupture et la compliance de la veine saphène humaine sont respectivement \approx 1500-2000 mmHg et \approx 0,7-1,5 %/mmHg (L'Heureux et al., 2006).

chez des sujets humains malades.

Les structures auto-assemblées

À la fin des années 90, L'Heureux *et al.* ont proposé une approche originale de régénération de tissu en laboratoire, dénommée "la technique d'auto-assemblage cellulaire". Ce travail s'appuie sur le potentiel des cellules cultivées en présence d'acide ascorbique à produire une quantité importante de leur propre matrice extracellulaire. La première application de cette technique fut de produire des feuillets tissulaires pour développer un substitut vasculaire (L'Heureux et al., 1998), puis cette technique fut déclinée à la reconstruction d'autres organes tels que la peau (Michel et al., 1999). Ainsi, des cellules du tissu vasculaire humain furent cultivées au-delà de leur confluence afin d'obtenir des feuillets de cellules et de matrice extracellulaire manipulables. Une membrane interne dévitalisée fut

obtenue en déshydratant une structure tubulaire réalisée à partir de films de FBs de peau humaine enroulés autour d'un mandrin perméable. Puis, des feuillets de CMLs furent enroulés par-dessus la structure précédente de sorte à mimer la tunique médiane des vaisseaux sanguins. L'étape suivante consistait à placer la structure dans un bioréacteur pendant une semaine afin de permettre la fusion des différentes couches du tissu. Après une semaine de culture, une deuxième couche formée par l'enroulement de feuillets de FBs fut enroulée sur la première permettant de simuler l'adventice des vaisseaux naturels. Cette construction fut alors portée à maturation pendant 8 semaines au sein d'un bioréacteur. Après maturation de la construction au sein du bioréacteur, le mandrin fut enlevé et des CEs furent cultivées pendant une semaine dans le *lumen* de la structure pour obtenir l'*intima*. La membrane interne faisait office de limitante élastique interne jouant à la fois le rôle de support pour l'endothélialisation mais également de barrière pour empêcher l'invasion de la lumière du greffon par les CMLs, phénomène à l'origine de l'hyperplasie intimale. Ainsi, publiés en 1998, les travaux de L'Heureux aboutissent au premier substitut de vaisseaux sanguins totalement biologique ayant une pression à la rupture supérieure à 2000 mmHg (2600 ± 500 mmHg) obtenu après trois mois de culture. La facilité de manipulation de ce substitut a permis son implantation dans des modèles canins. Le manque d'endothélialisation dû à la barrière xénogénique fut responsable du taux d'échec de 50 % des greffons au bout d'une semaine d'implantation.

En 2006, L'Heureux *et al.* ont approfondi leur étude (L'Heureux *et al.*, 2006). Ils ont ainsi développé un modèle vasculaire simplifié, le greffon "Lifeline", en supprimant la couche médiane constituée de CMLs afin de réduire la complexité et le temps de production des greffons. Ils ont implanté les constructions auto-assemblées sur des chiens dépourvus de système immunitaire pendant 14 jours. Lors de cette courte période, ces vaisseaux xénogéniques ont provoqué une vive réaction immunitaire. Par la suite, ils ont réalisé un pontage artériel sur des modèles animaux (rats et primates) à l'aide de substituts de vaisseaux réalisés à partir de cellules humaines appartenant à des patients plus âgés que dans les études précédentes (entre 57 et 79 ans) et atteints d'une maladie cardiovasculaire à un stade avancé. L'idée était de réaliser un modèle plus proche de la réalité clinique en prenant en considération que le comportement cellulaire est étroitement lié à l'âge et l'état de santé du patient. Après 225 jours d'implantation chez des rats (vaisseaux de 1,5 mm de diamètre interne), 85 % des greffons étaient encore fonctionnels. Dès 90 jours d'implantation, la présence d'un *vasa vasorum* et la formation d'une *neo-intima* respectivement autour et dans le lumen des vaisseaux étaient observées. Des fibrilles de collagène et d'élastine étaient également présentes. Après 6-8 semaines d'implantation de substituts de 4,5 mm de diamètre interne chez les primates immunosupprimés (modèles plus pertinents d'un point de vue clinique et biomécanique), les tests histologiques ont montré une faible réponse immunitaire mais également la formation d'une *néo-intima* plus mince. Les tests de pression à la rupture effectués sur ce greffon ont révélé des valeurs dépassant les 3000 mmHg, valeurs bien supérieures à celles des veines naturelles.

Auger et ses collaborateurs ont également utilisé la technique d'"auto-assemblage cellulaire" pour réaliser un modèle de *media* produit par des CMLs. Le but était d'obtenir un substitut vasculaire

ayant une compliance proche de celle des vaisseaux naturels et des propriétés contractiles de sorte à ce qu'il puisse s'adapter à la variation du flux sanguin. Ils ont utilisé des modèles physiologiques et pathologiques pour des études pharmacologiques et toxicologiques. Ces substituts ont ainsi été utilisés pour étudier l'effet vasoconstricteur de l'endothéline (Laflamme et al., 2006), de polyphénols (Diebolt, 2005; Diebolt et al., 2007) et de microparticules vasculaires (Pricci et al., 2009; Mostefai et al., 2013). Ils ont également travaillé sur la microstructure de leur modèle afin de reproduire l'anisotropie des vaisseaux naturels, et ce en utilisant des plaques de culture en élastomère thermoplastique avec une surface à la microstructure contrôlée (Guillemette et al., 2009, 2011).

La stratégie d'"auto-assemblage cellulaire" constitue une approche réellement séduisante qui reste encore limitée par le temps (> 13 semaines pour le modèle L'Heureux *et al.*) et la complexité de production des substituts.

Les matrices décellularisées

Cette approche consiste à utiliser au maximum les bénéfices que la nature a mis tant de temps à parfaire avec l'idée sous-jacente que les matériaux naturels sont les plus appropriés pour interagir avec les cellules et l'organisme hôte. Les tissus biologiques décellularisés sont donc envisagés comme support mécanique pour la reconstruction vasculaire. En effet, la matrice extracellulaire (MEC) ainsi obtenue conserve sa composition biologique naturelle, offre un environnement propice pour la prolifération cellulaire et permet, *a priori*, de diminuer les risques possibles de rejet.

La MEC, espace entre les cellules d'un organisme pluricellulaire, est une substance volumineuse insoluble constituée d'un réseau complexe hautement organisé de macromolécules et qui remplit des fonctions biologiques, physiques et structurales essentielles au sein de l'organisme. Elle assure ainsi le rôle de soutien dans l'architecture des organes et de vecteur de nombreux processus cellulaires tels que la communication intercellulaire, l'adhérence, l'étalement, la différenciation et la prolifération des cellules. De ce fait, elle est un élément majeur impliqué dans les mécanismes de mécanotransduction en jouant le rôle de vecteur des contraintes mécaniques entre l'os et les muscles par exemple, en emmagasinant et en restituant l'excès d'énergie aux muscles par dissipation sous forme de chaleur. On distingue plusieurs types de matrices extracellulaires comme celle du tissu conjonctif, encore appelée "matrice interstitielle", la matrice des lames basales qui séparent les tissus épithéliaux et endothéliaux, et les matrices des tissus plus spécialisés tels que le tissu cartilagineux, osseux, tendineux ou encore sanguin. Trois grands types de macromolécules y sont présentes :

- des protéines fibreuses très volumineuses : les collagènes, l'élastine ;
- des glycoprotéines moins volumineuses telles que la fibronectine ou la laminine qui jouent un rôle dans l'adhésion cellulaire ;
- des chaînes polysaccharidiques, les glycosaminoglycanes (héparine, les sulfates de chondroïtine et d'héparane, et l'acide hyaluronique), le plus souvent fixées de façon covalente à des protéines pour former des protéoglycanes. Les protéoglycanes constituent un gel hydraté de remplissage

de la matrice en piégeant de l'eau. De par leurs charges globalement négatives, les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes sont en interaction avec d'autres molécules chargées telles que des facteurs de croissance et des chimiokines, et influencent leur concentration locale et leur accessibilité.

Ces molécules fonctionnelles et structurales de la MEC sont produites par les cellules résidentes du tissu considéré (Plopper, 2007) :

- les FBs et cellules dérivées (ostéoblastes, chondrocytes) qui sont situés dans la matrice conjonctive / interstitielle ;
- les cellules épithéliales, endothéliales et les cellules entourées par une lame basale (comme les cellules musculaires) et qui coopèrent avec les FBs.

La MEC est donc, de par sa nature, un matériau idéal pour l'élaboration d'un échafaudage biologique (Badylak, 2007). L'une des propriétés intéressantes de la matrice extracellulaire est sa dégradabilité rapide et complète (Gilbert et al., 2007). Les propriétés structurales et fonctionnelles des molécules composant la MEC permettent aux cellules de communiquer entre elles mais également avec le tissu environnant (Kleinman et al., 2003; Brown and Dejana, 2003). La complexité de l'organisation tridimensionnelle de ces molécules fait qu'il est actuellement impossible de recréer une telle structure en laboratoire. Cependant, par décellularisation des tissus naturels, de nombreuses formes de matrice extracellulaire naturelle ont été utilisées pour la reconstruction de tissus et d'organes.

Ainsi, Cho *et al.* ont montré que des cellules extraites de moelle osseuse et cultivées dans des carotides canines décellularisées étaient capables de proliférer et de se différencier en CEs et en CMLs (Cho et al., 2005). Après 8 semaines d'implantation, la régénération des trois couches de l'artère (*intima*, *media* et *adventitia*) était visible.

La MEC extraite de la sous-muqueuse de l'intestin grêle contient les mêmes composants que ceux du tissu vasculaire, et les tissus décellularisés de ces organes ont été extrêmement utilisés pour créer des substituts vasculaires. Ainsi, Huynh *et al.* (1999) ont utilisé ce tissu décellularisé qu'ils ont recouvert de collagène, ensuite réticulé et finalement complexé avec de l'héparine. Après avoir traité la surface interne de la construction avec de l'héparine (Huynh et al., 1999), celle-ci fut utilisée en tant que greffon artériel chez le lapin. Au bout de 3 mois, le *lumen* du tissu était recouvert d'un endothélium et les observations histologiques montraient une structure semblable à celle des artères naturelles. Ces greffons présentaient une pression à l'éclatement de 1000 mmHg, une bonne suturabilité et des propriétés vasoactives.

Cette stratégie présente un intérêt considérable dans la mesure où les tissus conservent leur composition et leurs propriétés biologiques. De plus, la décellularisation des tissus diminue leur caractère immunogène en inhibant l'activité de leurs antigènes. Cependant, elle nécessite l'utilisation de détergents qui n'est pas totalement efficace pour éliminer le matériel cellulaire immunogène et qui peuvent compromettre l'intégrité mécanique et biologique de ces structures (Badylak et al., 2009). De plus, la fonctionnalité de ces greffons requiert une néo-colonisation complète et homogène des cellules de

l'organisme, processus qui n'est pas trivial en termes d'efficacité d'ensemencement, d'adhésion et de pénétration cellulaires et de temps de culture (Villalona et al., 2010).

Structures mixtes assemblées avec échafaudage

Les structures d'échafaudage en matériau synthétique

En appliquant les principes du génie tissulaire aux structures d'échafaudage à base d'un matériau synthétique, l'idée est de fournir un support mécanique synthétique afin de permettre la régénération d'un simili-tissu vasculaire aux propriétés physiologiques. Les polymères synthétiques sont utilisés en génie tissulaire vasculaire essentiellement car ils présentent des propriétés mécaniques plus importantes que les macromolécules naturelles. Cependant, ils ne présentent pas les propriétés biologiques adéquates pour leur implantation à long terme. C'est pourquoi la plupart des travaux utilisent des polymères synthétiques biodégradables assurant le soutien mécanique pendant la phase de régénération tissulaire, puis au fur et à mesure de leur dégradation, les propriétés mécaniques du substitut de vaisseau sanguin sont progressivement assurées par le tissu en croissance.

Les poly(acide lactique-L) (PLLA) et poly(acide glycolique) (PGA) sont parmi les polymères biodégradables les plus utilisés. Une des premières stratégies a été d'implanter ces polymères résorbables directement dans le corps, sans ensemencement de cellules au préalable, dans l'espoir qu'ils soient progressivement dégradés et remplacés par les cellules et le tissu de l'hôte. Cependant, il est très difficile d'optimiser la vitesse de dégradation du support en fonction de la vitesse de croissance du tissu qui est très dépendante de l'organisme hôte et du site de traitement. En conséquence, ces greffons étaient très sujets à l'anévrisme et n'ont jamais atteint le stade clinique.

Dans ce contexte, Niklason *et al.* ont énormément contribué au développement d'échafaudages synthétiques dégradables pour le génie tissulaire vasculaire. Ainsi, en 1999, ils ont mis en place des structures tubulaires en PGA ensemencées de CMLs bovines ou porcines (Niklason et al., 1999). Ces constructions furent ensuite placées sous contrainte de cisaillement et de pulsation radiale dans un bioréacteur pendant 8 semaines afin de stimuler la production de MEC par les cellules. Ensuite, des CEs autologues furent ensemencées dans leur lumière et le tout fut cultivé dans le bioréacteur dynamique pendant 3 jours. Le substitut artériel obtenu pouvait atteindre une pression à la rupture élevée soit 2200 ± 700 mmHg (à comparer à 1700 ± 300 mmHg pour les veines saphènes humaines (Lamm et al., 2001)). Un greffon xénogénique et un greffon autologue furent implantés avec succès pendant 24 jours dans un modèle porcin dans une branche de l'artère fémorale. Par la suite, ce groupe de recherche a travaillé sur des cellules humaines à la fois néonatales (McKee et al., 2003) et adultes (Poh et al., 2005) en tentant d'améliorer leur capacité de prolifération initialement limitée ainsi que sur des cellules souches mésenchymateuses adultes humaines dérivées de la moelle osseuse (Gong and Niklason, 2008). Cependant, les structures obtenues possédaient des propriétés mécaniques beaucoup plus faibles que dans les précédentes études. Plus récemment, dans une étude publiée par la compagnie Humacyte, Niklason et ses collègues ont présenté une évolution très intéressante de leur modèle (Dahl et al., 2011). Des CMLs aortiques d'origine cadavérique humaine ou canine furent cultivées

sur des structures tubulaires de PGA. L'idée était de permettre aux cellules, pendant 10 semaines de culture sous flux pulsé dans un bioréacteur dynamique, de produire une nouvelle MEC tout en laissant le polymère synthétique se dégrader. La décellularisation des constructions obtenues permettait alors d'obtenir un greffon vasculaire constitué de MEC aux propriétés non-immunogéniques. Malgré la variabilité des résultats due à la variabilité des donneurs, cette stratégie a permis de développer des substituts vasculaires de petits diamètres totalement biologiques avec des pressions à l'éclatement pouvant dépasser les 3000 mmHg et une compliance même plus importante que les veines saphènes humaines. Les greffons d'origine humaines furent ensuite implantés en tant que conduits artérioveineux de 12 cm de longueur (6 mm de diamètre) dans des babouins non-immunosupprimés mais traités à l'aspirine. Les greffons d'origine canine furent implantés dans des modèles canins lors de pontages périphériques (3-4 mm de diamètre) ou coronariens (3 mm de diamètre). Après 6 mois d'implantation, les greffons présentaient des propriétés mécaniques stables et très peu d'hyperplasie intimale, pas de calcification mais surtout, ils n'ont pas engendré de réponse immunitaire de l'hôte. À ces résultats extrêmement prometteurs, s'ajoute la grande stabilité mécanique dans le temps de ces structures, puisqu'après 12 mois de conservation dans du PBS à 4°C, les variations de la pression à la rupture et de la compliance n'étaient pas significatives. Cette approche permettrait d'obtenir des substituts vasculaires de petit calibre après des temps de culture très courts (< 1 mois) nécessaires à l'isolation des CEs autologues, à leur prolifération et à leur ensemencement. Finalement, Niklason *et al.* explorent la possibilité d'utiliser des cellules humaines dérivées de la moelle osseuse afin de s'affranchir de nombreuses contraintes législatives associées à l'utilisation des CMLs de cadavres humains ([Gong and Niklason, 2011](#)).

Les structures d'échafaudage en matériau naturel

Les matériaux naturels désignent des macromolécules ou leurs dérivés présents quelle que soit leur forme chez les animaux ou les végétaux. Selon une approche similaire à celle employant les matrices décellularisées, l'idée est d'offrir un environnement le plus propice à l'activité des cellules et qui s'intègre au mieux à l'organisme receveur. Ces macromolécules sont donc *a priori* des matériaux de choix pour l'élaboration d'échafaudage pour l'ingénierie tissulaire vasculaire dans la mesure où leurs propriétés biologiques et mécaniques résultent du long processus de sélection naturelle. Parmi les nombreux échafaudages naturels présents dans la littérature, cette section présente quelques travaux réalisés sur l'élastine, la fibrine et le collagène.

L'élastine est une protéine qui est rencontrée dans les parois des artères et dans quelques autres tissus des mammifères. Cette protéine est obtenue par polymérisation de molécules de tropoélastine ayant subi des modifications post-transcriptionnelles préalables. Son rôle principal est de conférer aux artères leur élasticité se traduisant par une déformation élastique et une résilience importantes. Ceci contribue à la vasomotricité du vaisseau sanguin qui lui permet de participer à la régulation de la pression sanguine. Cette protéine est sécrétée par les CMLs. Elle inhibe la prolifération et la migration des CMLs tout en améliorant celles des CEs pour des concentrations inférieures ou égales à 5 $mg.mL^{-1}$ ([Ito, 1997](#)) mais elle n'influence pas le comportement des FBs ([Daamen et al., 2003](#)). L'ad-

dition d'élastine augmente l'élasticité du collagène mais s'accompagne également d'une baisse de la résistance à la traction et de la rigidité (Couet et al., 2007).

L'utilisation de l'élastine présente de nombreux avantages pour la régénération du tissu vasculaire. Cependant, les difficultés de la solubilisation ou du mélange de l'élastine avec d'autres matériaux (avec le collagène notamment) rendent encore délicate la fabrication d'un tel échafaudage.

La fibrine est une protéine insoluble qui joue un rôle prépondérant dans la formation de caillots sanguins. Elle est formée par fibrillogénèse d'un monomère, le fibrinogène, qui circule dans le sang. Le fibrinogène polymérise sous l'action de la thrombine pour constituer une maille sous la forme d'un gel. Le recouvrement des prothèses synthétiques par de la fibrine permet d'améliorer l'adhésion des CEs. Dès 1989, Zilla *et al.* ont utilisé les colles de fibrine en tant que substrat pour l'endothélialisation des prothèses artérielles (Section 0.4.1, (Zilla et al., 1989b; Deutsch et al., 2000)).

Plusieurs groupes de recherche ont reconnu l'intérêt d'utiliser les gels de fibrine en tant qu'échafaudage pour la régénération tissulaire, particulièrement pour ce qui est de contourner les risques de réaction de l'organisme face à des résidus de matériaux synthétiques. Cependant, les matériaux à base de fibrine présentent généralement des propriétés mécaniques faibles, ce qui constitue le frein principal à leur implantation artérielle (Tschoeke et al., 2009; Grassl et al., 2003; Swartz et al., 2005). Parmi les groupes de recherche ayant travaillé sur cette problématique, nous pouvons notamment citer les travaux majeurs de Tranquillo et de ses collaborateurs. Ils ont ainsi montré que l'utilisation de facteurs de croissance tels que $TGF - \beta 1$, d'insuline et d'inhibiteurs de protéinases permet de renforcer les propriétés mécaniques initialement faibles des constructions de fibrine. Après 6 semaines de culture dans ces conditions, les échafaudages de fibrine avaient un module élastique et une résistance à la traction similaires à ceux des aortes abdominales de rats (Grassl et al., 2003). Ils ont également montré que,ensemencés dans un réseau de fibrine, les CMLs et les FBs semblent produire plus de collagène que lorsqu'ensemencés dans une matrice de collagène (Neidert et al., 2002; Grassl et al., 2002; Long and Tranquillo, 2003). De plus, ils ont réussi à contrôler la dégradation initialement rapide de la fibrine par les CMLs par l'ajout d'acide ϵ -aminocaproïque au milieu de culture, empêchant la liaison de la plasmine et du plasminogène à la fibrine (Grassl et al., 2002). Dès 2006, Tranquillo et ses collaborateurs étaient capables de produire un greffon artériel de 3 mm de diamètre interne pouvant atteindre une pression à l'éclatement de 1122 mmHg en cultivant des CMLs de rat dans un gel de fibrine pendant 6 semaines (Isenberg et al., 2006). Puis, ils ont poursuivi leur approche en utilisant des cellules humaines cette fois. Ainsi, sept à neuf semaines de culture dans un bioréacteur dynamique furent nécessaires pour obtenir un substitut vasculaire à base de fibrine et de FBs de derme humain (2 à 4 mm de diamètre interne). Ce bioréacteur dynamique permettait de fournir un flux pulsé de milieu de culture dans la lumière et à travers la paroi de la construction. À l'issue de cette culture, la construction présentait un alignement circonférentiel de la MEC, une pression à la rupture de 1400 à 1600 mmHg et une compliance comparable à celle des artères naturelles (Syedain et al., 2011). Cependant, le temps et les coûts de production restaient un obstacle majeur à la commercialisation de ces substituts vasculaires autologues. Pour contourner ces problématiques, ce groupe de recherche s'est

attaché à produire des constructions vasculaires allogéniques fabriquées à partir de FBs et ensuite décellularisées et stockées (Syedain et al., 2014). Suite à un temps de culture de seulement 5 semaines, les structures ainsi produites ont pu atteindre des pressions à l'éclatement de plus de 4000 mmHg et des compliances similaires à celles des artères fémorales ovines. Ces propriétés ne furent pas affectées par les étapes de décellularisation et de stockage. Après 6 mois d'implantation dans un modèle ovin traité aux anticoagulants, aucun signe de dilatation ou de calcification n'a pu être mis en évidence. Le groupe de Tranquillo a donc mis en place un substitut artériel fort prometteur qui doit encore être optimisé du point de vue de la rétention à la suture et du manque d'élastine de la construction.

En ce qui concerne les composites à base de fibrine et de matériaux synthétiques pour le génie tissulaire vasculaire, il apparaît intéressant de mentionner les travaux de Jockenhoevel et de ses collaborateurs. Cette équipe a combiné des gels de fibrine avec un poly(acide lactique) tricoté (Tschoeke et al., 2009). Après 21 jours de culture en conditions dynamiques, leurs substituts (diamètre de 5 mm) ensemencés de CMLs et de FBs extraits de carotides de mouton ne présentaient qu'une faible pression à la rupture, à savoir 466 ± 78 mmHg, à comparer à des valeurs 3 fois plus élevées pour des carotides ovines naturelles. Dans leurs travaux de 2010, leurs substituts autologues et endothélialisés (diamètre de 6 mm) ont pu être implantés avec succès au niveau de la carotide de moutons traités à l'aspirine (Koch et al., 2010). Après 6 mois d'implantation, les greffons présentaient une endothélialisation homogène de la lumière sans qu'aucun signe de calcification, de thrombus ou d'anévrisme n'ait pu être mis en évidence. Cependant, le remodelage de la construction n'était pas complète puisque tout le polymère n'était pas encore dégradé et que la quantité de collagène ne représentait que 40 % de celle des artères natives.

Le collagène est la composante principale de la matrice extracellulaire et confère aux tissus conjonctifs l'essentiel de leurs propriétés mécaniques. Le collagène est le matériau choisi pour la régénération tissulaire vasculaire dans ce projet doctoral, ainsi sa description détaillée fait l'objet de la Section 0.5.

Les applications cliniques du génie tissulaire

Quelques stratégies de substituts vasculaires développés par génie tissulaire précédemment présentées ont fait l'objet d'évaluations cliniques. Les deux principaux essais cliniques ont été réalisés sur les substituts conçus par génie tissulaire par les groupes de Shin'oka (Shin'oka et al., 2001) et de L'Heureux (L'Heureux et al., 2007). Bien que les greffons développés par Shin'oka *et al.* ne soient pas destinés au remplacement de vaisseaux de petit calibre (diamètre interne de 12 à 24 mm), leur étude est présentée dans cette partie car elle constitue la première étude clinique portant sur des greffons conçus par génie tissulaire.

Ainsi, Shin'oka *et al.* ont développé une construction vasculaire à partir d'un échafaudage biodégradable en copolymère d'acide lactique-L et de ϵ -caprolactone, renforcé par du PGA sur lequel ils ont ensemencé des cellules extraites de veines périphériques autologues (Shin'oka et al., 2001). Bien que conscients des faibles propriétés mécaniques de leur substitut, les auteurs l'ont implanté en remplacement de l'artère pulmonaire, zone de faible pression sanguine (18-25 mmHg), chez 42 patients

pédiatriques atteints d'une cardiopathie cyanogène. Pour accélérer le procédé, les auteurs ont commencé à isoler les cellules de la moelle osseuse des patients et à les ensemercer directement en salle d'opération. Les résultats, 32 mois après l'implantation, n'ont pas révélé de complications majeures reliées à l'implantation de la prothèse (Shin'oka et al., 2005). Après un suivi de 5,8 ans en moyenne, et sur 25 patients, aucun signe de rupture, d'infection, d'anévrisme ou de calcification ne purent être mis en évidence. À noter qu'un patient présentait de la thrombose qui a pu être soignée par administration de médicaments et que 4 patients ont dû subir une angioplastie percutanée pour cause de sténose. Ainsi, malgré des performances mécaniques insuffisantes pour leur utilisation dans une zone de haute pression, la faible propension à la sténose, la fonctionnalité à long terme de ces greffons et leur capacité à croître avec l'hôte sont des résultats extrêmement encourageants et prometteurs (Hibino et al., 2010). Néanmoins, l'efficacité de ces substituts sous pression artérielle reste encore à démontrer.

L'Heureux a continué le développement du substitut vasculaire auto-assemblé à partir duquel il a lancé la compagnie "Cytograft Tissue Engineering, Inc.". Une version simplifiée de ce substitut précédemment présenté (Section 0.4.2), le greffon "Lifeline", n'est constitué que d'une seule couche créée à partir d'un feuillet de FBs. Lors d'une étude clinique, L'Heureux *et al.* ont implanté leur substitut auto-assemblé totalement biologique en tant qu'accès vasculaire pour hémodialyse chez 10 patients atteints d'insuffisance rénale en phase terminale (L'Heureux et al., 2007). Les premiers résultats de cette étude montrent que 78 % et 60 % des prothèses sont fonctionnelles 1 mois et 6 mois après l'implantation respectivement (McAllister et al., 2009). Cytograft est sur le point de débiter des études cliniques de phase III en Amérique du Sud puis en Europe et utilise à la fois des greffons autologues et des greffons allogéniques toujours en tant qu'accès vasculaire pour hémodialyse. Parallèlement, l'équipe de L'Heureux travaille sur la réduction du nombre d'étapes de production des substituts afin d'en diminuer la complexité, le temps et le coût de production. Ainsi, l'utilisation de modèles allogéniques dévitalisés et dépourvus d'endothélium offre de nouvelles perspectives et ouvre la voie à l'exploitation commerciale par la fabrication de milliers de greffons à partir d'une seule lignée cellulaire (Peck et al., 2012). Dans le même sens, L'Heureux et ses collaborateurs ont développé une nouvelle approche en éliminant l'étape de maturation pendant laquelle les différentes couches fusionnent et en produisant des fils de tissu régénéré de différentes longueurs et diamètres. Ces fils peuvent être tissés, tressés ou tricotés en des structures 3D complexes. Ces structures qui peuvent être produites en l'espace de 8 semaines environ présentent des forces de rétention à la suture bien supérieures que pour les précédents modèles et des pressions à l'éclatement pouvant atteindre des valeurs supérieures à 10000 mmHg (communication personnelle).

Génie tissulaire et mécanotransduction : la nécessité des bioréacteurs

En vue d'optimiser l'interaction entre les cellules et la structure d'échafaudage, les bioréacteurs doivent permettre d'établir des conditions contrôlées en termes de température, de pH, de force ionique, de pression, de milieu nutritif, etc. L'utilisation des bioréacteurs est une composante commune de la plupart des stratégies de génie tissulaire. L'avantage de l'utilisation des bioréacteurs réside dans le fait qu'ils constituent un outil essentiel pour évaluer l'effet de paramètres biologiques, chimiques

et physiques (tels que les contraintes mécaniques, la température, l'ajout de facteurs de croissance, etc.) sur la prolifération des cellules, leur différenciation, leur phénotype, et leur fonction (ex. vitesse de production d'une nouvelle matrice extracellulaire) et ce, dans des conditions reproductibles et sécuritaires (moins de risques de contamination).

Par un phénomène dit de mécanotransduction, les stimulations mécaniques peuvent affecter plus ou moins les cellules. En effet, leur membrane présente des intégrines qui vont se lier aux domaines élastiques des fibrilles de collagène. La stimulation mécanique va déformer la matrice extracellulaire, et de manière séquentielle les éléments du cytosquelette. Ces événements vont engendrer une série de réactions en chaîne impliquant les canaux ioniques membranaires (canaux à Ca^{2+} , chaîne de phosphorylation), ce qui va réguler les processus de division, l'expression génique et la synthèse des protéines par les cellules (Silver and Siperko, 2003).

Parmi les différents types de bioréacteurs que l'on peut rencontrer dans le domaine de la régénération du tissu vasculaire, les bioréacteurs à perfusion sont les plus populaires. La distribution du milieu de culture dans la lumière (Tschoeke et al., 2009; Hoerstrup, 2001) et à l'extérieur de la construction artérielle (Niklason et al., 1999; Seliktar et al., 2000) génère à la fois des contraintes cycliques de cisaillement et de pression sur les parois du substitut (Syedain et al., 2008; Isenberg and Tranquillo, 2003; Seliktar et al., 2003) mais également permet la diffusion du milieu de culture à travers la paroi pour nourrir les cellules en profondeur (Bjork and Tranquillo, 2009; Kitagawa et al., 2006; Syedain et al., 2011; Brown, 2000). Il est suggéré que les *stimuli* physiques apportés aux cellules pourraient modifier l'expression des gènes et augmenter l'activité synthétique d'une grande variété de cellules (Ingber et al., 1994). Cependant, les connaissances actuelles sur les mécanismes impliqués dans la mécanotransduction, ensemble des processus par lesquels les cellules traduisent les contraintes mécaniques en signaux biochimiques pour réguler leurs fonctions biologiques, n'en sont qu'à leurs balbutiements (Korossis et al., 2006). Néanmoins, les travaux effectués jusqu'à présent avec les bioréacteurs nous permettent de lister les apports d'une culture dynamique et cyclique des tissus en cours de régénération :

- Activité cellulaire renforcée : production de matrice extracellulaire accélérée et augmentée.
- Réorientation et distribution homogène des cellules et des fibrilles de collagène dans le tissu en croissance.
- Différenciation cellulaire favorisée.
- Diffusion des nutriments et échanges gazeux favorisés.

Tous ces facteurs combinés peuvent améliorer les propriétés biologiques, mécaniques ainsi que l'organisation du tissu en croissance.

0.5 Les structures de collagène en tant que support de la régénération tissulaire

0.5.1 Composition et fonction de la matrice extracellulaire : Importance du collagène

Comme montré dans la Section 0.4.2, des propriétés biophysiques, de l'organisation et de la composition de la MEC découlent autant de signaux mécaniques et chimiques spécifiques qui régulent le recrutement cellulaire, la communication intercellulaire et plus généralement l'activité cellulaire (Sorokin, 2010; Badylak et al., 2009). Ainsi, en tant que composante principale de la MEC, le collagène joue également un rôle prépondérant dans ces phénomènes. C'est pourquoi, dans la perspective de l'emploi de stimulations mécaniques dans un bioréacteur, le collagène apparaît comme un matériau de choix pour la régénération du tissu vasculaire.

0.5.2 Structure et organisation supramoléculaire du collagène

Chez les mammifères, le collagène, principal composant de la plupart des tissus conjonctifs, représente environ 25 % de toutes les protéines (Murray et al., 2013). Par exemple, le collagène constitue plus de 90 % de la MEC extraite de la sous-muqueuse de l'intestin grêle (SMIG). La majorité de ce collagène est de type I, avec des quantités mineures de collagène de type III, IV, V et VI, le tout interconnecté par des éléments supra-structuraux que sont les glycoprotéines, les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes. D'excellentes revues de littérature présentent les structures et les fonctions des divers types de collagène (Kielty and Grant, 2002). Bien que présent en quantités modérées dans la MEC des vaisseaux sanguins, le collagène de type I est un élément primordial dans la stabilité mécanique du tissu vasculaire (Löhler et al., 1984). Dans la média des artères, il est distribué de manière uniforme autour des CMLs qui se trouvent en contact avec les lamelles élastiques (Kelleher et al., 2004).

Bien que la famille des collagènes se caractérise par une surprenante diversité de par leur organisation moléculaire et supramoléculaire, leur localisation tissulaire et leurs fonctions biologiques, la présence dans leur structure d'un domaine en triple hélice constitué par la répétition du triplet $(Gly - X - Y)_n$ dans la séquence d'acides aminés (X étant généralement une proline (Pro) et Y une hydroxyproline (Hyp), $n = 337-343$) est commune à tous les collagènes (Fratzl, 2008a). Les éléments prouvant la conformation en triple hélice du collagène (Figure 0.2) (Vogel and Venugopalan, 2003) furent proposés indépendamment en 1955 par Ramachandran et Kartha (1954), par Rich et Crick (1955) et par Cowan, Mc Gavin et North (1955), notamment par des études de diffraction des rayons X (Ramachandran and Kartha, 1954, 1955; Rich and Crick, 1955; Cowan et al., 1955). Vingt-huits types différents de collagènes qui se distinguent par leurs fonctions spécifiques dans divers tissus et par leurs différents modes d'organisation supramoléculaire ont été répertoriés jusqu'à aujourd'hui (Fratzl, 2008a). Les collagènes sont donc classés en plusieurs sous-familles déterminées en fonction des homologies de séquence peptidique et de similitude au niveau de la conformation des chaînes polypeptidiques et de leur assemblage supramoléculaire.

Dans certains types de collagène, la molécule entière est une triple hélice alors que dans d'autres types, seule une portion est formée d'une triple hélice, mais la présence de cette triple hélice est un dénominateur commun à tous les types de collagène. On distingue les collagènes non-fibrillaires des collagènes de type fibrillaire, qui ont la capacité de s'assembler en fibrilles présentant la bande périodique caractéristique dite "période D" visible en microscopie électronique (64 à 67 nm de longueur). Les collagènes de type fibrillaire sont les plus intéressants d'un point de vue biomécanique en raison de leur rôle structural communément admis. Parmi les collagènes de type fibrillaire, le collagène de type I est le plus répandu dans les tissus tels que la peau, les tendons, les os, la cornée, les poumons et les vaisseaux sanguins (Fratzl, 2008a). Le collagène mature de type I, formé d'environ 1000 acides aminés, possède cette structure en triple hélice. Chaque sous-unité polypeptidique, ou chaîne α (masse moléculaire d'environ 285 kDa), est enroulée en hélice gauche avec trois résidus d'acides aminés par tour. Trois chaînes α sont enroulées en une super hélice droite formant la molécule de tropocollagène de 300 nm de longueur et 1,4 nm de diamètre, précurseurs des fibrilles de collagène (Figure 0.2). En raison de considérations stériques, la présence d'un résidu de glycine tous les trois acides aminés est une condition nécessaire à l'obtention de la triple hélice, la glycine étant suffisamment petite pour pouvoir se placer dans l'espace restreint au centre de l'hélice (Bella et al., 1994). Ainsi, près d'un tiers des résidus sont des glycines (Gly), et entre 15 % et 30 % des résidus sont des prolines ou des hydroxyprolines. Les résidus de glycine se retrouvent alors au cœur de la protéine, les autres résidus étant exposés en surface de la protéine (Fratzl, 2008a).

La synthèse du collagène débute, dans le réticulum endoplasmique des cellules, par la production de molécules solubles de procollagène. Leurs extrémités N- et C- propeptidiques sont ensuite excisées par des enzymes spécifiques pour former les extrémités télopeptidiques des molécules de tropocollagène. Cette étape de la synthèse est primordiale pour que puisse avoir lieu l'autoassemblage des molécules de tropocollagène en une structure fibrillaire striée. Cet autoassemblage s'effectuerait essentiellement dans la matrice extracellulaire, et partiellement dans la membrane plasmique cellulaire. Le caractère spontané de cet auto-assemblage reste encore controversé puisqu'il semblerait que l'interaction entre le collagène, la fibronectine et les intégrines soit nécessaire pour l'auto-assemblage *in vivo* du collagène (Canty and Kadler, 2005). Bien que la nature des réticulations soit dépendante du type de tissu étudié, dans le cas du collagène extrait de tendons de queues de rats, cet auto-assemblage implique essentiellement la formation de liaisons covalentes intra- et inter-moléculaires (Eyre et al., 1984) entre les résidus lysine (Lys) et hydroxylysine (Hyl) au niveau des extrémités télopeptidiques (Kadler et al., 1996). La composition du collagène comprenant très peu de cystéines, peu de liaisons covalentes intra- et inter- moléculaires sont formées par des liaisons disulfure. En réalité, ces liaisons se forment à partir des chaînes latérales de lysine et d'histidine (His) suite aux réactions chimiques présentées dans la Figure 0.3. Le processus de réticulation fait intervenir des réactions au cours desquelles des résidus lysine (Lys) sont transformés par la lysyl oxydase en résidus aldéhyde allysine. Deux allysines réagissent alors ensemble pour former un aldol. Il peut y avoir jusqu'à quatre chaînes liées par covalence les unes avec les autres (Voët, 2005). Ces liaisons ne se font pas au hasard mais

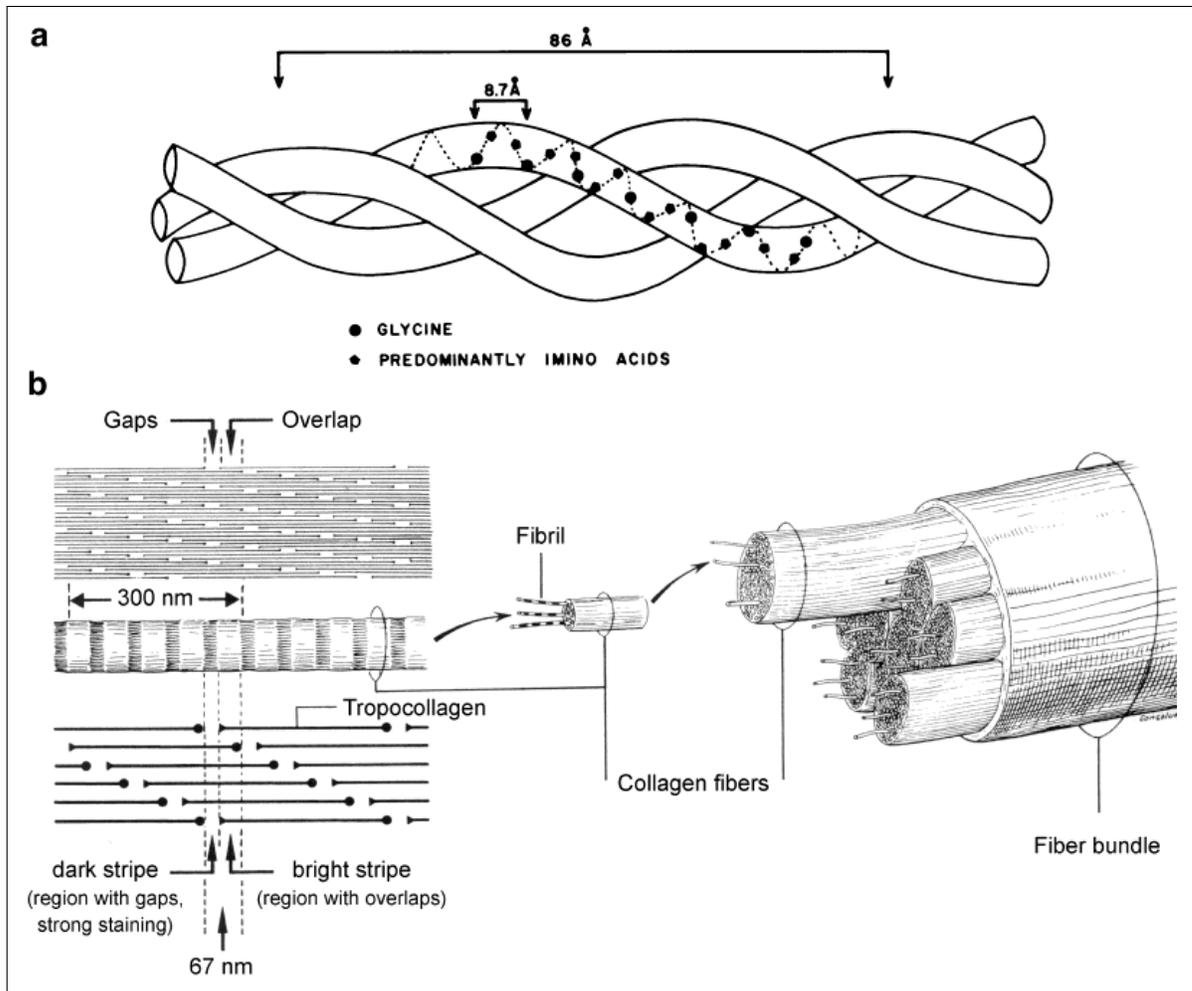


FIGURE 0.2 – Schéma de l'organisation spatiale du collagène dans le tissu : de la molécule de tropocollagène (a) à la fibre de collagène (b). L'arrangement des molécules de tropocollagène en fibrilles est à l'origine de la bande périodique D observable en microscopie électronique (Vogel and Venugopalan, 2003).

plutôt dans les régions proches des extrémités N- et C-terminales des molécules de collagène. Ce type de liaison est stable en conditions physiologiques mais il peut être brisé *in vitro* par de l'acide acétique dilué (voir le protocole d'extraction et de solubilisation du collagène en Annexe A). En effet, les charges créées par les acides dilués de la triple hélice créent des répulsions électrostatiques provoquant le gonflement du réseau de fibrilles de collagène (Rajan et al., 2006; Avery and Bailey, 2008).

La stabilisation de cette conformation est le fruit de la combinaison de plusieurs facteurs : l'interaction entre certains acides aminés présents le long de la chaîne, des liaisons hydrogène et la présence d'un réseau de molécules d'eau. Cette conformation est stabilisée par la présence des résidus proline et hydroxyproline. Les résidus hydroxyprolines sont formés par l'hydroxylation post-traductionnelle des résidus proline. Cette réaction est catalysée par la prolyl hydroxylase dont les cofacteurs de réaction

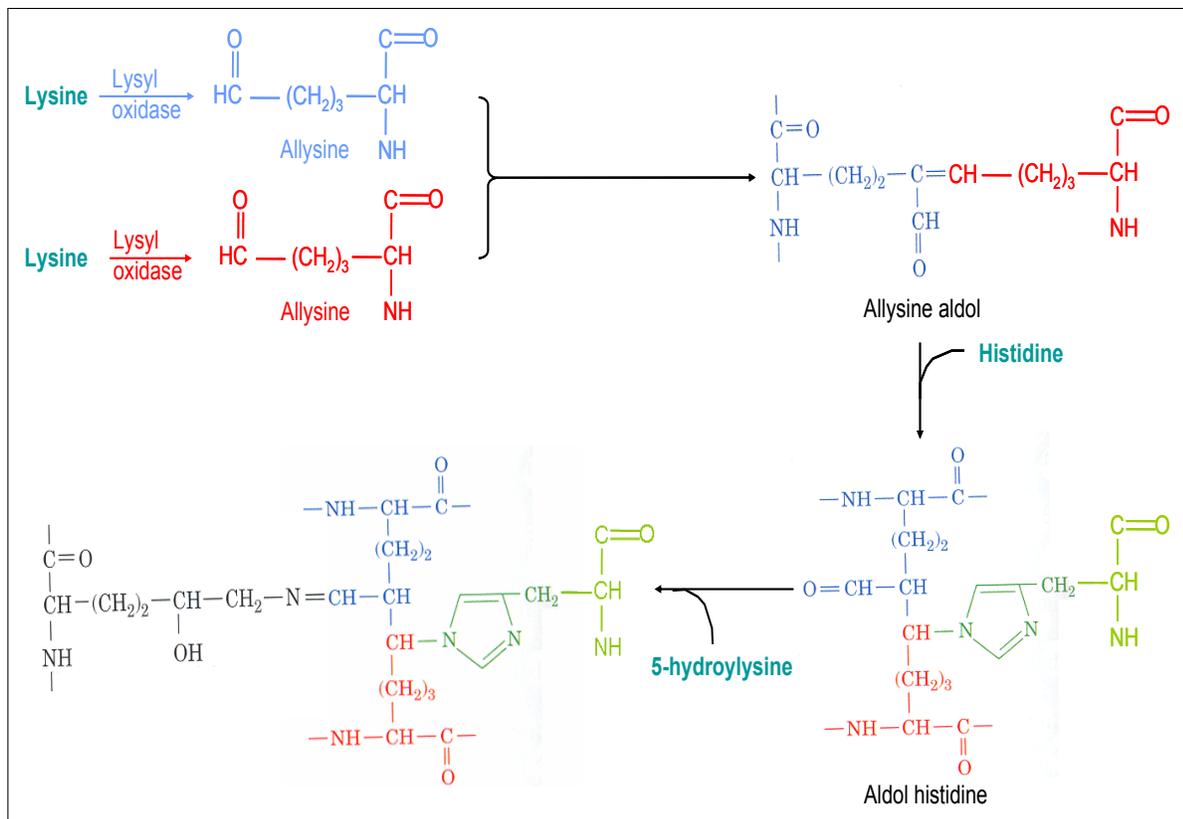


FIGURE 0.3 – Réactions chimiques impliquées dans les liaisons intra- et inter-moléculaires dans le collagène. Adapté de (Voët, 2005).

sont l'acide ascorbique (vitamine C) et l' α -cétoglutarate. Des études cristallographiques ont montré qu'une liaison hydrogène s'établit entre le groupement amide NH d'une glycine et le groupement carbonyle C=O d'un résidu en position X sur la chaîne voisine. De plus, lorsque la position X est occupée par un acide aminé autre que la proline, une seconde liaison hydrogène est formée entre l'amide du résidu en position X et le groupement carbonyle C=O d'une glycine par l'intermédiaire d'une molécule d'eau (Emsley et al., 2004). Ces liaisons hydrogène établies par l'intermédiaire de molécules d'eau contribuent à la stabilité et au renforcement de la conformation de la triple hélice dans les régions affectées par l'absence de résidu proline. Des liaisons hydrogène entre l'hydrogène du C_{α} d'un résidu glycine et le groupement carbonyle d'un résidu proline d'une chaîne voisine créent ainsi un réseau d'interactions faibles conférant une stabilité supplémentaire aux liaisons relativement fortes $NH \cdots CO$ (Bella et al., 1994).

Les molécules d'eau semblent faire partie intégrante des molécules de collagène. En effet, un réseau extrêmement ordonné de molécules d'eau assure la stabilité moléculaire des fibrilles de collagène en induisant à la fois des liaisons intra-moléculaires et inter-moléculaires. Les résidus d'hydroxyproline joueraient un rôle important dans ces interactions (Leikin et al., 1994, 1995, 1997).

0.5.3 Les réactions *in vivo* au collagène

Le collagène est choisi en tant que support pour la régénération tissulaire par les cellules vasculaires en raison de ses excellentes propriétés biologiques. Le collagène au sein de la matrice extracellulaire est la composante qui favorise l'adhésion et la prolifération des cellules, notamment les CEs, par interaction entre le site RGD de la protéine et les intégrines des membranes cellulaires (He et al., 2005; Kleinman et al., 1981). Il constitue un environnement idéal pour la croissance des cellules du tissu vasculaire. La croissance d'un endothélium est donc fortement envisageable pour pallier le caractère thrombogène du collagène.

Bien que le collagène soit communément utilisé dans le domaine médical à des fins diverses et variées, son extraction chez l'animal a toujours soulevé des questionnements quant à l'éventuelle réponse immunitaire de la part de l'organisme receveur. Une revue de littérature complète sur le sujet a été réalisée par Lynn *et al.* en 2004 (Lynn et al., 2004). Afin de lever toute ambiguïté, les auteurs utilisent les termes "immunogène" et "antigénique" selon la définition proposée par Crumpton (Crumpton, 1974). Le caractère antigénique renvoie donc exclusivement à l'éventuelle capacité du collagène à interagir avec des anticorps de l'organisme hôte, alors que le caractère immunogène fait référence à la capacité éventuelle du collagène d'induire une réponse immunitaire, processus par lequel sont synthétisés ces mêmes anticorps.

Les déterminants antigéniques du collagène peuvent avoir trois origines différentes : (1) Le caractère antigénique du collagène peut provenir de la reconnaissance par les anticorps de la structure tridimensionnelle des chaînes de collagène, à savoir sa conformation hélicoïdale ; (2) La reconnaissance d'une séquence peptidique spécifique du collagène peut aussi être à l'origine de ce caractère ; (3) Enfin, l'interaction entre l'anticorps de l'hôte et le collagène peut se faire au niveau des extrémités télopeptidiques des molécules de tropocollagène. Ces différents processus dépendent évidemment du site d'implantation et de la variabilité du collagène selon les espèces.

La revue de Lynn conclut sur le très faible caractère antigénique du collagène. La cause du caractère antigénique la plus attendue aurait pour origine la variation inter-espèce qui pourrait exister dans la structure du collagène. Mais, la triple hélice du collagène connaît une grande stabilité à travers les espèces avec une variation de la séquence peptidique n'excédant pas 3 % entre les mammifères (Fietzek and Kühn, 1976). Par contre, une plus grande variabilité est observée dans la région télopeptidique non hélicoïdale, dans laquelle la variation inter-espèce porte sur la moitié des acides aminés. Afin de diminuer encore plus le risque d'une réaction antigénique, l'atélocollagène dépourvu des extrémités télopeptidiques est de plus en plus utilisé.

La faible réponse immunitaire au collagène est à la fois de type humorale et à médiation cellulaire. Des expériences sur des souris ont montré que la réponse humorale au collagène dépend des cellules T et est étroitement liée aux espèces auxquelles appartiennent le donneur et l'hôte. Les observations cliniques montrent que seulement 2 à 4 % de la population totale possèderaient une allergie au collagène bovin de type I, ce qui est très faible comparé au taux d'allergie à d'autres matériaux d'utilisation

courante, comme par exemple, le nickel ou le latex (6 %) (Lynn et al., 2004).

Le collagène implanté est toujours rapidement dégradé. Ce phénomène est dû à l'activité du système immunitaire non-spécifique ou inné qui dirige les réponses inflammatoires. L'immunité non spécifique est celle qui survient en première lors de l'introduction d'un antigène externe à l'organisme. La réaction inflammatoire induit une vasodilatation des vaisseaux sanguins permettant la migration des cellules de l'immunité innée comme les monocytes qui vont se différencier en macrophages, et les granulocytes qui participent à la phagocytose des corps étrangers. Après digestion, une partie de l'antigène est présentée à la surface de cellules présentatrices de l'antigène professionnelles comme les cellules dendritiques (CD). Les CD quittent alors le site inflammatoire pour se rendre au ganglion lymphatique où la réponse adaptative spécifique va être déclenchée.

En résumé, le collagène possède de très faibles propriétés antigéniques et immunogènes. Les éventuelles réponses immunitaires pouvant subvenir lors de l'utilisation de produits contenant du collagène sont essentiellement dues à des composés présents autres que le collagène, tels que des impuretés, comme des traces d'agents de réticulation non éliminées. Les applications médicales du collagène sont très nombreuses. En effet, peu de cas de complications ont été enregistrés lors de l'utilisation clinique de dispositifs à base de collagène (Mullins et al., 1996). Le collagène est très utilisé pour la conception de systèmes à libération contrôlée de médicaments (Kaufman et al., 1994), de protéines (Lucas et al., 1989) et de gènes (Rossler et al., 1995), les éponges de collagène sont utilisées pour soigner les brûlures et autres blessures (Panduranga Rao, 1996), le collagène est également utilisé en tant que matrice de support pour la culture cellulaire, en tant que matériau pour les fils de suture (Miller et al., 1964), ou en tant qu'agent hémostatique (Browder and Litwin, 1986). Ce support naturel est actuellement très étudié pour la régénération des tissus épidermique, osseux, vasculaire et des valves cardiaques. Les différentes formes du collagène et leurs applications biomédicales sont présentées dans le Tableau 0.3 (Fujioka et al., 1998).

0.5.4 Des performances mécaniques limitées pour le génie tissulaire

Les tests mécaniques les plus couramment utilisés sur les matériaux à base de collagène sont des tests de traction uniaxiale. La Figure 0.4 montre des courbes contrainte-déformation typiques obtenues sur des matériaux biologiques durs (l'os) et mous (le tendon). Plusieurs paramètres d'intérêt peuvent être évalués par ce genre de tests. La partie élastique d'un matériau se définit comme la gamme de déformations n'engendrant aucune déformation plastique (c'est-à-dire permanente). La plupart des matériaux ont une partie élastique qui est linéaire. Le module élastique est alors défini comme étant la valeur du coefficient directeur de la relation linéaire entre la contrainte et la déformation résultante aux petites déformations. Certains matériaux ont une partie élastique non-linéaire comme les polymères naturels et synthétiques. La mesure du module élastique est alors un peu plus complexe et nécessite de définir cette valeur dans une région difficile d'accès de la courbe contrainte-déformation, zone très proche de l'origine de cette courbe pour laquelle la plupart des matériaux ont un comportement élastique linéaire (Fratzl, 2008b). Le module élastique est relié à la rigidité du matériau et correspond à

Formes	Exemples
Solutions	- Réparation de la peau. - Oreilles artificielles.
Gels	- Pansements.
Poudres	- Agents hémostatiques.
Fibres	- Fils de suture. - Vaisseaux sanguins artificiels. - Valves artificielles.
Membranes et films	- Membranes de dialyse. - Pansements. - Cornées artificielles. - Lentilles de contact.
Tubes	- Vaisseaux sanguins artificiels. - Canaux biliaires artificiels. - Membranes alvéolaires artificielles.
Éponges	- Pansements. - Substituts de cartilage et d'os. - Agents hémostatiques. - Peau artificielle

Tableau 0.3 – Applications biomédicales des différentes formes du collagène (Fujioka et al., 1998).

sa capacité à se déformer de manière élastique lors d'une sollicitation mécanique. Ce paramètre est très important pour la transmission des charges au sein d'un matériau soumis à des contraintes multiaxiales et cycliques. Ainsi, l'os, qui est soumis à des sollicitations mécaniques cycliques complexes, est composé d'une matrice extracellulaire renforcée par des particules minérales très dures, et présente un module élastique bien plus élevé que le tendon, composé essentiellement de collagène. La limite d'élasticité est la charge à partir de laquelle la déformation du matériau est irréversible. Cette valeur correspond à la zone de la courbe où la relation contrainte-déformation n'est plus linéaire. Au delà de la limite d'élasticité, la résistance à la traction correspond au maximum de contrainte que peut subir le matériau lors de la sollicitation mécanique. Cette propriété doit donc être évaluée pour les matériaux amenés à supporter de très fortes charges (ligaments, tendons, os, etc.). La ténacité est mesurée par l'aire totale sous la courbe contrainte-déformation et correspond à l'énergie qu'il faut apporter au système pour qu'une micro-fissure se propage au sein du matériau. Cette énergie emmagasinée doit être considérée pour la résistance des matériaux aux chocs. Cette valeur est très liée au point de rupture, où la déformation et la contrainte à la rupture peuvent être identifiées. Les tissus biologiques à base de collagène représentent un compromis entre rigidité, résistance et ténacité. Ceci est une des raisons pour lesquelles la plupart des tissus des organes sont très riches en collagène.

Le collagène est le principal constituant conférant aux tissus conjonctifs, tels que les os, les dents, les cartilages, les tendons, les ligaments et les matrices fibreuses de la peau et des vaisseaux sanguins, leur résistance et leur forme. La valeur élevée de la résistance à la traction des fibres de collagène (module

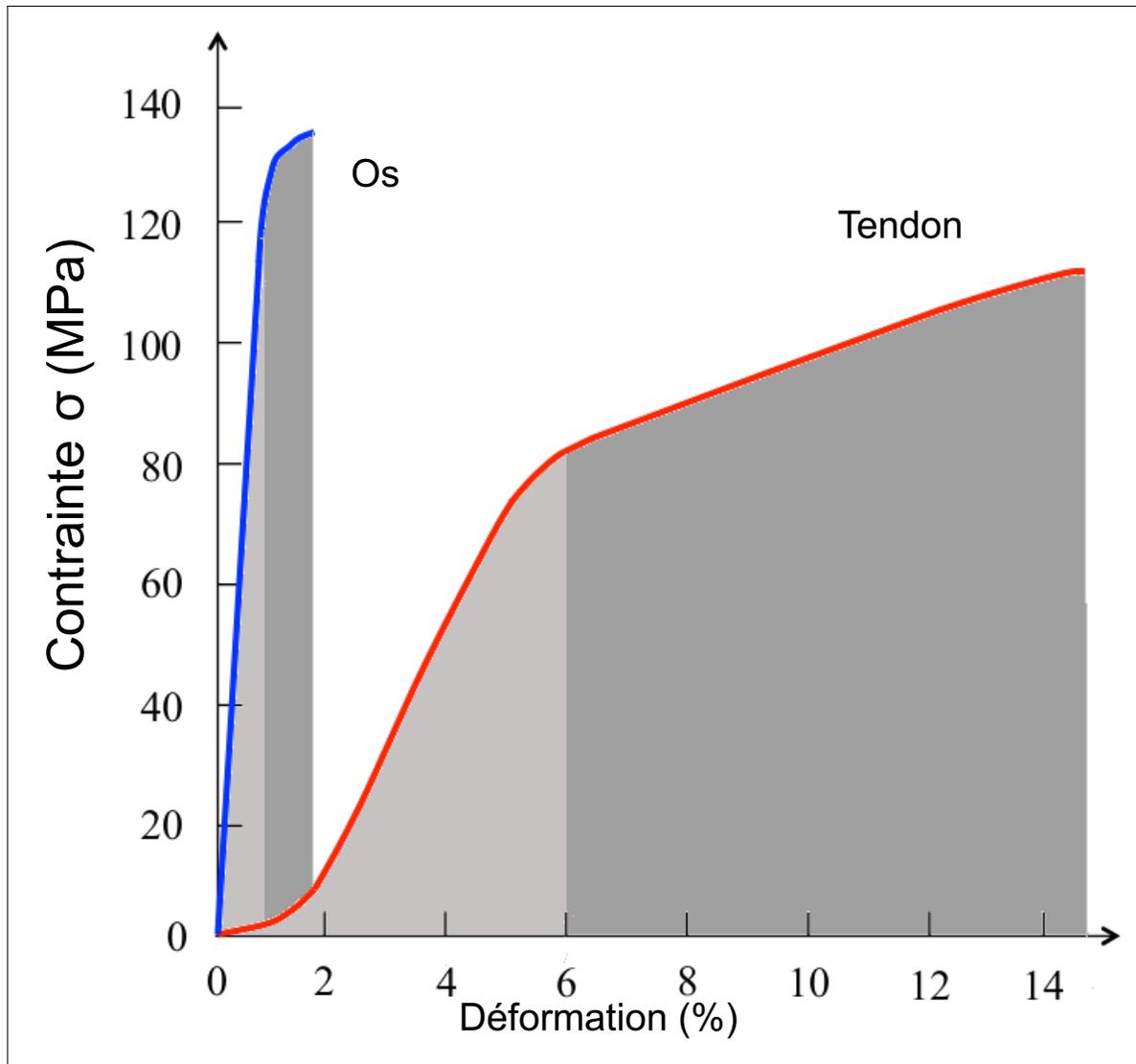


FIGURE 0.4 – Courbes typiques de contrainte-déformation de tendon de queue de souris et d’os. La surface grisée claire correspond à l’énergie élastique par unité de volume emmagasinée lors du test. La partie grisée foncée correspond à l’énergie dissipée par unité de volume lors du test et après la limite d’élasticité (adapté de (Fratzl, 2008a)).

de Young compris entre 100 MPa et 2900 MPa (Jouan, 2005)) provient de leur organisation supra-moléculaire spécifique. La structure en triple hélice rigide et compacte du collagène est responsable de sa résistance mécanique à la traction. Cette structure est analogue à celle rencontrée dans les niveaux successifs des faisceaux de fibres dans les cordes et les câbles. En effet, les chaînes polypeptidiques en extension et enroulées du collagène convertissent une force de traction longitudinale en une force de compression latérale beaucoup plus facile à supporter sur presque toute la triple hélice incompressible. Ce phénomène s’explique par les directions d’enroulement contraires des chaînes et de la triple hélice du collagène qui s’opposent au déroulement des spires sous l’effet d’une tension (Murray et al., 2013).

Malheureusement, bien que les mesures de leurs modules de soient très variables selon les études (1-500 kPa (Roeder et al., 2002; Feng et al., 2006)), les gels de collagène reconstitués en laboratoire possèdent des propriétés mécaniques bien plus faibles que le collagène naturel et ce, de plusieurs ordres de grandeur. Ceci s'explique par le fait que le processus d'extraction affecte énormément l'organisation naturelle des fibrilles, par leur forte contenance en eau et par leur faible densité (Brown, 2013).

La première tentative de construction *in vitro* d'un vaisseau sanguin à base de gel de collagène a été réalisée par Weinberg *et al.* en 1986. Sa structure multicouche mimait celle des artères naturelles (Weinberg and Bell, 1986). Cette construction de forme tubulaire fut obtenue en introduisant du collagène, des CMLs et du milieu de culture dans un moule. Après gélification de ce mélange, une deuxième couche de gel de collagène contenant des FBs fut ajoutée autour de la première selon la même méthode afin de créer une pseudo-*adventice*. Ensuite, la surface interne fut recouverte par des CEs afin de créer une pseudo-*intima*. Les cellules utilisées furent extraites d'une aorte bovine. Une telle construction ne pouvant supporter que de faibles pressions internes (< 10 mmHg), elle fut renforcée par une maille de Dacron. Ce modèle standard fut ensuite optimisé en termes de nombre de mailles, de concentration de collagène, de densité de cellules et de temps de culture. Le modèle optimisé était alors constitué par 3 couches de collagène cellularisées alternant avec 2 mailles de Dacron, et pouvait supporter une pression à la rupture de 320 ± 30 mmHg. Cette construction pouvait donc supporter la pression artérielle, mais la marge de sécurité était assez faible. De plus, la présence d'un matériau synthétique soulève toujours le problème d'une réaction de l'organisme hôte. Les performances mécaniques relativement faibles comparées aux artères naturelles avaient certainement pour origine le manque d'organisation des fibrilles de collagène et des cellules du tissu vasculaire. Sur ce point, L'Heureux *et al.* ont montré que la contraction des gels de collagène par des CMLs autour d'un mandrin entraînent un alignement des fibrilles de collagène et des CMLs dans la direction circonférentielle des structures (L'Heureux et al., 1993).

Selon une technique similaire, Hirai *et al.* ont créé un échafaudage tubulaire en mélangeant dans un moule en verre des CMLs de chien et du collagène de type I (Hirai and Matsuda, 1996). Après renforcement par une maille de Dacron et recouvrement de sa surface interne par des CEs, cette construction fut greffée à la veine cave d'un chien. 6 mois après l'implantation, le taux de succès de ces greffons fut de 64 %. La maturation du greffon dans l'organisme de l'animal a permis une réorganisation structurale du tissu et des cellules similaire à celle des vaisseaux naturels. En effet, l'observation de la structure révélait la présence d'une monocouche de CEs orientées de manière longitudinale, de CMLs montrant un phénotype contractile, ainsi que de FBs sur l'ensemble de la paroi vasculaire. Bien que présentant toujours une faible pression à la rupture (≈ 110 mmHg) et une compliance élevée, la formation d'élastine a été notée dans la pseudo-tunique moyenne de la paroi du vaisseau.

D'autres démarches originales ont été associées à l'utilisation des gels de collagène. On peut ainsi citer le travail de Tranquillo *et al.* en 1996 qui ont tenté d'orienter les fibrilles de collagène et les cellules

à l'aide d'un champ magnétique (Tranquillo et al., 1996). Pendant le processus de fibrillogénèse de la pseudo-*media* autour d'un mandrin, ils ont appliqué un champ magnétique intense dans la direction circumférentielle de l'échafaudage contenant des CMLs. Les résultats montrent que la compaction autour du mandrin a une plus forte influence sur l'orientation circumférentielle des cellules que n'en a le champ magnétique.

En 2003, Berglund *et al.* ont élaboré une construction hybride cylindrique totalement biologique constituée d'une couche externe de collagène contenant des FBs et d'un support interne temporaire de gel de collagène de type I réticulé par du glutaraldéhyde, des ultraviolets ou par déshydratation (Berglund et al., 2003). La pression à la rupture de ces structures atteint 650 mmHg, valeur supérieure à la pression sanguine mais néanmoins encore très inférieure à la pression à la rupture des artères naturelles. En 2004, ce même groupe a étudié l'incorporation d'élastine dans des gels de collagène et a ainsi pu montrer une amélioration de l'élasticité de l'échafaudage par des tests de relaxation de contrainte, malgré une faible pression à la rupture (≈ 80 mmHg).

Plus récemment, la compression plastique a été utilisée pour la production de matrice dense de collagène dépourvue de la majorité de son contenu en eau (Abou Neel et al., 2006; Brown, 2013). Les faibles performances mécaniques des gels de collagène proviennent en partie de leur fort contenu en eau ne faisant pas partie de la structure moléculaire du collagène. Ainsi, la compression plastique fut réalisée en appliquant une charge de $22,6 \text{ kN.m}^{-2}$ sur le gel de collagène hydraté (perte de 98 % de l'eau). Par enroulement de plusieurs feuillets de collagène comprimé, cette technique permet d'augmenter la densité du collagène et de réaliser des structures multicouches résultant en l'amélioration des propriétés mécaniques. Cependant, les propriétés biologiques de ces échafaudages doivent être évaluées afin de pouvoir apprécier le potentiel de cette technique.

Tous ces travaux sur les gels de collagène utilisés en tant que supports pour la régénération du tissu vasculaire mettent en évidence le manque criant de propriétés mécaniques de ces matériaux. Or, il est important de noter que les valeurs des paramètres mécaniques précédemment cités sont étroitement liées à la vitesse de sollicitation mécanique lors de tests de traction de tissus biologiques, ce qui témoigne du fort caractère viscoélastique de ces matériaux (Krishnan et al., 2004). Ce comportement viscoélastique est d'autant plus marqué pour les gels de collagène du fait de la présence à la fois d'une phase solide (la matrice de collagène) et d'une phase liquide aqueuse. Ainsi, la relation contrainte-déformation des gels de collagène se caractérise par un comportement de type élastique, indépendant du temps, correspondant à un stockage d'énergie élastique qui est typique des solides élastiques, ainsi qu'un comportement visqueux, correspondant à une dissipation d'énergie qui est typique des liquides visqueux. Dans le cas de ces gels, la partie solide, en l'occurrence la matrice de collagène, a un comportement viscoélastique c'est-à-dire à la fois liquide et visqueux. En effet, la partie élastique implique l'élongation axiale réversible de la molécule de collagène au niveau moléculaire de la triple hélice et au niveau supramoléculaire par augmentation de la distance interfibrillaire et de la période caractéristique D. La partie visqueuse de la matrice de collagène, quant à elle, est

reliée au glissement des molécules et des fibrilles de collagène entre elles. Les molécules et fibrilles de collagène qui ne sont pas liées les unes aux autres vont glisser les unes par rapport aux autres, ce type de déplacement est irréversible et on parle de déformation plastique permanente. À la lumière de ces informations, on comprend aisément toute l'importance de l'augmentation de la densité du réseau de collagène (Brown, 2013) ou de la présence de liens, ou réticulations, inter-moléculaires et interfibrillaires (Holzapfel, 2008) pour favoriser à la fois la rigidité et le caractère élastique des matériaux à base de collagène.

Suite à la présentation des propriétés biologiques et mécaniques des structures de collagène, le Tableau 0.4 résume les points forts et les points faibles de ce matériau. Ainsi, le grand potentiel de l'utilisation du collagène pour la réalisation de structures d'échafaudage permettant la régénération du tissu vasculaire réside essentiellement dans ses excellentes propriétés biologiques. Il est cependant nécessaire de développer des techniques pour renforcer ses propriétés mécaniques. Une brève revue de littérature des techniques de renforcement est présentée dans la Section 0.5.5 qui suit.

Le collagène	
Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - Source renouvelable abondante chez les organismes vertébrés. - Faibles caractères antigénique et immunogène. - Biodégradabilité contrôlable par le taux de réticulation. - Environnement propice à la prolifération des cellules du tissu vasculaire. - Différentes formes disponibles (film, solution, gel, éponge, nanoparticules). - Fonctionnalisable afin de créer une structure aux propriétés chimiques désirées. 	<ul style="list-style-type: none"> - Faibles propriétés mécaniques du collagène reconstitué. - Caractère hydrophile fait que cet hydrogel est difficile à manipuler. - Manque de reproductibilité des propriétés du collagène isolé en laboratoire (densité de réticulation, impuretés, taille des fibres, etc.). - Prix élevé du collagène de type I pur commercialisé.

Tableau 0.4 – Potentiel du collagène pour son utilisation en génie tissulaire.

0.5.5 Les techniques de renforcement mécanique du collagène : état de la littérature

Une des premières idées de renforcement est de combiner le collagène avec un polymère synthétique ou naturel pouvant apporter une contribution mécanique, tels que les glycosaminoglycanes (GAG) (Boyce et al., 1988; Ellis and Yannas, 1996; Chen et al., 2005), l'élastine (Arahamian et al., 1987; Buijtenhuijs et al., 2004; Garcia et al., 2009) ou le chitosane (Damour et al., 1994; Shahabeddin et al., 1990; Wu et al., 2007; Sionkowska et al., 2006). On parle alors de matériau à base de collagène. Ces matériaux peuvent soit être mélangés, soit ajoutés l'un à l'autre dans différentes phases. Le mélange peut alors être réalisé avec le collagène se présentant sous différentes formes telles que des éponges lyophilisées, des films, des gels ou des matrices électrospinnées. Par exemple, le mélange gel de collagène/gel d'élastine a permis d'augmenter l'élasticité de l'échafaudage (Cummings et al., 2004; Rowe

and Stegemann, 2006). Également, le mélange avec des polymères naturels chargés permet d'induire des réticulations ioniques avec les molécules de collagène. Ainsi, le chitosane, qui est un polysaccharide cationique, génère des liaisons ioniques avec les groupements amines et carboxyles présents en grand nombre dans la molécule de collagène. Ces interactions sont suffisamment importantes pour stabiliser le mélange et augmenter les propriétés du collagène. En l'occurrence, le protocole, relativement simple, consiste à mélanger le chitosane et le collagène avant de lyophiliser le mélange. Cette technique ne nécessite pas d'avoir recours à des étapes de lavage car le chitosane n'est pas toxique (Shahabeddin et al., 1990; Berthod et al., 1994).

Cependant, le mélange avec d'autres polymères naturels requiert souvent une grande proportion de la molécule de renfort réduisant une partie de la performance biologique de l'échafaudage. Cette stratégie nécessite de trouver un compromis entre gain en termes de propriétés mécaniques et perte au niveau biologique.

De nombreuses techniques de renforcement des matériaux à base de collagène présentées dans la littérature impliquent l'augmentation du degré de réticulation entre fibrilles de collagène. Il est reconnu de manière générale que l'augmentation du degré de réticulation du collagène s'accompagne d'une augmentation de ses propriétés mécaniques. En effet, les réticulations chimiques constituent autant de points d'ancrage entre les chaînes qui diminuent leur degré de liberté et limitent donc leur déplacement sous l'effet de la charge. En réalité, l'augmentation du degré de réticulation peut avoir plusieurs effets :

- Réduire le caractère antigénique du collagène et sa propension à induire une réaction de l'organisme face à un corps étranger, par réduction de l'accessibilité aux sites antigéniques. Mais cet argument est encore très controversé (Courtman et al., 1994; Hardin-Young et al., 1996; Lynn et al., 2004).
- Augmenter la résistance à la dégradation de la matrice de collagène par les enzymes spécifiques et par les cellules (par réduction de l'accessibilité aux sites de clivage).
- Augmenter les propriétés mécaniques, comme précédemment mentionné.

La plupart de ces techniques implique une réaction avec les groupements amines (souvent les groupements ϵ -amines) et carboxyles présents le long de la molécule de collagène. Comme précédemment mentionné, ces résidus se trouvent exposés à la surface de la molécule, offrant autant de sites de liaisons inter-moléculaires et inter-fibrillaires (Avery and Bailey, 2008).

Il ressort de la littérature qu'on peut distinguer majoritairement trois vecteurs de réticulations :

1) Les agents de réticulation chimiques.

Les plus souvent utilisés sont des composés aldéhyde tels que le formaldéhyde ou le glutaraldéhyde (Wu et al., 2007; Fathima et al., 2007; Chandran et al., 2012; Jorge-Herrero et al., 2010). La famille des carbodiimides sont également utilisés pour augmenter la résistance enzymatique et les propriétés

mécaniques des structures de collagène (Powell and Boyce, 2006; Duan and Sheardown, 2005). Les carbodiimides, de formule générale $R-N=C=N-R'$, sont des agents activateurs souvent utilisés pour amorcer la formation d'une liaison peptidique entre 2 acides aminés. Ils réagissent avec les groupes carboxyliques des acides aspartiques et glutamiques présents sur la chaîne de collagène pour donner des groupements O-acylisourés (Timkovich, 1977). Des études ont montré que le nombre de réticulations introduites par le carbodiimide pouvait être augmenté par l'addition de N-hydroxysuccinimide (NHS) qui inhiberait les réactions secondaires du carbodiimide (Olde Damink et al., 1996). Ces composés chimiques peuvent également être utilisés pour fonctionnaliser le collagène avec des nanoparticules d'or (Castaneda et al., 2008) ou en combinaison avec les composés époxy (Zeeman et al., 1999; Everaerts et al., 2008). L'hexaméthylène diisocyanate et les composés isocyanates de manière générale sont utilisés pour réticuler les échafaudages de collagène (Zeugolis et al., 2009). Finalement, la génipine est très étudiée en tant qu'agent de réticulation des matériaux biologiques du fait de sa synthèse naturelle et de sa faible cytotoxicité. Ce composé naturel est dérivé de l'hydrolyse de la géniposide extraite du fruit de la plante *Gardenia Jasminoides* (Fujikawa et al., 2006). L'équipe de Sung *et al.* ont réalisé des travaux majeurs avec la génipine (Sung et al., 2003, 1999a; Chang et al., 2002; Sung et al., 1998; Huang et al., 1998). La génipine permet d'induire des réticulations chimiques intra- et inter-molécules de collagène ainsi que des réticulations entre fibrilles de collagène (Tsai et al., 2000; Sung et al., 1999b; Sundararaghavan et al., 2008). Bien que ces agents de réticulation renforcent de manière indiscutable le collagène, leur utilisation en génie tissulaire reste encore problématique puisque leur toxicité les rend incompatibles avec l'utilisation des cellules (Huang-Lee et al., 1990; Speer et al., 1980; van Luyn et al., 1992), et certains sous-produits de réaction favorisent le dépôt de calcium fragilisant à long terme le tissu biologique (Levy et al., 1986) ou induisent des réactions d'inflammation ou une réponse immunitaire *in situ* ou dans les organes impliqués dans le métabolisme ou dans l'excrétion.

2) Les agents de réticulation naturels enzymatiques et non-enzymatiques.

Ces agents de réticulation sont impliqués dans des processus biologiques naturels. La réticulation du collagène par l'intermédiaire du glucose est un phénomène bien connu sous le nom de glycation, processus non-enzymatique. Notamment, ce processus se produit dans les tissus conjonctifs au cours de leur vieillissement et est accéléré chez les personnes atteintes de diabète. Lors de la mise en présence du collagène avec un sucre réducteur, celui-ci se lie de manière covalente aux fibrilles de collagène conduisant à la formation de liaisons inter-moléculaires. La glycation est une réaction de condensation entre un groupement amine de la protéine (présent sur les acides aminés lysine, hydroxylysine et arginine) et un groupement carbonyle du sucre réducteur formant des produits dits d'Amadori. Des oxydations ultérieures conduisent à la formation de d'AGE (Advanced-Glycosylation End products) dont les archétypes sont la n- carboxyméthyl-lysine et la pentosidine. Ce sont des liaisons inter-moléculaires supplémentaires qui induisent une augmentation de la résistance à l'étirement du collagène (Bailey, 2001; Paul and Bailey, 1996). Lorsque réalisée *in vitro*, la glycation n'affecte pas l'activité cellulaire et n'induit pas de réaction inflammatoire. Comme mentionné dans la section 0.5.2, l'enzyme lysyl oxidase induit des réticulations par transformation de la lysine et de l'hydroxylysine

en allysine et hydroxyallysine respectivement (cofacteurs : le phosphate de pyridoxal, le Cu^{2+} et l' O_2 (Elbjeirami et al., 2003)). Ils n'engendrent pas de sous-produits de réaction potentiellement toxiques pour les cellules et ils permettent également d'augmenter la résistance à la dégradation enzymatique et les propriétés mécaniques des matériaux à base de collagène.

3) Les agents de réticulation physiques.

Par techniques de réticulation physique, on sous-entend des traitements sans contact qui n'impliquent généralement pas de réactifs non biologiques, ni de sous-produits de réaction tels que les radiations γ , -UV ou photo-oxydation, micro-ondes, déshydratation, déshydratation par traitement thermique (Cornwell et al., 2007). La déshydratation aboutit à des structures de collagène d'une plus grande densité par la formation de liaisons covalentes et non-covalentes. La déshydratation par traitement thermique consiste à sécher les échantillons sous vide et à 110°C. Elle engendre de nombreuses réticulations par des réactions de condensation (estérification ou formation de liaisons amide).

Bon nombre de recherches ont été menées sur les effets photochimiques de l'exposition du collagène aux radiations UVC ($\lambda = 254$ nm). Ces études ont donc montré que les UVC peuvent engendrer une augmentation de la réticulation du collagène (Cooper and Davidson, 1965; Sudoh and Noda, 1972; Fujimori, 1965, 1985; Menter et al., 1995), la diminution de la quantité de tyrosine et de phénylalanine au sein de la matrice de collagène (Cooper and Davidson, 1965; Fujimori, 1965), des changements de conformation et des dégradations de chaînes (Cooper and Davidson, 1965; Sudoh and Noda, 1972) et le ralentissement de la croissance des fibrilles. Les mécanismes photochimiques induits par les radiations UVs font principalement intervenir des acides aminés aromatiques telles que le tryptophane (faible quantité dans le collagène), l'histidine, la tyrosine et la phénylalanine (Fujimori, 1965; Tam et al., 2004; Weadock et al., 1995). Deux mécanismes différents sont suggérés :

- *un mécanisme direct* dans lequel les acides aminés aromatiques, et notamment la phénylalanine et la tyrosine, atteindraient un état excité à l'état triplet dans lequel l'éjection d'un électron conduirait à la formation d'un radical libre. Ainsi, une liaison chimique peut s'établir entre deux fibrilles qui se trouvent suffisamment proches l'une de l'autre. (Creed, 1984a,b).
- *un mécanisme indirect* est également avancé. Celui-ci fait intervenir des intermédiaires réactionnels telles que des espèces oxydées. Ces espèces (peroxydes, 1O_2 , des anions superoxydés O_2^- et des radicaux $\cdot OH$) sont créées depuis l'état fondamental de l'oxygène soit par action directe des radiations UV soit par transfert d'énergie depuis un chromophore présent dans la matrice de collagène (Dalle Carbonare and Pathak, 1992; Balasubramanian et al., 1990).

Il est probable que les réticulations chimiques induites par les UVs fassent intervenir en même temps les deux types de mécanismes réactionnels. Il est donc clair que ce processus est limité par le nombre d'acides aminés aromatiques susceptibles d'être excités. Le flux d'énergie lumineuse ($J.cm^{-2}$) peut être contrôlé en modifiant les facteurs suivants : puissance de la source lumineuse (W), distance des échantillons à la source (cm), temps d'exposition des échantillons à la source lumineuse (s). Une exposition excessive aux UVs conduit à la dénaturation des fibrilles de collagène (Weadock et al.,

1983). Par conséquent, l'utilisation des UVs doit se faire de manière contrôlée. Car si dans un premier temps, le traitement UV permet d'augmenter le degré de réticulation entre les fibrilles de collagène, se traduisant par une augmentation des propriétés mécaniques, dans un second temps, son utilisation trop poussée conduit à des scissions de chaîne qui fragilisent alors le collagène pouvant aller jusqu'à sa dénaturation. À ce stade-là, tous les bénéfices du traitement UV en termes de réticulation sont contrebalancés par la perte en terme de résistance mécanique (Weadock et al., 1996; Wolff and Dean, 1986). Il faut donc déterminer les conditions optimales permettant d'établir un compromis entre les effets de ces deux phénomènes.

Ces techniques de réticulations physiques constituent des approches très séduisantes pour renforcer les propriétés mécaniques des structures de collagène, de par leur caractère pratique, rapide et permettant de s'affranchir de l'utilisation d'agents exogènes qui engendreraient d'éventuelles réactions immunitaires. Cependant, il est nécessaire de prendre en compte le risque de dénaturation de la protéine, voire de sa dégradation, processus antagoniste à la réticulation chimique. Nous remarquerons que, finalement la plupart de ces stratégies ont un potentiel de cytotoxicité pour les cellules et nécessitent de traiter l'échafaudage seul sans cellules, de le rincer abondamment pour éliminer les sous-produits de réaction et ce, avant d'ensemencer les cellules.

0.6 Problématique spécifique au projet doctoral

Comme le montre la revue de littérature précédente, l'un des défis que doit relever le génie tissulaire dans les prochaines années est de réduire le temps et le coût de production des substituts. L'utilisation d'un échafaudage naturel permet d'offrir aux cellules dès le début de la culture un environnement et une forme similaires aux tissus naturels. La Figure 0.5 propose un schéma explicatif de la stratégie de génie tissulaire par échafaudage adoptée dans le cadre de cette thèse (Couet et al., 2011b). L'objectif de cette thèse est de développer une structure tubulaire à base de collagène servant de support suffisamment résistant pour la culture tridimensionnelle de cellules vasculaires dans un environnement pseudo-physiologique et dynamique créé par un bioréacteur. Les structures de collagène reconstruites en laboratoire ont des propriétés mécaniques rendant délicates leur manipulation et leur fixation au bioréacteur. **Le principal mandat de cette thèse est de renforcer suffisamment la structure de collagène avant ou après ensemencement des cellules** afin d'être capable de placer cette construction dans un bioréacteur pour la suite de la maturation. De plus, cette structure doit rester totalement biologique afin de s'affranchir des complications inhérentes à l'utilisation de matériaux synthétiques (réaction inflammatoire, sténose, infection et incompatibilité de propriétés mécaniques entre la prothèse synthétique et le vaisseau naturel) (Mehta et al., 2011; Murray-Wijelath et al., 2004; Hagerty et al., 2000; Sarkar et al., 2006).

0.7 Description de la stratégie adoptée dans le cadre de cette thèse

Le but ultime de ce projet est de mettre au point une technique de renforcement mécanique de structures d'échafaudage de collagène qui permettra de les manipuler et de les placer dans un bioréacteur à perfusion. Le bioréacteur à perfusion permettra de cultiver les cellules du tissu vasculaire et de soumettre ces structures à des contraintes cycliques de sorte à générer un tissu vasculaire ayant une composition, une organisation et des propriétés mécaniques quasi-physiologiques. La mise au point de techniques de renforcement mécanique est une étape préalable à la manipulation et à la fixation de ces structures au bioréacteur. Du point de vue biomécanique, une étude rigoureuse et approfondie du renforcement de ces structures nécessite de définir les techniques et l'environnement de caractérisation mécanique les plus adéquats, en vue de l'application visée, en l'occurrence la maturation de la construction dans un bioréacteur.

Dans ce contexte, cette thèse s'articule autour de quatre Chapitres répondant à cette problématique. Ainsi, les meilleures conditions dans lesquelles tester les propriétés mécaniques de sorte à ce que l'environnement soit le plus proche possible de celui du bioréacteur sont définies dans **les Chapitres 1 et 2**. Ensuite, ces constructions artérielles devant être soumises à des contraintes cycliques, **le Chapitre 2** est dédié à la caractérisation du comportement viscoélastique et à l'identification des paramètres mécaniques les plus pertinents, éléments majeurs à prendre en compte pour le développement de constructions artérielles fonctionnelles.

Finalement, une méthode de renforcement des structures de collagène s'appuyant sur le fort potentiel

des cellules à remodeler les matrices naturelles est proposée dans **les Chapitres 3 et 4**. **Le Chapitre 3** présente la méthodologie d'obtention des constructions vasculaires de forme tubulaire. Dans la perspective de développer une construction artérielle modèle pour des tests cliniques et thérapeutiques, **le Chapitre 4** apporte également des éléments de compréhension des interactions cellules-matériaux (matrice naturelle dans le cas présent) ainsi que des relations fondamentales entre organisation et propriétés physiques des constructions développées dans le cadre de ce projet. La méthodologie d'extraction du collagène, de sa solubilisation, de sa stérilisation et de sa gélification est présentée en Annexe A. La démarche scientifique et la méthodologie de mise en forme des échafaudages et/ou des constructions vasculaires adoptées dans chacun de ces Chapitres est décrite plus en détail dans la suite de cette section.

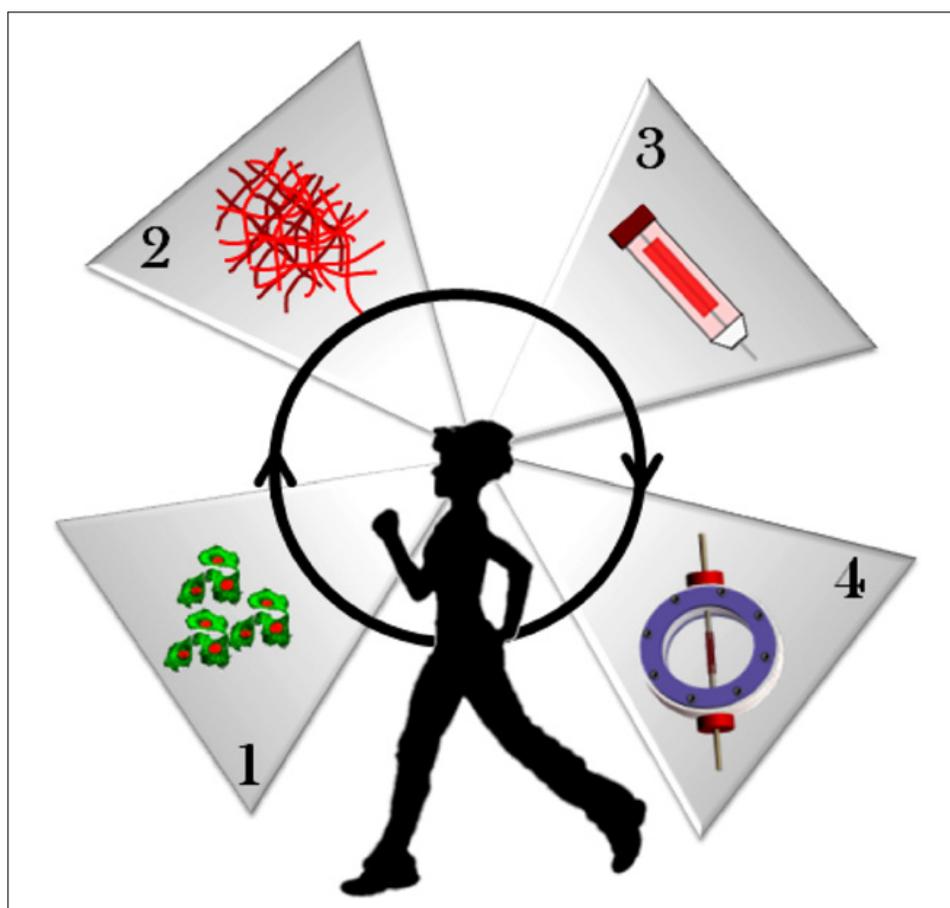


FIGURE 0.5 – Stratégie de génie tissulaire vasculaire basée sur les échafaudages naturels. (1) Des cellules autologues sont prélevées chez le patient alors qu’(2) un échafaudage est préparé en laboratoire. (3) Les cellules sont ensuite mélangées directement avec l’échafaudage afin de créer une construction (échafaudage + cellules) vasculaire tubulaire. (4) Finalement, la maturation de la construction se poursuit et est stimulée par des signaux biologiques et mécaniques dans un bioréacteur dynamique (Couet et al., 2011b).

De nombreuses stratégies de génie tissulaire font face à des problèmes de biomécanique. Ainsi, dans le cadre de cette thèse, la caractérisation des structures à base de collagène est essentiellement menée

du point de vue biomécanique dans le but de comprendre les relations entre la structure des constructions artérielles et leurs propriétés physiques. La thèse est tout d'abord orientée sur les caractérisations mécanique et viscoélastique des structures d'échafaudage seules, puis sur celles des structures d'échafaudage remodelées par les cellules. Les principales étapes de cette thèse sont :

Chapitre 1 : Renforcement mécanique des gels de collagène par un traitement de réticulation.

Plusieurs groupes de recherche dans le monde (entre autres les groupes de Nerem *et al.*, Tranquillo *et al.*, Vorp *et al.*, Niklason *et al.*, Hoerstrup *et al.*, L'Heureux *et al.*, Silver *et al.* et Auger *et al.*) ont développé des expertises dans la mesure des propriétés mécaniques des tissus biologiques durs et mous. Cependant, l'absence d'une norme commune dans ce domaine rend très difficiles les comparaisons entre les travaux de ces différents groupes. En effet, les conditions dans lesquelles ces tissus sont caractérisés sont très variables d'une étude à une autre, certains groupes se plaçant à l'air libre et à température ambiante pour réaliser leurs tests alors que d'autres les effectuent dans une solution physiologique à 37°C.

Dans le Chapitre 1 de cette thèse, un environnement contrôlé et reproductible pour tester les propriétés mécaniques des hydrogels de collagène est proposé. Cet environnement "pseudo-physiologique" consiste en un bain thermostaté à 37°C contenant une solution saline tamponnée à base de phosphate (PBS, pH = 7,4). Il assure le maintien de l'échantillon à une température physiologique constante et évite sa déshydratation, deux paramètres qui affectent énormément les propriétés mécaniques. Dans un premier temps, le but de ce Chapitre est de **montrer que les conditions (à l'air libre ou dans le bain thermostaté) dans lesquelles les caractérisations mécaniques sont réalisées peuvent avoir une influence majeure sur les propriétés mécaniques mesurées**. Pour diminuer la variabilité associée à la technique de caractérisation, un système d'accroche spécifique a été développé afin de manipuler des structures de collagène, préparées en forme d'anneaux, sans les endommager avant de les tester. Ainsi, dans un deuxième temps, l'objectif de ce travail est également de **montrer que ce dispositif permet de mettre en évidence le renforcement des gels de collagène par un traitement de réticulation et ce, malgré l'importante variabilité intrinsèque de ce genre de matériaux biologiques**.

Les ultraviolets apparaissent comme une technique de réticulation peu invasive pour la structure d'échafaudage puisqu'il s'agit d'un traitement sans contact. La simplicité de mise en œuvre et le faible coût de ce procédé font de ce traitement une technique de renforcement adéquate pour la validation du système de caractérisation mécanique. L'exposition du collagène aux radiations UV se fait en l'absence de cellules dans la matrice de collagène, après le processus de gélification et pendant un temps correspondant à la dose d'irradiation visée. En effet, le traitement de réticulation peut agir sur les cellules elles-mêmes mais également sur les sérums qui pourraient être réticulés et perdraient donc leurs fonctions biologiques. La stratégie envisagée était donc de renforcer les gels de collagène en les exposant aux radiations UV pour ensuite ensemercer ces structures avec des cellules. Sur la base de la littérature et des précédents travaux de notre groupe de recherche, la dose d'irradiation a été fixée à $20 J.cm^{-2}$ représentant un compromis entre les réactions de réticulation et les réactions de

scission de chaîne (Achilli et al., 2010; Lee et al., 2001b; Ohan et al., 2002; Sionkowska and Wess, 2004; Sionkowska et al., 2006). L'effet de cette exposition aux UVs sur les propriétés mécaniques des gels de collagène a été évalué par des tests de traction.

La Figure 0.6 présente la manière dont les échantillons ont été préparés pour les tests en micromécanique. La forme en anneau des gels de collagène permet de réaliser des tests de traction classique à une vitesse de déformation de $5 \text{ \%} \cdot \text{s}^{-1}$ en présence ou non d'un bain de PBS à 37°C et ce, jusqu'à la rupture. Le paramètre choisi pour évaluer l'effet des UVs et du bain est le module linéaire. Il est défini comme la pente de la partie linéaire apparaissant avant la rupture de l'échantillon.

La mesure du taux de gonflement est une technique communément utilisée pour évaluer la densité de réticulation chimique des polymères réticulés. Cette méthode a également été utilisée pour estimer la densité de réticulation de gels de collagène (Chan et al., 2007; Cornwell et al., 2007; Chan and So, 2005). De manière générale, un gel naturel ou synthétique hydrophile et déshydraté va avoir tendance à se gonfler en présence d'eau. Le taux de gonflement d'un gel est une mesure de la proportion relative en masse d'eau absorbée par un gel préalablement déshydraté. Cette technique est basée sur le principe que plus des gels de collagène sont réticulés, moins leur absorption d'eau est importante, le grand nombre de réticulations s'opposant à l'expansion du gel. Le taux de gonflement est donc calculé de la manière suivante (Chan and So, 2005) :

$$Q = \frac{M_H - M_D}{M_D} \quad (1)$$

Où M_D et M_H sont respectivement les masses du collagène déshydraté et réhydraté. À partir de cette valeur, il est possible d'en déduire une estimation du poids moléculaire moyen entre points de réticulation \bar{M}_C . Une simplification de la théorie de Flory-Renher permet de relier le taux de gonflement au poids moléculaire moyen entre points de réticulation \bar{M}_C (Cornwell et al., 2007) :

$$Q^{\frac{5}{3}} = \frac{\bar{v} \cdot \bar{M}_C}{V_1} \cdot (0,5 - \chi_{12}) \quad (2)$$

\bar{v} étant le volume spécifique du gel de collagène déshydraté, V_1 le volume molaire du solvant et χ_{12} le paramètre d'interaction solvant-polymère de Flory-Huggins. Ce paramètre d'interaction a été estimé à $0,49 \pm 0,05$ pour un gel de collagène en milieu aqueux (Cornwell et al., 2007). À l'aide de toutes ces données, il est alors possible de calculer la densité de réticulation du collagène ν_e grâce à l'équation suivante (Cornwell et al., 2007) :

$$\nu_e = \frac{\rho_P}{\bar{M}_C} \quad (3)$$

Où ρ_P est la densité du collagène déshydraté. La valeur communément admise pour la densité des protéines est de $1,35 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (Fischer et al., 2004).

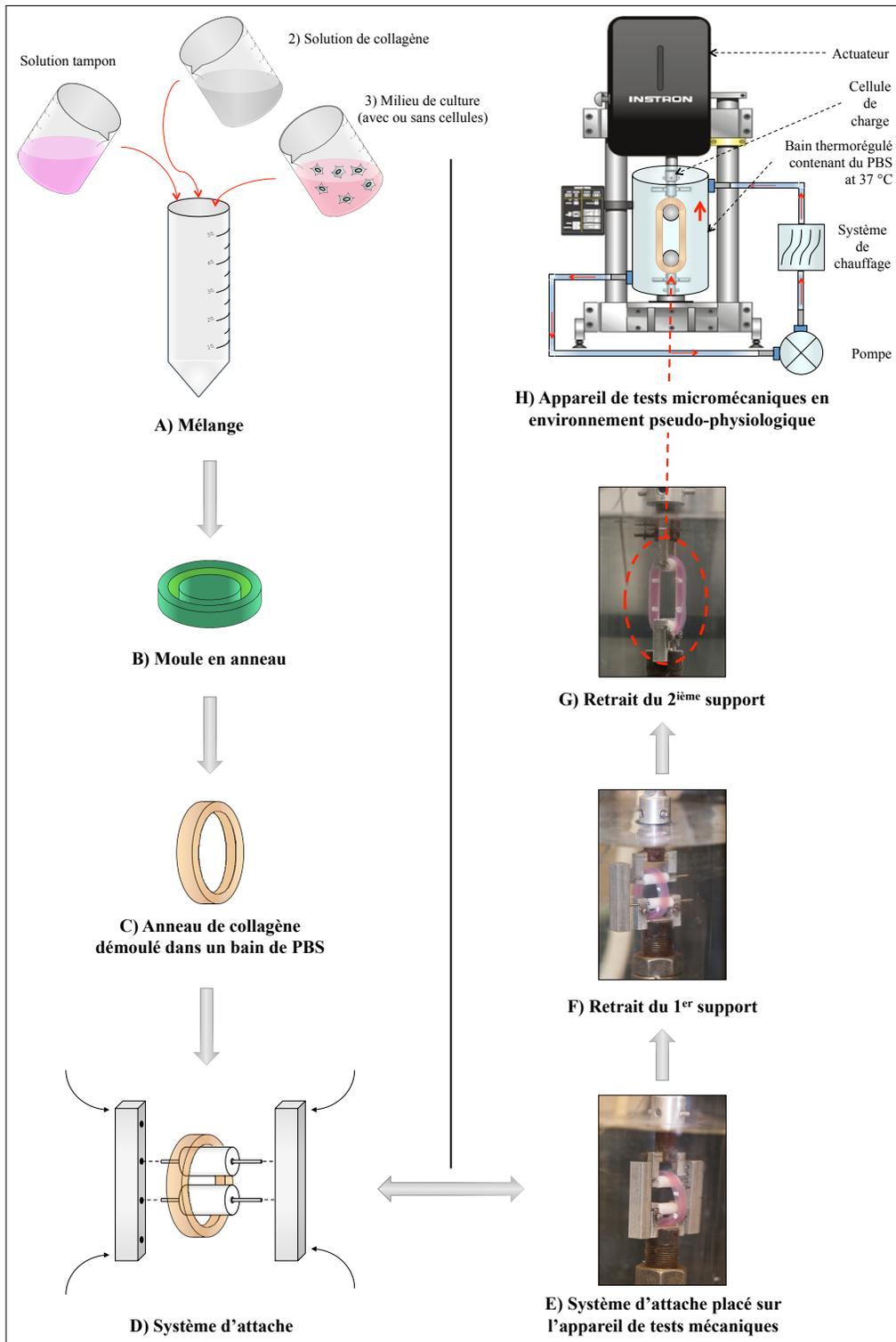


FIGURE 0.6 – Protocole de préparation des gels de collagène pour les tests mécaniques réalisés dans un environnement pseudo-physiologique (**Chapitres 1 et 2**).

L'évaluation du taux de gonflement des gels de collagène est réalisé après les avoir rincés avec de l'eau déionisée de sorte à éliminer le milieu de culture et les tampons et à ne conserver que la matrice de collagène. L'évaluation du taux de gonflement consiste à mesurer la masse des gels de collagène avant et après la déshydratation des gels, à les réhydrater en présence d'eau déionisée, et à calculer la masse d'eau relative absorbée. Les réticulations chimiques induites par le traitement UV sont autant de liens entre les fibrilles de collagène qui limitent la capacité du gel à absorber de l'eau. Dans ce projet doctoral, la mesure du taux de gonflement a permis d'évaluer l'effet direct des radiations UV sur le taux de réticulation des gels de collagène. De ce fait, l'évolution de ce paramètre a pu être corrélée avec celle des propriétés mécaniques des gels. Cette étude est nécessaire afin de comprendre comment optimiser les propriétés mécaniques de ces supports de régénération tissulaire en induisant des réticulations.

La dégradation enzymatique suivie par spectrophotométrie UV est une technique élaborée par notre groupe de recherche pour suivre l'évolution de la résistance des gels de collagène à la dégradation enzymatique suite à un traitement de réticulation. Cette technique alternative aux tests de gonflement est très sensible et permet de caractériser des échantillons de faible volume. En partant du constat qu'il était possible de suivre la fibrillogénèse par spectroscopie UV (Tenni et al., 2006; Yunoki et al., 2004; Kuo et al., 2005), nous avons suivi, en fonction du temps et en fonction du traitement de réticulation, la digestion des gels de collagène en présence de collagénase. Les analyses de la fibrillogénèse du collagène par suivi de l'absorbance de la solution de collagène sont décrites par Silver *et al.* (Silver and Birk, 1983, 1984). Les solutions de collagène contenues dans des cuvettes sont placées dans un spectrophotomètre UV-visible maintenu à une température de 37°C. La formation des fibrilles est mesurée en enregistrant l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 310$ nm en fonction du temps. Une courbe typique de l'évolution de la turbidité (absorbance) en fonction du temps est montrée sur la Figure 0.7 (Kuo et al., 2005). On y observe 3 phases : une première phase de latence, une phase de croissance suivie d'un plateau final pendant lequel la turbidité se stabilise.

La collagénase est une enzyme spécifique au collagène qui hydrolyse les liaisons peptiques X-Gly dans la séquence Pro-X-Gly-Pro-Y dans laquelle X et Y peuvent être n'importe quel acide aminé (Seifter et al., 1959). De nombreuses études ont utilisé la collagénase afin d'évaluer l'effet de différents traitements de réticulation du collagène sur la résistance à la dégradation enzymatique (Ohan et al., 2002; Lee et al., 2001b; Wei et al., 2005; Sung et al., 2003; Liang et al., 2004). Ces techniques comportent de nombreuses étapes rendant les caractérisations longues et complexes. Puisque les réticulations chimiques induites par les UVs influencent la conformation locale du collagène et l'accessibilité de l'enzyme aux sites spécifiques de dégradation, il est suggéré que l'augmentation du degré de réticulation des gels de collagène par le traitement aux UVs ralentisse le processus de dégradation par la collagénase.

Pour suivre la résistance à la dégradation enzymatique, une solution de collagénase (500 u/mL) est déposée sur les gels de collagène, préalablement traités aux radiations UV. Le tout est placé dans un incubateur (37°C, 5 % CO₂, 100 % d'humidité) pour initier l'activité de l'enzyme. L'absorbance des

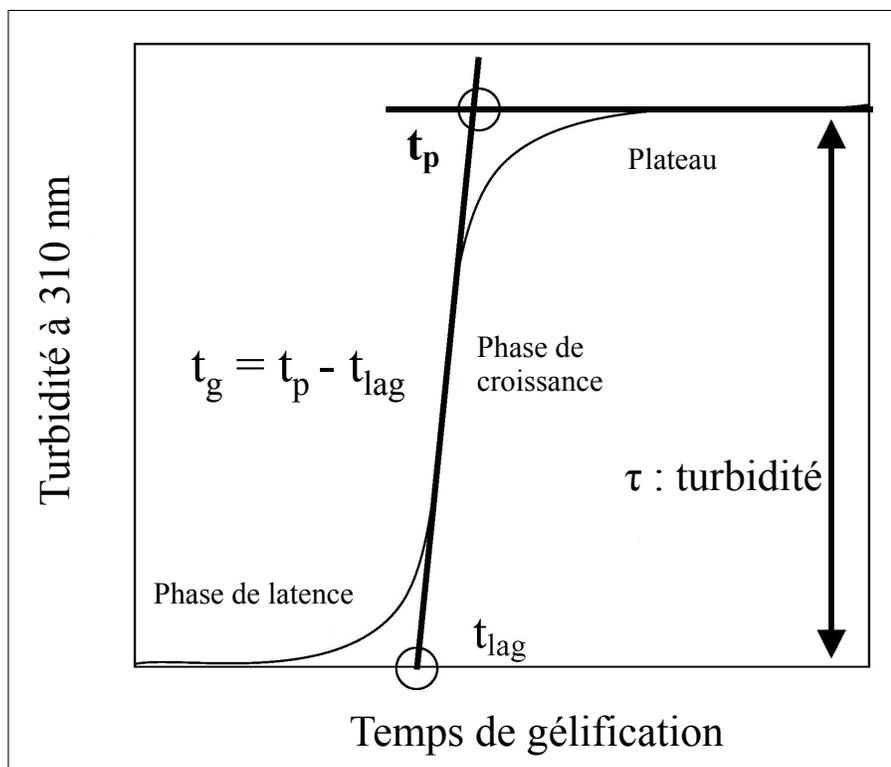


FIGURE 0.7 – Courbe typique de l'évolution de la turbidité d'une solution de collagène en fonction du temps (durée de la phase de latence t_{lag} , temps avant d'atteinte du plateau t_p , et durée de la phase de croissance t_g) (Kuo et al., 2005).

gels à $\lambda = 310$ nm est alors mesurée à 0 min, 10 min et toutes les 20 min. Plus les gels de collagène sont réticulés, plus la résistance à la digestion enzymatique, suivie par l'absorbance de la solution, devrait augmenter. La technique de dégradation enzymatique suivie par spectrophotométrie UV apparaît donc comme une méthode simple et rapide de suivi du degré de réticulation des gels de collagène soumis à divers traitements.

Ainsi, la mesure du taux de gonflement et de la résistance à la dégradation enzymatique sont respectivement des techniques semi-quantitative et qualitative complémentaires qui permettent d'évaluer la densité de réticulation des gels de collagène suite au traitement UV. Le détail des résultats de ces techniques corrélés au renforcement mécanique de ces échafaudages par les UVs sont présentés dans le Chapitre 1 de cette thèse.

Chapitre 2 : Impact des facteurs environnementaux sur les propriétés mécaniques et viscoélastiques des structures de collagène.

Les tissus biologiques sont des matériaux très particuliers à caractériser d'un point de vue mécanique. Cela tient en grande partie à leur fort caractère viscoélastique et à leur propriété de non-linéarité. Pour les hydrogels, ces propriétés sont accentuées par leur forte contenance en eau (plus de 99 %

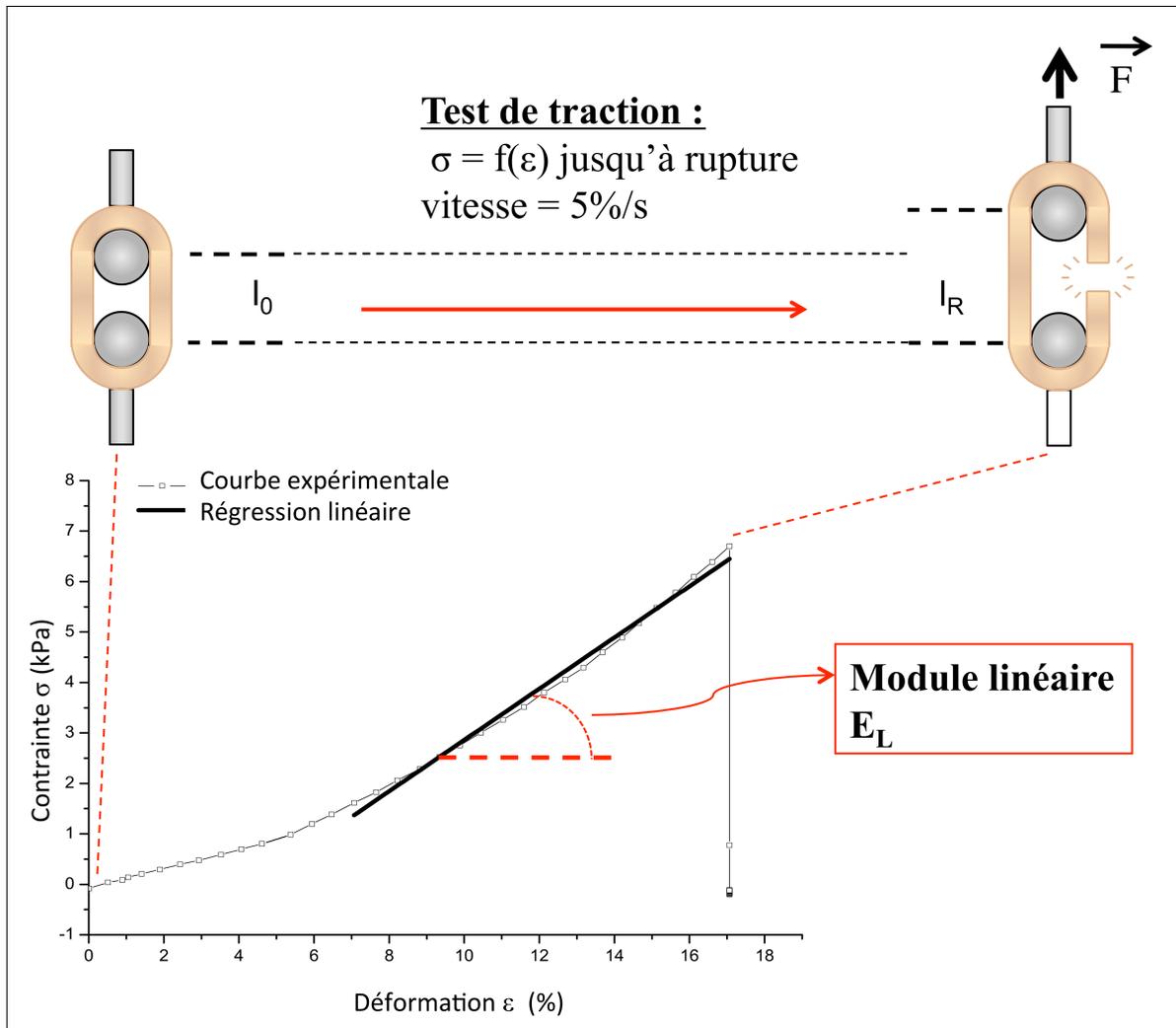


FIGURE 0.8 – Schéma explicatif d'un test de traction effectué sur des gels de collagène en forme d'anneau dans les **Chapitres 1** et **2**. Les anneaux de collagène sont étirés à une vitesse de déformation de $5\% \cdot s^{-1}$ jusqu'à la rupture. Le module lineaire E_L correspond à la pente de la partie lineaire de la courbe contrainte-déformation. l_0 et l_R correspondent respectivement à l'allongement initial et à la rupture.

en masse d'eau). Ceci étant dit et étant donné que les constructions artérielles développées dans ce projet sont destinées à être placées sous stimulation dynamique dans un bioréacteur, la caractérisation des propriétés viscoélastiques des échafaudages de collagène s'impose comme une évidence. Comme précédemment mentionné, la caractérisation des propriétés mécaniques des tissus biologiques dans la littérature n'est pas standardisée (Gauvin, 2010; Wagenseil et al., 2003). On peut ainsi lister de nombreuses techniques de caractérisation telles que les tests de traction (Roeder et al., 2002; Laterreur et al., 2014; Isenberg and Tranquillo, 2003; Berglund et al., 2003), de compression (Achilli and Mantovani, 2010), les tests de compliance (Dahl et al., 2007a; Diamantouros et al., 2013; Couet et al., 2011a; L'Heureux et al., 2006), de pression à la rupture (Laterreur et al., 2014; Niklason et al., 1999; L'Heureux et al., 1998), la rhéologie (Barocas et al., 1995; Velegol and Lanni, 2001) et les tests de re-

laxation de contrainte (Shen et al., 2011; Silver and Landis, 2008; Silver et al., 2002a; Berglund et al., 2005) ou de fluage (Berglund et al., 2005). Les trois dernières techniques permettent d'accéder aux propriétés viscoélastiques des matériaux. Pour des raisons de sensibilité et de sollicitation mécanique plus proche de celles en lien avec l'application, les tests de relaxation de contrainte apparaissent les plus adéquats pour tester les gels de collagène.

La technique de relaxation de contrainte apporte de nombreuses informations sur les propriétés mécaniques et viscoélastiques du collagène à la fois à l'échelle macroscopique mais également à l'échelle moléculaire. La Figure 0.9 présente un schéma explicatif d'un test de relaxation classique. Le principe consiste à solliciter mécaniquement le matériau en le soumettant à une déformation constante. Lors de la rampe de déformations, la contrainte exercée par l'échantillon en réaction à cette sollicitation augmente également jusqu'à une valeur de contrainte maximale atteinte très peu de temps après que la valeur de déformation constante ait été atteinte. Une fois la déformation constante atteinte, la réaction exercée par l'échantillon diminue au cours du temps (relaxation de contrainte) jusqu'à atteindre une valeur d'équilibre. Au point d'équilibre, toute la réponse visqueuse du matériau s'est dissipée, la contrainte est désormais un paramètre indépendant du temps donnant accès à la partie élastique de la réponse du matériau. Ceci représente un avantage certain sur les tests de traction. En effet, il est très difficile d'accéder au module élastique de matériaux fortement non linéaires comme les gels de collagène (Figure 0.8) par des tests de traction classiques qui mettent forcément en jeu la partie visqueuse des matériaux testés. Le module élastique apparaît alors comme un paramètre mécanique intrinsèque de référence pour connaître le comportement du matériau sollicité en fatigue dans le bioréacteur.

Les propriétés viscoélastiques sont également très influencées par l'environnement dans lequel les matériaux sont testés. Parmi ces facteurs, la température a un impact considérable sur les propriétés mécaniques des polymères naturels et synthétiques. En effet, la structure des polymères, et plus particulièrement celle des protéines, est stabilisée en grande partie par des liaisons hydrogène qui peuvent être brisées par augmentation de la température. Ceci a pour effet d'influencer la mobilité des chaînes moléculaires. L'état d'hydratation du matériau lors de sa caractérisation mécanique est également un facteur à prendre en compte car les molécules d'eau sont reconnues pour leur effet plastifiant accentuant la partie visqueuse du polymère. Les fibrilles de collagène, en tant que polypeptides, sont de longues molécules chargées. Les interactions entre les fibrilles de collagène sont donc directement influencées par la force ionique. La variabilité associée aux individus, à leur sexe ou à leur âge, aux sites et aux modes de prélèvements, aux différentes étapes dans le processus d'extraction et de mise en forme font que les tissus biologiques mous présentent une grande variabilité intrinsèque dans la mesure de leurs propriétés mécaniques et viscoélastiques. On comprend donc toute l'importance de l'historique de l'échantillon qui génère des concentrations de contrainte dans le tissu et qui rendent difficile la comparaison des échantillons au moment de la mesure. Pour pallier cela, Fung *et al.* ont montré que le préconditionnement mécanique, consistant en des sollicitations cycliques de l'échantillon à des petites déformations, permet de dissiper ces contraintes internes et d'atteindre un niveau mécanique d'équilibre (Fung, 1993). Ce préconditionnement mécanique ramène les tissus biologiques

à un même état initial et aboutit à des courbes de contrainte-déformation reproductibles.

En continuité par rapport au précédent Chapitre, **les objectifs du Chapitre 2 de cette thèse** sont : 1) de mettre en place et de valider un système de caractérisation des propriétés mécaniques et viscoélastiques permettant d'accéder au module élastique des gels de collagène ; 2) d'évaluer l'effet de la température, de l'hydratation et du préconditionnement mécanique sur les propriétés mécaniques et viscoélastiques des gels de collagène par des tests de traction et de relaxation de contrainte. Finalement, ce Chapitre établit les meilleures conditions de caractérisation et aboutit ainsi à des résultats toujours plus reproductibles et plus proches des conditions réelles d'utilisation.

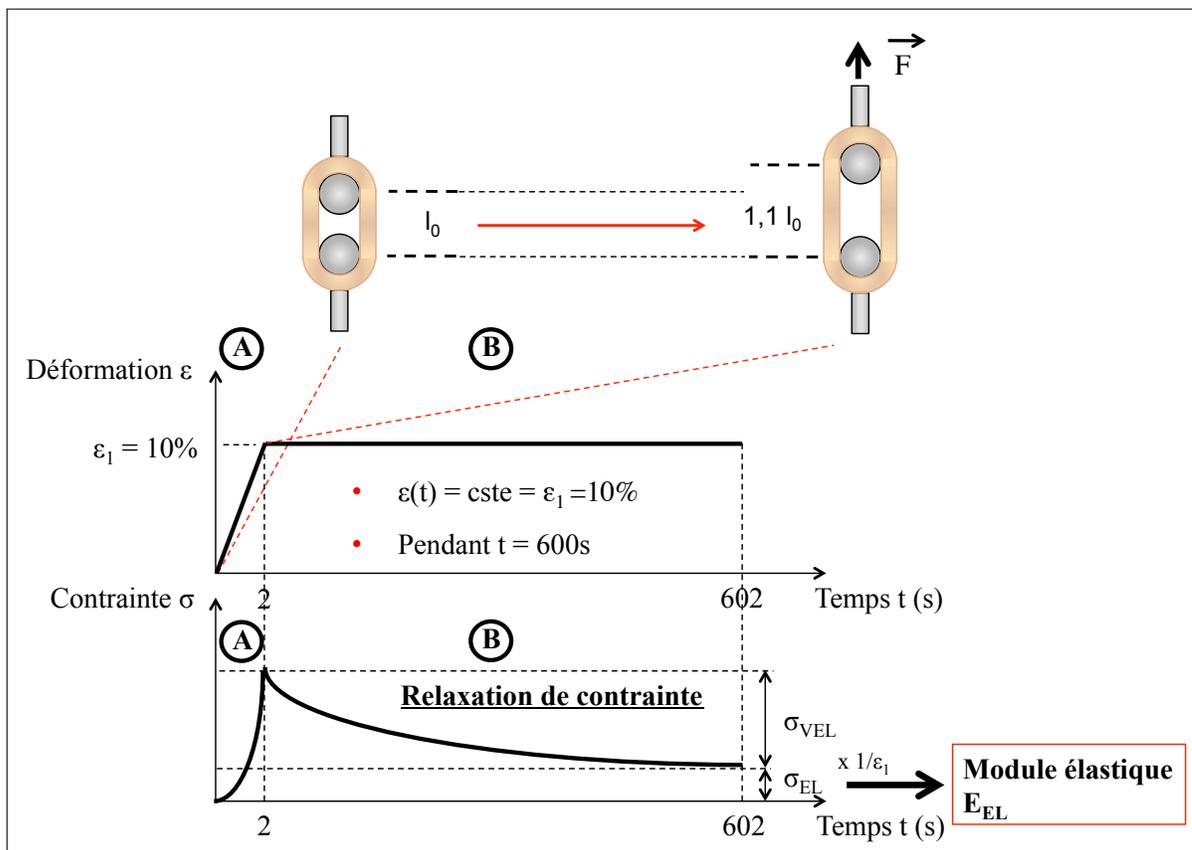


FIGURE 0.9 – Schéma explicatif d'un test de relaxation de contrainte effectué dans le cadre de cette étude sur des gels de collagène en forme d'anneau dans les **Chapitres 1 et 4**. Le graphique du haut montre l'évolution de la déformation en fonction du temps alors que le graphique du bas montre l'évolution de la contrainte en fonction du temps. À l'étape A), l'échantillon subit une déformation de 10 % à une vitesse de $5\% \cdot s^{-1}$. On mesure alors une augmentation de la contrainte due à la réaction de l'échantillon. La déformation est illustrée à l'aide des médaillons présents dans le haut de la figure. Ensuite, à l'étape B), la contrainte diminue, correspondant à la dissipation de la partie visqueuse du matériau, jusqu'à atteindre un plateau. À cet état d'équilibre, la contrainte est désormais indépendante du temps, correspondant ainsi au comportement élastique du matériau. La valeur de cette contrainte permet de calculer le module élastique.

Chapitre 3 : Mise en forme et fixation de structures tubulaires de collagène cellularisées

L'une des principales limitations à l'emploi des gels de collagène, et de la plupart des matrices naturelles, en génie tissulaire est le manque de maniabilité et de fixation du fait de leurs faibles propriétés mécaniques et de leur forte composition en eau. En réponse à cette problématique, le **Chapitre 3** vise le développement d'un système de mise en forme tubulaire de gels de collagène avec les cellules, qui assure à la fois une importante diffusion de milieu de culture dans la paroi de la construction artérielle et les échanges gazeux avec l'incubateur, le tout devant être stérilisable. De plus, ce dispositif doit incorporer un système d'ancrage permettant non seulement de manipuler la construction mais également de la fixer à des systèmes de caractérisation ou de maturation. Finalement, le système d'ancrage développé lors de ce projet doit également permettre de maintenir constante la longueur de la construction après la contraction de la matrice par les cellules lors de la période en culture statique, de manipuler la construction suite au démoulage du système, et de fixer cette construction à la fois sur les supports du bioréacteur mais également sur le système de caractérisation mécanique (Gauvin, 2010; Grassl et al., 2002; Cummings et al., 2004).

Le Chapitre 3 vise 1) à décrire la méthodologie de fabrication des constructions vasculaires (échafaudage + cellules) et de leur culture en conditions statiques, 2) à valider cette méthodologie par des tests de viabilité cellulaire, des tests histologiques et des tests mécaniques, et 3) à décrire et à valider un système de caractérisation des propriétés mécaniques et viscoélastiques des tubes de collagène dans différentes directions de sollicitation ainsi que les protocoles associés. Cette caractérisation est essentielle pour pouvoir mettre en évidence l'anisotropie des constructions remodelées par l'activité cellulaire. Les principales étapes de ces méthodologies de mise en forme et de caractérisation des propriétés mécaniques et viscoélastiques sont illustrées en Figure 0.10). Les protocoles qui y sont associés sont détaillés dans le Chapitre 3 et utilisés dans le Chapitre 4.

Chapitre 4 : Renforcement des structures de collagène par remodelage cellulaire en conditions statiques.

Le traitement aux UVs permet de renforcer les structures de collagène. Cependant, les UVs ne peuvent être efficaces sur des échantillons épais ou peu transparents à cette longueur d'onde particulière. De plus, les cellules ne peuvent être exposées aux UVs, ce qui sous-entend que les cellules doivent êtreensemencées après le traitement UV et que les sous-produits toxiques issus du traitement doivent être éliminés par rinçage avec du milieu de culture. Ceci pose le problème de l'efficacité du processus de repopulation des structures par les cellules qui n'est pas une entreprise triviale (Villalona et al., 2010). En effet, ceci est un processus long qui requiert une porosité optimale de l'échafaudage, c'est à dire une porosité à la fois limitée pour que les cellules puissent y adhérer mais également suffisamment importante pour qu'elles puissent proliférer dans la structure.

Le remodelage des matrices de collagène par l'activité contractile des CMLs permet de renforcer les constructions artérielles. Le principe est de laisser un temps d'adaptation des cellules à leur environnement (collagène, milieu de culture, 37°C) sans les stimuler par de quelconques contraintes

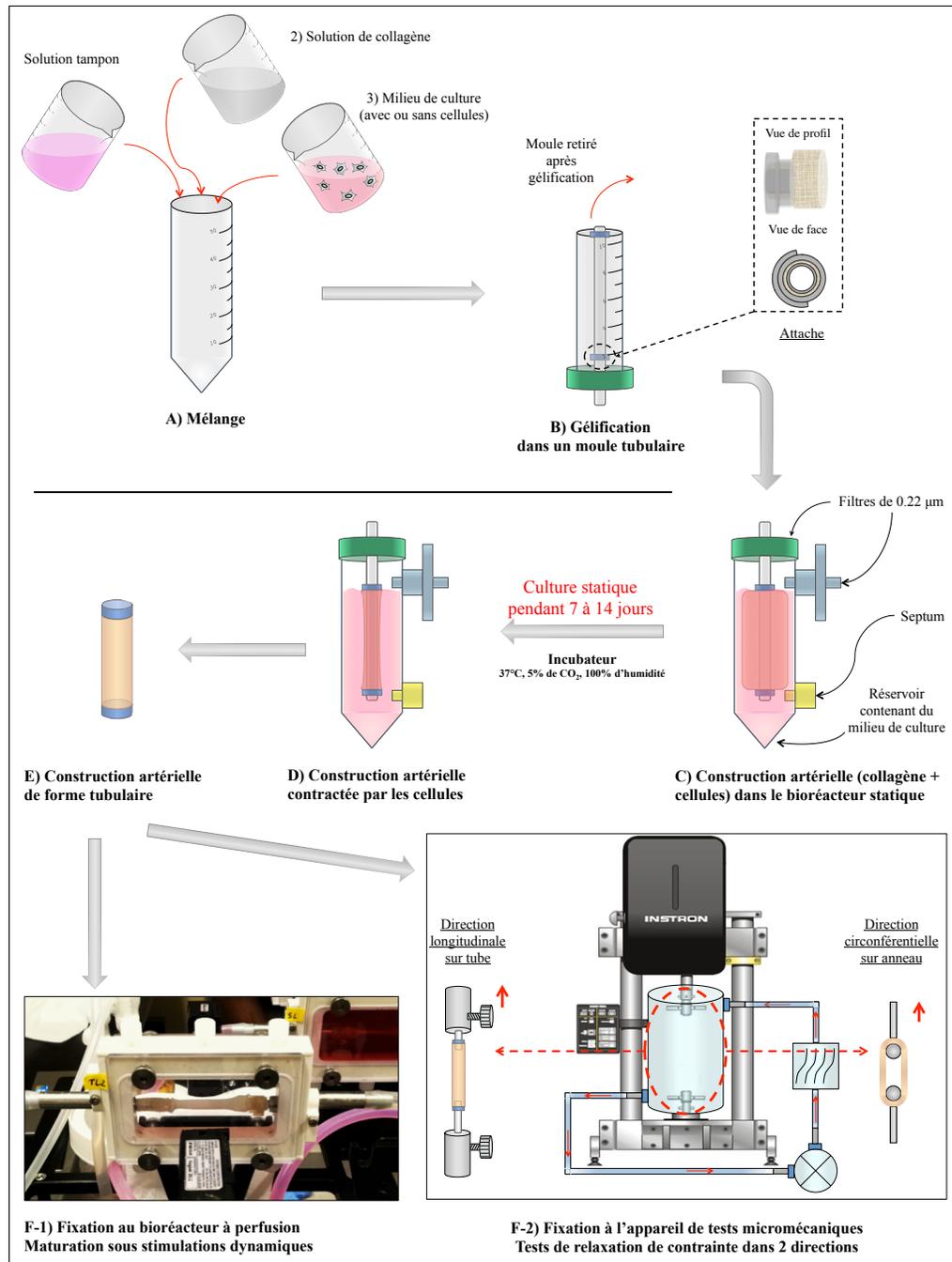


FIGURE 0.10 – Schéma expliquant la mise en forme des constructions artérielles (collagène + cellules) et leur préparation pour les tests mécaniques dans les directions circonférentielle et longitudinale réalisés dans le **Chapitre 4** ou leur stimulation dynamique dans un bioréacteur à perfusion.

mécaniques, pendant une période dite de culture en conditions statiques. Pendant "la culture statique", les cellules vont réorganiser la matrice environnante.

Ainsi, le **Chapitre 4** de cette thèse vise **1) à comprendre comment les interactions matrice-cellules**

peuvent influencer l'organisation des constructions artérielles et en modifier les propriétés physiques ; 2) à mettre en évidence les relations entre l'anisotropie de la structure organisationnelle cellules/matrice de collagène et les propriétés mécaniques et viscoélastiques des constructions remodelées.

Le diagramme de la Figure 0.11 illustre la démarche scientifique adoptée tout au long de cette thèse en mettant en évidence les liens entre les différents Chapitres.

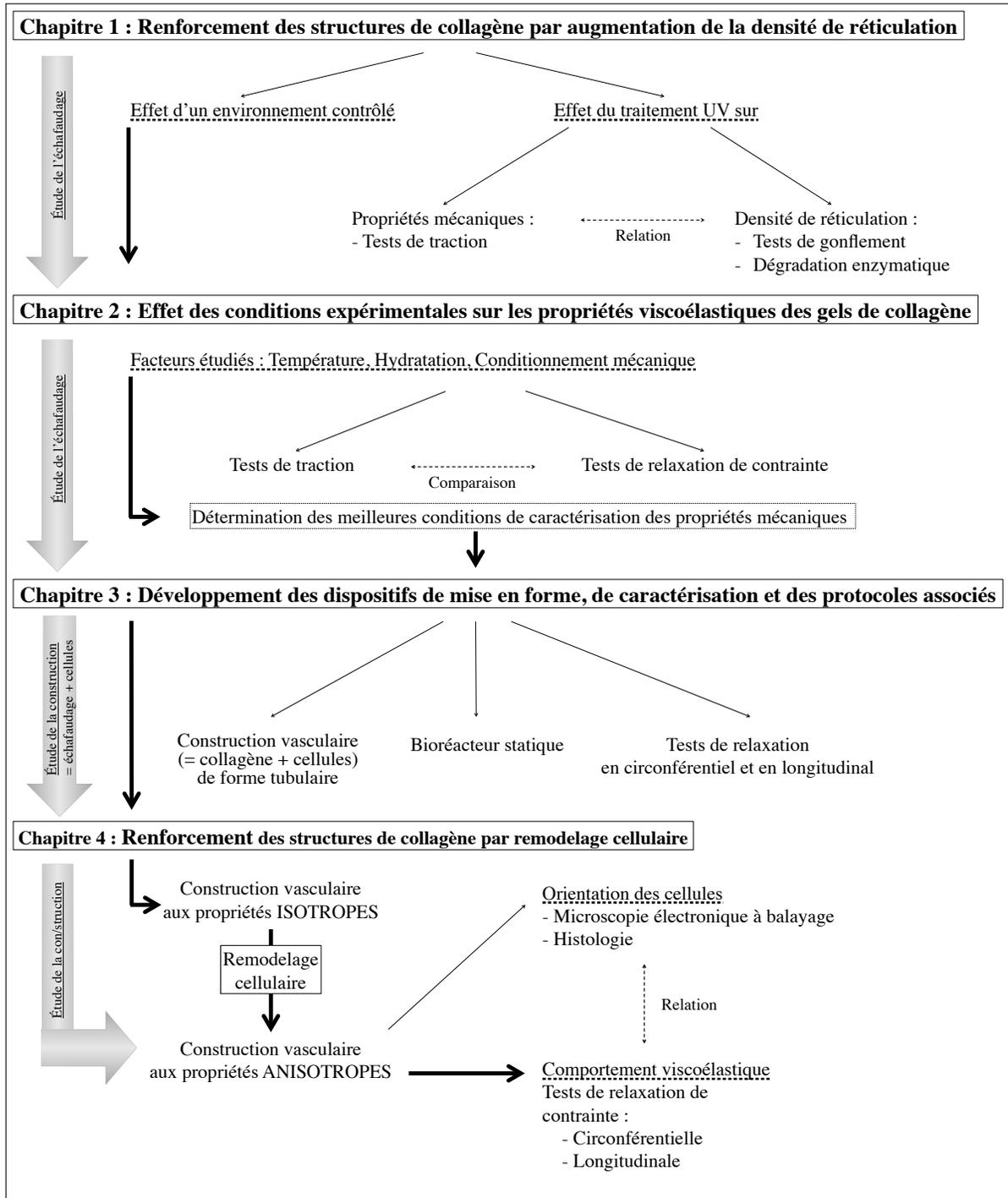


FIGURE 0.11 – Organigramme présentant la démarche scientifique adoptée dans cette thèse.

Chapitre 1

Importance d'un environnement contrôlé lors de la caractérisation mécanique des gels de collagène : Effet des réticulations UV

Why Mechanical Properties of Collagen Scaffolds Should be Tested in a Pseudo-Physiological Environment ?

Sébastien Meghezi¹, Pascale Chevallier², Diego Mantovani³

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

¹sebastien.meghezi.1@ulaval.ca, ²Pascale.Chevallier@crsfa.ulaval.ca,

³Diego.Mantovani@gmn.ulaval.ca

Published in
Advanced Materials Research
2011

DOI : 10.4028/www.scientific.net/AMR.409.158

1.1 Résumé

Les gels de collagène constituent des échafaudages adéquats pour supporter l'adhésion, la prolifération et la régénération du tissu par les cellules vasculaires au sein d'un bioréacteur. Cependant, leurs propriétés mécaniques doivent être améliorées non seulement pour pouvoir les manipuler mais également pour qu'ils puissent supporter les contraintes mécaniques appliquées dans le bioréacteur. La caractérisation des propriétés mécaniques d'un hydrogel nécessite de nombreuses précautions car ils sont très sensibles aux conditions environnementales (température, force ionique, environnement aqueux, etc.). Alors que les propriétés mécaniques sont généralement mesurées directement à l'air libre, le but de ce travail est d'évaluer les effets d'un environnement pseudo-physiologique sur les propriétés mécaniques des gels de collagène. De plus, le renforcement mécanique par un traitement UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$, 20 J/cm^2) induisant des réticulations fut caractérisé. Les échantillons irradiés furent plus résistants à la dégradation enzymatique et des tests de gonflement ont montré que la densité de réticulations fut multipliée par un facteur 30. Par la suite, cette augmentation fut corrélée aux propriétés mécaniques. Les résultats ont ainsi montré que les échantillons traités aux UVs étaient plus rigides et plus fragiles que les échantillons non traités lorsque mesurés à l'air libre. Néanmoins, une diminution de 20 % et une augmentation de 40 % furent mesurées respectivement sur le module linéaire et l'élongation à la rupture lorsque les gels étaient testés dans l'environnement pseudo-physiologique. Dans la perspective de la régénération du tissu vasculaire, les résultats montrent que les propriétés mécaniques des hydrogels devraient être caractérisées dans un environnement pseudo-physiologique afin de prendre en compte le phénomène plastification se produisant dans un bioréacteur.

1.2 Abstract

Collagen gels constitute an adequate scaffold for supporting the adhesion, proliferation and tissue regeneration of vascular cells inside a bioreactor. However, their mechanical properties should be enhanced not only for their manipulation but also to resist the mechanical constraints applied in the bioreactor. Actually, assessing the mechanical properties of a hydrogel requires many precautions since they are very sensitive to the environmental conditions (temperature, ionic strength, aqueous environment, etc.). Whereas mechanical properties are usually measured directly in the air, the aim of this work was to evaluate the effects of a pseudo-physiological environment (PPE) on the mechanical properties of collagen gels. Furthermore, reinforcement through UV treatments ($\lambda = 254 \text{ nm}$, 20 J/cm^2) known to induce crosslinking was characterized. Irradiated samples were more resistant to enzymatic degradation and swelling tests showed that the crosslink density was increased by a factor of 30. This increase was thereafter correlated to the mechanical properties. Results showed that the UV-treated samples were stiffer and more brittle than the non-treated ones when tested in air. However, a 20 % decrease and 40 % increase were respectively measured on the linear modulus and strain at rupture when the gels were tested in the PPE. In the perspective of vascular tissue regeneration, these results show that the characterization of the mechanical properties of a hydrogel should be performed in PPE in order to take into account the plasticization phenomenon that will occur in a bioreactor.

1.3 Keywords

Collagen scaffold, hydrogels, mechanical properties, pseudo-physiological environment, PBS, UV crosslinking.

1.4 Introduction

One of the major challenges in cardiovascular surgery is the replacement of small-diameter blood vessels (less than 6 mm). Nowadays, when a blood vessel is not functional because of a cardiovascular disease, substitution with synthetic prostheses is carried out when autologous vessels are not available anymore. Unfortunately, the patency rate of these substitutes is estimated to be 5 years (Kannan et al., 2005). One alternative to this practice would be to construct a new vascular tissue in laboratory from autologous cells cultured on a scaffold inside a bioreactor. This device has to be specifically designed to re-create the cells physiological environment regarding pH, temperature, ionic strength, aqueous environment, temperature, pressure, etc.

Collagen gels validate many requirements for this type of scaffold especially in terms of biological properties (Glowacki and Mizuno, 2008). However due to the collagen extraction process these hydrogels exhibit low mechanical properties making them difficult to manipulate. Mechanical properties of hydrogels can be enhanced by crosslinking process using physical or chemical agents such as UVC irradiation, dehydrothermal treatment, glutaraldehyde, carbodiimides, genipin, etc. (Koob, 2004). The characterization of the reticulation degree is not trivial and generally indirect techniques, such as enzymatic degradation and swelling ratio tests, are used in order to evaluate the treatment efficiency. In literature, enzymatic degradation technique consists in quantifying by spectrophotometry free amino-acids residues generated by the degradation of tissue specimens which rate would depend on the reticulation degree (Spoerl et al., 2004). In the present work, collagen degradation was directly quantified in function of time measuring the optical density at 310 nm which is commonly used to follow collagen fibrillogenesis (Tenni et al., 2006; Yunoki et al., 2004; Kuo et al., 2005). Crosslink density is also correlated to collagen swelling ratio that is based on the ability of a polymer to absorb water (Cornwell et al., 2007; Chan and So, 2005). Indeed, crosslinking limits the absorption of water due to the formation of a more strengthened network. Applied to hydrogels, such as collagen gels, it can be easily related that gel expansion due to water absorption is limited when the gel is highly crosslinked. All these techniques permit to characterize the efficiency of the UV treatment used for the mechanical reinforcement of collagen scaffolds that will be implanted in a bioreactor.

Until now, to the best of our knowledge, collagen gel mechanical performances were usually assessed by using compressive or tensile tests in the air and/or at room temperature (Chen et al., 2008; Tan et al., 2010; Powell and Boyce, 2009; Wang et al., 2005; Berglund et al., 2005). However for biomedical applications, environmental factors, such as temperature, physiological environment, ionic strength, pH, can strongly affect mechanical properties, especially for hydrogels (Leikin et al., 1995). Therefore, in the perspective of vascular tissue engineering, the mechanical properties of collagen gels should be sufficient in order to withstand the mechanical constraints subdued in the bioreactor. Thereby, the effects of a crosslinking treatment should be evaluated in an environment close to the one set in the bioreactor. This "pseudo-physiological environment" (PPE) can be established with a bath containing phosphate-buffered saline solution (PBS, pH = 7.4) maintained at 37°C.

Previous work in our laboratory has highlighted the UV ability to increase collagen gels mechanical properties (Achilli et al., 2010). Therefore, the main objective of this work was to identify the effect of a pseudophysiological environment on the mechanical properties both on UV-treated and not-treated collagen gels. As previously described, the UV-induced crosslinking degree was assessed by enzymatic degradation and swelling ratio measurements. Thereafter, the mechanical properties of both hydrogels were evaluated in the air at room temperature and in PBS at 37°C corresponding to the pseudo-physiological conditions.

1.5 Experimental Part

1.5.1 Sample Preparation.

Type I collagen was extracted from rat-tail tendons and solubilised in acetic acid solution (0.02 N) at a concentration of 4 g/L according to a protocol previously described (Rajan et al., 2006). Collagen gelation occurs in specific combinations of pH, ionic strength and temperature. The collagen solution was mixed with Dulbecco's Modified Eagle Medium (5X), $NaHCO_3$ (450 mM) and deionised water in a ratio of 5 : 2 : 1 : 2 (v/v). This mixture was then poured in appropriate moulds depending on the type of characterization and then let overnight in the incubator (37°C, 5 % CO_2 , 100 % of humidity) for the gelation. The UV-treatment consisted in exposing the samples under UV lamps in a microprocessor controlled UV irradiation system (Biolink® crosslinker, 254 nm) at 20 J/cm^2 .

1.5.2 Chemical Characterization.

Enzymatic Degradation.

Enzymatic degradation was followed with the optical density of the gels as a function of time. 100 μ L of collagen gel were poured in 96 multiwell plates (n=6) and let jellify overnight in the incubator (37°C, 5 % CO_2 , 100 % of humidity). A 500 u/mL collagenase solution was freshly prepared dissolving Type I Collagenase extracted from *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in a Tris Buffer solution (pH 7.5, Trizma Base 50 mM, $CaCl_2$ 10 mM). After the addition of 100 μ L of the collagenase solution, collagen samples were put in an incubator (37°C, 5 % CO_2 , 100 % of humidity). The reaction was followed with the optical density at $\lambda = 310$ nm using a UV-spectrophotometer μ Quant, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at different time : t = 0 min, t = 10 min and then every 20 min. The relative absorbance was defined as :

$$A_R(t) = \frac{A(t) - A(t = 0)}{A(t = 0)} \quad (1.1)$$

Swelling Ratio Measurements.

Collagen gels were washed in deionised water for 1 night for the removal of the salts and amino acids present in the gel. Subsequently, the gels were dehydrated in vacuum and the weight of the dehydrated

gels (W_D) was measured. Soon afterward, the gels were soaked in deionised water for 1 night and the weight of the hydrated gel was measured (W_H). Swelling ratio Q was calculated according to the following equation (Tenni et al., 2006; Yunoki et al., 2004; Kuo et al., 2005) :

$$Q = \frac{W_H - W_D}{W_D} \quad (1.2)$$

From these swelling measurements, the crosslink density of the gels can be also calculated from the swelling ration according to a simplification of the Flory-Renher theory (Cornwell et al., 2007) :

$$Q^{\frac{5}{3}} = \frac{\bar{v} \cdot \bar{M}_C}{V_1} \cdot (0,5 - \chi_{12}) \quad (1.3)$$

Where Q is the volumetric swelling ratio, \bar{v} is the specific volume of the dry polymer, V_1 is the molar volume of the solvent ($18 \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ for water), and χ_{12} is the Flory-Huggins polymer-solvent interaction parameter. A value of 0.49 ± 0.05 and 0.72 mL were used respectively for the Flory-Huggins interaction parameter (Cornwell et al., 2007) and the specific volume of the dry polymer (Noda, 1972) based on values determined on collagen gels. With these data, crosslink density of collagen gels can be determined with the following equation (Cornwell et al., 2007) :

$$v_e = \frac{\rho_P}{\bar{M}_C} \quad (1.4)$$

Where ρ_P is the density of the dry polymer, assumed to be the density of proteins ($1.35 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (Fischer et al., 2004)).

1.5.3 Mechanical Characterization.

Tensile tests were carried out on toroïdal-shaped collagen gels (dimensions of the squared cross sections : $5 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$, I.D. = 22 mm , $n = 2$) with an Instron 5848 Microtester (Instron Corporation, Norwood, MA, U.S.). White marks made with a liquid paper were drawn on gels in order to measure the strain with a video camera as a function of the applied load. For minimizing the iatrogenic defects, gels were removed from their moulds in a phosphate-buffered solution and fixed on supports that could be mounted on the Instron Microtester. The pseudo-physiological environment eventually used consisted in a bath (tensile bath) adapted on the Instron Microstester containing a circulating phosphate-buffered saline solution maintained at 37°C . The sample was tensile-tested at a strain rate of $5 \text{ \%} \cdot \text{s}^{-1}$. The experimental set-up is shown in Figure 1.1.

All the tests were performed in triplicate and results are presented as mean \pm standard error.

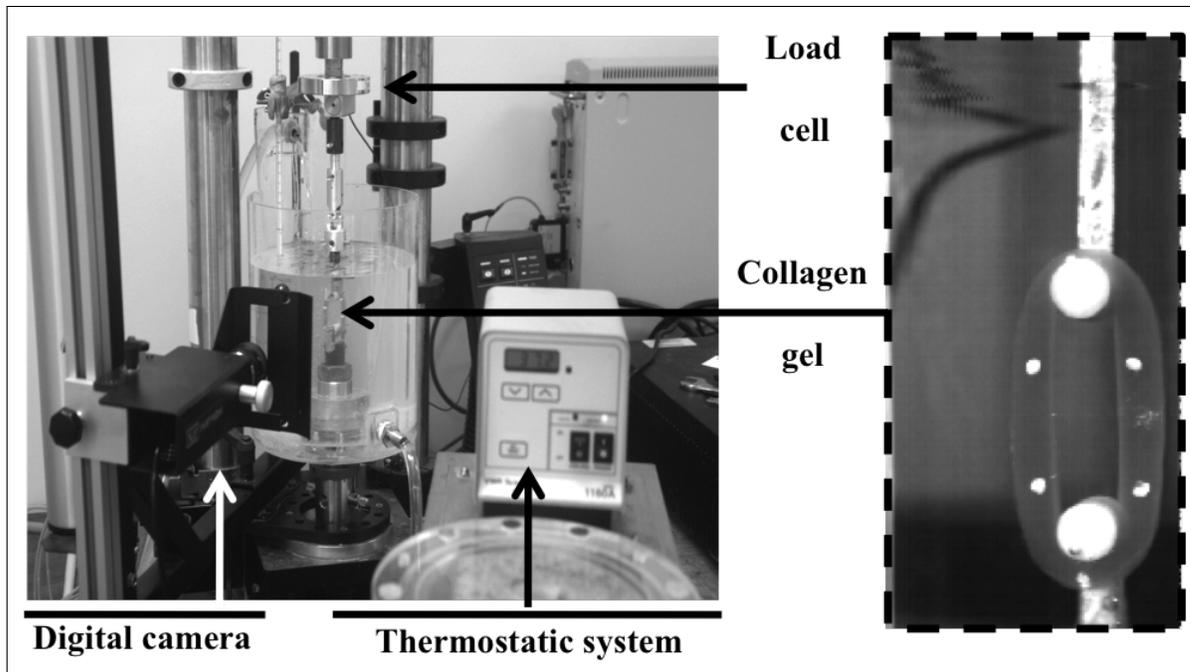


FIGURE 1.1 – Photography of the experimental set-up used for the mechanical characterization of a collagen gel placed in a pseudo-physiological environment (PBS, 37°C).

1.6 Results and Discussion

Enzymatic degradation tests were used as a biological characterization in order to highlight the UV-ability to induce crosslinks inside the collagen gels (Figure 1.2). For all the specimens, the relative absorbance of the gels decreased during the 70 first minutes of degradation then reached a plateau. Therefore no significant differences in the degradation rate or in the time at which the plateau was reached could be noticed between UV-irradiated and non-irradiated collagen gels. However, it should be emphasized that the final relative absorbance was significantly higher when the samples were UV irradiated : the final relative absorbance decreased from 56 % for the non-treated collagen gels to 46 % for the UV-treated ones. Collagenase is an enzyme that hydrolyses X-Gly peptide bonds in the specific sequence Pro-X-Gly-Pro-Y where Gly and Pro are respectively glycine and proline and where X and Y could be any other amino acid. Hence, the difference in the final relative absorbance is probably related to the efficiency of the collagenase enzymatic activity. UV-induced crosslinks in the gels may reduce the accessibility of collagenase to the specific sites of cleavage. Therefore, enzymatic degradation tests have shown qualitatively that the exposure of collagen gels to UV irradiation of $20 J/cm^2$ induces an increase in the crosslink density.

Swelling ratio measurements were performed to corroborate the enzymatic degradation results and also this technique allows the quantitative estimation of the crosslink density of the gels. The results indicated that the absorption of water was 5 times less important for the UV-irradiated collagen gels than for the non-treated ones, as seen in Figure 1.3. This is the typical behaviour of a highly crosslinked

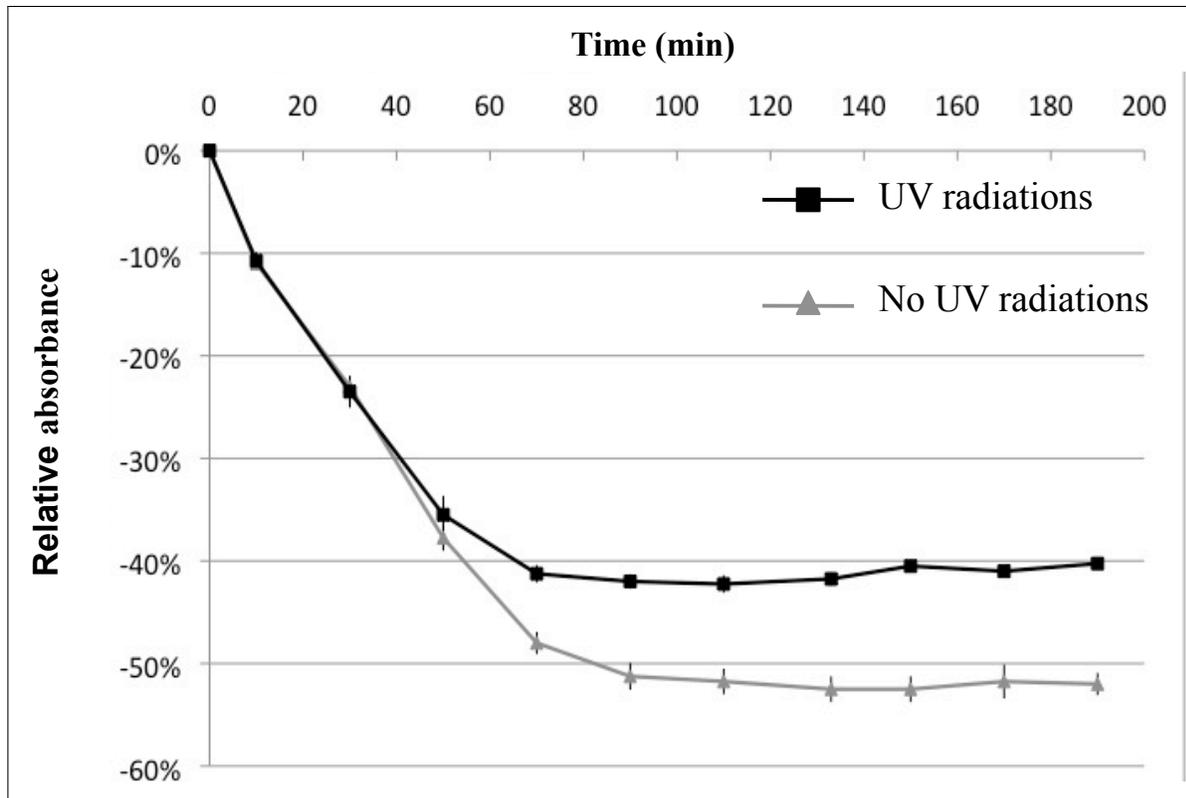


FIGURE 1.2 – Enzymatic degradation of collagen gels as a function of time and the UV-irradiation (n = 6).

hydrogel : the UV-treatment created some anchoring sites inside the gels and these bonds restrict the expansion of the gels in water. From these swelling measurements, the crosslink density of the gels can be also calculated according to the Flory Renner theory, as described in the experimental part. As expected, the crosslink density of the UV-treated collagen gels at $20 J/cm^2$ was increased by a factor of 30 as compared to the non-treated ones (Figure 1.3).

This increase in crosslink density due to UV-irradiation was particularly interesting because this effect produced a mechanical reinforcement of the collagen gels in terms of linear modulus (Figure 1.4a). Figure 1.4a clearly demonstrated that UV exposure gave rise to a nearly 50 % increase in the linear modulus when measured in the air. However the specimens appeared to be more brittle with the UV treatment since the UV exposure decreased the strain at rupture from 8.1 % (± 1.2) for the non-treated samples to 5.5 % (± 0.4) for the UV-treated ones (Figure 1.4b). Similar behaviours, in term of UV effect, were noticed for the tests performed in the pseudo-physiological conditions than in air.

However, concerning the effects of the pseudo-physiological environment on the mechanical behaviours, the tensile tests revealed the importance of assessing the mechanical properties of a hydrogel in a pseudo-physiological environment. Indeed, the linear modulus for the UV-crosslinked collagen gels was decreased from 100 kPa to 80 kPa when the tests were carried out in this environment : 20

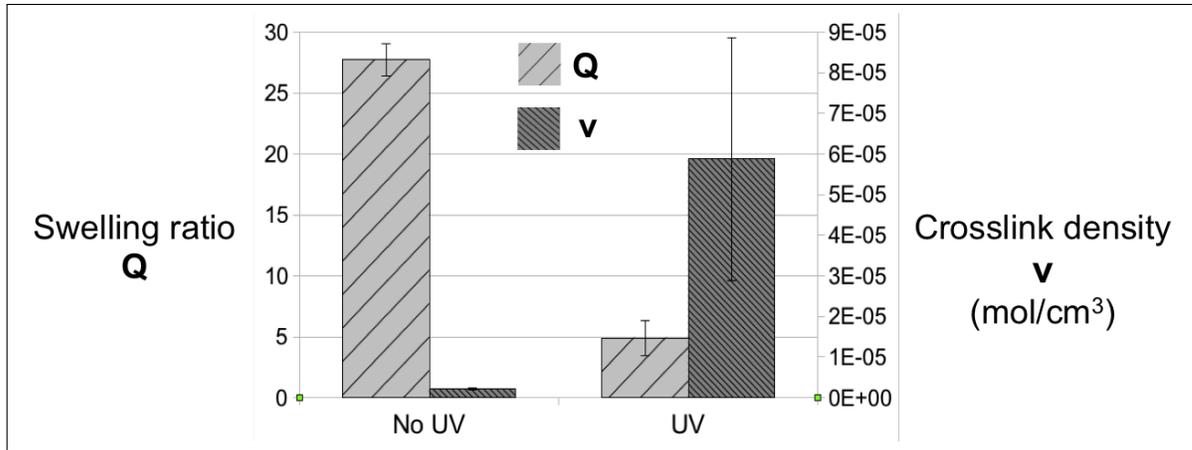


FIGURE 1.3 – Crosslink density of collagen gels calculated from their swelling ratio as a function of UV irradiation (n = 3).

% of loss (Figure 1.4). So an important overestimation of the linear modulus is made when measured directly in the air. Moreover, a noteworthy observation is that the UV-irradiated collagen gels are less brittle when tested in the PPE since they break at 10 % of strain whereas the strain at rupture for the non-irradiated samples is lower than 6 %. These results are not surprising insofar as the plasticization effect of water on the glass-to-rubber transition of many synthetic and natural polymer is well known (Doster and Settles, 2005). Moreover, as a natural polyelectrolyte, the mechanical properties of collagen are highly dependent on temperature and ionic strength (Leikin et al., 1995). These parameters affect the mobility of the polymer chains at the molecular level and thus the ductile or brittle response at the macroscopic level. Therefore, the mechanical properties of a hydrogel should be measured in an environment which is the closest as possible to the one of its final application.

1.7 Conclusion

In order to have collagen scaffolds suitable to be introduced in a bioreactor, their mechanical properties should be improved. Therefore, UV-irradiations were performed on collagen gels, which are known to induce crosslinking. The collagen modification was assessed using enzymatic degradation and swelling measurements. Both techniques clearly evidenced that crosslinking occurred as demonstrated by the lower enzymatic degradability as well as by the lower swelling ratio of the UV-irradiated collagen gels. Thereafter, the influence of the reticulation in collagen was assessed by mechanical characterization. These tests were performed both in the air at room temperature and in a pseudo-physiological environment, which is more realistic as this scaffold will be used for biomedical application. Thus during mechanical tests, the collagen gel was put in a PBS solution thermostated at 37°C. The results evidenced first that the linear modulus was increased for the UV-irradiated samples compared to the non-treated ones and second that it was also influenced by the environment as it was significantly decreased when measured in pseudo-physiological conditions. Furthermore, the UV-collagen

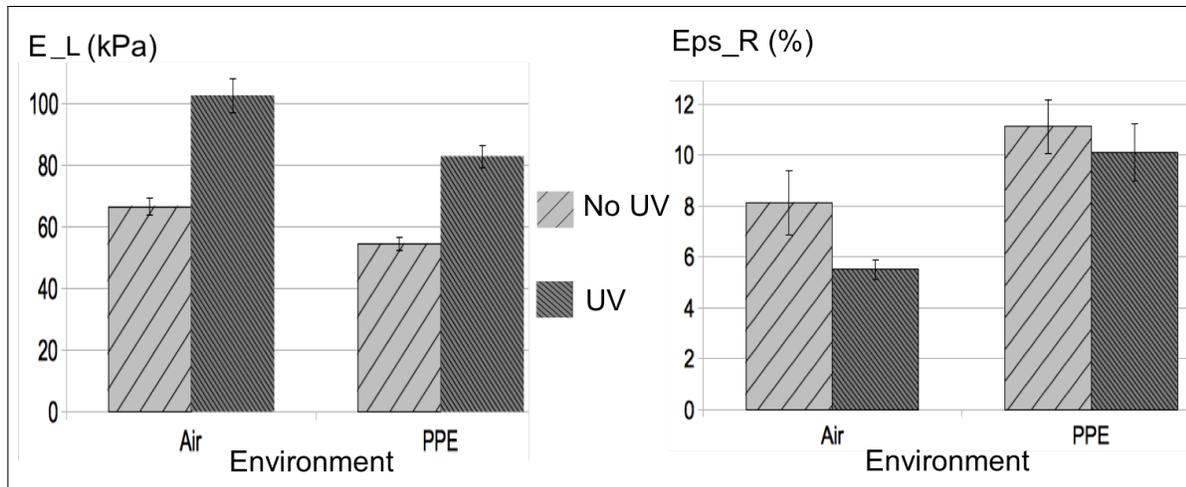


FIGURE 1.4 – Results of the mechanical tensile tests on collagen gels as a function of the environment in which the tests have been performed in the air or in the pseudo-physiological environment (PPE) and the UV irradiation (254 nm, 20 J/cm²) in terms of a) linear modulus and b) strain at rupture (n = 3).

gels presented a similar value of strain at rupture to untreated ones in such conditions. This means that not only the non-treated collagen gels but also the UV-irradiated ones became more ductile in these conditions. Therefore on top of that pseudophysiological conditions make easier the manipulation of collagen gels, this study pointed out the importance to test the mechanical behaviours of gel scaffolds in such an environment in order to reach the mechanical properties they would have in a bioreactor. Future work will be focused on identifying which parameter established by the pseudo-physiological environment (hydration, ionic strength, temperature, etc.) has a preponderant effect on the mechanical properties of collagen gels.

1.8 Acknowledgements

The authors thank Matteo Achilli and Frédéric Couet for their help in the collagen preparation and mechanical testing, Jean Lagueux for his advices in enzymatic degradation tests, Stéphane Turgeon and Daniel Marcotte for their help in designing the pseudo-physiological environment set-up, and the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, the Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Hôpital Saint-François d'Assise, the Canadian Institutes of Health Research and the Fonds de la Recherche en Santé Québec for partially funding this research.

Chapitre 2

Effets des conditions expérimentales sur les propriétés élastiques et viscoélastiques des gels de collagène

Effects of a Pseudophysiological Environment on the Elastic and Viscoelastic Properties of Collagen Gels

Sébastien Meghezi¹, Frédéric Couët¹, Pascale Chevallier¹, Diego Mantovani^{1,2}

¹Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Department of Mining Metallurgy and Materials Engineering and University Hospital Research Center, Laval University, Quebec City, QC, Canada G1V 0A6

²Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Laval University, Pavillon Pouliot, 1745-E, Quebec City, QC, Canada G1K 7P4

Correspondence should be addressed to Diego Mantovani, diego.mantovani@gmn.ulaval.ca

Published in
International Journal of Biomaterials
2012

DOI : 10.1155/2012/319290¹

1. Copyright © 2012 Sébastien Meghezi *et al.*. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2.1 Résumé

Le génie tissulaire vasculaire s'applique à trouver des solutions de remplacement des vaisseaux sanguins malades de diamètre inférieur à 6 mm pour lesquels aucun substitut adéquat n'existe. Une des approches du génie tissulaire vasculaire est de cultiver des cellules sur un échafaudage dans un bioréacteur. Le bioréacteur établit des conditions de culture pseudo-physiologiques (milieu de culture, 37°C, stimulation mécanique). Les gels de collagène sont largement utilisés en tant que supports de la régénération tissulaire de par leurs propriétés biologiques ; cependant, ils présentent de très faibles propriétés mécaniques. La caractérisation mécanique de ces échafaudages nécessite de définir les conditions de test au regard des conditions rencontrées dans le bioréacteur. Les effets de différents paramètres utilisés lors des tests sur les gels de collagène ont été évalués en termes de propriétés mécaniques et viscoélastiques. Ainsi, une expérience factorielle a été mise en place et 3 facteurs pertinents ont été considérés : la température (23°C ou 37°C), l'hydratation (solution aqueuse saline ou air), et le préconditionnement mécanique (avec ou sans). Les analyses statistiques ont révélé les effets significatifs de ces facteurs sur les propriétés mécaniques qui furent testées par des tests de traction et de relaxation de contrainte. Ces derniers tests apportent une meilleure compréhension des propriétés viscoélastiques des gels. En conséquence, réaliser des tests mécaniques sur des hydrogels nécessite de définir à la fois un environnement approprié en termes de température et de solution aqueuse saline mais également de choisir la technique de caractérisation la plus adéquate.

2.2 Abstract

Vascular tissue engineering focuses on the replacement of diseased small-diameter blood vessels with a diameter less than 6 mm for which adequate substitutes still do not exist. One approach to vascular tissue engineering is to culture vascular cells on a scaffold in a bioreactor. The bioreactor establishes pseudophysiological conditions for culture (culture medium, 37°C, mechanical stimulation). Collagen gels are widely used as scaffolds for tissue regeneration due to their biological properties ; however, they exhibit low mechanical properties. Mechanical characterization of these scaffolds requires establishing the conditions of testing in regard to the conditions set in the bioreactor. The effects of different parameters used during mechanical testing on the collagen gels were evaluated in terms of mechanical and viscoelastic properties. Thus, a factorial experiment was adopted, and three relevant factors were considered : temperature (23°C or 37°C), hydration (aqueous saline solution or air), and mechanical preconditioning (with or without). Statistical analyses showed significant effects of these factors on the mechanical properties which were assessed by tensile tests as well as stress relaxation tests. The last tests provide a more consistent understanding of the gels' viscoelastic properties. Therefore, performing mechanical analyses on hydrogels requires setting an adequate environment in terms of temperature and aqueous saline solution as well as choosing the adequate test.

2.3 Introduction

Cardiovascular diseases are one of the main causes of death all around the world ([Statistics Canada, 2010](#)). Functional vascular tissue engineering (VTE) aims to produce a functional blood vessel to replace diseased arteries. A common workflow for the maturation process of tissue-engineered blood vessels includes the following steps : scaffold preparation, cell seeding, and maturation in a bioreactor ([Couet et al., 2011b](#); [Couet and Mantovani, 2010](#)). Within this work, type I collagen hydrogels have been selected as suitable scaffolds for vascular tissue engineering. Collagen is one of the main components of a blood vessel's extracellular matrix (ECM). Its unique biological properties such as its non-toxicity, low immunogenicity, and antigenicity make it a suitable scaffold material to promote vascular smooth muscle (SMC) and endothelial cell (EC) adhesion and proliferation ([Boccafroschi et al., 2007](#); [Amadori et al., 2007](#); [Lynn et al., 2004](#)).

Since the initial mechanical properties of collagen gels are very low, maturation of constructs (scaffolds seeded with cells) in a controlled environment is required to produce a mechanocompatible tissue ([Weinberg and Bell, 1986](#)). This environment must respect cell culture constraints in terms of temperature and the biochemical and mechanical environment. This specific environment may be different from the environmental conditions used for preparation and conservation of scaffolds prior to cell seeding and culture in a bioreactor. In order to optimize the process of developing tissue-engineered blood vessels - from the initial step of scaffold preparation through the final steps involving tissue maturation under mechanical stimulation - it is important to measure the mechanical properties of the material throughout the procedure. No normative regulates the mechanical characterization of hydrogels in the perspective of tissue regeneration or biomedical applications. In this context, many different protocols can be referenced even concerning the mechanical characterization of a specific material such as collagen. Mechanical conditioning (strain amplitude, strain rate, number of cycles), temperature (room temperature or body temperature), strain rate during the test, and surrounding environment are some examples of the parameters that can differ from one study to another (Table 2.1).

The aim of this work is to evaluate the effects of different environments on the elastic and viscoelastic properties of collagen gels, in order to determine the optimal environmental conditions for mechanical characterization of the scaffold prior to maturation in a tissue bioreactor. Therefore, in this study, the strain rate applied during the mechanical and viscoelastic characterization was chosen according to the strain rate estimated in a bioreactor for VTE. This study focuses on three factors that are considered to have an impact on the mechanical state of collagen scaffolds : temperature (T), hydration (H), and mechanical preconditioning (PC). The factor hydration refers to both the aqueous environment and the ionic strength of the solution.

Temperature drives the molecular mobility of polymer chains and can break weak interactions such as hydrogen bonds. Consequently, with an increased temperature, the viscosity response of the material is less solicited ([Jeyapalina et al., 2007](#); [Flory and Garrett, 1958](#)). The hydrated environment plays a major role on the instantaneous and viscous behaviors of hydrogels ([von Hippel and Wong, 1963](#)).

Author	Materials	Experiments	Preconditioning/testing
Cornwell <i>et al.</i> (Cornwell <i>et al.</i> , 2007)	Extruded type I collagen	(i) Uniaxial tensile tests	(i) Tests in air at RT (ii) No mechanical preconditioning (iii) $\sigma_{max} = \sigma_{UTS}$, rate : $0.83 \% \cdot s^{-1}$ (tensile tests)
Yang <i>et al.</i> (Yang <i>et al.</i> , 2006)	Porcine esophagi	(i) Incremental stress relaxation tests (ii) Incremental cyclic tests	(i) Tests in air at RT (ii) No mechanical preconditioning (iii) Rate : $0.83 mm \cdot s^{-1}$ (iv) Holding time : 300 s (relaxation tests)
Roeder <i>et al.</i> (Roeder <i>et al.</i> , 2002)	Type I collagen gels (0.3 - 3 mg/mL)	(i) Uniaxial tensile tests on dumbbell-shape samples	(i) Tests in a bath containing PBS at $37^{\circ}C$ (ii) No mechanical preconditioning (iii) $\sigma_{max} = \sigma_{UTS}$, rate : $0.6 \% \cdot s^{-1}$ (ensile tests)
Feng <i>et al.</i> (Feng <i>et al.</i> , 2003)	Type I collagen gels (1.67 mg/mL + 10^6 cells/mL)	(i) Uniaxial tensile tests (ii) Stress relaxation tests (iii) Creep tests	(i) Tests in a bath containing culture medium at RT (ii) $\sigma = 33.3$ kPa, rate : at $0.9 \% \cdot s^{-1}$ (x10, mechanical max preconditioning) (iii) Holding time : 70 s (relaxation tests) (iv) $\sigma_{max} = \sigma_{UTS}$, rate : $0.9 \% \cdot s^{-1}$ (tensile tests)
Berglund <i>et al.</i> (Berglund <i>et al.</i> , 2005)	Type I collagen (2 mg/mL)	(i) Uniaxial tensile tests (ii) Stepwise stress relaxation tests (iii) Creep tests	(i) Tests in air at RT (ii) $\sigma_{max} = \sigma$ when $\epsilon = 0.2 \cdot \epsilon_{UTS}$; rate : $0.2 mm \cdot s^{-1}$ (x3, mechanical preconditioning) (iii) $\sigma_{max} = \sigma_{UTS}$, rate : $0.2 mm \cdot s^{-1}$ (tensile tests)
Assoul <i>et al.</i> (Assoul <i>et al.</i> , 2008)	Rat arteries	(i) Tensile tests on ring- and rectangular-shaped samples	(i) Tests in a bath containing PBS at $37^{\circ}C$ (ii) No mechanical preconditioning (iii) $\epsilon_{max} = 0.8 - 0.57$, duration of the tests : 0.13 - 1 s (tensile tests consisting in one loading and one unloading)
Chan <i>et al.</i> (Chan <i>et al.</i> , 2007)	Collagen membranes	(i) Uniaxial tensile tests	(i) Tests in air at RT (ii) No preconditioning (iii) $\sigma_{max} = \sigma_{UTS}$, rate : $0.083 mm \cdot s^{-1}$ (tensile test)

Tableau 2.1 – Example of various environments of mechanical characterization of collagen materials and tissues encountered in the literature. RT : room temperature; σ_{max} : maximal stress reached; σ_{UTS} : stress at rupture; ϵ_{UTS} : strain at rupture, ϵ_{max} : maximal strain reached.

First, in an aqueous saline environment, the viscous part of the material is favored because of the plasticizing effect of water (Matveev, 2000). Second, the change in ionic strength, because of the saline solution, will affect the molecular interactions within the collagen gel (Achilli and Mantovani, 2010). Mechanical preconditioning is also an important parameter when considering the characterization of mechanical properties of living tissues. Fung was the first to introduce this consideration (Fung, 1993). Indeed, mechanical preconditioning is believed to remove tissue stresses and strains history, so as to obtain a repeatable stress-strain relationship.

In this study, biomechanical characterizations were conducted either at room temperature or at physiological temperature (37°C), in air or in an aqueous saline solution (phosphate-buffered saline solution, PBS), and either after or not after mechanical preconditioning. The effects of these parameters and their eventual interactions on the mechanical and viscoelastic properties were evaluated and compared with the pseudophysiological conditions established in the bioreactor.

2.4 Materials and Methods

2.4.1 Sample Preparation

Type I collagen was extracted from rat-tail tendons and solubilized in acetic acid solution (0.02 N) at a concentration of 4 g/L in accordance with a protocol previously described (Rajan et al., 2006). The collagen solution (2 g/L) was then mixed with Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Gibco, Invitrogen Corporation, Burlington, ON, Canada, 1.1X), NaOH (15 mM), and HEPES (20 mM) in deionized water. Finally, this mixture was poured into moulds and let jellify overnight at 4°C.

2.4.2 Mechanical Characterization

Tensile tests were carried out on toroidal-shaped collagen gels (dimensions of the two squared cross-sections : 5 mm x 6 mm, ID = 22 mm) with an Instron 5848 MicroTester (Instron Corporation, Norwood, MA, USA). White marks were drawn on the gels to measure the strain with a video camera as a function of the applied load (Figure 2.1). In order to avoid any damage to the samples before testing, gels were removed from their moulds and put in a phosphate-buffered saline solution (PBS 1X, Fischer Scientific, Ottawa, ON, Canada) where the fixation to the supports was directly carried out. The dimensions of the cross-sections were then measured. After 5 minutes of environmental conditioning, mechanical tests were performed either in a bath containing PBS solution or in air and either at 23°C or at 37°C (Figure 2.1). Samples tested in air at 37°C required an environmental chamber (series 3119, Instron Corporation, Norwood, MA, USA) adapted to the Instron 5848 MicroTester. Samples were mechanically preconditioned to 5 % strain or not preconditioned at all. Mechanical preconditioning consisted of 10 cycles of loading and unloading at 5 % strain and a 1 %. s^{-1} strain rate. Then samples were tensile-tested until failure at a strain rate of 5 %. s^{-1} . This value was chosen after an estimation considering the flow, the pressure, and the pulsation of culture medium that characterize the mechanical constraints in the bioreactor. Stress-strain curves were thus obtained. The tensile linear modulus is

calculated by computing the slope of the linear region of the stress-strain curve before break (Achilli and Mantovani, 2010), as shown in Figure 2.2.

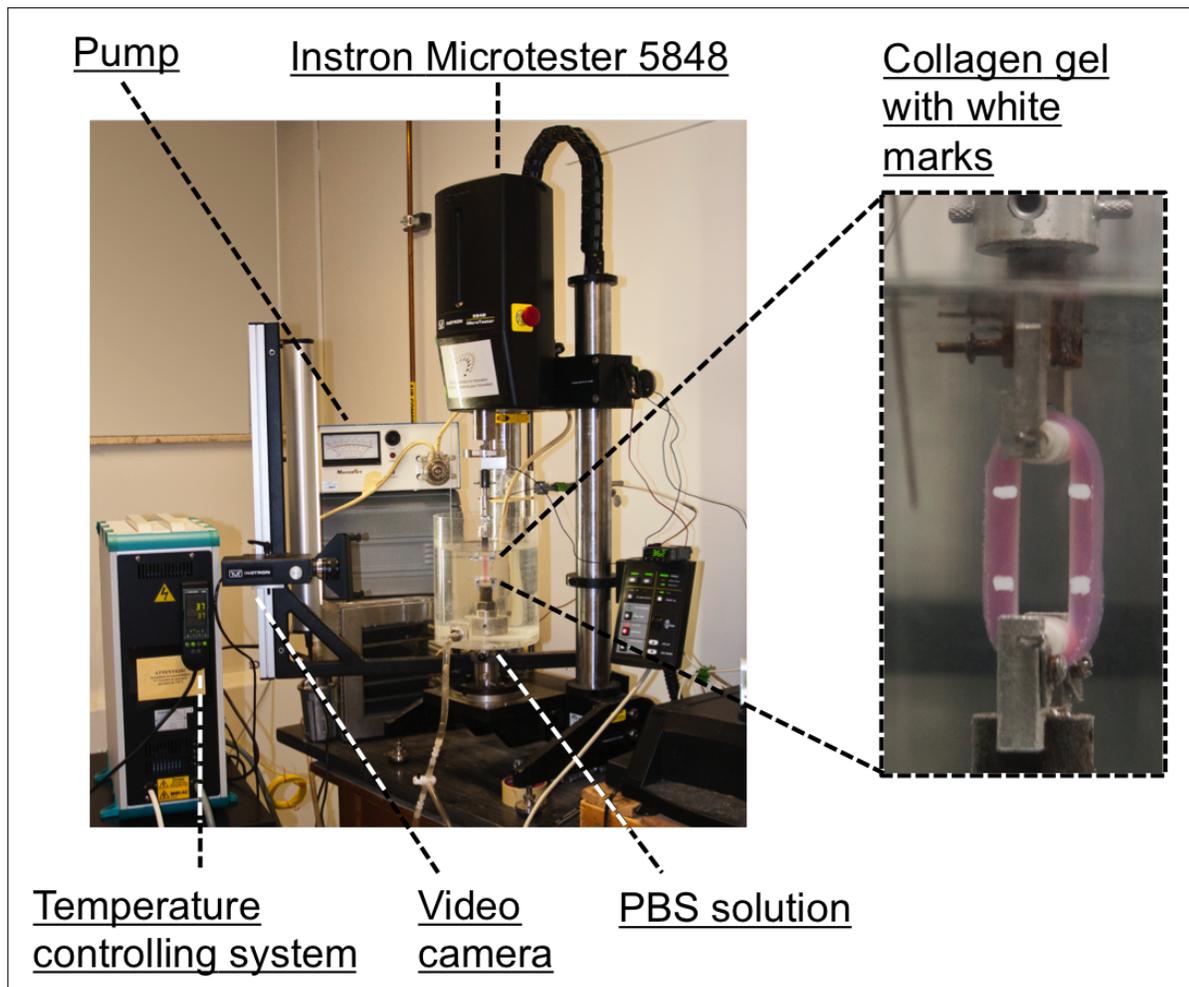


FIGURE 2.1 – Experimental setup for tensile and relaxation tests on collagen gels. White marks were applied on the gels in order to observe the strain of the sample during testing.

2.4.3 Stress Relaxation Tests

Samples were prepared in the same conditions as for tensile tests. Similarly to tensile tests, relaxation tests were performed in a bath containing PBS solution or in air and at 23°C or at 37°C. Prior to the test, samples were mechanically preconditioned to 5 % strain ($1 \text{ \%} \cdot \text{s}^{-1}$, 10 cycles) or not. The relaxation test consisted of stretching the sample at a 10 % strain ($5 \text{ \%} \cdot \text{s}^{-1}$) and maintaining the strain constant for 150 s. The stress was recorded as a function of time as shown in Figure 2.3. This figure confirms the consistency in setting the parameters of mechanical preconditioning since the decline in the maximum stress at each cycle reached an equilibrium state (Fung, 1993).

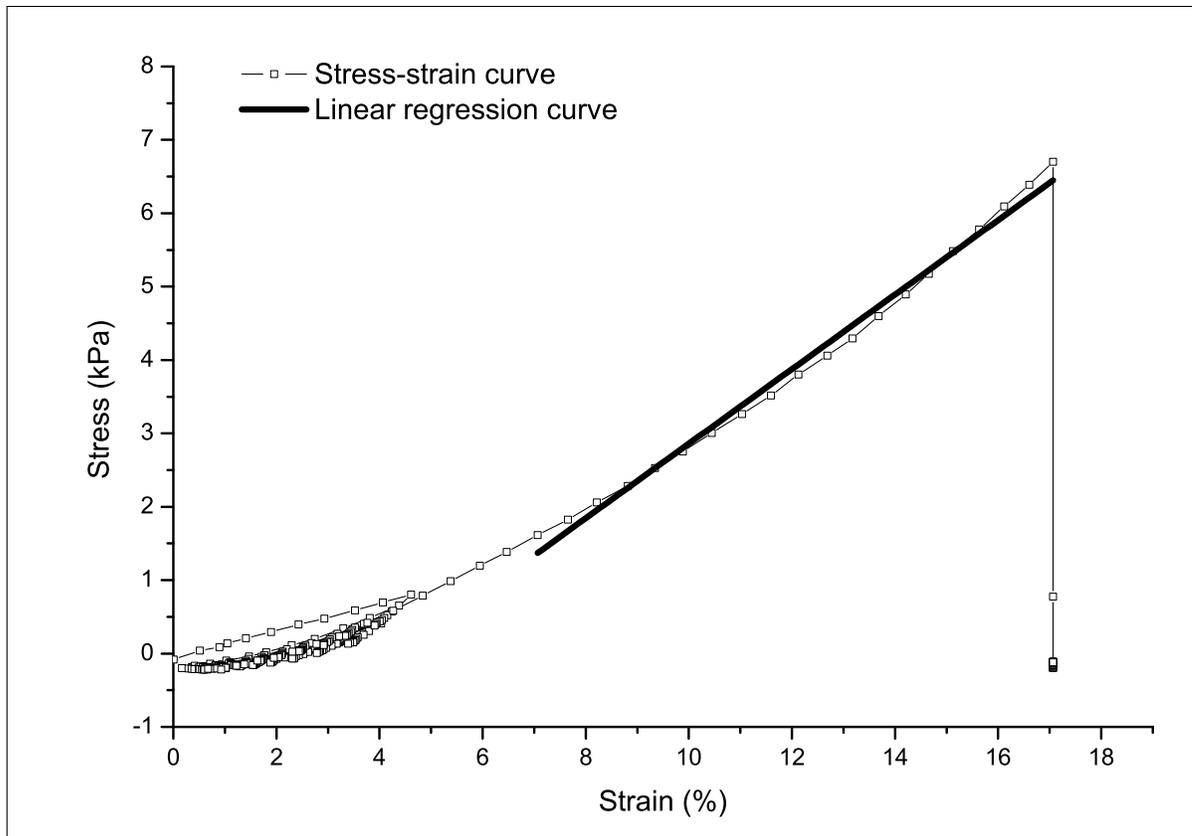


FIGURE 2.2 – Example of a stress-strain curve obtained from a tensile test on a preconditioned collagen gel (10 cycles of loading and unloading) in air at 23°C. Linear modulus was calculated from the slope of the linear regression. The linear regression was determined by successively adding points in data in the left direction (starting from the point at rupture) as long as the squared R was > 0.990.

2.4.4 Design of Experiment and Statistical Analysis

A factorial experiment was designed in order to evaluate the individual effect of three factors (temperature, hydration, and mechanical preconditioning) on the mechanical and viscoelastic properties of collagen gels. Each factor had two levels : temperature (23°C or 37°C), hydration (PBS or no PBS), and mechanical preconditioning (PC or no PC). Therefore, this factorial experiment is constituted of 8 conditions of testing (Table 2.2). For each condition of each characterization, 5 to 8 samples were analyzed. In order to consider the intrinsic variability of the samples and the random effect of the day of preparation, a linear mixed model was chosen for the statistical analysis of the data. Statistical analysis was performed with the open source software "R" (Development Core Team, 2011).

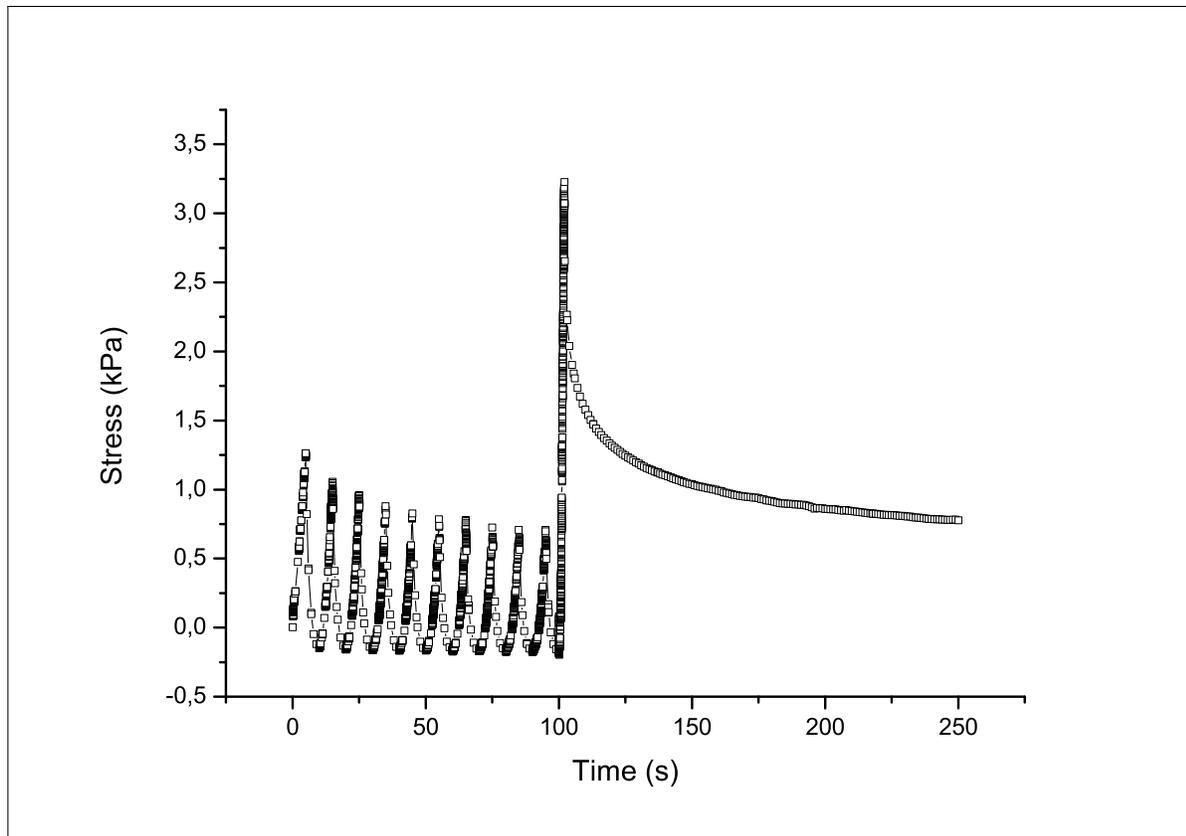


FIGURE 2.3 – Example of a curve obtained from a stress relaxation test on a preconditioned collagen gel in air at 23°C.

Condition	Environmental factors		
	T	H	C
1	23°C	No PBS	No PC
2	23°C	No PBS	PC
3	23°C	PBS	No PC
4	23°C	PBS	PC
5	37°C	No PBS	No PC
6	37°C	No PBS	PC
7	37°C	PBS	No PC
8	37°C	PBS	PC

Tableau 2.2 – Design of the experiments. A complete factorial experiment was used to estimate the effects of temperature (T, 23 or 37°C), hydration (in a phosphate-buffered saline solution : PBS or without : no PBS) and mechanical preconditioning (C, with : PC or without : no PC) on the mechanical and viscoelastic properties of collagen gels.

2.5 Results and Discussion

2.5.1 Mechanical Characterization

The effects of temperature, hydration, and mechanical preconditioning on the linear modulus of collagen gels are shown in Figure 2.4. These environmental factors have a significant impact on the linear modulus. Indeed, performing the tests at 37°C decreased the values of the linear modulus from 59 ± 2 kPa when done at 23°C to 48 ± 2 kPa, corresponding to a 19 % decrease ($P < 0.001$). The opposite effect was noticed for the tests done either in PBS solution or in air : the linear modulus increased from 49 ± 2 kPa in air to 58 ± 2 kPa in PBS solution, corresponding to an 18 % increase ($P < 0.05$). Finally, mechanical preconditioning also led to a slight increase of the linear modulus. It is worth noting that mechanical preconditioning did not improve the reproducibility of the measurements since the variances are quite similar with or without the precycles prior to the test (data not shown).

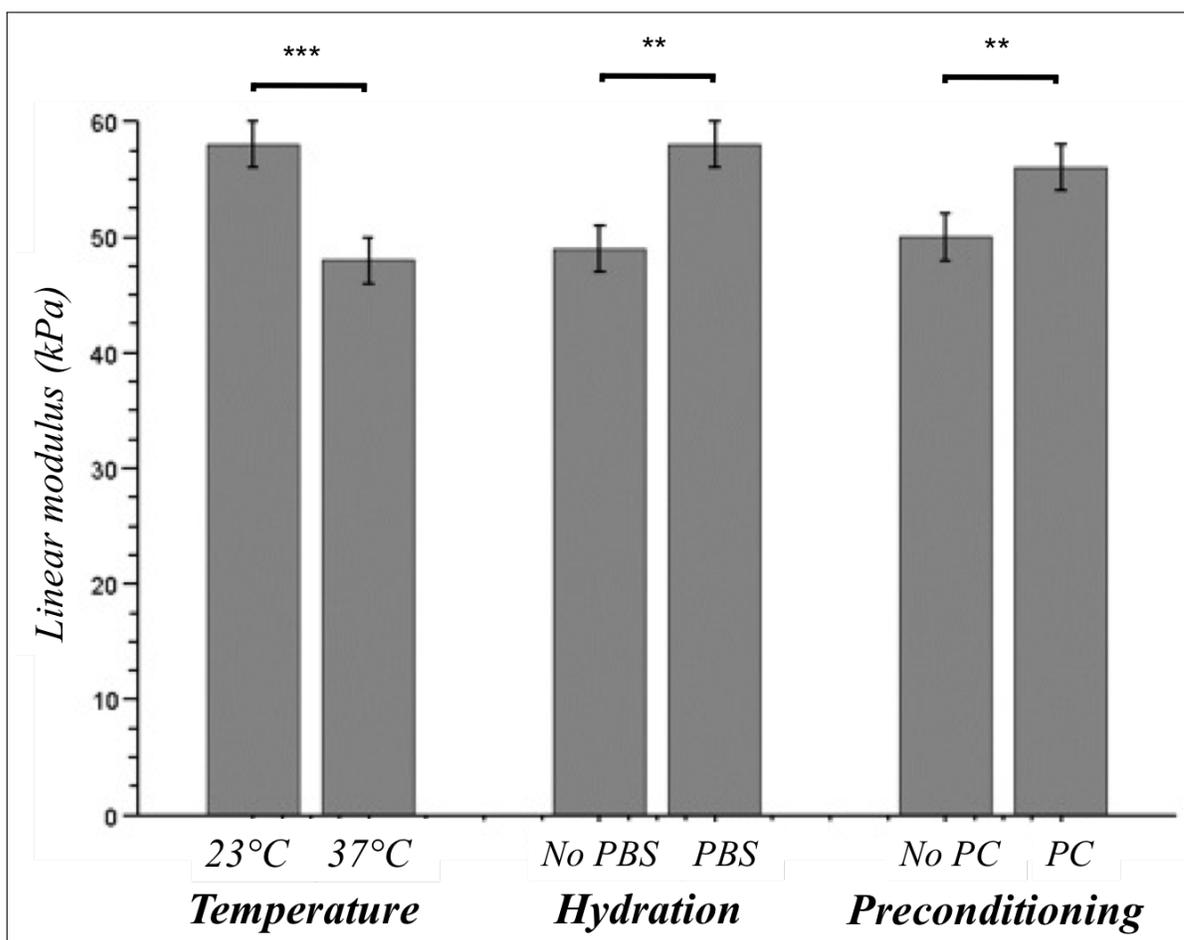


FIGURE 2.4 – Tensile linear modulus of ring-shaped collagen gels as a function of temperature (experiments performed either at 23°C or 37°C), hydration (either with or without a PBS solution), and mechanical preconditioning (either with or without mechanical preconditioning PC). Values are expressed as mean \pm standard error. Significance : * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

These results evidenced that temperature and hydration are critical parameters for the estimation of a linear modulus from tensile tests. Consequently, performing tensile tests in different environments can result in great differences in the estimation of the stiffness of the gels. For example, the linear modulus is 46 ± 1 kPa when measured in PBS solution at 37°C , whereas this value is 59 ± 3 kPa when the test is done in PBS solution but at 23°C , which represents a difference of 28 % on the linear modulus estimation. Therefore, in the perspective of using the collagen scaffold in the bioreactor, the pseudophysiological conditions will be referred to as the aqueous saline solution at 37°C without mechanical preconditioning. For a better understanding of the mechanisms involved as a function of the conditions of testing, it is preferable to study the influence of these environmental factors on the viscoelastic parameters of the gels. This will allow anticipation of the behavior of the collagen scaffold subdued to mechanical constraints inside the bioreactor.

2.5.2 Stress Relaxation Test

Stress relaxation tests can provide information on how the studied factors influence the viscoelastic properties of the hydrogels in the long term (e.g., for a period of time greater than a few seconds). The relaxation processes are related to the physicochemistry of the stretched polymer, which can include interactions between the polymer chains and types of side chains, as well as length and diameter of the polymer chains. A relaxation time is related to each one of these processes. Considering that the collagen gel is constituted of fibrils with a range of lengths, multiple relaxation times are expected. The Weichert model has been previously used to explain stress relaxation of collagen gels (Shen et al., 2011). It can be represented by a spring (elastic modulus of the spring E_{EL}) and Maxwell elements associated in parallel. Each Maxwell element i is composed of a spring (modulus E_i) and a dashpot (viscosity η_i) associated in series (Figure 2.5). Empirically, the present model composed of two Maxwell elements was sufficient to fit these different relaxation times. Therefore, the relaxation modulus E_R (in kPa) can be expressed by the following expression :

$$E_R(t) = E_{EL} + E_1 \times \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + E_2 \times \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \quad (2.1)$$

where E_{EL} and E_i ($i = 1$ to 2 , in kPa) are, respectively, the elastic and the viscous moduli and τ_i are the relaxation times ($i = 1$ to 2 , in s). The viscosity η_i of each Maxwell element can be calculated according to the following equation : $\eta_i = E_i \cdot \tau_i$ in kPa.s. When the relaxation terms are ordered starting from the highest relaxation time to the smallest one ($\tau_1 > \tau_2$), the viscous moduli are ordered starting from the smallest to the highest one ($E_1 < E_2$), which is consistent with the fact that the main relaxation processes occur very early during the relaxation as it can be observed in Figure 2.3. A molecular mechanism of the origin of the viscoelastic processes is proposed in Figure 2.6. At low strains (region A), the collagen gel is composed of randomly oriented fibrils. In this region (the so-called "toe region"), crimps in the collagen gel are being removed at the fibrillar and then at the molecular level. The gel behaves as an uncoiling spring. The stiffness of the material in this region corresponds to the elastic modulus E_{EL} . In region B (the so-called "heel region"), collagen fibrils progressively become

oriented in the direction of the tensile force \vec{F} . In region C, the maximal extension of collagen fibrils is reached. Collagen fibrils slip past each other generating friction responsible for the viscous response (Roeder et al., 2002; Freed and Doehring, 2005). If we simplify the system and consider the length of collagen fibrils as a unique parameter of the relaxation processes, two main characteristic lengths (« shorter chains » and « longer chains ») would generate two different relaxation processes with their own amplitude E_i and relaxation time τ_i . These two factors, amplitude and relaxation time, would both take place from the beginning of the relaxation, but the viscous process generated by friction between « shorter chains » will be rapidly negligible compared to those induced by « longer chains ». In order to understand the effect of an environmental factor on the viscoelastic properties of the gel, its influence on the molecular interactions between the collagen fibrils should be considered. Hence, any factor that will increase the molecular interactions between the collagen fibrils will induce an increase in E_i and τ_i because of the increased friction. This would lead to a more viscous response of the material to a mechanical stress.

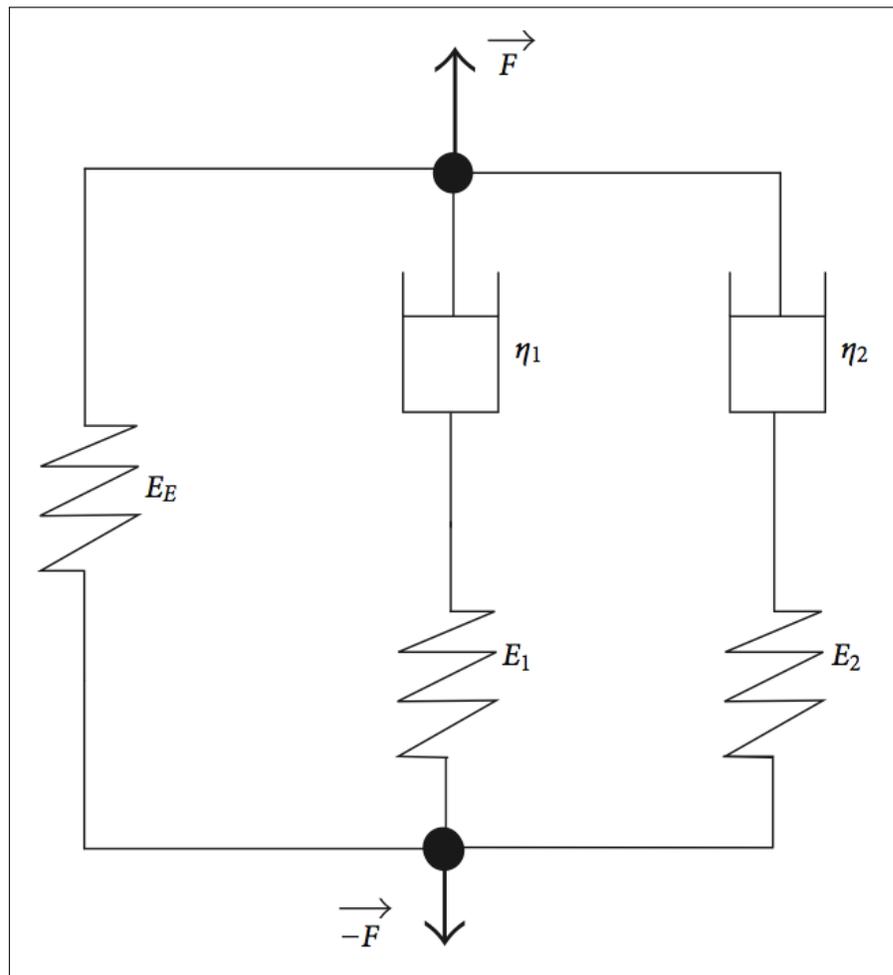


FIGURE 2.5 – Viscoelastic model constituted of a spring associated in parallel with two Maxwell elements. A tensile force \vec{F} is applied to this model. E_{EL} , η_i , and E_i are, respectively, the elastic modulus, the viscosity, and the relaxation moduli associated with the model.

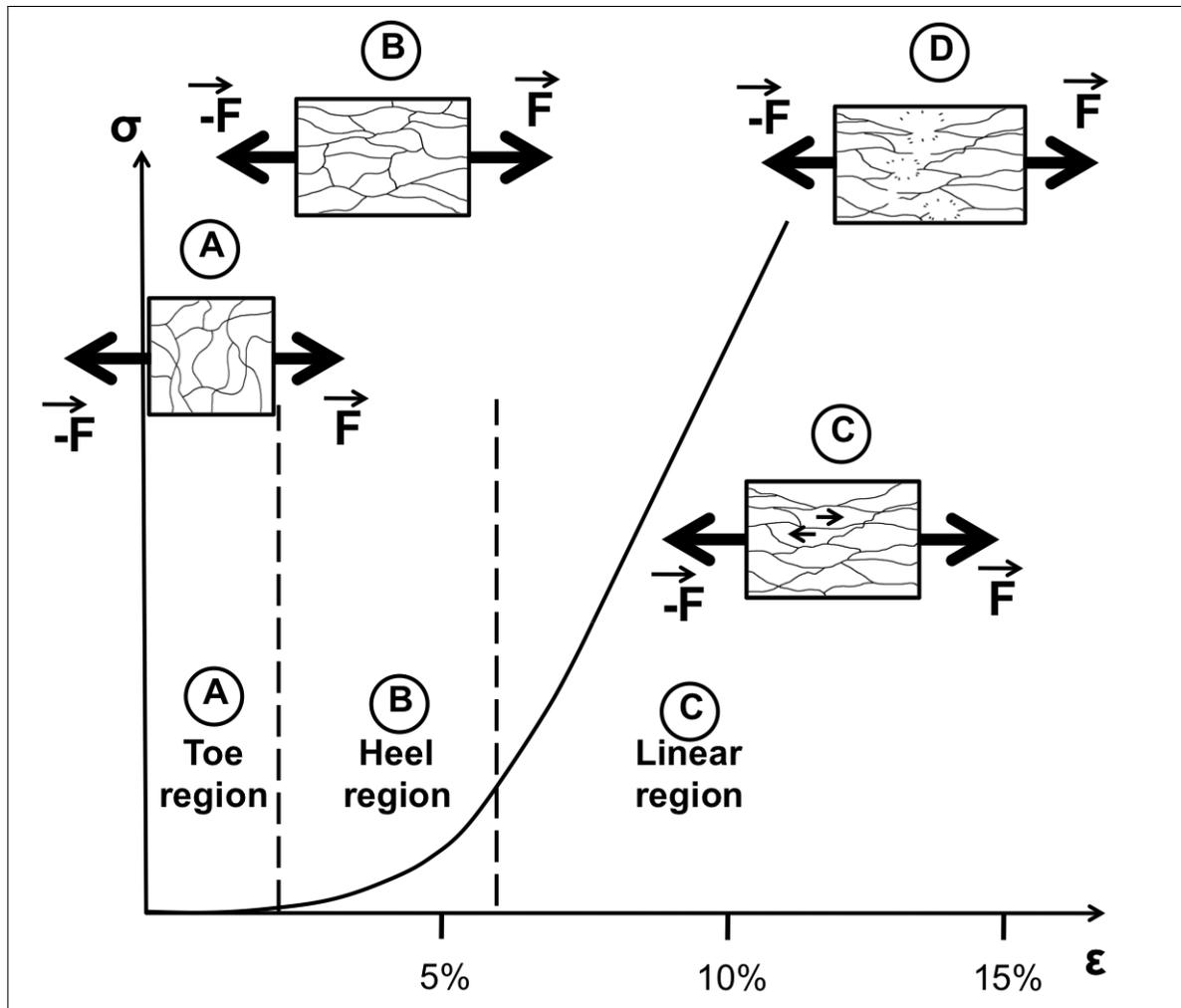


FIGURE 2.6 – Proposed molecular mechanism involved during the collagen gel stretching when applying a tensile load F . Four regions can be identified : (A) « toe region » (low strains), (B) « heel region » (nonlinear region), (C) linear region (small arrows symbolize friction), and (D) rupture of the gel.

Effect of the Environmental Factors on the Viscosities

Viscosities of the gels η_i related to each relaxation process were calculated from the values of the relaxation times τ_i and the viscous moduli E_i (Figure 2.7). Temperature drastically influenced the viscosity of the gels. Hence, η_1 decreased from 327 ± 12 kPa·s, when measured at 23°C , to 231 ± 16 kPa·s when the test was performed at 37°C , respectively ($P < 0.001$). This effect could be explained by the fact that collagen fibrils offer less resistance to tension when temperature is increased due to two main phenomena : a higher molecular mobility at 37°C compared to 23°C and the possible cission of intramolecular links between collagen chains, such as hydrogen bonds or Van der Waals interactions (Flory and Garrett, 1958; Xu et al., 2008).

Concerning the influence of PBS solution, two processes have to be considered : the plasticizing effect

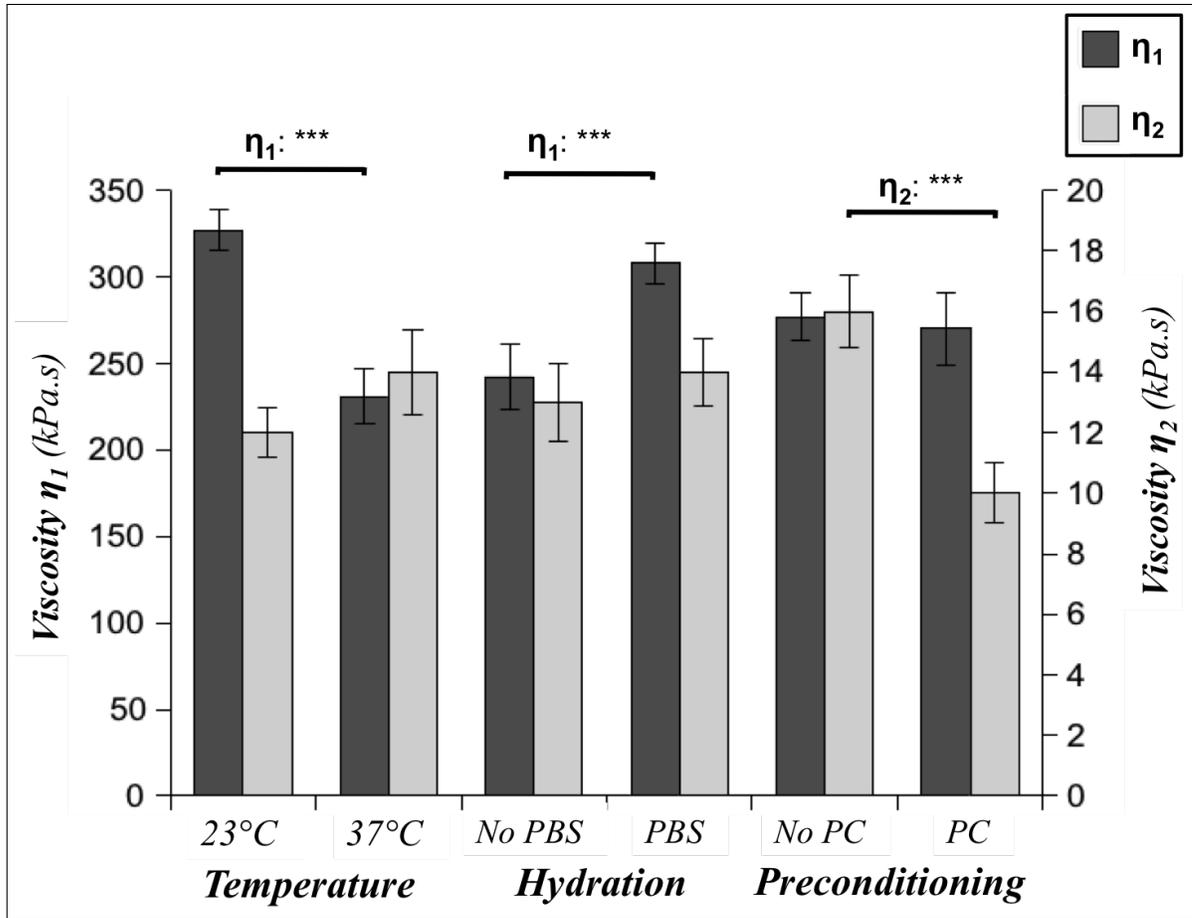


FIGURE 2.7 – Viscosities of ring-shaped collagen gels as a function of temperature (experiments performed either at 23°C or 37°C), hydration (either with or without a PBS solution), and mechanical preconditioning (either with or without mechanical preconditioning PC). Viscosities η_1 and η_2 are extracted from the first and the second term of the second-decay exponential regression of stress-strain relaxation curves obtained on collagen gels. Values are expressed as mean \pm standard error. Significance : *P < 0.05 ; **P < 0.01 ; ***P < 0.001.

of water and the ionic strength of the solution. Because of a high dipolar moment, water molecules break intra- and intermolecular dipole-dipole interactions as well as hydrogen bonding between protein molecules, creating hydrogen bonds with polar and charged groups such as $-NH_2$, $-OH$, $-COOH$. Therefore, water molecules increase chain mobility within the biopolymer, decreasing its viscosity and stiffness (Matveev, 2000). The ionic strength has an opposite effect on chain motion. The ionic strength of PBS solution (1X, IS = 171mM) is lower than the one of the gels (IS > 280 mM) ; thus, the ionic strength of the gels in this saline solution may be lowered because of the osmotic pressure that controls water in the gels. Electrostatic forces ΔF_{el} are closely related to ionic strength IS and increase when IS decreases ($\Delta F_{el} \propto \exp(-IS)^{1/2}$) (Rosenblatt et al., 1992). As a consequence, if IS decreases, electrostatic forces are stronger, the gels are more viscous, and therefore become stiffer. Hence, η_1 increased from 242 ± 19 kPa.s when measured in air to 308 ± 12 kPa.s when the test was

performed in PBS solution, respectively ($P < 0.001$). This result evidences that the change in IS has a more important effect on the viscosity of the gels than the plasticizing effect of water.

Interestingly, mechanical preconditioning had a significant effect on η_2 since this parameter decreased from 16 ± 1 kPa·s to 10 ± 1 kPa·s when the test was performed without and with mechanical preconditioning, respectively ($P < 0.001$). After mechanical preconditioning, collagen molecules are preferentially aligned in the direction of the strength and in a stretched configuration. This is schematically represented by the states B and C on Figure 2.6 where molecular frictions between collagen fibrils contribute to the viscoelastic properties of the gels as they slip pass each other (Puxkandl et al., 2002). Mechanical preconditioning may enhance the chains motion by disrupting some molecular interactions. It should be noticed that only the viscosity extracted from the second term of (1) is affected by the mechanical preconditioning. As discussed previously, the second term in the regression may be related to the more rapid relaxation processes involving « shorter » collagen fibrils. As a consequence, mechanical preconditioning may generate shorter polymer chains as a result of premature failure of collagen fibrils.

Effect of the Environmental Factors on the Relaxation Times

The relaxation times obtained from the second-decay exponential regression were one magnitude in difference, with the first and second processes of the viscous response relaxing within 26 s and less than 1 s, respectively (Figure 2.8). Despite the changes in viscosity as a function of the conditions of testing, no impact of the environmental factors could be identified. Therefore, the study of the influence of these factors on the viscous moduli may allow a further understanding of the origin of these changes.

Effect of the Environmental Factors on the Relaxation Moduli

The effects of temperature, hydration, and mechanical conditioning on the elastic and viscous moduli are shown in Figure 2.9. An increase in temperature from 23°C to 37°C generated a decrease in E_1 and E_2 from 12.9 ± 0.6 kPa and 16.4 ± 0.6 kPa to 9.0 ± 0.6 kPa and 14 ± 1 kPa, respectively ($P < 0.001$). Performing the test in PBS resulted in a 44 % and 50 % increase in E_1 and E_2 , respectively, versus performing the test in air ($P < 0.001$). Mechanical preconditioning decreased the value of E_2 from 16.6 ± 0.6 kPa to 13.3 ± 0.8 kPa which is consistent with the decrease in η_2 in the same conditions. Therefore, the environmental factors had an important influence on the viscous moduli explaining the variation of viscosity of the gels with the conditions of testing.

The same tendency is observed when considering the effects of temperature and hydration on the elastic modulus E_{EL} (Figure 2.9). Indeed, E_{EL} decreases from 11.1 ± 0.6 kPa when measured at 23°C to 7.8 ± 0.8 kPa when the test is performed at 37°C. Oppositely, E_{EL} increases from 6.5 ± 0.5 kPa to 12.3 ± 0.7 kPa in air and in PBS solution, respectively. Consequently, stiffness of the gels is decreased with temperature whereas it is increased in the presence of PBS solution. As previously discussed, this can be explained by the fact that temperature increases molecular mobility and disrupts some weak

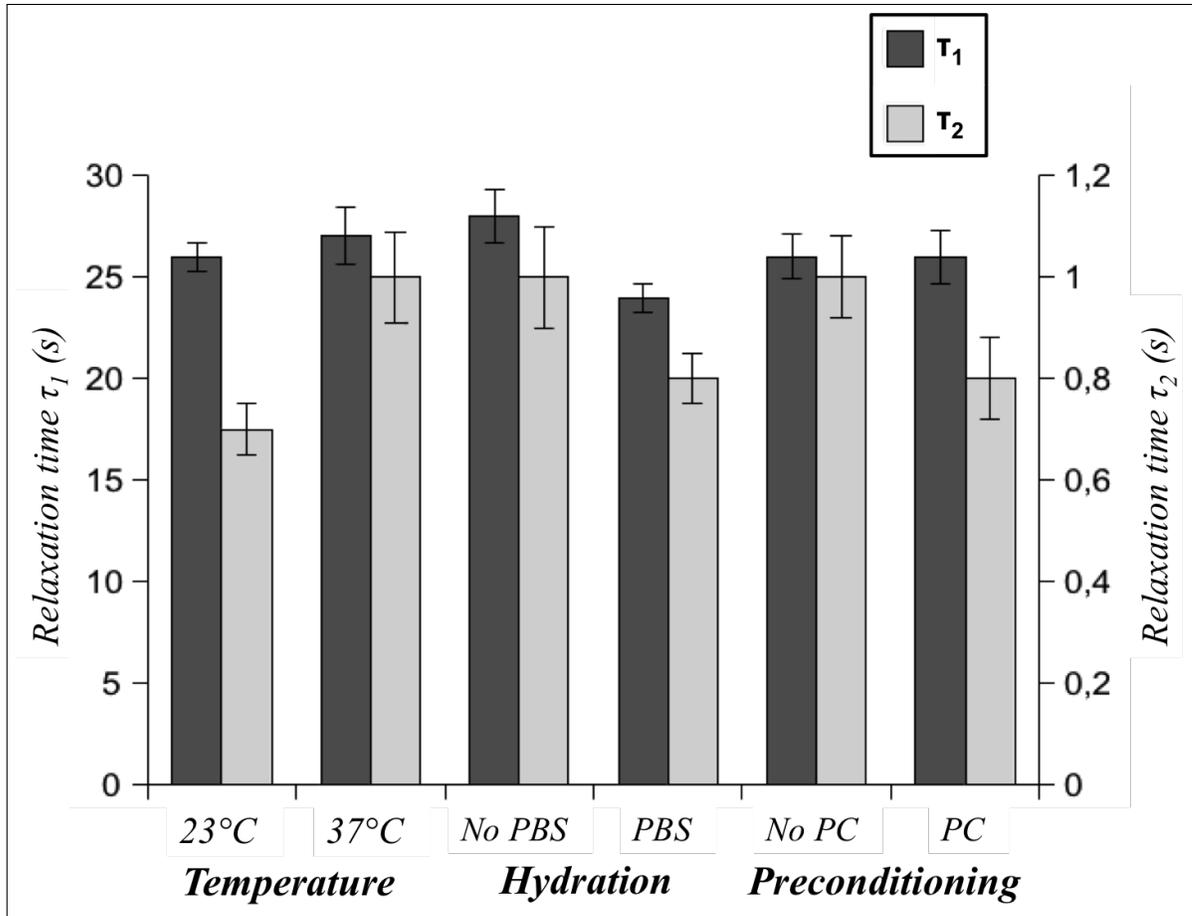


FIGURE 2.8 – Relaxation times of ring-shaped collagen gels as a function of temperature (experiments performed either at 23°C or 37°C), hydration (either with or without a PBS solution), and mechanical preconditioning (either with or without mechanical preconditioning PC). τ_1 and τ_2 are the relaxation times of the gels considered in the viscoelastic model. Values are expressed as mean \pm standard error. Significance : *P < 0.05 ; **P < 0.01 ; ***P < 0.001.

molecular interactions. PBS solution has a lower ionic strength, which results in stronger electrostatic interactions lessening the molecular motion of collagen fibrils (Rosenblatt et al., 1992).

However, it should be noticed that the elastic modulus determined by relaxation tests (Figure 2.9) is different from the one determined by tensile tests (Figure 2.4). For example, in PBS solution at 37°C, the tensile linear modulus of collagen gels was 46 ± 1 kPa whereas the elastic modulus estimated by relaxation tests was 12 ± 1 kPa. This difference indicates that the linear modulus previously determined by tensile tests was not only related to the elastic behavior of the gels but also to the viscous response. A closer look at relaxation times clearly shows that most of the viscous processes relax after around 30 s (τ_1) (Figure 2.8). Therefore, the rate of the ramp, $5 \% \cdot s^{-1}$, for stretching during tensile tests appears to be high. Nevertheless, this value was initially chosen in order to mimic the bioreactor conditions. In order to be sure that this material would withstand the mechanical constraints in the bioreactor without any rupture or plastic deformation, the elastic modulus needs to be considered.

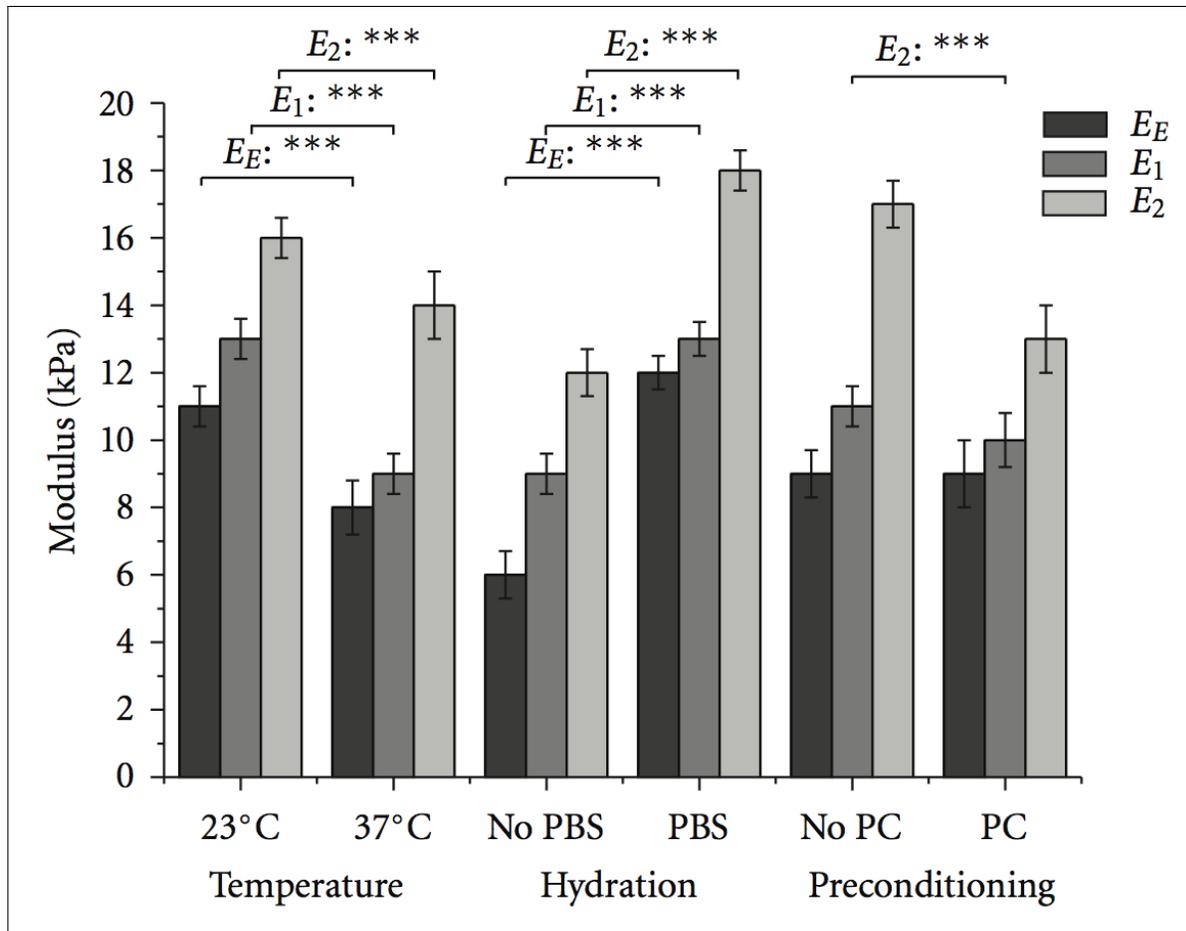


FIGURE 2.9 – Relaxation moduli of ring-shaped collagen gels as a function of temperature (experiments performed either at 23°C or 37°C), hydration (either with or without a PBS solution), and mechanical preconditioning (either with or without mechanical preconditioning PC). E_{EL} , E_1 , and E_2 are, respectively, the elastic and the viscous moduli of the gels considered in the viscoelastic model. The sum of all 3 moduli is the instantaneous linear modulus $E_R(0)$ at a strain of 10%. Values are expressed as mean \pm standard error. Significance: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

This is a crucial parameter to assess because it allows for the evaluation of the stiffness of the scaffold. The determination of the elastic modulus of the gels would require stretching the samples in their elastic range of strains, which is very narrow, or stretching them in quasi-static conditions which means at an infinitely low rate. In this context, relaxation tests are an interesting alternative to tensile tests regarding the estimation of the elastic modulus.

Combined Effects of the Environmental Factors on the Viscoelastic Parameters

Statistical analyses allowed for the evaluation of the combined effects of the environmental factors and showed that the effects are magnified when two factors are combined. Indeed, the decrease in the elastic modulus with temperature is even more important when this factor is interacting with the variation of hydration (-55%, $P < 0.05$) or mechanical preconditioning (-70%, $P < 0.01$) whereas mechanical

preconditioning alone has no notable effect on the viscoelastic parameters of the gels. Similarly, the decrease in viscosity with temperature is also more important when this factor is interacting with the variation of hydration (-66 %, $P < 0.01$ for η_1) or mechanical preconditioning (-66 %, $P < 0.01$ for η_2). Hence, E_2 underwent a 53 % decrease when measured in air at 23°C versus in PBS solution at 37°C. Performing the test at 23°C without mechanical preconditioning versus at 37°C with mechanical preconditioning caused a 75 % decrease on E_2 whereas temperature alone was responsible for a 15 % decrease only (2.9). Therefore, mechanical preconditioning and aqueous saline solution appear to improve heat transfer facilitating the increase in molecular motion due to temperature.

2.6 Conclusion

The aim of this work was to evaluate the effects of temperature, hydration, and mechanical preconditioning on the elastic and viscoelastic properties of collagen gels. It was shown that all three factors have a significant effect on both elastic and viscous components of collagen gels' mechanical properties. Therefore, we conclude that mechanical tests of collagen scaffolds prior to their use and continuous evaluation in bioreactors should be tested in a pseudophysiological environment consisting of a bath with PBS solution at 37°C without any mechanical preconditioning.

Viscous processes are involved when tensile tests are performed at a strain rate representative of the mechanical stresses that are established in the bioreactor which impede the measurement of the elastic modulus. Consequently, relaxation tests appear to be more appropriate for the mechanical characterization of collagen gels in the perspective of their use for vascular tissue regeneration, since viscosity and viscous and elastic moduli can be accessed with this technique.

In the future, the preparation of collagen scaffolds should be optimized in order to reach appropriate mechanical properties assessed in the environment previously described. This optimization must not alter the biological performances of the scaffold. The pseudophysiological conditions will allow measuring the contribution of the cells to the overall mechanical properties of the constructs.

2.7 Acknowledgements

The authors thank Matteo Achilli and Jean Lagueux for their advice concerning the experimental design, the collagen preparation, and the mechanical testing, Stéphane Turgeon for his advice and help in designing the pseudophysiological environment setup, and Daniel Marcotte for his help in fabricating this device. The authors express their gratitude to the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, the Centre Hospitalier Universitaire de Québec, the Hôpital Saint-François d'Assise, the Canadian Institutes of Health Research, and the Fonds de la Recherche en Santé Québec for partially funding this research. This work was also partially supported by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Fond Québécois de Recherche en Science et Technologie (FQRNT).

Chapitre 3

Développement de méthodes de fabrication et de caractérisation de structures de collagène tubulaires cellularisées

Engineering 3D Cellularized Collagen Gels for Vascular Tissue Regeneration

Sébastien Meghezi¹, Dawit G. Seifu¹, Nina Bono^{1,2}, Larry Unsworth³, Kibret Mequanint⁴, Diego Mantovani¹

¹Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Department Min-Met-Materials Eng & CHU de Québec Research Center, Research Chair I for the Innovation in Surgery, Laval University, Quebec City, Canada ; ²Department Electronics, Information and Bioengineering, Politecnico di Milano Milan ; ³Department of Chemical and Materials Engineering, University of Alberta & National Institute for Nanotechnology National Research Council (Canada), Edmonton, Alberta, Canada ; ⁴Department of Chemical and Biochemical Engineering, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

In press
Journal of Visualized Experiments
2014

3.1 Résumé

Les matériaux synthétiques sont reconnus pour engendrer des complications cliniques telles que de l'inflammation, de la sténose, et des infections lorsqu'implantés en tant que substituts vasculaires. Le collagène est utilisé pour une large gamme d'applications biomédicales et il se présente alors comme une alternative aux matériaux synthétiques à fort potentiel de par sa biocompatibilité intrinsèque (faible caractère antigénique, peu de réponse inflammatoire et cytotoxique induites). Cependant, les propriétés mécaniques limitées des gels de collagène et la difficulté à les manipuler freinent leur utilisation en tant que matériau d'échafaudage pour le génie tissulaire vasculaire. Par conséquent, la démarche associée à ce travail s'articule tout d'abord autour de la conception de gels de collagène cellularisés possédant une géométrie tubulaire et ensuite autour de la réorganisation de la matrice de collagène afin de construire des tissus suffisamment résistants pour être manipulés.

La stratégie décrite ici est basée sur l'assemblage direct du collagène et de cellules musculaires lisses (construction) dans une géométrie cylindrique 3D par une technique de moulage. Ce processus nécessite une période de maturation, pendant laquelle les constructions sont cultivées dans un bioréacteur en conditions statiques (sans contrainte mécanique dynamique externe appliquée) pendant une ou deux semaines. Le "bioréacteur statique" fournit aux constructions un environnement stérile contrôlé (pH, température, échange de gaz, apport de nutriments et élimination des déchets). Tout au long de la culture, l'épaisseur de la paroi des échantillons fut mesurée afin de suivre le remodelage cellulaire de la matrice, et la consommation de glucose ainsi que la production de lactate furent mesurées afin de suivre l'activité métabolique des cellules. Finalement, les propriétés mécaniques et viscoélastiques furent évaluées sur ces constructions tubulaires. Dans ce but, des protocoles spécifiques ainsi qu'un savoir-faire particulier (manipulation, fixation, travail en environnement hydraté, etc.) ont été développés pour caractériser ces équivalents de tissus.

3.2 Short abstract

In this work, we present a technique for the rapid fabrication of living vascular tissues by direct culturing of collagen, smooth muscle cells and endothelial cells. In addition, a new protocol for the mechanical characterization of engineered vascular tissues is described.

3.3 Long abstract

Synthetic materials are known to initiate clinical complications such as inflammation, stenosis, and infections when implanted as vascular substitutes. Collagen has been extensively used for a wide range of biomedical applications and is considered a valid alternative to synthetic materials due to its inherent biocompatibility (i.e., low antigenicity, inflammation, and cytotoxic responses). However, the limited mechanical properties and the related low hand-ability of collagen gels have hampered their use as scaffold materials for vascular tissue engineering. Therefore, the rationale behind this work was first to engineer cellularized collagen gels into a tubular-shaped geometry and second to enhance SMCs-driven reorganization of collagen matrix to obtain tissues stiff enough to be handled.

The strategy described here is based on the direct assembling of collagen and smooth muscle cells (construct) in a 3D cylindrical geometry with the use of a molding technique. This process requires a maturation period, during which the constructs are cultured in a bioreactor under static conditions (without applied external dynamic mechanical constraints) for one or two weeks. The "static bioreactor" provides a monitored and controlled sterile environment (pH, temperature, gas exchange, nutrient supply and waste removal) to the constructs. During culture period, thickness measurements were performed to evaluate the cell-driven remodeling of the collagen matrix, and glucose consumption and lactate production rates were measured to monitor the cells metabolic activity. Finally, mechanical and viscoelastic properties were assessed for the resulting tubular constructs. To this end, specific protocols and a focused know-how (manipulation, gripping, working in hydrated environment, and so on) were developed to characterize the engineered tissues.

3.4 Keywords

Collagen, cell culture, 3D constructs, vascular tissue engineering, bioreactor, mechanical characterization.

3.5 Introduction

Vascular tissue engineering envisions different strategies aimed at the fabrication of engineered vessels, including grafts based on synthetic scaffolds, cell sheet-based tissue-engineered blood vessels (TEBVs), and extracellular matrix (ECM) components-based TEBVs. Among these approaches, synthetic polymers exhibit good mechanical properties, but share a common drawback as they lack bioactivity (Kim et al., 1999). The cell sheet-based method allows the production of engineered vascular substitutes with high mechanical properties, but the time required to produce such grafts is approximately 28 weeks (L'Heureux et al., 2007). Natural biopolymers of the ECM, such as collagen, elastin, fibrin (Syedain et al., 2011) or a combination thereof, remain the gold standard materials for tissue engineering scaffolds. This is primarily for the reason that these materials possess a generally good biocompatibility while being able to induce functional cellular responses (Lee et al., 2001a; Couet et al., 2007). Among these biopolymers, type I collagen is one of the most abundant and predominant load-bearing protein of the ECM in many tissues such as skin, blood vessels and tendons. Extensive work has been conducted on the mechanical properties of collagen (Christiansen et al., 2000; Eppell et al., 2006; Lai et al., 2012), but there have been only a few studies on cellular remodeling of collagen gels during static maturation. Cellular remodeling refers to the structural modifications of the collagen matrix induced by cells that could affect the stability of the collagen fibrils network (Seliktar et al., 2001). As a natural scaffold, relatively large quantities of type I collagen can be isolated, sterilized and stored from different sources such as rat-tail tendons (Rajan et al., 2006). Understanding cellular interactions with collagen and the related overall mechanical behaviors of the cellularized collagen scaffolds (constructs) is an essential step for the construction of tissues. Collagen-based TEBVs can be processed by directly mixing cells with collagen during gel preparation and further molded into specific shapes such as tubular and planar (Kumar et al., 2013). Vascular cells inside the gels proliferate and remodel type I collagen (Li et al., 2003). Thus, this method bypasses the need for specific macroporosity that represents one of the significant issues in the development of scaffolds for tissue engineering applications. However, the major drawbacks of collagen gels are their low mechanical properties compared to synthetic materials (Badylak et al., 2009).

In this study, a viable tissue with homogenous distribution of cells was engineered by direct mixing of collagen with cells in a one-step process. "Static bioreactors" were used for the 1- or 2-weeks of static maturation of the cellularized collagen gels (without applied external dynamic mechanical constraints). During the culture, collagen matrix remodeling occurred, thus providing structural reinforcement to the constructs. Furthermore, these constructs were ready to be transferred to a rotating-wall bioreactor and a homogenous endothelium was achieved. In addition, in this work a specific mechanical testing protocol is also proposed to provide an appropriate novel approach in characterizing the mechanical properties of tubular soft tissues.

In summary, this work presents a method for the *in vitro* rapid fabrication and maturation of vascular tissues that are strong enough to be handled not only for biological and mechanical characterizations,

but also for further mechanical conditioning in a dynamic bioreactor, which is considered a crucial step in the regeneration of tissues.

3.6 Protocol

1. Fabrication and assembly of the static bioreactor

1.1. Fabrication of the reservoir

1.1.1. Prepare 50 mL centrifuge tubes as a culture medium reservoir for the bioreactor.

1.1.2. Make two ports by drilling two 5 mm diameters holes at 20 mm from the bottom and the top of the reservoir, respectively. Then insert two luer fittings in 5 mm length silicone tubes. Press-fit these luer fittings through the holes, and seal all the connections with medical grade silicone glue.

1.1.3. Insert a $0.22 \mu\text{m}$ filter into the upper port of the reservoir (Figure 3.1, a).

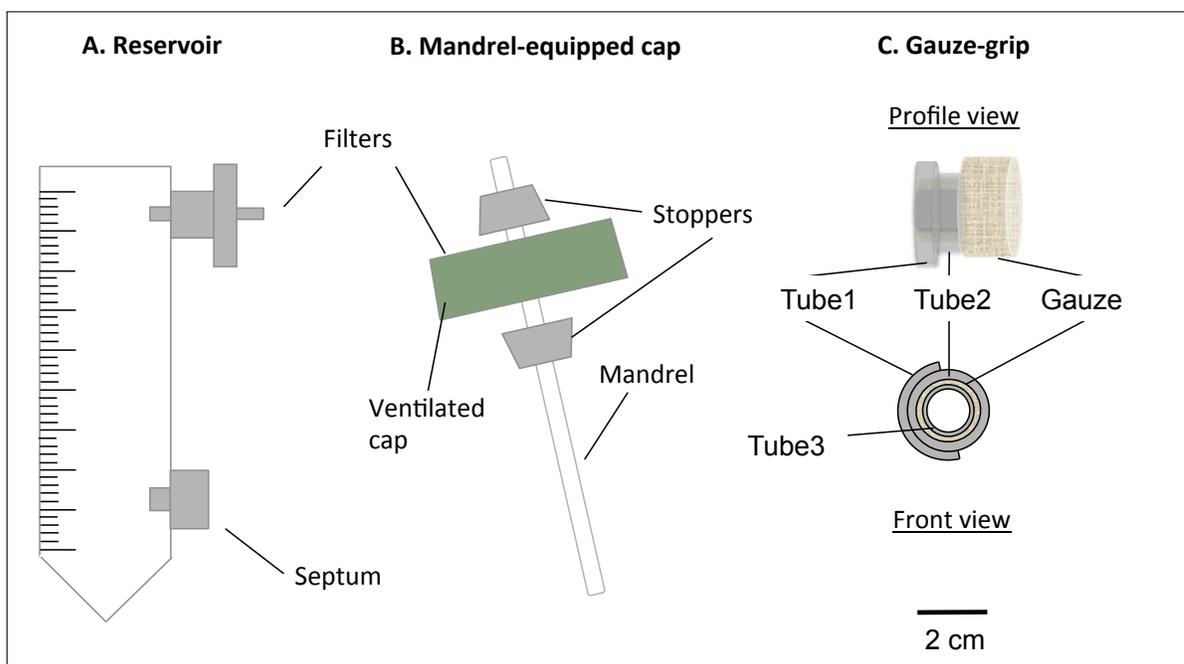


FIGURE 3.1 – Components of the static bioreactor. The static bioreactor consisted of a modified 50 mL centrifuge tube (A) and a mandrel-equipped cap (B). The tube served as medium reservoir, and was equipped with a port for a $0.22 \mu\text{m}$ filter, for the gas exchange, and a septum, for the medium sampling and changing. A mandrel present in the ventilated cap allowed the fabrication of constructs in tubular shape. The gauze-grips (C) were designed and fabricated to support the gelation of the constructs over the mandrel. Moreover, these grips allowed the constructs to be handled after the static maturation and to be fixed to the mechanical apparatus. The external diameter of the mandrel was 4.7 mm.

1.1.4. Insert a luer septum into the lower port of the reservoir (Figure 3.1, a).

1.2. Mandrel-cap assembly

1.2.1. Drill a 4.5 mm diameter hole at the center of the ventilated cap of the reservoir tube without damaging the filter membrane that covers the aerating holes.

1.2.2. Prepare a stir bar (diameter = 4.5 mm, length = 100 mm) as a mandrel for the construct.

1.2.3. Prepare two silicone conical stoppers (length = 10 mm, middle hole diameter = 4.5 mm).

1.2.4. Assemble the mandrel and the cap (mandrel-cap complex) as described in Figure 3.1, b.

1.2.4.1. Press-fit the mandrel into the hole. Insert the 2 stoppers over the mandrel so that the cap is fitted between them. Adjust the position of the mandrel so that its useful length is 78 mm.

1.2.4.2. Apply a primer and then medical grade silicone glue to the surfaces that will be in contact before joining the cap and the silicone conical stoppers together. Remove the excess glue on the cap.

1.2.5. Let it dry at room temperature for 1-3 days.

1.3. Fabrication of the gauze-grips

1.3.1. Prepare 3 silicone tubes (tube1 : inner diameter = 6.4 mm, length = 5 mm ; tube2 : diameter = 6.4 mm, length = 10 mm, and tube3 : diameter = 3.1 mm, length = 12 mm).

1.3.2. Assemble the gauze-grips as described in Figure 3.1, c.

1.3.2.1. Cut tube1 longitudinally, and open it over tube2. Stick them together with the silicone glue.

1.3.2.2. Cut sterile surgical gauze to 5 cm x 7 cm sheet, and then roll tightly the gauze over the tube 3 along the longest side of the gauze. Insert the tube 1-tube 2 complex over the gauze.

1.3.2.3. Add silicone glue to stick together the gauze, the tube 1-tube 2 complex and the tube 3. Cut the gauze at a length of 8 mm.

1.4. Assembly and Sterilization

1.4.1. Assemble the mandrel-cap complex and the gauze-grips as described in Figure 3.2.

1.4.1.1. Coat the mandrel with medical grade grease (Figure 3.2, a). Place the gauze-grips over the mandrel (Figure 3.2, b). Distance the grips at fixed value of 35 mm from each other.

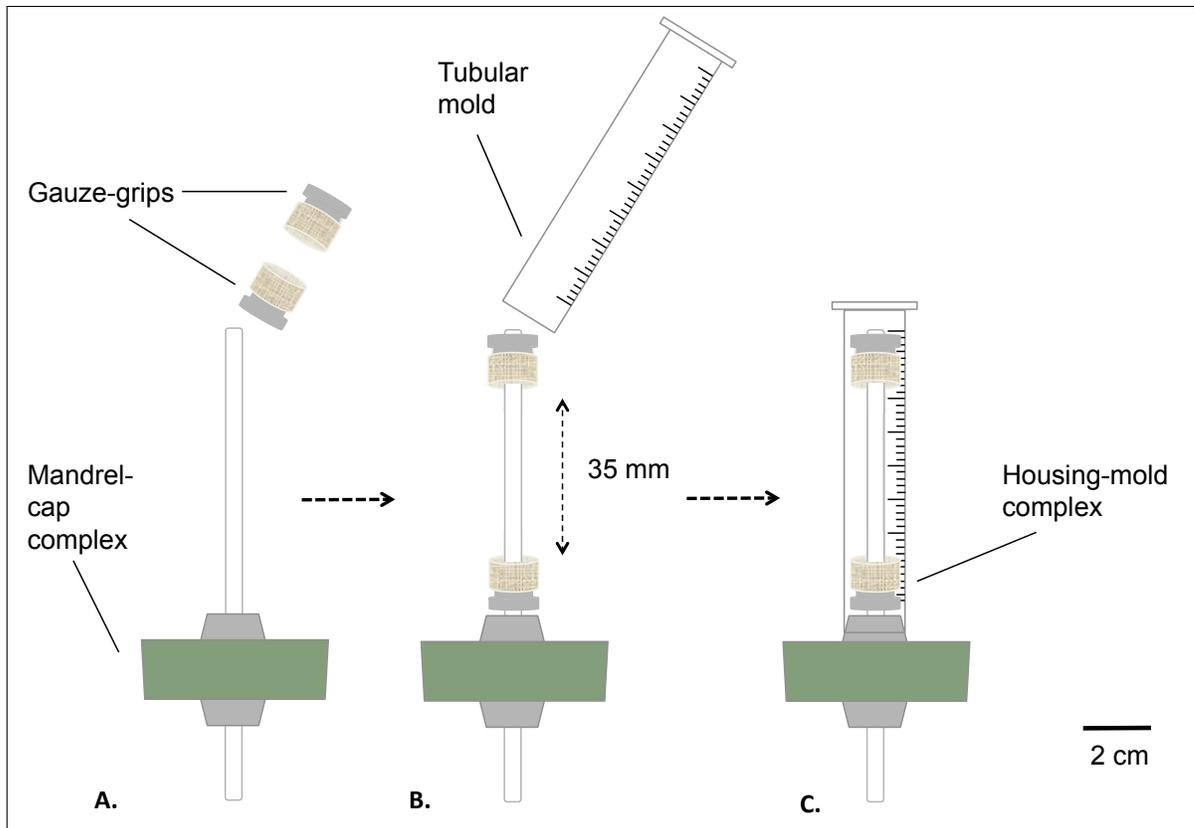


FIGURE 3.2 – Assembling of the static bioreactor. Assembling phases of the bioreactor before the sterilization. The gauze-grips were mounted on the mandrel (A) at a fixed distance. A mold was inserted (B) and tightly fixed to the silicone stopper (C). The external diameter of the mandrel was 4.7 mm.

1.4.1.2. Prepare a tubular mold by removing the bottom part of a 10 mL syringe using a table saw (final length = 8 mm) (Figure 3.2, b).

1.4.2. Insert the mold over the gauze grips-equipped mandrel-cap assembly (housing-mold complex), snap-fitting the mold on the silicone stopper (Figure 3.2, c).

1.4.3. Autoclave the reservoir and the housing-mold complex.

Note : Be careful to hold on the silicone stopper tightly when inserting the mold to avoid its detachment.

2. Engineering SMCs-collagen gel-based constructs and static maturation

2.1. Engineering constructs

2.1.1. Expand porcine aortic smooth muscle cells (pSMCs) in 175 cm^2 culture flasks filled with 20 mL of complete culture medium consisting of Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10 % (v/v) porcine serum (PS), 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS), 1

% (v/v) penicillin-streptomycin (pen-strep).

2.1.2. At ≈ 90 % confluence, detach pSMCs (passage 2-4) by removing the culture medium from the flask of pSMCs, adding 5 mL of trypsin solution (1X in phosphate-buffered saline solution, PBS), and incubating for 10 min ($T = 37^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , 100 % humidity).

2.1.3. Resuspend the pSMCs at a concentration of 4×10^6 cells/mL in complete culture medium.

2.1.4. Prepare collagen solution as previously described (Rajan et al., 2006).

2.1.4.1. Extract and collect collagen bundles from rat-tail tendons in a PBS solution.

2.1.4.2. Transfer the collagen fibers subsequently into acetone (5 min), isopropanol 70 % (v/v) (5 min) and acetic acid (0.02 N, 48 h, 4°C) solutions.

2.1.4.3. Blend the viscous solution and freeze at -20°C for 3 days.

2.1.4.4. Lyophilize the frozen solution to obtain collagen sponges.

2.1.4.5. Solubilize the collagen sponges into acetic acid solution (0.02 N) at a concentration of 4 g/L and centrifuge at 29581 g force for 45 min.

2.1.4.6. Sterilize the collagen solution through dialysis process against subsequent solutions of acetic acid (0.02 N, 1 h), chloroform 1 % (v/v, 1 h) and acetic acid (0.02 N, sterile solution changed every 2 days for 1 week).

2.1.4.7. Collect the sterile collagen solution (4 g/L) in a sterile cell culture hood.

2.1.5. Prepare cellularized collagen gels as shown in Figure 3.3.

2.1.5.1. Prepare 50 mL of sterile buffer solution by mixing 35 mL of DMEM (5X), 4 mL of HEPES (1 N), 3 mL of NaOH (1 N) in 8 mL of sterile deionized water.

2.1.5.2. Prepare cells and collagen gel mixture by mixing 50 % (v/v) of sterile collagen solution (4 g/L of acetic acid 0.02 N) with 25 % (v/v) of buffer solution and 25 % (v/v) of the suspension of pSMCs in complete culture medium.

2.1.6. Measure the pH of the mixture and ensure that it is between 7.0 and 7.4.

2.1.7. Pour gently 9 mL of cells-and-collagen mixture into the above mentioned housing/mold complex (Step 1.4.3., Figure 3.3, a-b).

2.1.8. Let it gel at room temperature for 1 h under the cell culture hood (Figure 3.3, b).

2.2. Maturation in static bioreactor

2.2.1. Remove the mold (Figure 3.3, c) and transfer carefully the construct into the reservoir,

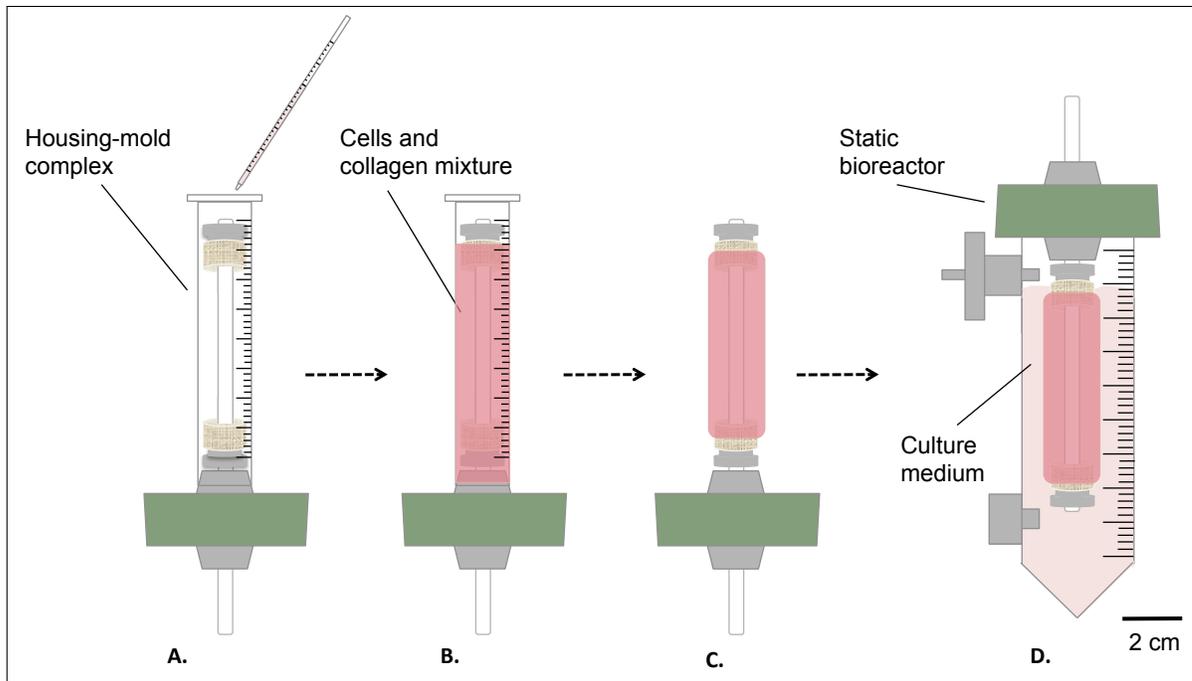


FIGURE 3.3 – Fabrication of the constructs in sterile conditions. The cells and collagen mixture was poured into the housing-mold complex (A), and let gel for 1 h at room temperature (B). Afterwards, the mold was removed (C), the static bioreactor was assembled (D) and transferred inside a reservoir for the static maturation of the construct in incubator ($T = 37^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , 100 % humidity). The external diameter of the mandrel was 4.7 mm.

containing 35 mL of culture medium (Figure 3.3, d).

2.2.2. Incubate the construct ($T = 37^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , 100 % humidity) in vertical position for 1 or 2 weeks of static maturation.

2.2.3. Install a web camera (sealed in order to ensure insulation) inside the incubator in front of the construct.

2.2.4. Change the culture medium every 2 days by aspirating the old medium from the luer septum port and re-filling the reservoir with an equivalent amount of fresh culture medium.

2.3. Measurement of thickness and metabolic activity of SMCs-collagen gel-based constructs during static culture

2.3.1. Place the scanning laser interferometer into the cell culture hood and flip it from the vertical to the horizontal position using a spirit level.

2.3.2. Transfer the bioreactor into the cell culture hood and remove the construct from the reservoir.

2.3.3. Transfer the construct (still mounted on the mandrel) into the pathway of the laser

beam, and place it strictly orthogonally with respect to the beam axis (as shown in Figure 3.4).

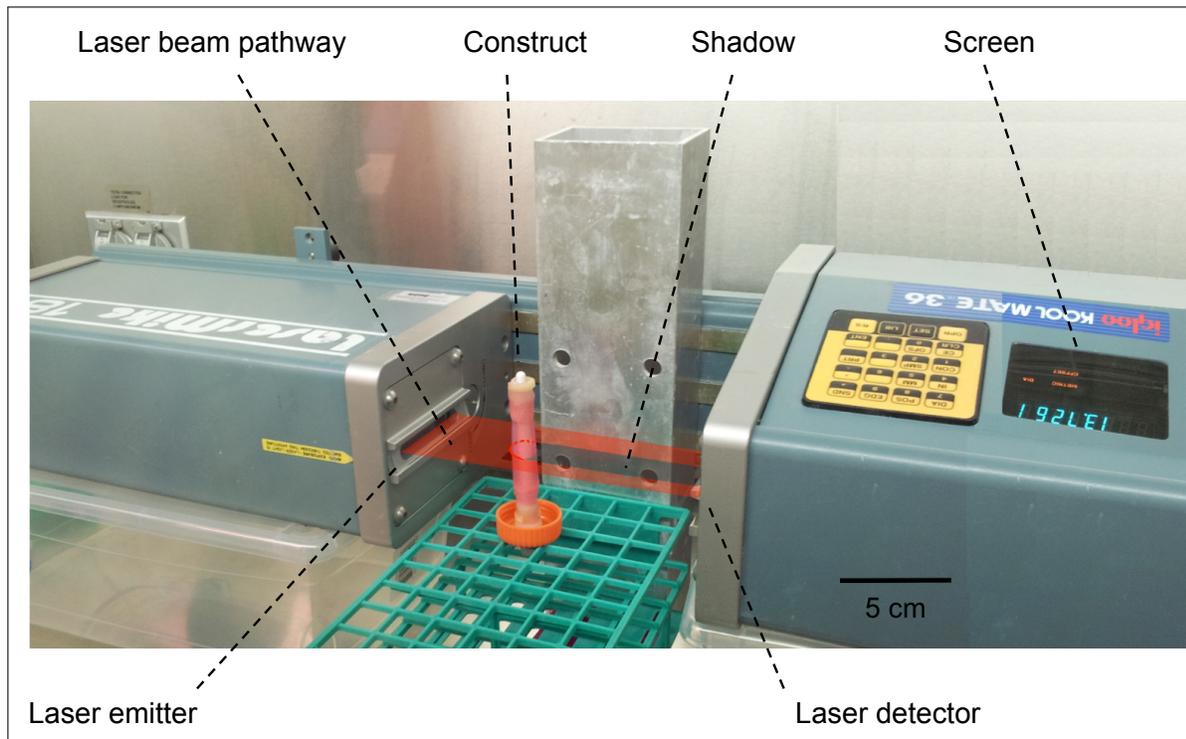


FIGURE 3.4 – Measurement of the thickness/external diameter of the constructs. A laser scanning interferometer was used to perform the measurement of the external diameters of the constructs. The construct was placed into the pathway of the laser beam and generated a shadow. The width of the shadow, corresponding to the external diameter of the construct, was then measured and displayed on the screen.

2.3.4. Read the value displayed on the screen of the scanning laser interferometer, corresponding to the external diameter of the construct.

2.3.5. Calculate the wall thickness of the construct based on its external and internal diameter (i.e. the mandrel diameter).

Note : Repeat the Steps 2.3.1. to 2.3.5. every hour for the first 12 hours and then every 24 hours.

2.3.6. Use 1 mL of the old culture medium (sampled when changing the culture medium, Step 2.2.4.) for measuring the lactate and glucose concentrations with the blood gas analyzer.

2.3.7. Use 1 mL of the fresh culture medium as a baseline level for the glucose and lactate concentrations measurements (Engbers-Buijtenhuijs et al., 2006).

Note : Repeat the Steps 2.3.6. and 2.3.7. every 2 days after culture medium changing.

2.4. Construct harvesting for further mechanical and biological characterizations

2.4.1. After 1 or 2 weeks of static maturation period, transfer the static bioreactor into the cell culture hood.

2.4.2. Transfer gently the mature construct from its mandrel (Supplementary Video 1) to a 100 mm diameter Petri-dish containing 40 mL of fresh culture medium (Figure 3.5 and Figure 3.7, a).

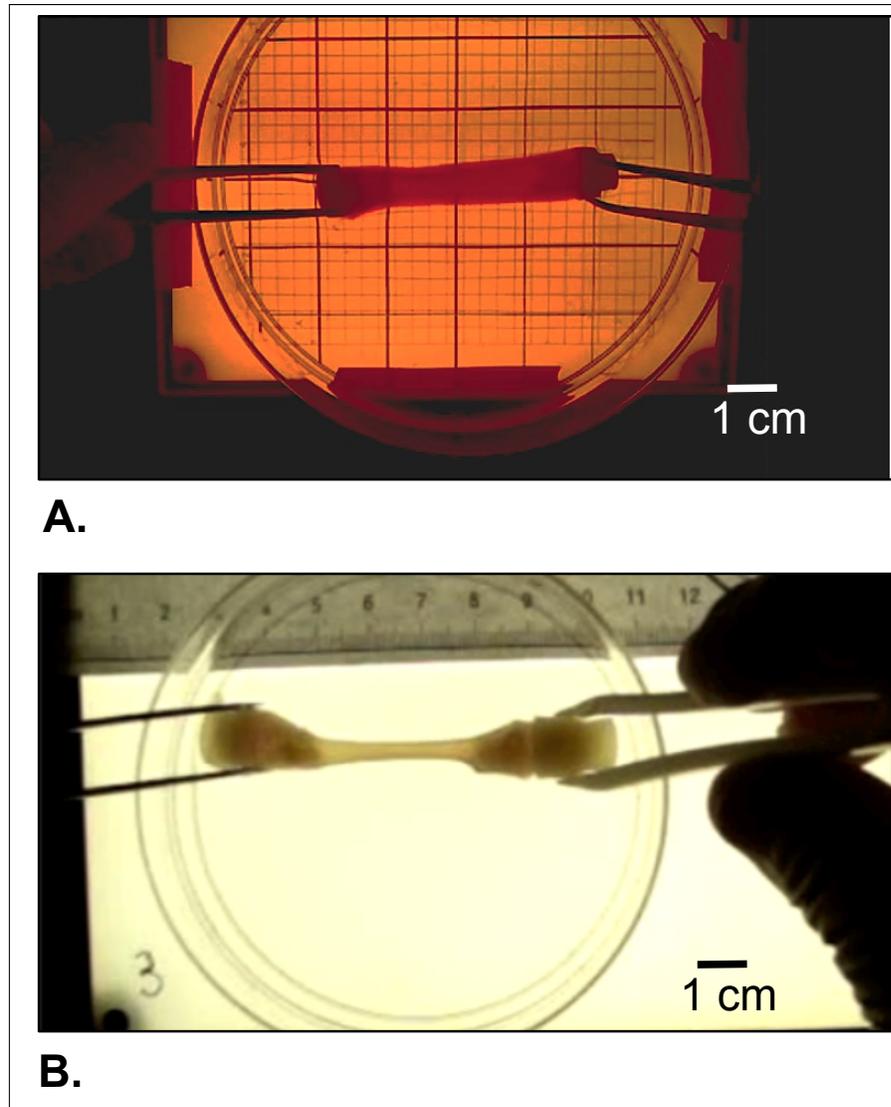


FIGURE 3.5 – Morphological appearance of the harvested construct. (A) Right after gelation and (B) after cells-driven remodeling during static maturation for 2 weeks.

3. Mechanical characterization of the constructs in the longitudinal and circumferential directions

3.1. Install the experimental set-up consisting of the micromechanical tester equipped with a 5 or 10 N load cell and a bath containing PBS at 37°C to keep the samples at pseudo-physiological

conditions (Figure 3.6).

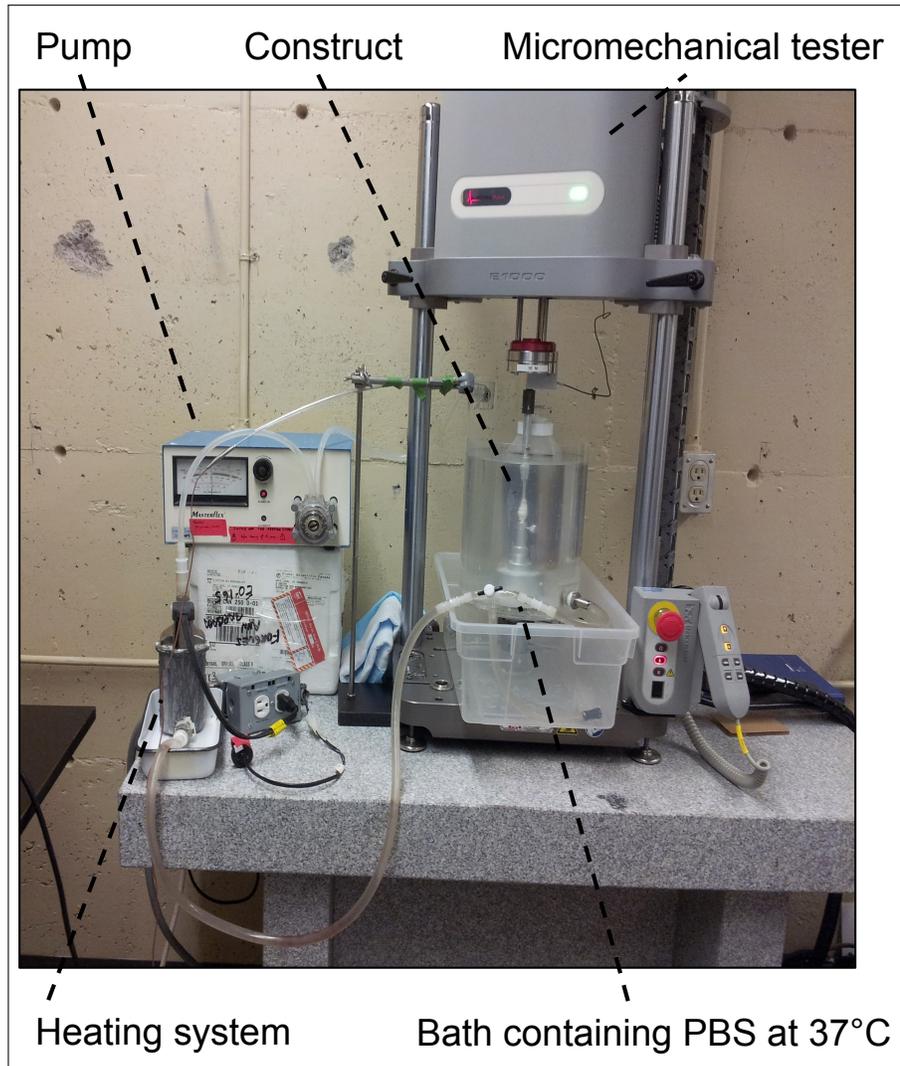


FIGURE 3.6 – Experimental set-up for mechanical characterizations. It consisted of the micromechanical tester equipped with a 5 or 10 N load cell and a bath containing PBS at 37°C to keep the samples in pseudo-physiological conditions.

3.2. Balance the load cell and the extensometer.

Note : Balancing is a function integrated into the micromechanical tester consisting in resetting the displayed extension value and the displayed load value while no sample is mounted onto the machine. This function allows defining the reference for both measurements.

3.3. Mounting the tubular constructs onto the mechanical apparatus : longitudinal direction

Note : Perform longitudinal fatigue tests directly on the entire tubular constructs. Use in-house-built gripping devices to connect the gauze grips of the constructs to the load cell and to the base of the PBS bath.

3.3.1. Mount the tubular construct onto the gripping devices (Figure 3.7, b), following the harvesting procedure (Section 2.4.).

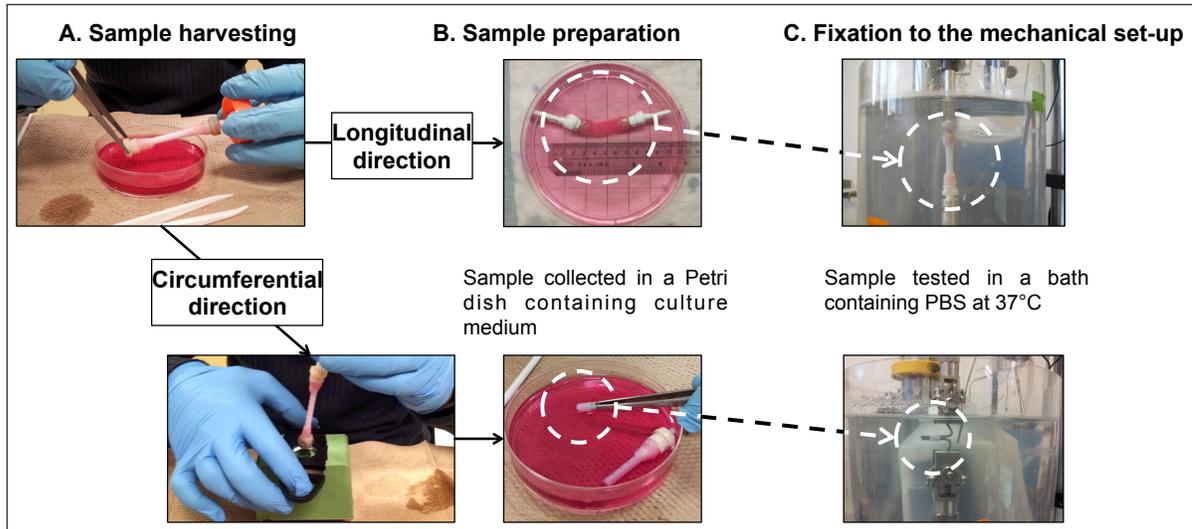


FIGURE 3.7 – Sample preparation for mechanical characterizations. Sample harvesting (A) and preparation (B) for fatigue tests performed in the longitudinal and the circumferential directions (C). The external diameter of the mandrel was 4.7 mm.

3.3.2. Wrap the gripping devices and the gauze grips together with Teflon tape to prevent any slipping of the gauze grips during the test. Mount the sample onto the micromechanical tester (Figure 3.7, c).

3.4. Mounting the ring-shaped constructs onto the mechanical apparatus : circumferential direction

Note : Perform circumferential fatigue tests on ring-shaped specimens sectioned from the tubular constructs. Use two stainless steel bars as grips to hold the specimens.

3.4.1. Mount the tubular construct onto a plastic pipe as a support marked with 5 mm gaps (Figure 3.7, b), following the harvesting (Section 2.4.).

3.4.2. Cut 10 mm rings from the tubular construct.

3.4.3. Measure the length of the specimen using a vanier caliper for the further analyses.

3.4.4. Mount the ring-shaped specimen onto the stainless steel bars of the micromechanical tester (Figure 3.7, c). Make sure to place the specimen at the center of the bars.

Note : The plastic pipe in the Step 3.4.1. and a cutting system as shown in Figure 3.7, b are used to avoid any damage to the construct during cutting.

3.5. Fatigue test on constructs in the longitudinal or circumferential direction

3.5.1. Stretch the construct to its initial gauge length.

3.5.2. Maintain the construct in this position for 10 minutes in pseudo-physiological environment.

3.5.3. Apply 10 % cyclic strain of the initial gauge length (30 cycles) to the construct at 5 %. s^{-1} strain rate.

3.5.4. Repeat Step 3.5.3. at incremental steps of 10 % cyclic strain until failure of the sample.

Note : The use of the pseudo-physiological environment requires taking into account the buoyancy and the inertia of the gripping system that affect the measurement of the applied load.

3.5.5. Record the background as follows :

3.5.5.1. Move the load frame to the initial gauge length.

3.5.5.2. Repeat the Steps 3.5.3. and Step 3.5.4. without any sample mounted, and keeping the gripping devices connected to the load cell (only 1 cycle is required).

4. Luminal endothelialization of constructs

Note : After following the harvesting protocol (Section 2.4.), the constructs withstand handling to be mounted in the rotating-wall bioreactor for the further endothelialization.

4.1. Rotating-wall bioreactor design

4.1.1. Drill a 4.5 mm diameter hole at the center of the ventilated cap of the reservoir tube without damaging the filter membrane that covers the aerating holes.

4.1.2. Press-fit a mandrel (diameter = 4.5 mm, length = 40 mm) into the hole and fix the mandrel as described in Step 1.1.2.

4.1.3. Prepare two C-shaped silicone support for the construct external diameter = 14 mm ; internal diameter = 8 mm).

4.1.4. Position a rotating motor in one end of the rotating-wall bioreactor and a bearing on other end (Figure 3.8, b).

4.2. Lumen endothelialization

4.2.1. Expand human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in 25 cm^2 culture flasks with 5 mL of M199 culture medium supplemented with 10 % (v/v) PS, 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) pen-strep in Petri dish inside an incubator (T = 37°C, 5 % CO_2 , 100 % humidity) till 90 % confluence.

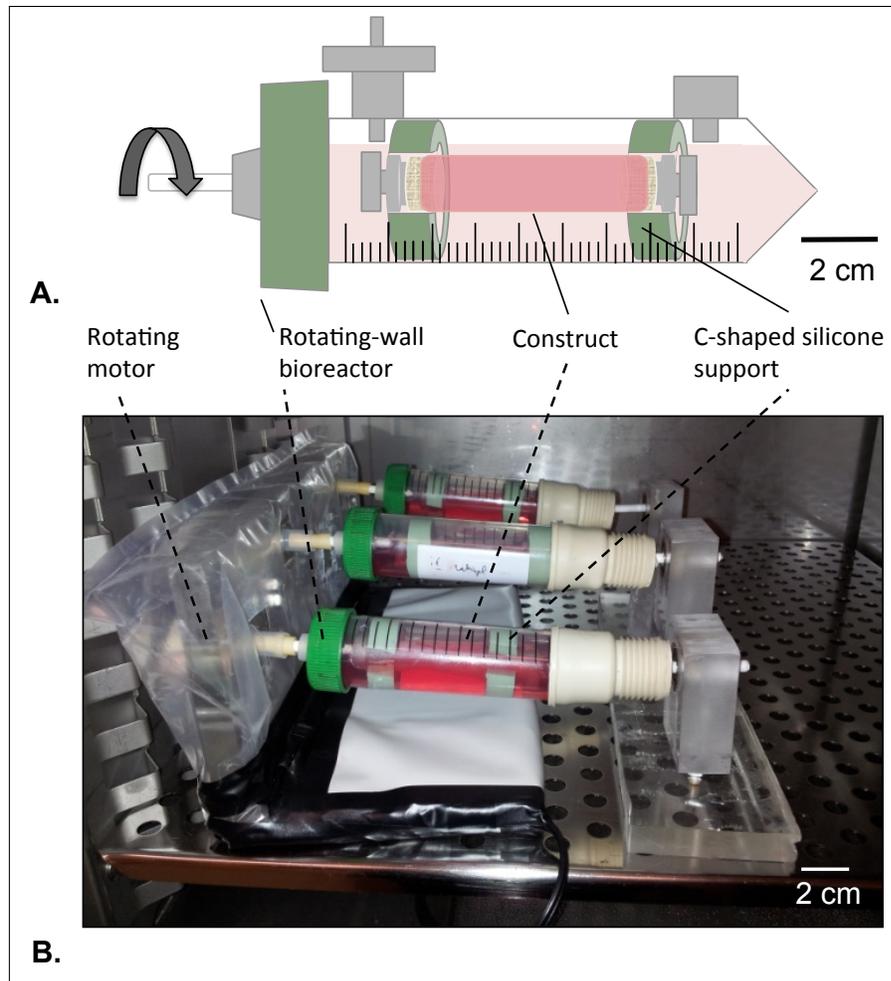


FIGURE 3.8 – Rotating-wall bioreactor. (A) The tubular constructs were assembled in the center of the reservoir with the help of c-shaped silicone support. Both of the extremities of the construct were closed to avoid any leakage of the HUVECs solution. (B) The constructs were cultured in incubator ($T = 37^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , 100 % humidity) in rotation at 4.02×10^{-5} g force for 2 days.

4.2.2. Prepare 1.5 mL of the protein coating solution per construct required for optimal cell adhesion by diluting the concentrate protein mixture to 10.5 ng/mL in serum-free endothelial cell culture medium.

4.2.3. Measure the length of the construct using a vernier caliper.

4.2.4. Calculate the luminal volume V and the luminal area A of the construct as : $V = \frac{L}{4} \pi D_{in}^2$ and $A = \pi D_{in} L$ respectively (where D_{in} is the inner diameter corresponding to the mandrel diameter, and L is the length of the construct).

4.2.5. Position the construct at the center of the reservoir following the harvesting procedure (Section 2.4.). Use C-shaped silicone support to fix the construct at both ends to the reservoir (Figure 3.8, a).

- 4.2.6. Fill the reservoir with 35 mL of culture medium.
- 4.2.7. Fill 75 % of the calculated luminal volume of the construct (V) with the protein coating solution prepared in Step 4.2.2.. Close both of the extremities of the construct to avoid any leakage of the protein coating solution (Figure 3.8, a).
- 4.2.8. Assemble the rotating-wall bioreactor system inside the cell culture hood.
- 4.2.9. Start the rotation of the bioreactor at 4.02×10^{-5} g force for 1 h to allow the luminal coating as shown in Figure 3.8, b.
- 4.2.10. Open the upper extremity of the construct and aspirate the protein coating solution from the lumen.
- 4.2.11. Detach HUVECs (passage 2-3) by removing the culture medium from the flask of HUVECs and adding 3 mL of the trypsin solution (1X in PBS). Incubate for 5 min (T = 37°C, 5 % CO₂, 100 % humidity).
- 4.2.12. Resuspend the HUVECs at a concentration of 4×10^6 cells/mL in supplemented M199 culture medium.
- 4.2.13. Inside the cell culture hood, seed HUVECs into the lumen of the construct with a density of 1000 cells/cm² (Cheung, 2007). Close the upper extremities of the construct to avoid any leakage of the HUVECs solution.
- 4.2.14. Incubate the constructs (T = 37°C, 5 % CO₂, 100 % humidity) hosted into the rotating-wall bioreactor (Figure 3.8, b) and culture for 2 days at a constant rotation of 4.02×10^{-5} g force.
- 4.2.15. Harvest the construct after 2 days of culture in sterile conditions and prepare it for further biological characterization as described in 2.4..

3.7 Representative results

This work describes the fabrication of engineered tubular collagen-based constructs containing vascular cells. Already after 1 h of early gelation, cells-and-collagen mixture was directly assembled in a 3D tubular geometry, with the external diameter equal to the diameter of the corresponding mold (around 14 mm). All along static maturation, measurements revealed the rapid reduction of the external diameter of the tubular cellularized structures, as shown in Table 3.7. The diameter of the cellularized collagen gels shrunk of about 60 % of its initial value after 1 day of static culture, and of almost 85 % within 7 days (Supplementary Video 2). SMCs within the constructs are responsible for the observed shrinking and the related mechanical reinforcement, as this phenomenon does not occur in non-cellularized collagen scaffolds. Note that no gradient of any type (thermal, biochemical, mechanical, or others) was applied. The cells-driven contraction resulted in a material with greater collagen

density that could be handled and subdued to mechanical solicitations (Supplementary Video 3 and 4).

Time	Thickness (mm)	Contraction
0h	4.83 ± 0.02	0 ± 0 %
2h	4.26 ± 0.02	12 ± 0 %
4h	4.21 ± 0.03	13 ± 1 %
6h	4.06 ± 0.10	16 ± 2 %
12h	3.16 ± 0.07	35 ± 1 %
1 day	2.08 ± 0.11	57 ± 2 %
1 week	0.68 ± 0.07	86 ± 1 %
2 weeks	0.36 ± 0.00	93 ± 0 %

Tableau 3.1 – Rapid contraction of construct diameter during the static maturation. Wall thickness of the constructs and the contraction rate as a function of time of static culture. Contraction was measured by determining the external diameter of the tubular constructs with a scanning laser interferometer (Series 183B, LaserMike 136). After 24 h, the constructs contracted to 57 ± 2 % of their molded dimensions. Data are expressed as *mean* ± *SD* (n = 3). The presence and the activity of living smooth muscle cells was the only responsible for such major changes.

To relate the cells-driven remodeling to the overall mechanical and viscoelastic properties, fatigue tests were performed on the constructs (Supplementary Video 4 and 6). These tests consisted in cycling the constructs (30 times) at different constant strains (10, 20 and 30 % of initial gauge length) and to record the stress as the response of the constructs to the mechanical solicitation over time. The representative results for one construct are shown in Figure 3.9. The construct withstood higher stresses in the longitudinal direction (75 kPa) than in the circumferential direction (16 kPa) when subjected to the same strain range (30 % strain). Meanwhile, at each cycle, the stress peak value reached for the targeted maximum strain decreased over time. This behavior is typical of the high viscoelastic properties exhibited by these collagen-based constructs.

The biological activity of the cellularized constructs was assessed during static maturation. Hence, metabolic activity of SMCs was evaluated by measuring the glucose consumption and lactate production during static culture. Culture medium was sampled every 2 days and glucose and lactate concentrations were measured using a blood gas analyzer. The constant increase in glucose consumption and lactate production combined to the important shrinking of the constructs, attest the SMCs activity all along static culture (Figure 3.10).

The increased mechanical stability due to the cell-driven remodeling allowed the manipulation of the constructs and the subsequent endothelialization process. Masson’s trichrome staining performed on the endothelialized constructs showed a highly homogenous endothelium. SMCs exhibited a spindle-like shaped morphology and appeared homogeneously dispersed through the wall, while HUVECs

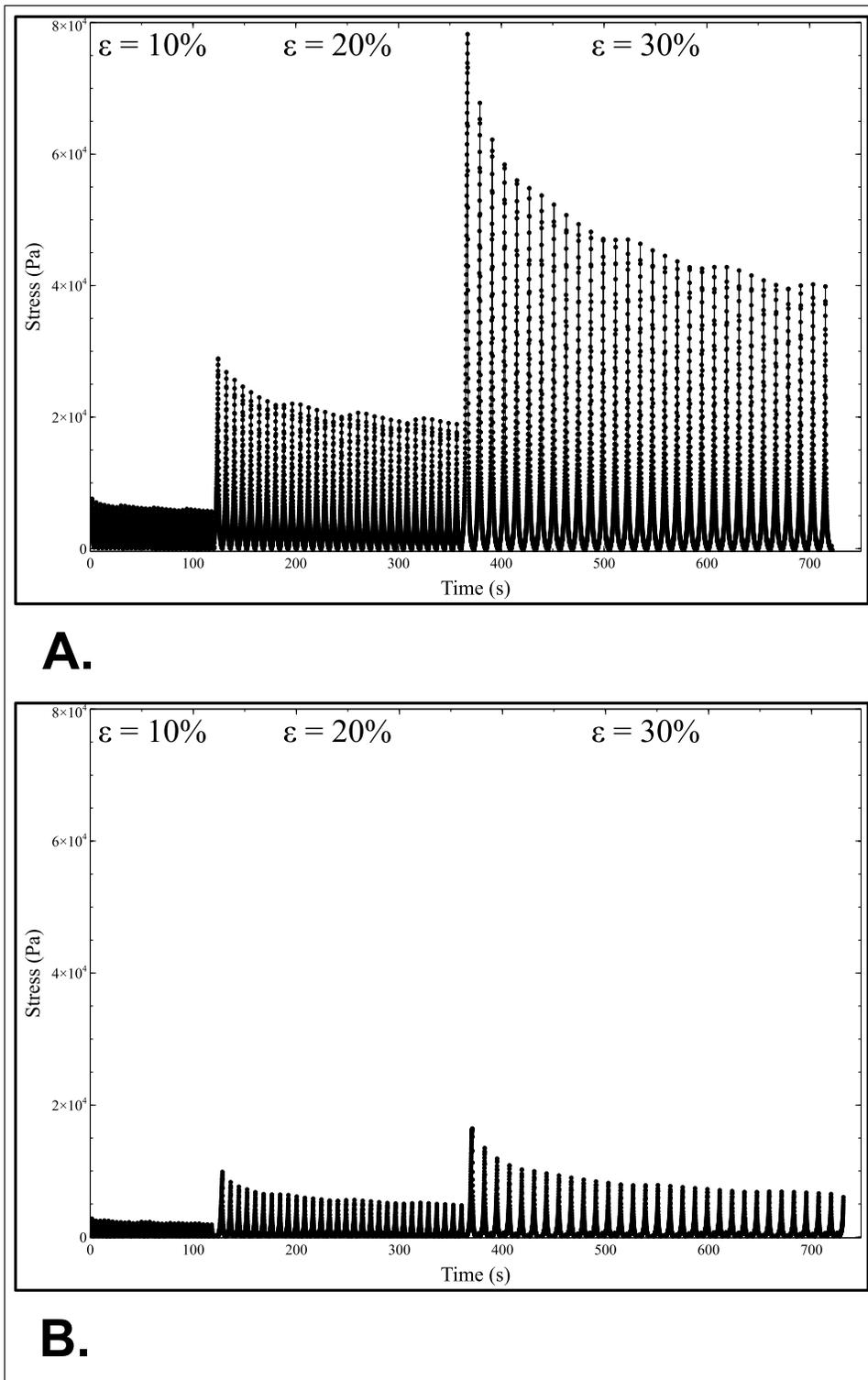


FIGURE 3.9 – Mechanical characterizations. Results of fatigue tests performed on constructs in longitudinal (A) and circumferential (B) directions after cell-driven remodeling.

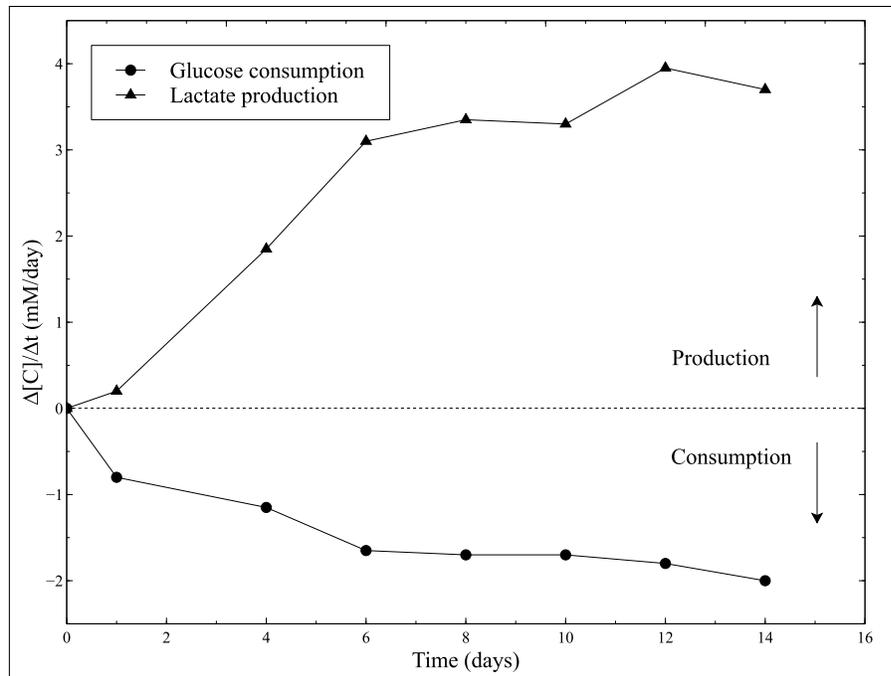


FIGURE 3.10 – Metabolic activity of SMCs within the collagen gels. Measurements of glucose consumption rate and lactate production rate were performed with the blood gas analyzer every 2 days, after the culture medium changing. Fresh culture medium was used as a baseline level for the glucose and lactate concentrations measurements.

appeared well spread in the luminal side (Figure 3.11).

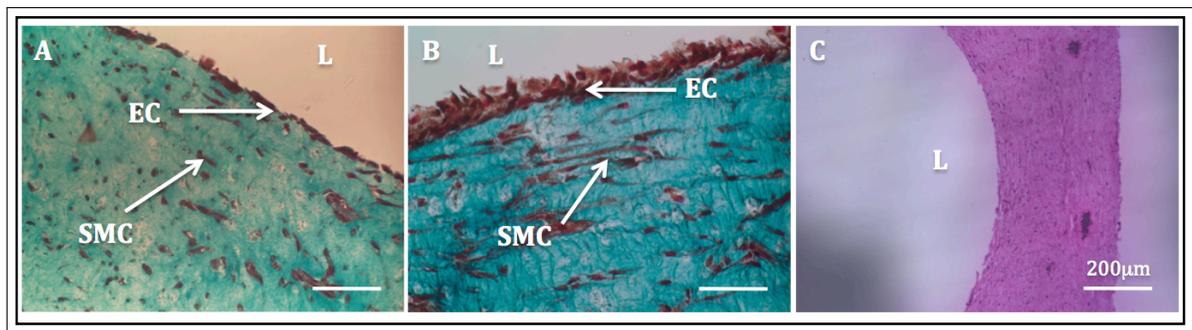


FIGURE 3.11 – Lumen endothelialization. Histological images of the radial cross-sections of tubular constructs. Masson's Trichrome staining of tubular constructs cultured statically for 1 week (A) and 2 weeks (B). H & E staining of a tubular construct (C).

3.8 Discussion

Among the community of vascular tissue engineers, tremendous efforts have been done to reproduce the tunica media layer responsible for the mechanical stability of blood vessels (Seifu et al., 2013).

Since the pioneering work of Weinberg and Bell ([Weinberg and Bell, 1986](#)), collagen has been widely used as a scaffold for vascular tissue engineering because of its biocompatibility, non-immunogenic properties and availability. However, the use of collagen represents a big challenge for researchers, as this material is not easy to handle, due to the intrinsic lack of mechanical stiffness. Manipulations during scaffold preparation may damage the scaffolds, compromising them for further use.

The technique described in this work allows : i) to engineer cellularized collagen gels into a tubular-shaped geometry ; ii) to engineer biological tissues strong enough to be handled after a short static maturation period (1 or 2 weeks) ; iii) to assess mechanical and viscoelastic properties of such tubular-shaped biological tissues in 2 directions. Cells in the gel play a key role in the collagen matrix remodeling. During the maturation period, contractile SMCs led to the compaction of the gels yielding a construct with higher mechanical stability that could be assessed in the longitudinal and circumferential directions. Afterwards, HUVECs seeded in the luminal side of the constructs generated a homogenous and viable endothelium, thus demonstrating the suitability of the collagen gels for vascular tissue engineering applications.

The bioreactor described in this work for the fabrication of the static maturation of the construct was specifically designed to provide an optimal environment for cells maturation. In addition, the devices developed for the characterization of the mechanical and viscoelastic properties of the constructs were designed with the aim to reduce any potential damage inherent to the manipulation of such delicate materials. Hence, the static bioreactor was equipped of a 0.22 μm filter and a filter membrane on the cap (Step 1.1.2, Figure 3.1, a and b) that allowed gas exchange between culture medium inside the reservoir and the incubator, while keeping a sterile culture environment. The luer septum at the bottom was used as a port for culture medium sampling and changing during static culture. Some critical steps have to be considered during construct fabrication and characterizations. All the manipulations (performed in the Step 2.1.1. and in the subsequent steps) that might alter the sterility of the system were performed in a sterile biological hood. Cells and collagen gel mixture preparation was handled on ice in order to delay the gelation process (Steps 2.1.4. to 2.1.7.). At Step 2.1.7., any air-bubbles entrapped in the mixture prior to gelation are potential stress concentration areas that can compromise the stability of the constructs. Therefore, removal of such air-bubbles requires slightly shaking the assembly or using medical vacuum for 3 min for degasing in sterile conditions. Finally, the grips were specifically designed for maintaining the axis of the mandrel central in the tubular mold during gelation and for allowing delicate manipulation of the constructs during harvesting (removal of the mandrel, Section 2.4., for endothelialization, and for facilitating the mounting onto the mechanical system (longitudinal tests)).

The present protocol proposes an original easy-to-process alternative approach of reinforcement of collagen gels constructs based on the natural inherent contractile potential of SMCs. Common techniques of collagen matrices reinforcement involve the use of physical and chemical crosslinking agents that can have deleterious effects on cells-matrix interactions ([Meghezi et al., 2011](#); [Tirella et al., 2012](#); [Madhavan et al., 2011](#)). The fabrication technique presented in this work allows directing this cells-

driven remodeling process to yield a tissue-engineered construct with targeted mechanical properties without any physical or chemical treatment.

Characterization of mechanical and viscoelastic properties of hydrated collagen gels is a great challenge. In this perspective, the present protocol describes an original simple and efficient method for assessing the mechanical properties of tubular soft tissues. This characterization can be performed not only in the circumferential direction, but also in the longitudinal direction, directly on the whole tubular structure. During mechanical characterization, temperature, aqueous environment, pH and ionic strength are some of the environmental factors that are known to drastically affect the mechanical behavior of biological tissues (Meghezi et al., 2012). Hence, the present work suggests an original set-up and protocol for the mechanical characterization of biological tissues in a highly reproducible pseudo-physiological environment (saline solution at 37°C and pH 7.4). To the best of our knowledge, this kind of characterization has never been reported elsewhere.

In conclusion, the technique proposed in this work demonstrates the high potential of direct mixing of cells with collagen for vascular tissue engineering applications. This method together with the mechanical characterization and endothelialization process constitute high polyvalent protocols. Hence, through slight modifications of the set-ups and protocols while keeping the same rationale, main requirements for engineering vascular tissue equivalents can be addressed such as rapid and uncomplicated processing, including endothelialization, and the possibility to be transposed to a wide range of soft tissues with various lengths and diameters. Furthermore, different adherent cell types, ECM proteins and molded geometries can be investigated for a number of targeted applications, such as engineering tendons, skin grafts, cardiac patches, nerves, among others. Although the mechanical properties of the constructs are encouraging, they are still lower than those of native tissues. In this context, we strongly believe that a very short static maturation period is a crucial step toward the dynamic stimulation into a bioreactor, thus leading to a higher structural integrity and mechanical stability. However, the possibility to rapidly produce tissue-engineered cellularized collagen-based constructs suitable for mechanical and histological analyses makes the static bioreactor described herein a useful and promising tool to provide insight into the interplay between cells and ECM during growth and remodeling, or even to be used as a model for therapies and drug delivery systems.

3.9 Supplementary videos

Supplementary Video 1 : Harvesting of the non-remodeled tubular collagen gels

Supplementary Video 2 : Cells-driven contraction of tubular collagen gels

Supplementary Video 3 : Manipulation of the non-remodeled tubular collagen gels

Supplementary Video 4 : Manipulation of the cells-remodeled tubular collagen gels

Supplementary Video 5 : Longitudinal fatigue test (at 30 %) on cells-remodeled tubular collagen gels

Supplementary Video 6 : Circumferential fatigue test (at 30 %) on cells-remodeled tubular collagen gels

3.10 Disclosures

No funding was received from organizations or agencies with potential conflict of interests.

3.11 Acknowledgements

This research was funded by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, the Canadian Institute for Health Research and the *CHU de Québec* Research Center.

Chapitre 4

Renforcement et réorganisation des structures de collagène par remodelage cellulaire

Smooth Muscle Cells Remodeling of Collagen Scaffolds Yields Improved Anisotropic Mechanical Properties

Sébastien Meghezi¹, Dawit G. Seifu¹, Diego Mantovani¹

¹Laboratory for Biomaterials and Bioengineering
Department Min-Met-Materials Eng & CHU de Québec Research Center
Canada Research Chair I for the Innovation in Surgery
Laval University, Quebec City, Canada

To be submitted to
Tissue Engineering, part A
2015

4.1 Résumé

Les gels de collagène sont reconnus en tant que supports appropriés à l'adhésion, l'étalement et la prolifération *in vitro* des cellules musculaires lisses (CMLs) dans le contexte du génie tissulaire vasculaire. Malheureusement, leurs faibles propriétés mécaniques rendent très difficiles toute stimulation mécanique de ces échafaudages cellularisés. Ces stimulations mécaniques, réalisées dans un bioréacteur dynamique, sont supposées favoriser la production d'un tissu régénéré possédant des propriétés mécaniques et structurales similaires au tissu naturel. À cet égard, les CMLs imprégnées dans un gel de collagène vont spontanément remodeler la matrice et, de ce fait, elles ont le potentiel de renforcer l'ensemble de la structure. Le but de ce travail est de caractériser le processus de remodelage cellulaire d'une structure tubulaire de collagène lors d'une culture en conditions statiques (aucune stimulation mécanique dynamique externe), en mettant en évidence l'orientation des fibrilles de collagène et des cellules ainsi que l'amélioration des propriétés mécaniques de ces constructions vasculaires. Après une ou deux semaines de culture en conditions statiques de ces constructions tubulaires fixées par leurs extrémités dans un bioréacteur spécifiquement conçu, une importante réorganisation structurale du tissu a pu être mise en évidence en terme d'orientation des cellules et des fibrilles de collagène, avec une orientation privilégiée dans la direction longitudinale. Des protocoles et des dispositifs expérimentaux spécifiques ont été mis en place pour évaluer les propriétés mécaniques à la fois dans la direction circonférentielle mais également dans la direction longitudinale et ce, à l'aide de tests de relaxation de contrainte. Ainsi, le module élastique des constructions mesuré dans la direction circonférentielle a été multiplié par un facteur 9 en une semaine et par un facteur 35 après deux semaines de culture en comparaison aux échafaudages non cellularisés. De plus, le module élastique mesuré dans la direction longitudinale était 3 fois plus important que celui mesuré dans la direction circonférentielle. L'ensemble de cette étude offre une meilleure compréhension des relations cellules-matrice extracellulaire et établit un lien direct entre le caractère anisotrope des propriétés mécaniques et viscoélastiques de ces constructions remodelées et la réorganisation du tissu induite par les cellules. De plus, dans la perspective de la régénération tissulaire, ce travail met en évidence le rôle primordial de la culture en conditions statiques avant la culture dans un bioréacteur dynamique.

4.2 Abstract

Collagen gels are well-known as suitable supports for the *in vitro* adhesion, spreading and proliferation of smooth muscle cells (SMCs) for vascular tissue engineering applications. However, their low mechanical properties hinder the mechanical stimulation of cellularized collagen scaffolds in a dynamic bioreactor, which are expected to lead to tissue-engineered blood vessels with mechanical and structural properties similar to that of natural ones. In this respect, SMCs embedded in a collagen gel spontaneously remodel the matrix and thus have the potential to reinforce the overall structure. The aim of this work was to characterize this remodeling process during static culture (no applied external dynamic mechanical stimulation), focusing on the orientation of collagen fibrils and cells and on the consequent improvement of the mechanical properties of these vascular constructs. After one or two weeks of static maturation of these tubular constructs fixed in a homemade bioreactor, an important reorganization of cells and collagen fibrils could be evidenced with a preferential orientation in the longitudinal direction. Specific set-ups and experimental protocols were designed to assess the mechanical properties of the constructs in both the longitudinal and circumferential directions through stress relaxation tests. Importantly, the elastic modulus of the constructs measured in the circumferential direction was increased by a factor 9 within one week and by a factor 35 after two weeks of static culture compared to non-cellularized scaffolds. Moreover, the elastic modulus in the longitudinal direction was 3 times higher than the one measured in the circumferential direction. Taken together, these results give a further insight into the understanding of the intimate relation existing between cells and extracellular matrix and especially relates the anisotropic mechanical and viscoelastic properties of cells-remodeled constructs to the cells-driven reorganization of collagen fibrils. Furthermore, in prospect of tissue engineering applications, it highlights the pivotal role of a static maturation step prior to further stimulations in a dynamic bioreactor.

Keywords : Blood vessels, tissue engineering, collagen, remodeling, bioreactor, mechanical stimulation, stress relaxation test, viscoelasticity.

4.3 Introduction

The replacement of small-caliber blood vessels (diameter less than 6 mm) with substitutes of high patency rate is still a major challenge in medicine and bioengineering (Kannan et al., 2005; Chlupáč et al., 2009). In this context, the field of vascular tissue engineering (VTE) has relied on the synthesis of a neo-tissue by vascular cells in order to provide a viable tubular structure with i) non-thrombogenic properties, ii) high diffusion of nutrients, iii) capability of vasoactive response, iv) adequate mechanical and viscoelastic properties and v) homogenous anisotropic structural organization in terms of vascular cells and extracellular matrix (ECM) orientation similar to natural blood vessels (Liu, 1998; Gasser et al., 2006; Dahl et al., 2007b). Two major approaches exist in VTE : the self-assembly (SA-VTE) or the scaffold-based (SB-VTE) strategies. The SA-VTE method relies entirely on the high

potential of cells to produce their own extracellular matrix and to self-organize a new tissue. This strategy is very effective but not efficient enough since it is really time-consuming (Konig et al., 2009). In the second method, a synthetic/natural scaffold is used to support and guide cell adhesion and growth and ECM synthesis. The design and process of engineered scaffolds still represents a considerable challenge for researchers since different criteria should be taken into account such as adequate structural (pore size and porosity), biological (cues for cells-matrix interactions) and mechanical properties (to withstand mechanical stimulation) (Chen et al., 2002). While synthetic materials used as substrates for SB-VTE require complex cell-seeding techniques, natural matrices, in particular collagen gels, constitute an appropriate environment for vascular cell culture, providing specific biological cues and adequate porosity for cells adhesion, spreading and proliferation. Despite the lack of suitable mechanical characteristics, a major benefit of collagen gels is that the preparation of the scaffold and cells seeding through the material can be processed at the same time generating a cellularized scaffold (construct) with homogenous cells distribution and optimal pore size and porosity required for the mass transfer of metabolites and catabolites (Ko et al., 2007; Villalona et al., 2010).

Since the conception of this strategy for modeling media-equivalent of blood vessels using collagen gels cellularized with SMCs, reported in 1986 by Weinberg and Bell (Weinberg and Bell, 1986), many approaches have been studied and developed in order to enhance the mechanical properties of collagen gels. Actually, most of the scientific community agrees on the necessity to apply both biochemical cues (extracellular matrix composition, growth factors, vitamins) (Bowens et al., 2012; Stringa et al., 2000) and biomechanical stimulations (Bilodeau and Mantovani, 2006; Seliktar et al., 2003) to the engineered constructs inside a dynamic bioreactor in order to appropriately guide the tissue regeneration process (Stegemann et al., 2005). Mostly, these strategies consisted in inducing crosslinking between collagen fibrils with chemical (Chandran et al., 2012; Achilli et al., 2012; Sung et al., 1997; Koob, 2004; Ohan and Dunn, 2003), or physical agents (Achilli et al., 2010; Meghezi et al., 2011; Tirella et al., 2012; Weadock et al., 1995; Berglund et al., 2003; Kozowska and Sionkowska, 2014), enzymatic (Khew et al., 2008; Orban et al., 2004) or non-enzymatic biological agents (Girton et al., 1999; Ohan and Dunn, 2003; Xu et al., 2011; Bedran-Russo et al., 2007). Unfortunately, these strategies still did not lead to adequate mechanical properties and often altered the good biological characteristics of the collagen matrix (Tang et al., 2008).

Apparently, owing to the strong focusing on the properties of the scaffold, the role of cells and of their interaction with the extracellular matrix has been often overlooked. In fact, SMCs are key actors in the reinforcement of collagen gels through active remodeling of the collagen ECM leading to an autologous neo-tissue with superior properties. When cultured in appropriate conditions, such as on a collagen gel scaffold in a physiological environment and in static conditions (without dynamic external mechanical stimulations), SMCs apply forces on the collagen fibrils through their contractile activity, degrade the exo-ECM and synthesize new ECM components such as elastin and collagen. Finally, this cell-driven remodeling process leads to microscopic and macroscopic changes, respectively in terms of overall size/dimensions of the tubular structure and tissue organization (Baaijens et al., 2010; Ogle

and Mooradian, 2002; Seliktar et al., 2001). Several studies investigated the important compaction effect by contractile cells on two-dimensional (2D) collagen matrices (Bell et al., 1979; Chen et al., 2008; Guidry and Grinnell, 1985; Brinkman et al., 2003; Lee et al., 1998; Zaman, 2013) but only few focused on the relationship between cell-mediated remodeling of three-dimensional (3D) collagen matrices and their resulting mechanical properties (Seliktar et al., 2003; Isenberg and Tranquillo, 2003).

In light of these considerations, the objectives of this work were i) to describe how the SMCs-driven remodeling process during static culture of a 3D tubular construct affected the orientation of collagen fibrils and cells and ii) to correlate the microscopic and macroscopic changes in the structure of the construct to the increased mechanical properties of these arterial constructs. To the best of our knowledge, this is the first work focusing on unraveling the relationship existing between the anisotropic organization of cells and collagen fibrils of 3D tubular constructs after static maturation and their anisotropic mechanical and viscoelastic properties.

4.4 Materials and Methods

Cellularized constructs preparation

Porcine aortic smooth muscle cells (SMCs), obtained from the aorta of a young pig were cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM High Glucose, Gibco, Invitrogen Corporation, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS, HyClone Laboratories Inc., Logan, UT, USA), 10 % (v/v) porcine serum (PS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1 % (v/v) penicillin-streptomycin solution (1X, Gibco, Invitrogen Corporation, Burlington, ON, Canada). SMCs were used between passage 2 and 6. Type I collagen was extracted from rat-tail tendons and solubilized in acetic acid solution (0.02 N) at a concentration of 4 g/L as previously described (Rajan et al., 2006). In order to prepare the vascular constructs, SMCs were suspended in a physiological mixture (pH 7.1) consisting of DMEM (1.1X) supplemented with 2 g/L collagen solution, NaOH (15 mM) and HEPES (20 mM) buffer at a final density of 10^6 cells/mL (Figure 4.1-A). Finally, this mixture was poured into molds and let gel for 1 hour at room temperature (Figure 4.1-B).

Static culture

Static maturation consisted in culturing the vascular construct without any external dynamic mechanical stimulation in a specifically designed bioreactor. This static bioreactor was composed of a mandrel-equipped cap placed inside a 50 ml centrifuge tube as previously described (Meghezi et al., 2015). Briefly, a 50 mL centrifuge tube (Bio-Reaction Tube (Vent Cap), Celltreat, MA, USA) served as a reservoir of culture medium. It was equipped with a sterile filter (0.2 μ m, GE HealthCare, Whatman™, PolyVent™4, BKM, UK) for the gas exchange and with a septum (greiner bio-one, GE) for sampling the culture medium during the maturation period. The vented cap of the reservoir was equipped with a mandrel (diameter = 4.7 mm) and supported specific anchoring grips placed at 35 mm of distance. The grips maintained the central axis of the mandrel during gelation, facilitated the removal of the

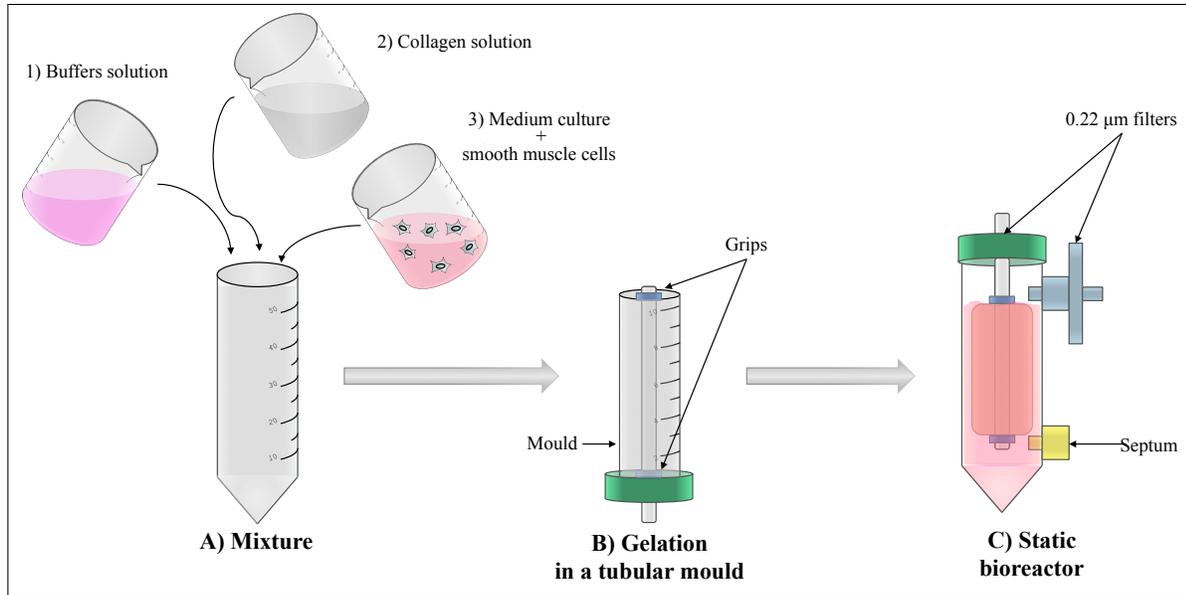


FIGURE 4.1 – Schematic representation of the experimental set-up for static culture. The arterial construct is obtained through the mixture of a collagen solution, culture medium, and buffers solution together with SMCs (A). The mixture is then poured in a tubular mould and let gel at room temperature (B). After gelation, the arterial construct is immersed in the static bioreactor containing culture medium and equipped with filters and septum respectively for gas exchange and medium sampling (C). This system is placed inside an incubator (5 % CO_2 , 100 % humidity and 37°C) for a period of static culture of one or two weeks (no external dynamic mechanical stimulations are applied).

mold and finally allowed for the delicate manipulation and fixation of the construct during further characterizations. The mandrel was coated with food grade silicone lubricant (Krytox®, Dupont™, DE, USA) to facilitate the removal of the construct and the anchoring grips from the mandrel. A tubular mold (internal diameter = 14.3 mm) was fixed around the mandrel and the collagen mixture was poured inside. After gelation, the tubular mold was removed (Figure 4.1-B) and the construct with the mandrel was screw-fixed to the reservoir of culture medium (Figure 4.1-C). This system was placed inside an incubator (37°C, 5 % CO_2 , 100 % humidity) for one or two weeks of static culture. Culture medium was changed every two days. At the end of the static maturation, the construct was harvested by sliding it along the mandrel with the help of the grips and used for further biological or mechanical characterizations.

Thickness measurements

Collagen gel remodeling during static culture was assessed measuring the external diameter reduction of the construct with a scanning laser interferometer (Series 183B, LaserMike 136) placed in a sterile biological hood. Each hour for the first 12 hours and then every day of static culture, the construct and its mandrel were removed from the reservoir and placed in the laser pathway for the measurement of the external diameter. A web camera (LifeCam VX-3000, Microsoft Canada Inc., ON, CA) was used

for time-lapse recording of the external diameter reduction during culture with pictures taken every hour. Images were processed with ImageJ software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, imagej.nih.gov/ij/).

Metabolic activity

Metabolic activity of the construct was measured at day 1, 5 and 13 by resazurin cell viability assay. Resazurin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was diluted at 25 $\mu\text{g/mL}$ of culture medium prepared for SMCs and added to the bioreactors hosting the constructs (35 mL). After 3 hours of incubation at 37°C, 5 % CO_2 , 100 % humidity, resazurin-containing cell culture medium was mixed for homogenization, 100 μL of the metabolized solutions were withdrawn from each bioreactor and collected in a 96-multiwells plate and fluorescence was measured with λ_{ex} 530 nm and λ_{em} 590 nm. Diluted resazurin solution was used as negative control (n = 3) and 32 μM resorufin solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as positive control (n=3). After the measurements at days 1 and 6, samples were rinsed with culture medium, placed in the static bioreactors with fresh culture medium and medium changing was carried out every 2 days (n = 3 to 8).

Histological staining

Tissues were fixed in 3.7 % buffered formaldehyde solution, embedded in paraffin, sliced (10 μm sections) and deparaffinized with toluene. Masson's Trichrome staining was then used for histological observations. Light green SF yellowish was used to stain collagen fibrils (in green), acid fuchsin for SMC cytoplasm (in red) and Weigert's iron hematoxylin for SMC nuclei (in dark brown). The samples were then dehydrated through graded ethyl alcohol solutions (80 %, 95 %, 100 %), cleared in toluene and fixed with a mounting medium. All the chemical products were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Samples were observed with an optical microscope (Olympus BX51 microscope, n = 3) and images were captured with a Q imaging RETIGA EXI digital camera driven by Image pro express software.

Scanning electron microscopy

For scanning electron microscopy observations, samples were briefly rinsed in a cacodylate solution (0.1 M in water) and fixed in a buffered glutaraldehyde solution (2.5 % in cacodylate 0.1M) for 2 hours. Samples were fixed directly on their mandrel in order to keep their overall tubular shape and were then rinsed three times with cacodylate (0.1 M) and post-fixed in a buffered osmium tetroxide solution (0.25 %, in cacodylate 0.1 M) for 30 minutes. Most of the osmium tetroxide solution was removed with an extensive rinsing with cacodylate solution (0.1 M). Samples were dehydrated with ethyl alcohol solutions with increased concentrations (70 %, 95 %, 100 %). Samples were then transferred to the critical point drying system (Polaron CPD 7501, VG Microtech, East Grinstead, W Sussex, UK) for the removal of ethanol without damaging the structure and sputter-coated with gold-palladium. Images were captured with a scanning electron microscope JSM-35CF (Jeol Ltd., Tokyo, Japan, 15

kV, n = 3). All the chemical products were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Mechanical characterization

The anisotropic mechanical and viscoelastic properties of the constructs were assessed using stress relaxation tests performed along different directions of solicitation (Figure 4.2). After the period of static culture, constructs were removed from their mandrel and either used directly for **longitudinal stress relaxation tests** or cut into rings for **circumferential stress relaxation tests**. Samples had an internal diameter of 4.7 mm and a length of around 10 mm for the rings and 35 mm for the entire tubular construct. Stress relaxation tests were performed on an Instron 5848 MicroTester (Instron Corporation, Norwood, MA, USA), in a bath containing PBS solution thermoregulated at 37°C and specific holding systems were designed for both types of tests (Figure 4.2-C) (Meghezi et al., 2012). No mechanical preconditioning was performed prior to the test according to literature (Meghezi et al., 2012). Thicknesses of the samples were obtained by laser-guided measurement. The stress relaxation test consisted of stretching the sample at a 10 % strain ($5 \text{ \%} \cdot \text{s}^{-1}$ strain rate) and maintaining the strain constant for 600 s. The stress decay was recorded as a function of time for 600 s. At the end of this relaxation, the same process was performed at higher strains with incremental steps of 10 % strain until 30 % strain (n = 3 to 5).

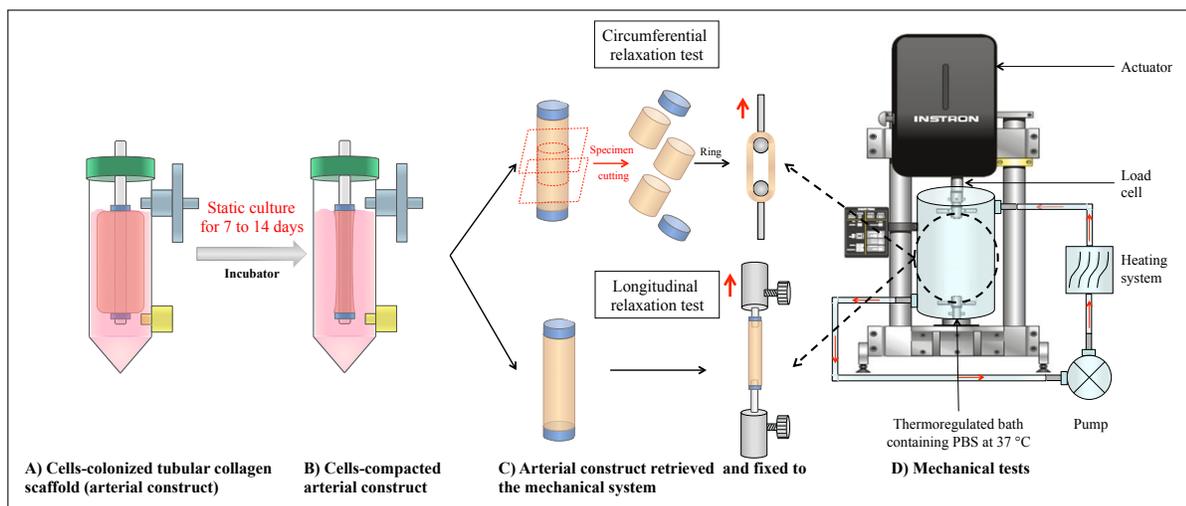


FIGURE 4.2 – Schematic representation of the experimental set-up for stress relaxation tests. After a period of static culture (A), samples were either tested on rings for circumferential tests or directly on tubes for longitudinal tests (B). Stress relaxations tests were performed in a thermoregulated bath containing PBS at 37°C adapted to an Instron 5848 MicroTester, which was equipped with specific grips (C).

After each test, raw data were collected and analyzed with Scilab (Scilab Enterprises. Scilab : Open source free numerical calculations software, Mac OS, Version 5.4.1, 2012, available on <http://www.scilab.org>). For each test, a background curve was obtained running the test in the presence

of the bath but with grips free of sample. This allowed correcting the values of stress by compensating for the buoyancy and for the inertia of the grips during the test.

In order to relate the stress relaxation process to mechanical and viscoelastic parameters of the arterial construct, the Weichert model was used to describe the decay of stress as a function of time. This model has been previously used to explain stress relaxation of collagen gels (Meghezi et al., 2012). It can be represented by a spring (elastic modulus of the spring E_E) and Maxwell elements associated in parallel. Each Maxwell element i is composed of a spring (modulus E_i) and a dashpot (viscosity η_i) associated in series. Empirically, the present model composed of two Maxwell elements was sufficient to fit these different relaxation times. The relaxation stress σ_R (in kPa) can be expressed with the following expression :

$$\sigma_R(t) = \sigma_{EL} + \sigma_1 \times \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + \sigma_2 \times \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \quad (4.1)$$

where σ_{EL} and σ_i ($i = 1$ to 2 , in kPa) are respectively the elastic and the viscous stresses and τ_i are the relaxation times ($i = 1$ to 2 , in s).

The elastic stress σ_{EL} is obtained by fitting the experimental values with Equation 4.1 and extrapolating the value of the stress at $t = 0$ according to the following relation :

$$\sigma_{VEL} = \sigma_R(0) = \sigma_{EL} + \sigma_1 + \sigma_2 \quad (4.2)$$

The **elastic modulus** E_{EL} was calculated from the slope of the linear regression performed on three points (σ_{EL} , strain) obtained from Equation 2 at each incremental strain until 30 %.

The viscoelastic stress σ_{VEL} was obtained by fitting the experimental values with the Equation 4.1 and calculating the value of the stress at $t = \infty$ according to the following relation :

$$\sigma_{EL} = \sigma_R(\infty) \quad (4.3)$$

Similarly, the **viscoelastic modulus** E_{VEL} was calculated from the slope of the linear regression performed on three points (σ_{VEL} , strain) obtained from Equation 3 at each incremental strain until 30 %. The **viscous modulus** E_V was calculated as the difference between the elastic E_{EL} and the viscoelastic moduli E_{VEL} .

4.5 Results

Thickness of the tubular construct

The thickness of the tubular constructs was evaluated by laser-guided measurements during all the

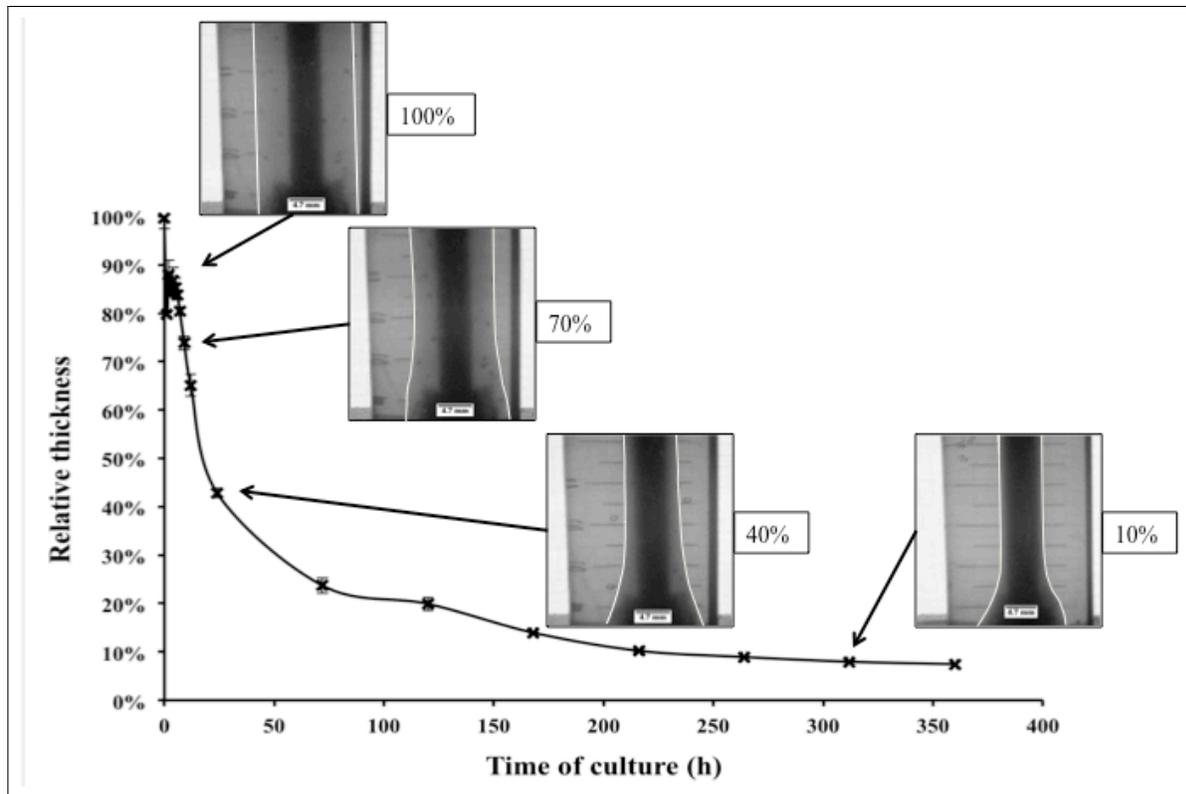


FIGURE 4.3 – Collagen gel contraction as a function of time of culture of smooth muscle cells. The static bioreactor was placed inside the incubator. A non-contact technique allowed the measurement of the external diameter of the arterial construct throughout the period of static culture (one or two weeks). Collagen gel contraction was visualized with a digital camera.

period of static culture (Figure 4.3). An important compaction rate was observed in the first 24 hours of culture ($20 \pm 2\%$ after 6 hours; $60 \pm 2\%$ after 24 hours) then compaction slowed down till reaching the plateau after ca 10 days corresponding to a thickness of ca 10% with respect to the initial value. Specifically, the initial thickness of the scaffold was 4.85 mm, in contrast with 0.68 ± 0.07 mm after one week of contraction and 0.36 ± 0.01 mm after two weeks of static culture.

Contractility of SMCs is one important clue of cells activity. During remodeling, SMC contract the extracellular matrix while expelling water. This very fast compaction around the mandrel (approximately 3% of contraction per hour in the first 24h) testifies that collagen gels constitute an adequate environment for cell adhesion, spreading and contractility. Images of the cells-colonized collagen gels during static culture show a largely homogenous compaction along its length, which suggests an homogenous cell density (Figure 4.3). This confirms that collagen gelation is fast enough so that cells do not migrate to the bottom of the mold as an effect of gravity.

Histological and SEM images

The compaction of the construct by SMCs around the mandrel brings forth an overall reorganization

of the cells and of the collagen matrix, as shown in Figure 4.4. For microscopic observations, samples were processed as schematized on Figure 4.4-A to -D. The cells-colonized collagen gels (Figure 4.4-A) were cultured statically for one week (Figure 4.4-B).

In order to visualize cells organization throughout the wall, histological observations were performed on half rings extracted from the cultured construct (Figure 4.4-E to -H). The histological images (an example reported in Figure 4.4-E) captured immediately after the gelation process of the arterial construct show very low initial cell and collagen densities but also a homogeneous distribution of cells throughout the thickness of the scaffold without any particular orientation. After one week of static culture, an important tissue remodeling can be observed (Figure 4.4-F to -H) : i) both cell and collagen density was increased ; ii) cells were not homogeneously distributed throughout the scaffold anymore but rather more concentrated in the lumen of the arterial construct and iii) a preferential cell orientation in the longitudinal direction was clearly visible.

In order to have a closer look to the lumen organization of cells and collagen fibrils, the surface of the constructs was observed by SEM (Figure 4.4-I). Immediately after gelation, the wall of the constructs appeared very thick and no cells could be identified either on the lumen or the external surface ; after one week of static culture the great compaction of the construct was evident (Figure 4.4-J) and the cells present on the lumen of the tubular construct were homogeneously distributed, at high density and clearly oriented in the longitudinal direction, confirming the previous observations (Figure 4.4-K). Oppositely, no cells could be detected on the external surface of the arterial constructs (data not shown). At higher magnification, collagen fibrils could be easily identified and appeared to be intimately linked to cells that reorganize their surrounding matrix (Figure 4.4-L) (Meghezi et al., 2012).

Metabolic activity

Resazurin is metabolized by cells in resorufin (RSF), which fluorescence was quantified to assess the overall metabolic activity of the constructs (Figure 4.4). The different times of culture led to metabolic activities with few differences. Despite the variability in the measurements and with the hypothesis that the individual cell activity during culture is constant, this observation leads to the conclusion that SMC did not proliferate that much in the gels. Therefore, these results together with the high contractile activity observed during static culture reveals that the design of the static bioreactor ensures an efficient nutrient diffusion and gas exchange between the incubator and the culture medium required for cells metabolic activity.

Circumferential and longitudinal stress relaxation tests

Stress relaxation studies are considered as appropriate tests to characterize the elastic (time-independent) and viscous (time-dependent) response of biological tissues (Silver et al., 2001). A typical 3D curve of stress relaxation on a vascular construct is presented in Figure 4.6-red curve. Stress relaxation curves are usually presented as stress as a function of strain (Figure 4.6-blue curve) or as stress as a function

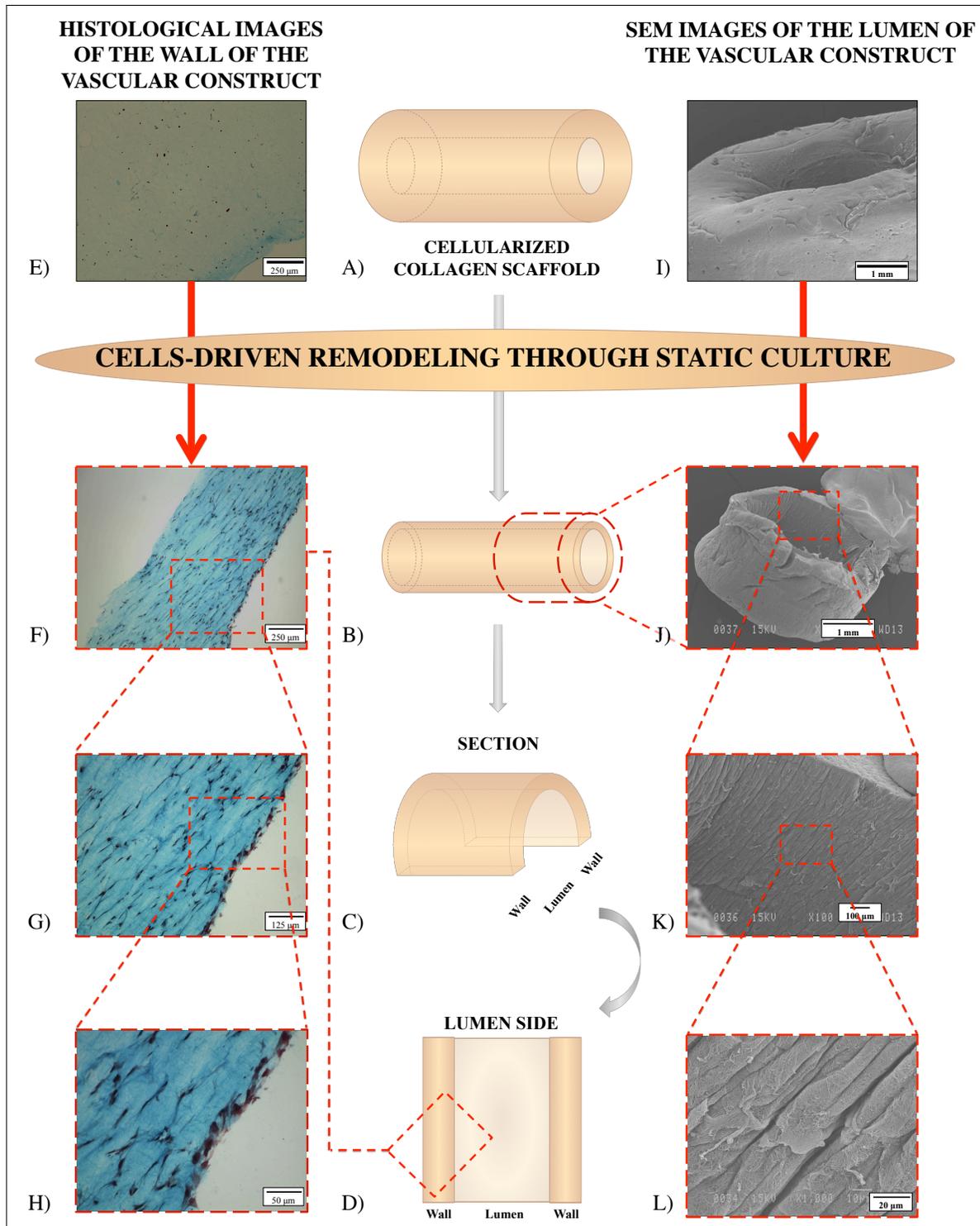


FIGURE 4.4 – Effect of one-week static culture on the overall organization of SMC and the collagen matrix. A) to D) are schematic representations of a cells-populated collagen gel scaffold processed for microscopic observations. A), E), and I) correspond to the arterial construct at the beginning of the static culture, right after gelation. After contraction during a period of static culture, the arterial construct was either cut into rings for SEM observations of the lumen side (I) to M) with graded magnifications) or into half-rings to observe the wall with histological staining (E) to H) with graded magnifications), in which collagen is colored in green-blue, cytoplasm and nuclei of SMCs are respectively colored in red and in dark brown. Both SEM and histological images reveal how static culture generates an anisotropic material with a specific orientation of cells and collagen fibrils out of an initial isotropic material.

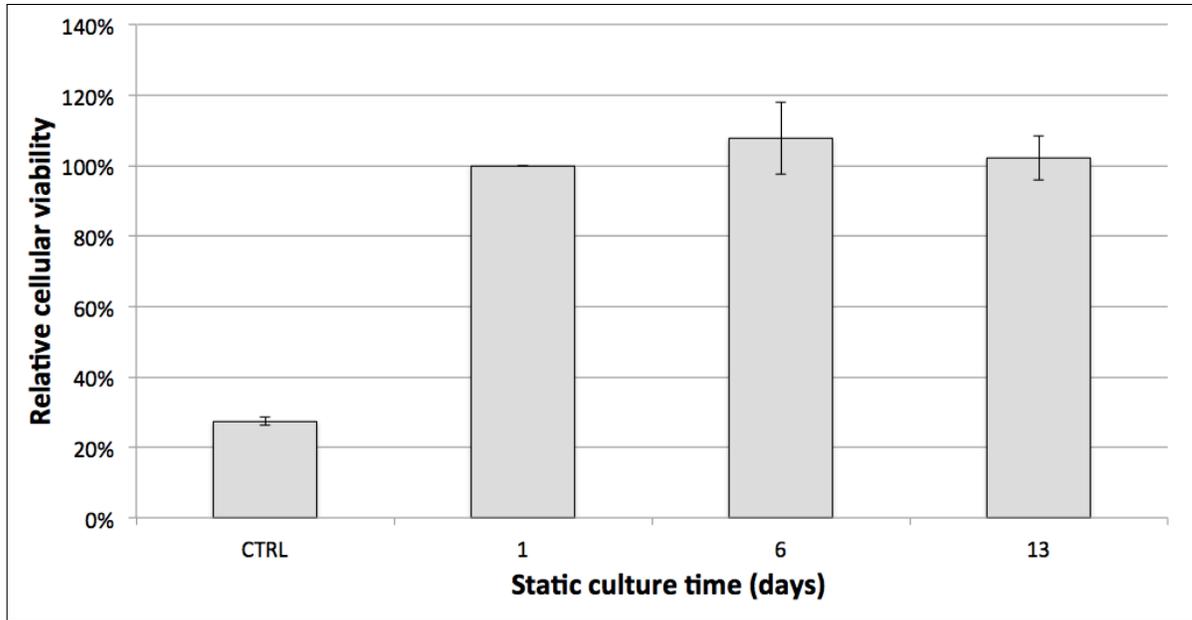


FIGURE 4.5 – Relative metabolic activity of the arterial construct as a function of time of static culture. Reference is the metabolic activity of the arterial construct, right after gelation (day 1 of static culture). CTRL corresponds to the collagen gel scaffolds statically cultured for two weeks. Results show no difference in the metabolic activity throughout the culture.

of time (Figure 4.6-green curve).

The elastic modulus E_{EL} of the arterial construct as a function of time of culture and the direction of solicitation (circumferential or longitudinal) is shown in Figure 4.7. Results showed that the elastic modulus of the vascular construct measured in the circumferential direction was increased by a factor 9 within one week and by a factor 35 after two weeks of static culture. An important increase was also observed for the elastic modulus measured in the longitudinal direction that was 3 times higher than the one measured in the circumferential direction. The viscous modulus E_V of the construct as a function of time of culture and the direction of solicitation is shown in Figure 4.7. Viscous moduli in the circumferential and the longitudinal directions showed similar trend as a function of time of static culture as for the elastic moduli. Additionally, a significant difference between the values obtained in the longitudinal and the circumferential directions appears only after two weeks of culture, when E_V is ca 5 times higher in the longitudinal direction than in the circumferential one. These results confirm the anisotropic organization of the construct after static maturation.

4.6 Discussion

Over the past 20 years, many studies involved collagen gels because of their unique biological properties and high potential as scaffolds for SB-VTE (Couet et al., 2007; Glowacki and Mizuno, 2008). Our group showed that reconstituted neutralized collagen films exhibit good hemocompatibility and

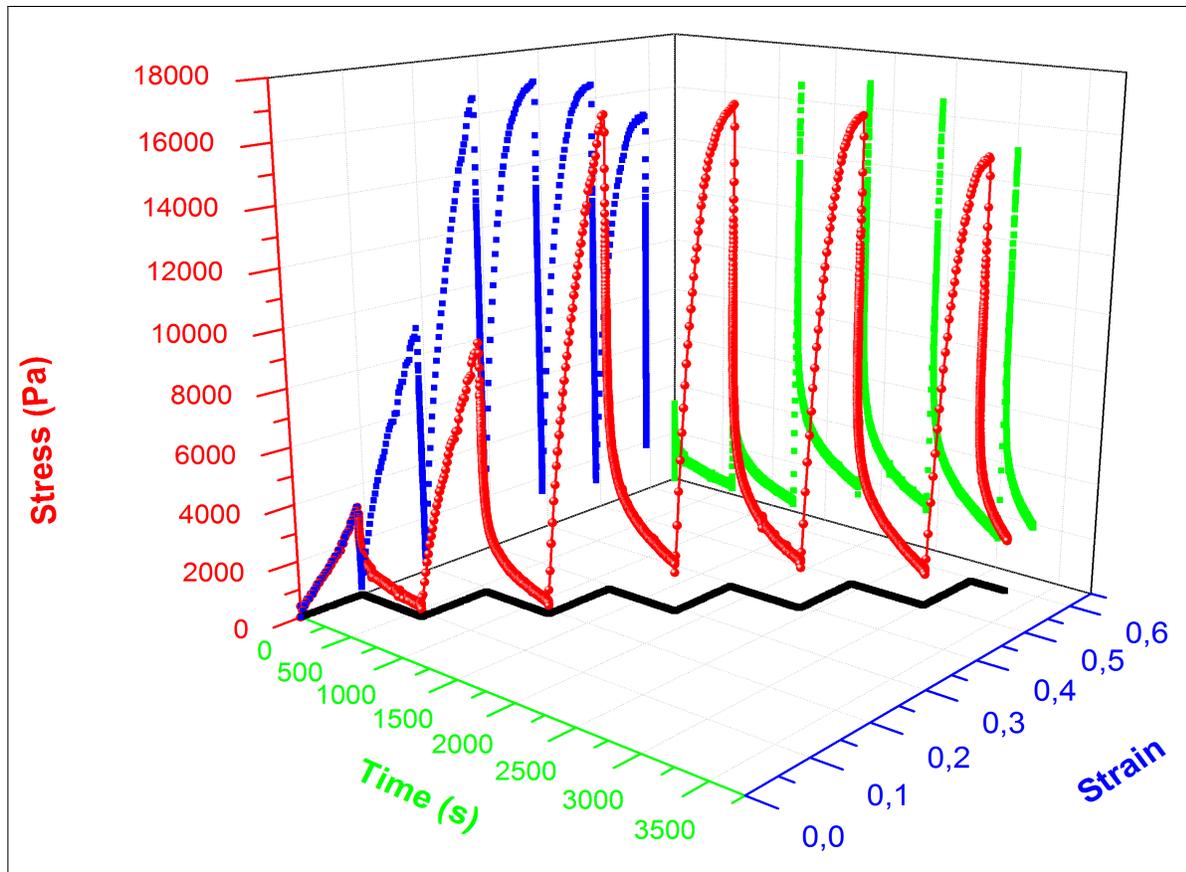


FIGURE 4.6 – Typical values of stress obtained during circumferential incremental stress relaxation tests (red curve). Arterial constructs, cultured statically for one week, were stretched to 10 % strain at a rate of $5 \text{ \%} \cdot \text{s}^{-1}$ and hold at this value. Stress relaxation was recorded for 600 s. The same procedure was performed at each subsequent 10 % strain until failure. The green curve corresponds to the stress-time projection, the blue curve to the stress-strain projection and the black curve to the strain-time projection.

promote the adhesion and proliferation of endothelial cells and SMCs (Rajan et al., 2006; Boccafoschi et al., 2005). In subsequent studies, we developed a custom-made rotating device for the direct assembling of collagen gels and cells in a cylindrical geometry and showed that one week culture in this condition yielded cells-colonized structures with good biological and hematological properties and finally improved mechanical properties in terms of compliance. Atomic force microscopy (AFM), SEM and confocal images showed the high contractile activity of SMCs embedded in a collagen matrix (Amadori et al., 2007).

In the present article, SMCs-colonized collagen gels with a tubular configuration were prepared and cultured in static bioreactors that allowed high diffusion of culture medium and improved gas-exchange. By culturing these vascular constructs without any external dynamic stimulation we aimed to identify the relationships existing between the cell-driven remodeling process, the structural characteristics of the constructs and their mechanical properties, highlighting the importance of static

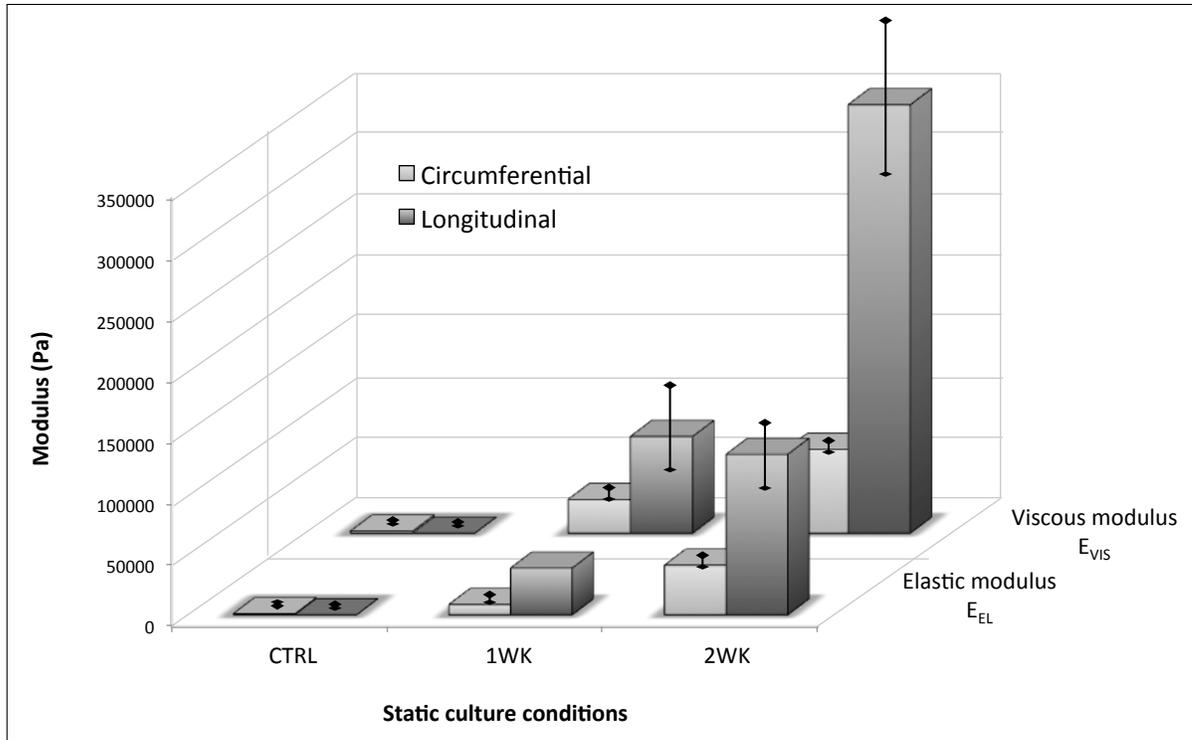


FIGURE 4.7 – Elastic and viscous moduli of the arterial construct as a function of time of culture. CTRL corresponds to the collagen gel scaffold statically cultured for two weeks. Stress relaxation tests were performed on the samples either in the circumferential or in the longitudinal directions.

maturation in vascular tissue engineering.

The contractile phenotype of smooth muscle cells through static culture

Metabolic activity was measured on the cells-colonized collagen gels during static culture. These structures exhibited the same metabolic activity throughout the static maturation. The metabolic activity is an indicator of the cells functionality and thus by extrapolation the cells number. Hence no proliferative behavior could be evidenced on the constructs throughout the static culture (Figure 4.5), which could be the result of a contractile phenotype of the SMCs. Indeed, SMCs can adopt many phenotypes from the synthetic one to the contractile together with intermediate states (Rensen et al., 2007; Alford et al., 2011). During remodeling, the change of cells phenotype is highly probable. This phenomenon can be observed through a change of morphology : spindle-shape for elongated contractile SMCs to the rhomboid morphology for synthetic SMCs. Many evidences tend to support this change of phenotype during the static remodeling process. Actually, when they were cultured in standard flasks for cell expansion, SMCs had a rhomboid morphology characteristic of synthetic phenotype (data not shown). However, the rapid shift to the contractile phenotype was evidenced by the rapid contraction of the arterial construct during the early hours after the gelation and throughout the whole static culture process (Figure 4.3). Moreover, after the period of static culture, SMCs were

more elongated with a spindle-shape, characteristic of contractile phenotype as shown by histological and SEM images (Figure 4.4). Ultimately, the results of cellular viability, the contractile activity and the change of morphology are some clues that converge to a hypothetical contractile phenotype. This change in cells phenotype during static culture and the related high contractile capability had a great impact on the tissue organization.

Collagen and matrix reorganization during static culture

Many works have shown the large contractile potential of SMCs and their ability to compact biological matrices such as collagen (Bell et al., 1979; Chen et al., 2008; Guidry and Grinnell, 1985; Brinkman et al., 2003; Lee et al., 1998; Zaman, 2013). However, few studies focused on the possibilities of directing this compaction toward a highly organized tissue (Seliktar et al., 2003; Isenberg and Tranquillo, 2003). Herein, static maturation of tubular SMCs-colonized collagen gels led to strong gel compaction around the mandrel, as shown in Figure 4.3, clearly confirming the results reported in literature for similar systems. But looking in detail to the organization of the constructs by histology and SEM images, a specific cells orientation in the longitudinal direction (that was not present at the beginning of the culture) could be observed. Interestingly, a deeper look to the stained construct reveals a slight gradient of cells density throughout the wall with higher density in the lumen (Figure 4.4-E to -H). Numerous studies have shown that cell migration can be influenced by the rigidity and the topography of the surface. In particular, these works show that cells tend to migrate toward surfaces of higher rigidity, such as the rigid mandrel (Wong et al., 2003; Engler et al., 2004). Hence, this durotaxis phenomenon might explain the observation of the progressive migration of SMCs toward the lumen of the construct. Moreover, it is evident that also collagen fibrils adopted a similar preferential orientation in the longitudinal direction revealing an intimate connection between collagen fibrils and cells (Guidry and Grinnell, 1985). Our results differ from previous works performed on similar systems. In fact, Tranquillo, Barocas *et al.* (Isenberg and Tranquillo, 2003; Tranquillo et al., 1996; Barocas et al., 1998; Girton et al., 2002) showed that the presence of a mandrel had a great impact on the orientation of cells and collagen fibrils. But in that case, cells and collagen fibrils tended to orientate in the circumferential direction. They noticed that the presence of the mandrel resulted in a higher compaction in terms of length and thickness compared to the samples cultured in the absence of a mandrel. In light of these considerations, the present work reveals the important role of grips on the maturation of the construct. In fact, the orientation of the SMCs and subsequently of the collagen fibrils is not directed only by the presence of the mandrel but above all by the presence of the grips. Upon contraction, the grips create a longitudinal tension that forces the cells to orientate in that direction. Interestingly, a similar behavior was recently observed for tubular cell-sheets of neonatal human dermal fibroblast cultured directly on a non-porous synthetic tube (Weidenhamer and Tranquillo, 2013). Cells tended to align in the longitudinal direction when the growing structure was constrained with grips the extremities and in the circumferential direction when not constrained. Finally, this reorganization of cells and collagen fibrils had a great impact on the reinforcement of the constructs.

Anisotropic mechanical reinforcement during static culture

The mechanical set-up and the grips were specifically designed for handling and subdue the cellularized collagen gels to a circumferential or longitudinal tension or for fixation to a dynamic bioreactor for further stimulations. This unique system allowed us to measure the mechanical and viscoelastic properties of collagen gels with tubular shape through stress relaxation tests. Generally speaking, the remodeling process during static culture generated an important increase in the elastic and viscous behaviors of the constructs. By pulling the collagen fibrils, cells compacted the collagen matrix and water was expelled. This process yielded a denser material with subsequent higher mechanical properties (more than 30 fold increase in the elastic modulus after two weeks of culture).

Additionally, stress relaxation tests revealed the anisotropic mechanical and viscoelastic properties of these cells-remodeled collagen gels. Particularly, the elastic modulus was close to 3 times higher in the longitudinal direction than in the circumferential direction (Figure 4.7). Consequently, in the present case, the elastic contribution of the cytoskeleton of SMCs to the overall mechanical properties of the arterial construct would be even more important when cells are aligned in the direction of the mechanical solicitation (Sarma, 2011; Legant et al., 2010; Lai et al., 2013; Halpern et al., 1978). The viscoelastic properties of collagen fibrils would also contribute more to the overall viscoelastic properties of the material in this specific direction since collagen fibrils tend to adopt the same orientation as the cells (Baaijens et al., 2010; Harris et al., 1981; Stopak and Harris, 1982; Sawhney and Howard, 2002).

Stress relaxation tests allowed the assessment not only of the elastic component (time independent) but also of the viscous component (time dependent) of the mechanical behavior of these structures as a function of time of culture. Similarly to the elastic modulus, the viscous modulus increased more than 30 fold after two weeks of static culture. A closer look to the viscoelastic modulus shows that the viscous response of the material against the mechanical solicitation is becoming more important as the time of static culture increases (Figure 4.7). The viscous contribution of collagen fibrils involves friction occurring when fibrils slip pass each other as a result of the stress solicitation. The evolution of the viscoelastic modulus as a function of time may be related to collagen fibrils that gradually orientate closer to the longitudinal direction as long as the static culture is ongoing.

4.7 Conclusion

Natural tissues are known to exhibit anisotropic characteristics in terms of tissue organization and structural stability. In the prospect of regenerating such tissues, this work sheds light on the unique relationship between cellular activity, structural tissue organization and resulting mechanical properties when combining the amazing remodeling potential of SMCs to the biological performance of collagen, as main component of the ECM. Since these structures cannot withstand any external dynamic mechanical stimulation at the early stage of maturation, one week static maturation in a specifically designed bioreactor constitutes a simple and fast procedure to generate media-like structures with 1)

preferential orientation of cells and collagen fibrils, 2) higher mechanical properties compared to the non-cellularized collagen gel scaffolds allowing mechanical stimulation inside dynamic bioreactors and 3) targeted anisotropic mechanical and viscoelastic properties that are related to the cell-driven ECM remodeling. In future studies, a multilayered endothelialized construct subjected to further mechanical stimulations is expected to further improve this model of media-equivalent in terms of mechanical properties and tissue organization.

4.8 Acknowledgements

The authors would like to thank Daniele Pezzoli, Bernard Drouin, Nina Bono, Caroline Loy and Lucie Levesque for their advice during revision of the manuscript. The authors express their gratitude to the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the CHU de Québec Research Center (Regenerative Medicine Division), the Canadian Institutes of Health Research and the Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQS) for partially funding this research. Dawit G. Seifu was recipient of a postdoctoral fellowship from NSERC CREATE program for regenerative medicine (NCPRM), and co-supervised by Dr. Larry D. Unsworth (University of Alberta) and Kibret Mequanint (University of Western Ontario).

Chapitre 5

Discussion Générale

Ce chapitre présente une vue d'ensemble de la thèse en mettant en évidence l'originalité et la pertinence de la démarche scientifique adoptée et en focalisant sur les résultats majeurs de cette thèse. Après un bref retour sur le contexte dans lequel s'inscrit ce projet, la discussion portera sur les apports de la mise au point d'outils de caractérisation des propriétés mécaniques et viscoélastiques spécifiques des structures à base de collagène. Ainsi, **les chapitres 1 et 2 ont permis de montrer que les tests mécaniques des constructions vasculaires devraient être réalisés dans une solution pseudo-physiologique (PBS à 37°C) et que les tests de relaxation de contrainte permettent d'accéder au module élastique** de la construction. Par la suite, la discussion s'orientera sur le potentiel des cellules musculaires lisses à remodeler les matrices naturelles. En effet, comme présenté dans **le Chapitre 3**, ce processus de remodelage cellulaire fut permis par le développement de systèmes de mise en forme et de caractérisation spécifiques aux structures tubulaires de collagène colonisées par des CMLs. **Le Chapitre 4**, quant à lui, **a permis de montrer que le remodelage cellulaire s'accompagne d'un impressionnant renforcement mécanique et d'une importante réorganisation de la matrice et des cellules**, et met finalement l'accent sur **la relation structure-propriétés** primordiale dans la stabilité des tissus biologiques. Ce chapitre se terminera par les limites, selon l'auteur, de la stratégie adoptée et sur la suggestion de pistes de recherche en continuité du présent projet et ce, dans le but de réaliser *in vitro* des modèles de tissus biologiques vivants toujours plus proches des tissus naturels.

5.1 Les gels de collagène en tant qu'échafaudages pour le génie tissulaire vasculaire

Dans les années 70, Elsdale et Bard ont introduit la notion selon laquelle la culture tridimensionnelle des cellules sur des structures à base de collagène offrirait un environnement plus physiologique comparée à la culture 2D des cellules directement sur des surfaces rigides, telles que le plastique des boîtes de Pétri (Elsdale and Bard, 1972). Ainsi, dès les prémises du génie tissulaire vasculaire dans le milieu des années 80, les matrices naturelles, telles que le collagène, sont apparues comme des matériaux de

choix pour aider les cellules à créer un nouveau tissu en laboratoire. Par opposition aux polymères synthétiques, le gel de collagène constitue un environnement spatial, mécanique et biologique propice à la culture 3D des cellules à plusieurs égards :

- En tant que principale composante de la matrice extracellulaire, le collagène de type I fournit à la fois les signaux biologiques nécessaires à l'adhésion et à la prolifération cellulaires, mais également à la liaison de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire (comme la fibronectine) et constitue ainsi un vecteur de transmission des stimulations mécaniques pour les cellules.
- L'ensemencement des cellules se fait en même temps que le processus de fibrillogénèse (menant à la gélification) en mélangeant directement les cellules avec la solution de monomères de collagène.
- La forme du gel peut être adaptée à celle du tissu à reproduire.
- La forte teneur en eau des gels de collagène favorise la diffusion de nutriments aux cellules et une porosité optimale pour la prolifération des ces dernières.
- La matrice de collagène peut être dégradée, réorganisée et remplacée par les cellules qui sécrètent une nouvelle matrice extracellulaire. De plus, les produits de dégradation n'engendrent qu'un faible risque de réaction immunogène ou autre complication chez l'hôte.
- Cette matrice est suffisamment souple et compliant pour être déformée par la faible force générée par les cellules (de l'ordre de quelques nano-Newton).

Ces propriétés mécaniques et biologiques en font un substrat qui est extrêmement susceptible d'être remodelé par les cellules. Comparée aux deux principales stratégies de génie tissulaire, à savoir l'utilisation d'un échafaudage synthétique en tant que support de la régénération ou la méthode d'auto-assemblage (voir Section 0.4.2), l'utilisation d'une matrice naturelle constitue donc une voie intermédiaire combinant les avantages des 2 précédentes stratégies. En effet, la matrice de collagène a une fonction prépondérante d'échafaudage consistant à supporter et à guider les cellules dans les premiers temps de culture. Dans un deuxième temps, la souplesse de ce réseau de protéines permet aux cellules de s'auto-organiser et de remodeler le tissu en croissance en un court temps de culture. Ces caractéristiques particulières expliquent pourquoi les structures à base de collagène ont eu un tel succès dans la construction d'un modèle de *media* de vaisseau sanguin.

Cependant, le facteur le plus limitant à l'utilisation de ces structures en tant que modèles de tissus biologiques reste leurs faibles propriétés mécaniques. Effectivement, ces matériaux sont tellement instables qu'ils s'affaissent sous l'effet de leur propre poids lors du démoulage (Cheema and Brown, 2013). Bien que présentant des structures identiques, le collagène naturel et le collagène reconstitué présentent des comportements mécaniques bien différents. En effet, le processus d'extraction du collagène de type I depuis les tendons de queues de rats affecte grandement l'organisation naturelle des fibrilles de collagène, leur densité, et rompt des liaisons aux niveaux moléculaire et supra-moléculaire. En conséquence, ces structures, n'ayant que peu de comportement élastique, ne sont pas capables de supporter la moindre stimulation mécanique dans un bioréacteur.

Dans l'optique de concevoir des structures totalement biologiques, la possibilité d'utiliser un élément synthétique de renfort est alors exclue. Dès lors, la restauration d'une partie de ces propriétés élastiques passe soit par l'introduction de nouvelles réticulations entre les fibrilles de collagène, soit par une réorganisation de la matrice, voire même par une combinaison de ces 2 techniques. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est, dans un premier temps, d'établir les techniques de caractérisation mécanique et les conditions de tests les plus appropriées pour la mesure des propriétés viscoélastiques des structures de collagène. Dans un deuxième temps, les travaux présentés dans cette thèse visent à évaluer l'effet de l'augmentation de la densité de réticulation des gels de collagène par leur exposition aux radiations UV et de la réorganisation de la matrice lors du remodelage cellulaire sur les propriétés viscoélastiques de ces structures à base de collagène.

5.2 Développement de techniques de mise en forme et de caractérisation spécifiques aux gels de collagène

À de nombreux titres, les gels de collagène sont des matériaux non conventionnels à caractériser, tant du point de vue mécanique que biologique. Une bonne partie de ce projet doctoral a été consacrée à la conception et à la mise en place d'outils de caractérisation à la fois biologique et mécanique des gels de collagène, des protocoles et des dispositifs expérimentaux associés. Sur le plan biologique, les structures de collagène forment un réseau tridimensionnel qui peuvent souvent emprisonner, limiter la diffusion, voire interagir avec des molécules d'intérêt pour la caractérisation de la viabilité cellulaire ou du décompte cellulaire par exemple. De même, les techniques d'imagerie doivent souvent être adaptées au cas des gels de collagène pour les raisons précédemment mentionnées mais également du fait de leur importante épaisseur.

Sur le plan mécanique, la caractérisation des gels de collagène est compliquée par le fait que ces matériaux soient biphasés, c'est-à-dire, constitués de fibrilles, faiblement reliées entre elles, et largement diluées dans plus de 99 % d'eau en masse. En effet, ces caractéristiques en font des matériaux non-linéaires aux fortes propriétés viscoélastiques. Lors de la réalisation de n'importe quel type de tests mécaniques et, particulièrement pour les matériaux biologiques mous, une attention toute particulière doit être accordée à la géométrie et au mode d'attache de l'échantillon, deux paramètres qui peuvent affecter la répartition des charges. De plus, la géométrie doit être choisie de sorte à assurer que la distribution des contraintes est indépendante du mode d'application des charges. Dans ce sens, une fixation efficace de l'échantillon à l'instrument de mesure passe par une technique d'attache qui minimise les concentrations de contrainte à l'interface entre l'échantillon très fragile et le système d'ancrage tout en serrant suffisamment fortement pour éviter le glissement de l'échantillon ultra-hydraté (Ng et al., 2005).

Dans le cadre de ce projet, ces principes ont été pris en compte dans la conception des outils de caractérisation mécanique et ce, de sorte à affecter le moins possible le comportement mécanique de l'échantillon et d'obtenir des données significatives et reproductibles. Or, tout comme il n'existe pas

de norme pour la caractérisation mécanique des gels de collagène, aucun appareil commercial n'est adapté pour tester ce type de matériaux extrêmement délicats. Effectivement, la simple manipulation des gels les déforme et leur fait perdre une bonne partie de leur contenu en eau (Brown et al., 2005). Afin de contourner cette complication lors de l'étude des propriétés mécaniques et viscoélastiques des échafaudages seuls, traités ou non aux UVs (Chapitres 1 et 2), des moules ont été conçus pour donner aux gels une forme en anneau, géométrie plus facile à manipuler. De sorte à éviter tout dommage lors du démoulage, celui-ci était réalisé dans un bain de PBS et le silicone, polymère très souple, a été choisi comme matériau pour ces moules. Des systèmes d'accroche ont alors été conçus pour transporter et fixer le plus rapidement le gel à l'instrument de mesure (Figure 0.6). Les supports cylindriques fixés à l'appareil et permettant d'étirer l'anneau de collagène sont constitués d'un cylindre de Téflon, reposant sur une tige en acier inoxydable ; des roulements à bille en céramique faisant la jonction entre les deux précédents éléments permettent la rotation du support afin de balancer les charges entre les deux extrémités de l'anneau de collagène.

Dans le souci d'améliorer la signification statistique et la reproductibilité des résultats, un environnement pseudo-physiologique a été mis en place. Il consiste en un bain de solution saline (PBS) d'un volume optimisé pour maximiser l'accessibilité lors de la fixation de l'échantillon et minimiser le volume de solution. Une pompe permet de faire circuler en continu le PBS maintenu à 37°C par une résistance reliée à un système de contrôle de la température. Ce dernier permet également de contrôler la vitesse de montée en température (utile dans le cadre d'étude de température de dénaturation des protéines) (Figure 3.6).

Puis, le potentiel du remodelage cellulaire dans le renforcement des matrices de collagène a été étudié. Pour cela, la Section 3.6 présente comment un bioréacteur dit "statique" a été mis en place dans le but de cultiver une construction vasculaire dans un milieu de culture spécifique aux CMLs. Ce bioréacteur a été conçu pour offrir un environnement de culture stérile optimal aux CMLs. Ainsi, le réservoir offre un volume suffisant de milieu de culture assurant la diffusion des nutriments nécessaires à l'activité cellulaire et les filtres placés sur le côté du réservoir ainsi que sur le bouchon participent à l'échange gazeux avec l'incubateur (37°C, 5 % de CO₂ et 100 % d'humidité). Les accroches à base de gaze chirurgicale présentes sur le mandrin jouent un rôle central dans la performance du bioréacteur statique. Elles ont en effet plusieurs fonctions : **(1)** Éviter la contraction longitudinale de la construction vasculaire au cours de la culture ; **(2)** Faciliter le démoulage et la manipulation de l'échantillon à la fin de la culture (Section 2.4.) ; **(3)** Faciliter la fixation de l'échantillon tubulaire à l'instrument de mesure mécanique lors des tests en direction longitudinale ; **(4)** Faciliter la fixation de la construction vasculaire à un bioréacteur à perfusion pour l'éventuelle culture sous stimulation dynamique (Section 0.10 - F1).

Par la suite, afin de mettre en évidence l'anisotropie des propriétés mécaniques des structures tubulaires de collagène remodelées par les cellules, il a été nécessaire de réaliser les mesures dans différentes directions de sollicitation, en l'occurrence, dans les directions circonférentielle et longitudinale du tube. Ainsi, les tests dans la direction circonférentielle ont été réalisés d'une manière très simi-

laire à ceux réalisés dans l'étude des échafaudages seuls, à savoir sur des anneaux d'environ 1 cm de largeur découpés depuis les constructions tubulaires. Une attention toute particulière a été portée à endommager le moins possible l'échantillon lors de la découpe des anneaux. L'utilisation d'une paire de ciseaux ou d'un scalpel aurait engendré forcément une pression et des irrégularités dans la coupe, qui auraient été autant de zones de concentration de contrainte fragilisant l'échantillon. Afin d'éviter cela, la construction a été montée sur un tube en plastique servant de support et la coupe réalisée à l'aide d'un coupe-cigare, procurant une coupe franche et nette (Figure 3.7, b). Les tests de relaxation longitudinale, quant à eux, furent réalisés directement sur les tubes. Pour cela, un système de fixation pouvant recevoir un mandrin a été adapté à l'appareil de mesure. Les constructions tubulaires furent montées sur des mandrins par les attaches à base de gaze chirurgicale présentes à leurs extrémités puis fixées sur l'appareil de tests mécaniques (Figure 3.7, b et c).

Enfin, les structures de collagène remodelées par les cellules étant manipulables, il était intéressant de pouvoir les endothélialiser pour ainsi affiner le modèle vasculaire. Pour cela, le bioréacteur statique a été quelque peu modifié au niveau du bouchon non seulement pour accueillir et maintenir la construction vasculaire dépourvue de son mandrin, mais également pour fixer le bioréacteur à un moteur rotatif. Une base montée sur des roulements à billes a été ajoutée pour accueillir le bioréacteur rotatif (Figure 3.8). Après avoir recouvert la lumière de la construction vasculaire d'une fine couche de Matrigel, l'endothélialisation de ces structures pouvait être réalisée en ajoutant une solution de CEs et en mettant le tout en rotation pendant 48 h dans un incubateur (37°C, 5 % de CO_2 et 100 % d'humidité).

Somme toute, le développement de ces dispositifs fut essentiel pour la réalisation des études sur les propriétés mécaniques et viscoélastiques des échafaudages de collagène et des constructions vasculaires présentées dans cette thèse et ce, avec des résultats significatifs et reproductibles.

5.3 Propriétés mécaniques et viscoélastiques des échafaudages de collagène

Dans la littérature, les conditions dans lesquelles sont testés les tissus biologiques sont très disparates et rendent très difficiles les comparaisons entre les études. Face à ce manque de normes en la matière, une étape nécessaire avant d'étudier le renforcement des structures de collagène fut d'établir les meilleures conditions, en termes d'environnement de tests et de techniques de caractérisation, pour déterminer les propriétés mécaniques et viscoélastiques d'échafaudages à base de gels de collagène.

5.3.1 Origine du comportement viscoélastique du collagène

La viscoélasticité est une caractéristique essentielle du comportement mécanique d'un tissu biologique qui est mise en jeu dès lors qu'une déformation lui est appliquée. Ainsi, lors de la mise sous tension de l'échantillon au cours du test de relaxation, les réponses instantanée (élastique) et retardée ou dépendante du temps (visqueuse) sont engagées et doivent être mesurées, complexifiant l'analyse

des propriétés mécaniques. Le stockage d'énergie sous forme élastique impliquerait l'élongation élastique des triple hélices de collagène réticulées présentes. Ainsi, l'énergie stockée sous forme élastique est associée à des changements conformationnels dans la triple hélice de collagène qui auraient pour origine des répulsions électrostatiques entre groupements de même charge dans la séquence d'acides aminés de la chaîne α du collagène. Ceci explique le fait que le module élastique augmente avec une diminution de force ionique (favorisant les répulsions électrostatiques). Bien que la molécule de triple hélice de collagène ait la forme d'un bâtonnet, elle présente de nombreuses zones de courbures et de points de flexion. Des études de modélisation ont montré que la molécule de collagène est constituée d'une alternance de domaines flexibles et de domaines rigides. Les domaines flexibles correspondent approximativement aux bandes claires dans la périodicité D observée sur des images de microscopie à force atomique (Amadori et al., 2007). En fait, ces domaines contiennent peu d'imino-acides, tels que la proline et l'hydroxyproline, et semblent se déformer quand une contrainte mécanique extérieure est appliquée (Freeman and Silver, 2004; Silver et al., 2002b; Fratzl, 2008a). L'augmentation de température accentue la mobilité de ces domaines flexibles, entraînant une diminution du module élastique.

Lors de la relaxation de contrainte, les fibrilles de collagène glissent les unes par rapport aux autres produisant le phénomène de friction ou de relaxation visqueuse. Des tendons de queues de rats, qui ont un comportement viscoélastique très similaires au collagène reconstitué, ont été mises sous tension et le déplacement axial par acide aminé le long de la chaîne de collagène, désigné par le paramètre h , et la périodicité D typique du collagène ont été suivis en fonction de la déformation macroscopique. Il a été montré que la périodicité D caractéristique du collagène augmente avec l'étirement de tendons de queues de rats et ce, de manière bien plus importante que pour la valeur du déplacement axial h . Ainsi, à chaque 10 % de déformation macroscopique, la valeur du paramètre h n'augmente que de 1 %. Par conséquent, près de 90 % de la déformation appliquée au tendon peut être attribuée au glissement des molécules et des fibrilles de collagène les unes par rapport aux autres (Fratzl, 2008a).

Pour résumer, **l'énergie mécanique est emmagasinée sous la forme d'élongation des hélices de collagène, et la dissipation visqueuse de cette énergie mécanique se produit lors du glissement des fibrilles les unes par rapport aux autres lors de la déformation du tissu.**

5.3.2 Influence de l'environnement sur les propriétés viscoélastiques

Dans le chapitre 1, les échafaudages de collagène furent caractérisés par des tests de traction, technique de caractérisation mécanique la plus répandue. Essentiellement, ce Chapitre a permis de mettre en évidence l'impact majeur d'un environnement pseudo-physiologique sur les propriétés mécaniques des gels de collagène. Ainsi, lorsque la caractérisation est réalisée à l'air libre à température ambiante plutôt que dans un bain de solution saline (PBS) à 37°C, une surestimation du module linéaire de 20 à 30 % et une sous-estimation de plus de 40 % sur la déformation à la rupture sont réalisées (Figure 1.4).

Pour aller plus loin dans la compréhension de ce phénomène de plasticité due à la présence du bain, **le chapitre 2** s'attache à déterminer l'effet de différents facteurs associés au protocole expérimental. Cependant, il est très vite apparu essentiel d'évaluer le module élastique de ces structures de collagène, destinées à être placées sous stimulation mécanique dynamique et cyclique. Dans cette perspective, les mesures de relaxation de contrainte se sont très vite imposées comme des tests adéquats et faciles à mettre en oeuvre pour étudier les propriétés viscoélastiques des gels de collagène. Les facteurs retenus furent la température (T), l'état d'hydratation (H, en présence ou en l'absence de PBS) et le conditionnement mécanique (C, avec ou sans pré-conditionnement mécanique). De manière générale, ces facteurs ont un effet sur les interactions moléculaires et supramoléculaires entre les fibrilles de collagène. De plus, le conditionnement mécanique (consistant en plusieurs cycles de déformation de faible amplitude avant le test de traction) est reconnu pour diminuer la variabilité de la réponse mécanique des échantillons biologiques, variabilité liée à la présence de contraintes internes. Afin de réaliser une étude statistique valide, une expérience factorielle a été mise en place avec les 3 facteurs (T, H et C), chacun ayant 2 niveaux pour un total de 8 conditions à étudier (Tableau 2.2). Les tests ont été réalisés à la fois en traction et en relaxation de contrainte pour comparer les deux techniques. Afin d'augmenter la puissance de l'étude statistique, 5 à 8 échantillons par condition furent testés pour un total d'environ une centaine d'échantillons.

Globalement, les tests de traction ont permis de retrouver des résultats similaires à ceux de la précédente étude, avec une forte surestimation de la valeur du module linéaire lorsque testé à l'air libre. Le module élastique des structures de collagène a pu être déterminé par les résultats des tests de relaxation de contrainte analysés en modélisant le comportement viscoélastique par des éléments de Maxwell mis en parallèle. De manière plus détaillée et en considérant le module élastique, ces résultats ont montré une influence prépondérante de la température et un effet plus modéré mais significatif de l'état d'hydratation (Figure 2.9). En effet, l'augmentation de la température augmente la mobilité moléculaire et diminue les interactions moléculaires engendrant une réduction des comportements visqueux et élastiques. La présence du PBS offre un environnement aqueux et maintient un pH et une force ionique constants. Les ions présents dans la solution saline viennent s'adsorber sur les résidus chargés des protéines et réduisent donc les interactions électrostatiques (attractives et répulsives) entre les groupements chargés. Ainsi, à faible concentration, les ions occultent la répulsion des groupes de même charge (phénomène d'écran) et, à plus forte concentration, ces ions occultent également l'attraction entre groupes de charge différente. Lorsque les tests sont effectués dans la solution saline, la force ionique du gel (plus forte que celle du PBS) est amenée à diminuer par effet osmotique. Les résultats montrent que l'effet rigidifiant de la diminution de la force ionique l'emporte sur l'effet inverse plastifiant de l'environnement aqueux (Figure 2.9). Le pré-conditionnement mécanique, quant à lui, n'a eu que peu d'effet sur le module élastique et un effet modéré mais significatif sur le module visqueux (Figure 2.9). Ceci s'explique certainement par le fait qu'après le préconditionnement mécanique, les fibrilles de collagène sont déjà étirées et orientées dans la direction de sollicitation, ne pouvant plus que glisser les unes par rapport aux autres lors du test de relaxation, d'où la réponse visqueuse accrue. En revanche, le préconditionnement mécanique n'a pas eu l'effet de diminuer la

variabilité de la réponse comme escompté, confirmant les observations de Wagenseil *et al.* qui ont également travaillé sur des gels de collagène (Wagenseil *et al.*, 2003). Un résumé de l'effet de chacun des facteurs étudiés sur le comportement viscoélastique des gels de collagène est présenté dans le Tableau 5.1.

Pour résumer, ces travaux ont permis de définir les conditions utilisées pour mesurer les propriétés mécaniques et viscoélastiques des gels de collagène dans le cadre de cette thèse, à savoir par des tests de relaxation de contrainte dans un environnement pseudo-physiologique (PBS à 37°C).

Facteur	T ↑ 23°C → 37°C	H Sans PBS → Avec PBS	C Sans PC → Avec PC
Paramètre $\eta = E_V \times \tau$	$\eta \downarrow$ ⊖ interactions, glissement facilité car ⊖ frottement ⊖ visqueux	$\eta \uparrow$ I ↓, interactions ↑, glissement ⊕ limité ⊕ visqueux	$\eta \downarrow$ Interactions ↓ (quelques liaisons faibles rompues) ⊖ visqueux
E_V Dépend de la vitesse de sollicitation	$E_V \downarrow$ ⊖ interactions, glissement facilité car ⊖ frottement ⊖ visqueux	$E_V \uparrow$ I ↓, interactions ↑, glissement ⊕ limité ⊕ visqueux	$E_V \downarrow$ Interactions ↓ (quelques liaisons faibles rompues) ⊖ visqueux
E_E Ne dépend pas de la vitesse de sollicitation, correspond à la rigidité aux faibles déformations (due à la mobilité moléculaire et angulaire)	$E_E \downarrow$ ⊖ interactions, ⊖ de résistance à la traction ⊖ rigide	$E_E \uparrow$ I ↓, interactions ↑, ⊕ de points de résistance à la traction ⊕ rigide	$E_E = cste$ Pas d'effet sur la mobilité moléculaire
τ	$\tau \downarrow$ ⊖ interactions, glissement entre les chaînes ⊕ rapide	$\tau \uparrow$ I ↓, interactions ↑, glissement entre les chaînes ⊖ rapide	$\tau \downarrow$ Interactions ↓ (quelques liaisons faibles rompues)

Tableau 5.1 – Tableau présentant l'effet qualitatif d'un environnement pseudo-physiologique sur les principaux paramètres liés à la viscoélasticité des gels de collagène, à savoir la viscosité η , le module visqueux E_V , le module élastique E_E et le temps de relaxation τ . Les facteurs environnementaux étudiés sont la température (T), l'état d'hydratation (H, en présence ou en l'absence de PBS) et le conditionnement mécanique (C, avec ou sans pré-conditionnement mécanique). I désigne la force ionique.

5.3.3 Renforcement des propriétés mécaniques par les UVs

Dans un tissu biologique, la quantité d'énergie emmagasinée et dissipée est étroitement liée à l'architecture de la matrice extracellulaire, à la quantité de collagène et de cellules contenues dans le tissu, et à la structure organisationnelle et hiérarchique du collagène dans ce tissu. Les techniques de réticulation permettent de jouer sur la microstructure des matrices biologiques et la réticulation entre fibrilles de collagène favorise le stockage d'énergie sous forme élastique (Fratzl, 2008a).

Les résultats présentés dans **le chapitre 1** de cette thèse montrent que les réticulations induites par l'exposition des gels de collagène aux UVs permet de renforcer la stabilité de ces structures. En effet, le traitement aux UVs a permis d'augmenter le module linéaire de près de 50 %. La mesure du taux de gonflement et de la résistance à la dégradation enzymatique montrent que l'augmentation de ces propriétés mécaniques est directement liée à la présence de réticulations induites par les UVs qui sont autant de points d'ancrage s'opposant à la mobilité moléculaire lors de sollicitations mécaniques. Cependant, il est à noter que ce renforcement mécanique est minime et qu'il rend les structures de collagène plus fragiles, à en juger par la baisse de la déformation à la rupture ϵ_R . De plus, le traitement UV a un effet dommageable pour les cellules soit par action directe, soit par la générations d'espèces oxydées réactives. Cela suppose des étapes supplémentaires dans la construction d'un tissu vasculaire, à savoir un rinçage des échafaudages préalable à l'ensemencement des cellules. Finalement, l'ensemencement des cellules suppose une longue période de culture pour que les cellules puissent pénétrer et coloniser l'ensemble de l'échafaudage.

Les traitements des gels de collagène par les agents de réticulation classiques afin de pouvoir soumettre ces structures sous stimulation dynamique dans un bioréacteur ne présentent donc pas le potentiel espéré. De cette observation a émergé l'idée d'offrir les conditions optimales de culture en statique aux CMLs dans le but d'utiliser au maximum leur fort potentiel à remodeler les matrices de collagène.

5.4 Renforcement des gels de collagène par remodelage cellulaire

La difficulté à reproduire l'architecture complexe des tissus naturels, notamment en termes d'alignement cellulaire et/ou de la MEC est une réelle limitation lors de la réparation et de la reconstruction tissulaires cliniques. C'est la raison pour laquelle, au niveau académique, de nombreuses techniques ont été étudiées pour reproduire de telles architectures et guider l'adhésion et la prolifération de cellules comme l'utilisation de fibres, de canaux, de surfaces avec différentes topographies ou avec différentes fonctionnalités, des champs magnétiques ou électriques, des gradients de vecteurs d'adhésion, etc. Dans cette optique, la capacité des cellules à remodeler des matrices de collagène peut être utilisée pour obtenir de telles structures.

Le remodelage cellulaire de structures de collagène désigne tous les changements structurels et dimensionnels des fibrilles de collagène induits par les cellules et qui peuvent affecter la stabilité de ce réseau (Seliktar et al., 2001). En conséquence, ce processus implique, entre autres, la synthèse, la dégradation et le réarrangement des protéines de la MEC par les CMLs (Ogle and Mooradian, 1999),

qui s'accompagnent d'un changement de dimensions macroscopiques et de propriétés mécaniques.

5.4.1 Réorganisation de la matrice lors du remodelage

À l'état naturel, le collagène contribue de manière prépondérante à la résistance des tissus biologiques. Le fait qu'il soit un élément majeur de renfort de tissus biologiques naturels aussi variés d'un point de vue mécanique que des tissus élastiques comme la peau, la cornée et les vaisseaux sanguins ou que des tissus mous comme le cartilage ou encore des tissus durs tels que les os, la dentine, les tendons et ligaments est essentiellement relié à l'organisation supramoléculaire des fibrilles de collagène qui est propre à chaque tissu. Cette organisation hiérarchique est intimement liée au mode de sollicitation mécanique du tissu concerné au sein de l'organisme vivant. Ceci a pour conséquence que la résistance mécanique de la plupart des tissus varie selon la direction de sollicitation. On parle alors d'**anisotropie à la fois structurale et mécanique**. Ainsi, lors de la régénération d'un tissu, un soin particulier doit être consacré à reproduire cet état organisationnel et à comprendre l'étroite relation avec l'anisotropie des propriétés mécaniques résultantes (Fratzl, 2008a).

Les **Chapitres 3 et 4** montrent comment le potentiel de remodelage de CMLs imprégnées dans une matrice de collagène peut être contrôlé et dirigé vers l'obtention d'une construction vasculaire aux propriétés mécaniques améliorées et anisotropes. Le remodelage d'un échafaudage de collagène de forme tubulaire a pu être suivi d'un point de vue macroscopique tout au long de la culture en statique en utilisant une caméra. Une importante contraction circonférentielle a ainsi pu être constatée avec près de 90 % de contraction en l'espace de 10 jours de culture (Figure 4.3). Cette contraction s'est accompagnée d'une impressionnante réorganisation des cellules et de la matrice de collagène. En effet, bien qu'homogène, la structure initiale de la construction vasculaire était isotrope avec des CMLs et des fibres de collagène orientées de manière aléatoire. Suite à la culture statique, les CMLs ont adopté une direction préférentielle, essentiellement longitudinale, et un gradient de densité de cellules pouvait être observé au travers de la paroi de la construction avec une plus forte concentration de cellules à proximité du mandrin (Figure 4.4). Ce remodelage cellulaire a abouti à un impressionnant renforcement mécanique, principalement par densification de la structure de collagène, avec un module élastique multiplié par un facteur 35 au bout de 2 semaines de culture. De plus, l'anisotropie d'organisation de la construction vasculaire a pu être reliée à une anisotropie en termes de propriétés mécaniques puisque le module élastique mesuré dans la direction longitudinale était 3 fois plus important que celui mesuré dans la direction circonférentielle (Figure 4.7). De manière similaire, le caractère visqueux de la structure a été renforcé au cours de la culture. Ceci pourrait s'expliquer par l'augmentation de la densité de collagène qui favoriserait les phénomènes de friction lors de la sollicitation mécanique (Silver, 2003).

Ainsi, selon le concept initial, les structures de collagène devaient être renforcées, notamment par des techniques de réticulation, avant d'accueillir les cellules, faute de stabilité suffisante pour leur manipulation. Finalement, le remodelage cellulaire constitue une alternative efficace de renfort et la culture statique apparaît comme une étape incontournable lors du développement de tissus biologiques

issus du génie tissulaire. De plus, la simple application d'une faible restriction mécanique au remodelage cellulaire, imposée par les attaches à base de gazes chirurgicales de manière appropriée, permet d'obtenir des équivalents de tissus aux propriétés anisotropes, essentielles pour les tissus biologiques naturels.

5.4.2 Importance de l'anisotropie dans le développement d'un modèle de tissu biologique

L'alignement des MECs et des cellules est une caractéristique commune à de nombreux tissus biologiques (le tissu conjonctif, le tissu musculo-squelettique, la peau, le cartilage, les tendons, le tissu neuronal, etc.) et cette anisotropie revêt une importance primordiale dans la fonctionnalité du tissu. Par exemple, la MEC de la sous-muqueuse de l'intestin grêle a une orientation en spirale tout comme les CMLs adjacentes permettant la contraction d'une manière telle que cela favorise le transport efficace de la biomasse. Ainsi, la caractérisation mécanique biaxiale de cette MEC met en évidence la relation entre propriétés mécaniques et orientation des fibres de collagène avec une plus grande résistance et un module tangent à la direction préférentielle des fibres (Badylak et al., 2009; Phillips, 2014).

Les vaisseaux sanguins sont également des tissus biologiques anisotropes aux propriétés viscoélastiques non linéaires. Dès 1969, les travaux de Patel et Fry ont révélé la nature anisotrope de l'arrangement du collagène dans des segments artériels de chiens (Patel and Fry, 1969). Il est communément admis que les CMLs sont disposées de manière hélicoïdale dans la plupart des vaisseaux sanguins, avec une prédominance dans la direction circonférentielle. Cependant, l'organisation des cellules et de la MEC des vaisseaux sanguins est multiple et dépend de la fonction et de la localisation de ces derniers dans l'arbre artériel (Pease and Paule, 1960; Silver et al., 2003; Dahl et al., 2007b; Standring, 2005). Ainsi, pour l'aorte abdominale et la veine cave de porcs, les données recueillies par Silver *et al.* (Silver et al., 2003) montrent que les modules élastiques et visqueux sont plus grands en longitudinal qu'en circonférentiel. Leur modèle propose un arrangement parallèle entre les fibres élastiques et les fibres de collagène. De plus, ils montrent que les fibrilles de collagène sont étroitement liées aux cellules musculaires lisses, de sorte que, lors des grandes déformations, la charge de la sollicitation est supportée conjointement par les fibrilles de collagène et les cellules musculaires lisses. Néanmoins, ils observent un phénomène inverse avec les carotides, qu'ils attribuent à un arrangement différent des composants précédemment cités. La contribution mécanique des cellules musculaires lisses dans les tissus biologiques est donc flagrante et a fait l'objet de plusieurs études (Herlihy, 1980; Sarma, 2011). Dans ce sens, les travaux de Herlihy *et al.* (Herlihy, 1980) ont par exemple montré que la contribution mécanique des cellules musculaires lisses dans les aortes de rats varie énormément selon la direction d'observation et que celle-ci est prépondérante dans la direction circonférentielle.

À la lumière de ces observations, une contribution mécanique des CMLs aux constructions vasculaires remodelées pourrait être avancée. En effet, cette contribution pourrait se faire de par les réticulations qu'elles peuvent créer (Brown, 2013) et de par leur orientation préférentielle. Ainsi, les points focaux d'adhésion à l'extrémité de leurs pseudopodes pourraient représenter autant de points de réticulation.

Ces points de réticulation renforceraient la réponse élastique de la structure de collagène en limitant la mobilité moléculaire des fibrilles de collagène. Le comportement élastique du cytosquelette des CMLs, provenant de la viscoélasticité et de la connectivité des éléments structuraux de la cellule (microtubules, filaments d'actine et filaments intermédiaires, etc.) pourrait même être invoqué et contribuer aux propriétés mécaniques dans la direction d'orientation préférentielle (Halpern et al., 1978; Legant et al., 2010; Lieber, 2002).

L'importance de la contribution mécanique des CMLs peut dépendre également de leur phénotype. Or, en cours de culture ou *in vivo*, les CMLs peuvent adopter différents phénotypes, à savoir les phénotypes synthétique et contractile, ainsi que les phénotypes intermédiaires. Une morphologie plutôt rhomboïde est associée à un phénotype synthétique, dans lequel les cellules prolifèrent, migrent et produisent plus de MEC. Les CMLs adoptant un phénotype plutôt contractile présenteront une morphologie plus allongée. Les CMLs sont très sensibles à leur environnement et peuvent changer très facilement de comportement. Ainsi, le phénotype des CMLs dépend de nombreux facteurs, dont notamment la composition de la MEC, la rigidité du substrat, des stimulations mécaniques, de la présence de facteurs de croissance, et de la géométrie du tissu (Alford et al., 2011). Dans le cadre de cette étude, l'observation des CMLs en microscopie électronique montre qu'elles adoptent une forme allongée après le remodelage des structures de collagène en culture statique (Figure 4.4-L). Cette morphologie fusiforme et cet arrangement parallèle très compact sont similaires à ceux rencontrés *in vivo*. Cela assure un transfert plus efficace des forces d'une cellule à l'autre. Dans les vaisseaux sanguins, cette communication cellulaire est renforcée par la présence d'une membrane basale interconnectée avec un réseau de fibres de collagène de type III (réticulaires) et de type I et d'élastine. Ces éléments, synthétisés par les cellules musculaires lisses elles-mêmes, font la jonction entre les cellules et assurent la continuité mécanique à travers le tissu (Standring, 2005). De plus, il est reconnu que les CMLs produisent peu de MEC lorsqu'imprégnées dans un gel de collagène (Thie et al., 1991). Ainsi, il est fort probable que la morphologie observée corresponde à un phénotype contractile exprimé par les CMLs. La forte contraction de la structure de collagène (Figure 4.3) et la faible prolifération (Figure 4.5) convergent vers la même hypothèse, à savoir un phénotype plutôt contractile que synthétique. Un autre comportement intéressant de la construction vasculaire remodelée peut venir supporter cette hypothèse. Des anneaux obtenus à partir de constructions vasculaires cultivées en statique pendant 2 semaines manifestent un comportement contractile. En effet, lorsque ces anneaux, placés dans un bain de PBS à 37°C, sont coupés dans la direction longitudinale, ils ont tendance à se contracter et à se replier rapidement sur eux-mêmes (Video 1). Ceci n'est pas observé sur les tubes de collagène cultivés dans les mêmes conditions mais en l'absence de cellules. Un comportement similaire a été rapporté par le groupe de Tranquillo *et al.* (Isenberg and Tranquillo, 2003). Ce comportement, issu du remodelage cellulaire de la matrice de collagène, s'apparente au phénomène d'angle d'ouverture observé dans les vaisseaux sanguins naturels. En effet, lorsqu'une section de vaisseau sanguin est coupée dans le sens longitudinal et totalement déployée, cette section va progressivement se refermer jusqu'à adopter un certain angle d'ouverture. Ce phénomène bien décrit par Fung est attribué à la présence de contraintes résiduelles dans la paroi vasculaire et qui sont distribuées de manière non homogène (Fung, 1991).

Ainsi, dans les constructions vasculaires cultivées en statique, des contraintes résiduelles similaires, liées à la réorganisation du tissu, peuvent être invoquées.

Afin d'optimiser le développement d'un tissu biologique, l'objectif final de cette thèse était de produire une construction vasculaire tri-dimensionnelle de collagène colonisée par des CMLs aux propriétés mécaniques et viscoélastiques adéquates permettant sa manipulation et sa fixation sur un bioréacteur à perfusion pour des stimulations mécaniques. Le renforcement prépondérant dans la direction longitudinale de la construction vasculaire est de ce fait intéressante pour la fixation sur les supports du bioréacteur. Finalement, après 1 semaine de culture en statique, la construction vasculaire possède déjà les propriétés mécaniques minimales requises pour être soumises aux contraintes mécaniques minimales attendues dans le bioréacteur. Pour illustrer cela, un lien peut être établi entre la charge supportée par la construction vasculaire lors des tests de relaxation et la pression interne que celle-ci pourrait supporter dans un bioréacteur dynamique. En fait, la force circonférentielle sur la paroi de la construction vasculaire soumise à une pression interne p_{int} dans un bioréacteur dynamique peut être calculée à l'aide de l'Équation 5.1 suivante :

$$Stress = \frac{Load}{A} = \frac{2 \times l}{A} \times (\Delta p \times r_{int} - p_{ext} \times e) \quad (5.1)$$

où A , l , r_{int} , e sont respectivement la section de surface, la longueur, le rayon interne et l'épaisseur de la paroi de la construction vasculaire. Δp est la pression transmurale correspondant à la différence entre les pressions interne p_{int} et externe p_{ext} (Achilli et al., 2012). La pression externe p_{ext} dépend de la hauteur du milieu de culture au-dessus de la construction, facteur lié à la conception du bioréacteur. Après la contraction cellulaire, l'épaisseur de la construction vasculaire e est très faible, rendant le terme " $p_{ext} \times e$ " négligeable. À partir de ces approximations, le Tableau 5.2 fournit les valeurs calculées de contraintes supportées par les parois de la construction vasculaire en fonction de la pression interne appliquée p_{int} . Ce tableau montre qu'une pression interne p_{int} de 40 mmHg correspond à une contrainte 18 kPa pour la construction vasculaire. La Figure 4.6 montre que la construction artérielle cultivée de manière statique pendant 1 semaine peut supporter cette amplitude de contrainte. L'étape suivante de ce travail serait donc de soumettre cette construction à de faibles stimulations dynamiques initialement faibles puis progressivement augmentées pendant 1 semaine (10 mmHg à 100 mmHg, 1Hz, 15 dyn.cm^{-2}). Les effets espérés de cette stimulation dynamique seraient de stimuler et diriger le remodelage cellulaire en termes de dégradation de la matrice de collagène pré-existante, produire une nouvelle MEC et réorganiser le tissu afin que son organisation soit proche de celle du tissu naturel.

Pour résumer, l'utilisation de la capacité des cellules à remodeler des structures de collagène apparaît comme une technique simple et rapide d'obtention de modèles 3D de tissus biologiques reproduisant la complexité de l'architecture et des propriétés physiques des tissus naturels.

Pression interne p_{int} (mmHg)	Contrainte circonférentielle (Pa)	
	1 semaine	2 semaines
10	4607	8703
20	9215	17406
30	13822	26109
40	18430	34812
50	23037	43515
100	46075	87030
150	69112	130545
200	92149	174060
3000	1382239	2610896

Tableau 5.2 – Contrainte circonférentielle appliquée à la paroi de la construction artérielle en fonction de la pression interne appliquée p_{int} et du temps de culture statique.

5.5 Limites et perspectives : vers un modèle plus proche des vaisseaux sanguins naturels

La continuité de ce projet devrait découler directement des limites du modèle de tissu vasculaire développé dans le cadre de cette thèse : la caractérisation plus approfondie des constructions vasculaires, **le renforcement élastique** de ce modèle vasculaire, **la réorganisation de la matrice de collagène** et **la réduction du temps d'obtention de la construction vasculaire**.

5.5.1 Caractérisation plus approfondie de la construction vasculaire

Plusieurs questions restent en suspens concernant la caractérisation de ces constructions vasculaires. En effet, un certain voile persiste sur l'éventuelle prolifération des CMLs. Une technique de décompte des cellules spécifique aux gels de collagène devrait être mise en place.

La quantification de l'orientation des cellules musculaires lisses et des fibrilles de collagène permettrait de préciser la relation structure-propriétés mise en avant dans ce travail.

Le changement de phénotype des CMLs depuis un phénotype synthétique vers un phénotype contractile au cours de cette étude a été soulevé. Des techniques de protéomique pourraient apporter quelques réponses sur ce point. Cette étude a été menée de manière conjointe avec Dawit G. Seifu, un étudiant post-doctorant et fait actuellement l'objet d'une publication mentionnée en annexe (Annexe B - 10, expériences terminées).

Au niveau mécanique, les mesures de compliance et de pression à la rupture fourniraient des informations complémentaires à celles obtenues par les tests de relaxation de contrainte.

5.5.2 Organisation : apport de la stimulation mécanique dynamique

Dans la perspective de la régénération tissulaire, les CMLs doivent dégrader l'exo-collagène et produire une nouvelle matrice extracellulaire. Or, en présence de collagène, les cellules ne synthétisent que peu de MEC. Un changement de phénotype et une réorganisation des cellules et des fibrilles dans la direction circonférentielle des constructions vasculaires sont attendues suite à la stimulation mécanique dynamique au sein d'un bioréacteur (Kanda et al., 1993; Finlay et al., 1995; Driessen et al., 2003; Ghezzi et al., 2013; Weidenhamer and Tranquillo, 2013). Cependant, les conditions d'application de ces stimulations doivent être fixées avec soin afin de ne pas endommager la construction, à la fois au niveau physique mais également au niveau fonctionnel (Rubbens et al., 2009b; Seliktar et al., 2003, 2001; Rubbens et al., 2009a; van Geemen et al., 2013).

Dans cette perspective, un bioréacteur dynamique a été développé dans le cadre de cette thèse et conjointement avec Frédéric Couët, un étudiant au doctorat (maintenant Ph.D.) afin de soumettre la structure de collagène remodelée par les cellules à une perfusion de milieu de culture (Figures 5.1 et 5.2). Le développement de ce bioréacteur dynamique a fait l'objet d'une publication conjointe (Annexe B - 6, (Couet et al., 2011b)) et la publication relative à l'étude de la perfusion des constructions vasculaires remodelées est en cours de rédaction avec Dawit G. Seifu (Annexe B - 10, expériences terminées).



FIGURE 5.1 – Participation à la conception et au développement d'un bioréacteur à perfusion pour la régénération du tissu vasculaire (Plus d'information en vidéo).

5.5.3 Renforcement par des structures multicouches

En moulant successivement un gel de collagène colonisé par des cellules par dessus un autre gel préalablement remodelé par les cellules, il est possible d'obtenir des constructions vasculaires multicouches. Cette structure multicouche peut alors être soumise à de plus grandes stimulations mécaniques au sein du bioréacteur à perfusion.

Ce sujet fait l'objet d'une publication en rédaction avec Dawit G. Seifu (Annexe B - 8, expériences

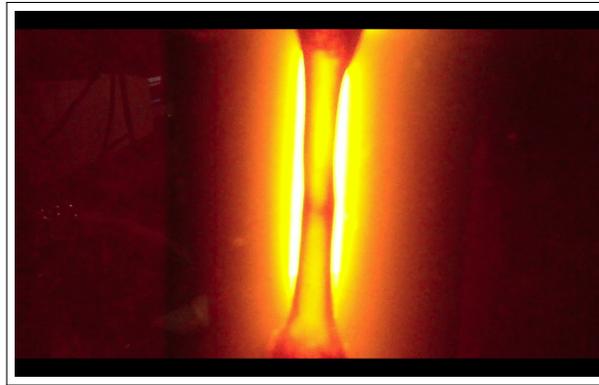


FIGURE 5.2 – Image d’une matrice de collagène remodelée par les cellules et placée dans le bioréacteur à perfusion.

terminées).

5.5.4 Élasticité : incorporation d’élastine

Le développement d’une construction vasculaire implantable et viable nécessite la présence d’élastine. En effet, dans la paroi des artères musculaires et élastiques, les charges sont principalement supportées par les fibres d’élastine aux faibles déformations alors que le collagène joue un rôle de soutien et de résistance aux déformations plus importantes (Roach and Burton, 1957). Ceci est d’ailleurs responsable du fort caractère non-linéaire des vaisseaux sanguins.

Ainsi, ce composant essentiel pour la construction vasculaire peut être soit sécrété par les CMLs suite à la stimulation mécanique et/ou biochimique, soit directement incorporé en tant que composite dans la structure à base de collagène. La faible solubilité de l’élastine est la principale limitation à cette stratégie. Ce sujet est à l’origine des projets de maîtrise de Michel Bocourt et d’Audrey Lainé.

5.5.5 Fonction : ajout d’autres types cellulaires

La plus-value apportée par l’ajout d’autres types cellulaires est multiple. Tout d’abord, cela permettrait d’obtenir un modèle plus proche des vaisseaux sanguins naturels constitué des différentes tuniques de l’artère. La présence concomitante de chaque tunique permettrait d’améliorer la fonction spécifique à chacune des tuniques par le biais du renforcement de la communication intercellulaire (ex. les CMLs sont influencées par les sécrétions d’agents vasoconstricteurs par les CEs). Ce sujet a fait l’objet d’une étude de la tri-culture cellulaire (CMLs, FBs et CEs) tout d’abord sur des disques de collagène et fait l’objet d’une publication conjointe avec Caroline Loy, étudiante au doctorat (Annexe B - 9, expériences terminées). Par la suite, les outils de mise en forme développés dans le cadre de la présente thèse permettront de poursuivre l’étude de la tri-culture sur des structures tubulaires.

La recherche d’autres sources de cellules permettrait à long terme de réduire le temps de production de ces structures vasculaires (ex. les cellules mésenchymateuses (Peck et al., 2012; Peng et al., 2011),

les fibroblastes dermiques ou les cellules de la moelle osseuse qui peuvent être extraites et utilisées en moins de 2 h).

5.5.6 Réduction du temps d'obtention

Dans le protocole d'obtention des constructions vasculaires remodelées par les cellules, l'expansion des cellules et la culture statique nécessaires pour fabriquer une structure qui puisse soutenir les contraintes dynamiques minimales sont les deux étapes qui consomment le plus de temps. Pour contourner ces étapes, il est possible d'envisager de préparer des structures remodelées à l'avance, de les décellulariser de sorte à n'en conserver que la matrice de collagène dense et organisée. Cette matrice servirait de support mécanique pour les premiers temps de culture dans le bioréacteur dynamique ainsi que de pseudo-limitante élastique, empêchant la prolifération des CMLs vers la lumière de la construction.

De plus, de nouveaux moules et mandrins sont en cours de conception, en collaboration avec Audrey Lainé et Caroline Loy, de sorte à pouvoir mouler les constructions vasculaires directement dans le bioréacteur dynamique. Ceci permettrait de réaliser la culture statique directement dans le bioréacteur dynamique, et ainsi de réduire le temps de production d'une construction multicouche, de diminuer le risque de contamination et d'endommagement de ces structures

Conclusion

Outre la caractérisation minutieuse des propriétés mécaniques et viscoélastiques des gels de collagène remodelés ou non par les cellules, le travail présenté dans cette thèse a permis de redorer le blason d'un matériau au potentiel important dans ses interactions biologiques avec les cellules, mais ô combien limité par son manque de stabilité mécanique. En faisant appel à des expertises multidisciplinaires du domaine de la bioingénierie, la technologie développée dans le cadre de cette thèse permet d'exploiter la capacité de remodelage des cellules pour la régénération *in vitro* de modèles tri-dimensionnels de tissus biologiques avec une architecture et des propriétés physiques et biologiques d'une complexité proche de celle des tissus naturels. Ces structures peuvent être manipulées et soumises à des contraintes mécaniques dynamiques dans un bioréacteur à perfusion pour affiner encore ce modèle.

Bibliographie

- Abou Neel, E. A., Cheema, U., Knowles, J. C., Brown, R. A., and Nazhat, S. N. (2006). Use of multiple unconfined compression for control of collagen gel scaffold density and mechanical properties. *Soft Matter*, 2(11) :986–992.
- Achilli, M. (2012). *Modification de la Microstructure et des Propriétés Mécaniques d'Échafaudage à Base de Gels de Collagène pour la Régénération du Tissu Vasculaire*. PhD thesis, Laval University (Québec).
- Achilli, M., Lagueux, J., and Mantovani, D. (2010). On the effects of UV-C and pH on the mechanical behavior, molecular conformation and cell viability of collagen-based scaffold for vascular tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*, 10(3) :307–16.
- Achilli, M. and Mantovani, D. (2010). Tailoring Mechanical Properties of Collagen-Based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering : The Effects of pH, Temperature and Ionic Strength on Gelation. *Polymers*, 2(4) :664–680.
- Achilli, M., Meghezi, S., and Mantovani, D. (2012). On the Viscoelastic Properties of Collagen-Gel-Based Lattices under Cyclic Loading : Applications for Vascular Tissue Engineering. *Macromolecular Materials and Engineering*, 297(7) :724–734.
- Alford, P. W., Nesmith, A. P., Seywerd, J. N., Grosberg, A., and Parker, K. K. (2011). Vascular smooth muscle contractility depends on cell shape. *Integrative Biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 3(11) :1063–70.
- Amadori, L., Rajan, N., Vesentini, S., and Mantovani, D. (2007). Atomic Force and Confocal Microscopic Studies of Collagen-Cell-based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. *Advanced Materials Research*, 15-17 :83–88.
- Aprahamian, M., Lambert, A., Balboni, G., Lefebvre, F., Schmitthaeusler, R., Damge, C., and Rabaud, M. (1987). A new reconstituted connective tissue matrix : preparation, biochemical, structural and mechanical studies. *Journal of Biomedical Materials Research*, 21 :965–977.
- Assoul, N., Flaud, P., Chaouat, M., Letourneur, D., and Bataille, I. (2008). Mechanical properties of rat thoracic and abdominal aortas. *Journal of biomechanics*, 41(10) :2227–36.

- Avery, N. C. and Bailey, A. J. (2008). Restraining Cross-Links Responsible for the Mechanical Properties of Collagen Fibers : Natural and Artificial. In Fratzl, P., editor, *Collagen : Structure and Mechanics*, page 81. Springer.
- Baaijens, F., Bouten, C., and Driessen, N. (2010). Modeling collagen remodeling. *Journal of biomechanics*, 43 :166–175.
- Badylak, S., D, F., and Gilbert, T. (2009). Extracellular matrix as a biological scaffold material : Structure and function. *Acta Biomaterialia*, 5(1) :1–13.
- Badylak, S. F. (2007). The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, 28(25) :3587–93.
- Bailey, A. J. (2001). Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122 :735–755.
- Balasubramanian, D., Du, X., and Zigler, J. S. (1990). The reaction of singlet oxygen with proteins, with special reference to crystallins. *Photochemistry and Photobiology*, 52 :761–768.
- Barocas, V. H., Girton, T. S., and Tranquillo, R. T. (1998). Engineered Alignment in Media Equivalents : Magnetic Prealignment and Mandrel Compaction. *Journal of Biomechanical Engineering*, 120(5) :660.
- Barocas, V. H., Moon, A. G., and Tranquillo, R. T. (1995). The Fibroblast-Populated Collagen Microsphere Assay of Cell Traction Force-Part 2 : Measurement of the Cell Traction Parameter. *Journal of Biomechanical Engineering*, 117 :161–170.
- Bedran-Russo, A. K. B., Pereira, P. N. R., Duarte, W. R., Drummond, J. L., and Yamauchi, M. (2007). Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 80(1) :268–72.
- Beghi, C., Nicolini, F., Budillon, A. M., Borrello, B., Ballore, L., Reverberi, C., and Gherli, T. (2002). Midterm clinical results in myocardial revascularization using the radial artery. *Chest*, 122(6) :2075–2079.
- Bell, E., Ivarsson, B., and Merrill, C. (1979). Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 :1274–1278.
- Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B., and Berman, H. M. (1994). Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 266 :75–81.
- Berger, K., Sauvage, L. R., Rao, A. M., and Wood, S. J. (1972). Healing of arterial prostheses in man : its incompleteness. *Annals of Surgery*, 175(1) :118–127.

- Berglund, J. D., Mohseni, M. M., Nerem, R. M., and Sambanis, A. (2003). A biological hybrid model for collagen-based tissue engineered vascular constructs. *Biomaterials*, 24 :1241–1254.
- Berglund, J. D., Nerem, R. M., and Sambanis, A. (2005). Viscoelastic Testing Methodologies for Tissue Engineered Blood Vessels. *Journal of Biomechanical Engineering*, 127(7) :1176.
- Berthod, F., Saintigny, G., Chretien, F., Hayek, D., Collombel, C., and Damour, O. (1994). Optimization of thickness, pore size and mechanical properties of a biomaterial designed for deep burn coverage. *Clinical Materials*, 15 :259–265.
- Bhan, A., Gupta, V., Choudhary, S. K., Sharma, R., Singh, B., Aggarwal, R., Bhargava, B., Sharma, A. V., and Venugopal, P. (1999). Radial artery in CABG : could the early results be comparable to internal mammary artery graft ? *The Annals of Thoracic Surgery*, 67(6) :1631–1636.
- Bilodeau, K. and Mantovani, D. (2006). Bioreactors for tissue engineering : focus on mechanical constraints. A comparative review. *Tissue Engineering*, 12(8) :2367–83.
- Bjork, J. W. and Tranquillo, R. T. (2009). Transmural flow bioreactor for vascular tissue engineering. *Biotechnology and bioengineering*, 104(6) :1197–206.
- Boccafoschi, F., Habermehl, J., Vesentini, S., and Mantovani, D. (2005). Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, 26(35) :7410–7.
- Boccafoschi, F., Rajan, N., Habermehl, J., and Mantovani, D. (2007). Preparation and characterization of a scaffold for vascular tissue engineering by direct-assembling of collagen and cells in a cylindrical geometry. *Macromolecular Bioscience*, 7(5) :719–26.
- Boivin, M.-C., Chevallier, P., Hoesli, C. a., Lagueux, J., Bareille, R., Rémy, M., Bordenave, L., Durrieu, M.-C., and Laroche, G. (2013). Human saphenous vein endothelial cell adhesion and expansion on micropatterned polytetrafluoroethylene. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 101 :694–703.
- Borowiec, J., Thelin, S., Bagge, L., Nilsson, L., Venge, P., and Hansson, H. E. (1992). Heparin-coated circuits reduce activation of granulocytes during cardiopulmonary bypass. A clinical study. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 104(3) :642–647.
- Bowens, N., Parmacek, M. S., and S, C. L. (2012). Development of the Smooth Muscle Cell Lineage. In *Muscle : Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, volume 1, chapter 82, pages 1105–1116. Elsevier Inc.
- Boyce, S. T., Christianson, D. J., and Hansbrough, J. F. (1988). Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes. *Journal of Biomedical Materials Research*, 22 :939–957.

- Brinkman, W. T., Nagapudi, K., Thomas, B. S., and Chaikof, E. L. (2003). Photo-cross-linking of type I collagen gels in the presence of smooth muscle cells : Mechanical properties, cell viability, and function. *Biomacromolecules*, 4 :890–895.
- Browder, I. W. and Litwin, M. S. (1986). Use of absorbable collagen for hemostasis in general surgical patients. *American Surgeon*, 52 :492–494.
- Brown, E. and Dejana, E. (2003). Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(5) :505–508.
- Brown, R. A. (2013). In the beginning there were soft collagen-cell gels : Towards better 3D connective tissue models ? *Experimental Cell Research*, 319 :2460–2469.
- Brown, R. A., Wiseman, M., Chuo, C. B., Cheema, U., and Nazhat, S. N. (2005). Ultrarapid engineering of biomimetic materials and tissues : Fabrication of nano- and microstructures by plastic compression. *Advanced Functional Materials*, 15 :1762–1770.
- Brown, T. D. (2000). Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro : A review. *Journal of Biomechanics*, 33 :3–14.
- Buijtenhuijs, P., Buttafoco, L., Poot, A. A., Daamen, W. F., van Kuppevelt, T. H., Dijkstra, P. J., de Vos, R. A. I., Sterk, L. M. T., Geelkerken, B. R. H., Feijen, J., and Vermes, I. (2004). Tissue engineering of blood vessels : characterization of smooth-muscle cells for culturing on collagen-and-elastin-based scaffolds. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 39 :141–149.
- Campbell, G. R. and Campbell, J. H. (2007). Development of Tissue Engineered Vascular Grafts. *Current pharmaceutical biotechnology*, 8(1) :43–50.
- Campbell, J. H., Efendy, J. L., and Campbell, G. R. (1999). Novel Vascular Graft Grown Within Recipient's Own Peritoneal Cavity. *Circulation Research*, 85(12) :1173–1178.
- Canty, E. G. and Kadler, K. E. (2005). Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of cell science*, 118 :1341–1353.
- Carpentier, A., Guermontprez, J., Deloche, A., Frechette, C., and DuBost, C. (1973). The Aorta-to-Coronary Radial Artery Bypass Graft. *The Annals of Thoracic Surgery*, 16(2) :111–121.
- Carrel, A. (1902). La technique des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. *Lyon Médical*, 98 :859–864.
- Carrel, A. and Guthrie, C. C. (1906). Uniterminal and biterminal venous transplantations. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, 11(3) :266–286.
- Carrel, A. and Lindbergh, C. A. (1938). *The culture of organs*. Harper Brothers, New York, NY, USA.

- Castaneda, L., Valle, J., Yang, N., Pluskat, S., and Slowinska, K. (2008). Collagen cross-linking with Au nanoparticles. *Biomacromolecules*, 9 :3383–3388.
- Catto, V., Farè, S., Freddi, G., and Tanzi, M. C. (2014). Vascular Tissue Engineering : Recent Advances in Small Diameter Blood Vessel Regeneration. *ISRN Vascular Medicine*, 2014 :1–27.
- Chan, B. P., Hui, T. Y., Chan, O. C. M., So, K.-F., Lu, W., Cheung, K. M. C., Salomatina, E., and Yaroslavsky, A. (2007). Photochemical cross-linking for collagen-based scaffolds : a study on optical properties, mechanical properties, stability, and hemocompatibility. *Tissue Engineering*, 13(1) :73–85.
- Chan, B. P. and So, K.-F. (2005). Photochemical crosslinking improves the physicochemical properties of collagen scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 75(3) :689–701.
- Chandran, P. L., Paik, D. C., and Holmes, J. W. (2012). Structural mechanism for alteration of collagen gel mechanics by glutaraldehyde crosslinking. *Connective tissue research*, 53(4) :285–97.
- Chang, Y., Tsai, C. C., Liang, H. C., and Sung, H. W. (2002). In vivo evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin). *Biomaterials*, 23 :2447–2457.
- Cheema, U. and Brown, R. a. (2013). Rapid Fabrication of Living Tissue Models by Collagen Plastic Compression : Understanding Three-Dimensional Cell Matrix Repair In Vitro. *Advances in Wound Care*, 2 :176–184.
- Chemla, E. S. and Morsy, M. (2009). Randomized clinical trial comparing decellularized bovine ureter with expanded polytetrafluoroethylene for vascular access. *British Journal of Surgery*, 96(1) :34–39.
- Chen, G., Ushida, T., and Tateishi, T. (2002). Scaffold design for tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*, 2 :67–77.
- Chen, M.-Y., Sun, Y.-L., Zhao, C., Zobitz, M. E., An, K.-N., Moran, S. L., and Amadio, P. C. (2008). Substrate adhesion affects contraction and mechanical properties of fibroblast populated collagen lattices. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 84(1) :218–23.
- Chen, P., Marsilio, E., Goldstein, R. H., Yannas, I. V., and Spector, M. (2005). Formation of lung alveolar-like structures in collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. *Tissue Engineering*, 11 :1436–1448.
- Cheung, A. L. (2007). Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Current Protocols in Microbiology*, 4 :4B.
- Chlupáč, J., Filová, E., and Bacáková, L. (2009). Blood vessel replacement : 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiological Research*, 58 Suppl 2(Ricotta 2005) :S119–39.

- Cho, S.-W., Lim, S. H., Kim, I.-K., Hong, Y. S., Kim, S.-S., Yoo, K. J., Park, H.-Y., Jang, Y., Chang, B. C., Choi, C. Y., Hwang, K.-C., and Kim, B.-S. (2005). Small-Diameter Blood Vessels Engineered With Bone Marrow-Derived Cells. *Annals of Surgery*, 241(3) :506–515.
- Christiansen, D. L., Huang, E. K., and Silver, F. H. (2000). Assembly of type I collagen : fusion of fibril subunits and the influence of fibril diameter on mechanical properties. *Matrix Biology*, 19(5) :409–420.
- Chue, W. L., Campbell, G. R., Caplice, N., Muhammed, A., Berry, C. L., Thomas, A. C., Bennett, M. B., and Campbell, J. H. (2004). Dog peritoneal and pleural cavities as bioreactors to grow autologous vascular grafts. *Journal of Vascular Surgery*, 39 :859–867.
- Collins, P., Webb, C. M., Chong, C. F., and Moat, N. E. (2008). Radial artery versus saphenous vein patency randomized trial : Five-year angiographic follow-up. *Circulation*, 117(22) :2859–2864.
- Conte, M. S. (2007). Molecular engineering of vein bypass grafts. *Journal of Vascular Surgery*, 45(6) :A74–A81.
- Cooper, D. R. and Davidson, R. J. (1965). The effect of ultraviolet irradiation on soluble collagen. *The Biochemical Journal*, 97 :139–147.
- Cornwell, K. G., Lei, P., Andreadis, S. T., and Pins, G. D. (2007). Crosslinking of discrete self-assembled collagen threads : Effects on mechanical strength and cell-matrix interactions. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 80(2) :362–71.
- Couet, F. and Mantovani, D. (2010). How to optimize maturation in a bioreactor for vascular tissue engineering : focus on a decision algorithm for experimental planning. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(9) :2877–84.
- Couet, F., Meghezi, S., Levesque, L., and Mantovani, D. (2011a). Monitoring Compliance and Elastic Modulus in a Bioreactor for Optimal Control of Vascular Tissue Growth. *Advanced Materials Research*, 409 :123–128.
- Couet, F., Meghezi, S., and Mantovani, D. (2011b). Fetal development, mechanobiology and optimal control processes can improve vascular tissue regeneration in bioreactors : An integrative review. *Medical Engineering & Physics*, pages 1–10.
- Couet, F., Rajan, N., and Mantovani, D. (2007). Macromolecular biomaterials for scaffold-based vascular tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*, 7(5) :701–18.
- Courtman, D. W., Pereira, C. A., Kashef, V., McComb, D., Lee, J. M., and Wilson, G. J. (1994). Development of a pericardial acellular matrix biomaterial : biochemical and mechanical effects of cell extraction. *Journal of Biomedical Materials Research*, 28 :655–666.

- Cowan, P. M., McGavin, S., and North, A. C. T. (1955). The Polypeptide Chain Configuration of Collagen. *Nature*, 176(4492) :1062–1064.
- Creed, D. (1984a). The Photophysics and Photochemistry of the Near-UV Absorbing Amino Acids-II. Tryptophan and its Simple Derivative. *Photochemistry and Photobiology*, 39(4) :537–562.
- Creed, D. (1984b). The Photophysics and Photochemistry of the Near-UV Absorbing Amino Acids-II. Tyrosine and its Simple Derivative. *Photochemistry and Photobiology*, 39(4) :563–575.
- Crumpton, M. (1974). Protein antigens : the molecular bases of antigenicity and immunogenicity. In Sela, M., editor, *The Antigens II*, pages 1–78. Academic Press, New York.
- Cummings, C. L., Gawlitta, D., Nerem, R. M., and Stegeman, J. P. (2004). Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures. *Biomaterials*, 25(17) :3699–706.
- Daamen, W. F., van Moerkerk, H., Hafmans, T., Buttafoco, L., Poot, A. A., Veerkamp, J. H., and van Kuppevelt, T. H. (2003). Preparation and evaluation of molecularly-defined collagen-elastin-glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 24(22) :4001–4009.
- Daenens, K., Schepers, S., Fourneau, I., Houthoofd, S., and Nevelsteen, A. (2009). Heparin-bonded ePTFE grafts compared with vein grafts in femoropopliteal and femorocrural bypasses : 1- and 2-year results. *Journal of Vascular Surgery*, 49(5) :1210–1216.
- Dahl, S. L. M., Kypson, A. P., Lawson, J. H., Blum, J. L., Strader, J. T., Li, Y., Manson, R. J., Tente, W. E., DiBernardo, L., Hensley, M. T., Carter, R., Williams, T. P., Prichard, H. L., Dey, M. S., Begelman, K. G., and Niklason, L. E. (2011). Readily available tissue-engineered vascular grafts. *Science Translational Medicine*, 3(68) :68ra9.
- Dahl, S. L. M., Rhim, C., Song, Y. C., and Niklason, L. E. (2007a). Mechanical properties and compositions of tissue engineered and native arteries. *Annals of Biomedical Engineering*, 35 :348–355.
- Dahl, S. L. M., Vaughn, M. E., and Niklason, L. E. (2007b). An ultrastructural analysis of collagen in tissue engineered arteries. *Annals of Biomedical Engineering*, 35(10) :1749–55.
- Dalle Carbonare, M. and Pathak, M. A. (1992). Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, 14 :105–124.
- Damour, O., Gueugniaud, P. Y., Berthin-Maghit, M., Rousselle, P., Berthod, F., Sahuc, F., and Col-lombel, C. (1994). A dermal substrate made of collagen–GAG–chitosan for deep burn coverage : first clinical uses. *Clinical Materials*, 15 :273–276.

- Dardik, H., Wengerter, K., Qin, F., Pangilinan, A., Silvestri, F., Wolodiger, F., Kahn, M., Sussman, B., and Ibrahim, I. M. (2002). Comparative decades of experience with glutaraldehyde-tanned human umbilical cord vein graft for lower limb revascularization : An analysis of 1275 cases. *Journal of Vascular Surgery*, 35(1) :64–71.
- Davidson, I. J., Hackerman, C., Kapadia, A., and Minhajuddin, A. (2009). Heparin bonded hemodialysis e-PTFE grafts result in 20% clot free survival benefit. *Journal of Vascular Access*, 10(3) :153–156.
- Desai, N. D., Cohen, E. A., Naylor, C. D., and Fremes, S. E. (2004). A Randomized Comparison of Radial-Artery and Saphenous-Vein Coronary Bypass Grafts. *New England Journal of Medicine*, 351(22) :2302–2309.
- Deutsch, M., Meinhart, J., Fischlein, T., Preiss, P., and Zilla, P. (1999). Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients : A 9-year experience. *Surgery*, 126(5) :847–855.
- Deutsch, M., Meinhart, J., Scheme, J., Hubbell, J., and Zilla, P. P. (2000). Endothelial cell seeding : Revisiting the issues. *Journal of Vascular Surgery*, 31(6) :1265–1268.
- Deutsch, M., Meinhart, J., Zilla, P., Howanietz, N., Gorlitzer, M., Froeschl, A., Stuempflen, A., Bezuidenhout, D., and Grabenwoeger, M. (2009). Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *Journal of Vascular Surgery*, 49(2) :352–62 ; discussion 362.
- Development Core Team, R. (2011). R : A Language and Environment for Statistical Computing.
- Diamantouros, S. E., Hurtado-Aguilar, L. G., Schmitz-Rode, T., Mela, P., and Jockenhoevel, S. (2013). Pulsatile perfusion bioreactor system for durability testing and compliance estimation of tissue engineered vascular grafts. *Annals of Biomedical Engineering*, 41(9) :1979–89.
- Diebolt, M. (2005). Mechanism of potentiation by polyphenols of contraction in human vein-engineered media. *AJP : Heart and Circulatory Physiology*, 288(6) :H2918–H2924.
- Diebolt, M., Laflamme, K., Labbé, R., Auger, F. A., Germain, L., and Andriantsitohaina, R. (2007). Polyphenols modulate calcium-independent mechanisms in human arterial tissue-engineered vascular media. *Journal of Vascular Surgery*, 46(4) :764–772.
- Dilley, R. J. (1988). A Review of the Histologic Changes in Vein-to-Artery Grafts, With Particular Reference to Intimal Hyperplasia. *Archives of Surgery*, 123(6) :691.
- Dobrin, P. B., Littooy, F. N., and Endean, E. D. (1989). Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. *Surgery*, 105(3) :393–400.

- Doster, W. and Settles, M. (2005). Protein-water displacement distributions. *Biochimica et biophysica acta*, 1749(2) :173–86.
- Driessen, N. J. B., Peters, G. W. M., Huyghe, J. M., Bouten, C. V. C., and Baaijens, F. P. T. (2003). Remodelling of continuously distributed collagen fibres in soft connective tissues. *Journal of Biomechanics*, 36 :1151–1158.
- Duan, X. and Sheardown, H. (2005). Crosslinking of collagen with dendrimers. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 75 :510–518.
- Ehsan, A., Mann, M. J., Dell'Acqua, G., Tamura, K., Braun-Dullaeus, R., and Dzau, V. J. (2002). Endothelial Healing in Vein Grafts : Proliferative Burst Unimpaired by Genetic Therapy of Neointimal Disease. *Circulation*, 105(14) :1686–1692.
- Elbjeirami, W. M., Yonter, E. O., Starcher, B. C., and West, J. L. (2003). Enhancing mechanical properties of tissue-engineered constructs via lysyl oxidase crosslinking activity. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 66 :513–521.
- Elliott, D. H. and Crawford, G. N. C. (1965). The Thickness and Collagen Content of Tendon Relative to the Cross-Sectional Area of Muscle during Growth. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences*, 162(987) :198–202.
- Ellis, D. L. and Yannas, I. V. (1996). Recent advances in tissue synthesis in vivo by use of collagen-glycosaminoglycan copolymers. *Biomaterials*, 17 :291–299.
- Elsdale, T. and Bard, J. (1972). Collagen substrata for studies on cell behavior. *Journal of Cell Biology*, 54 :626–637.
- Emsley, J., Knight, C. G., Farndale, R. W., and Barnes, M. J. (2004). Structure of the Integrin Alpha2Beta1-binding Collagen Peptide. *Journal of Molecular Biology*, 335 :1019–1028.
- Engbers-Buijtenhuijs, P., Buttafoco, L., Poot, A. a., Dijkstra, P. J., de Vos, R. a. I., Sterk, L. M. T., Geelkerken, R. H., Vermes, I., and Feijen, J. (2006). Biological characterisation of vascular grafts cultured in a bioreactor. *Biomaterials*, 27(11) :2390–7.
- Engler, A., Bacakova, L., Newman, C., Hategan, A., Griffin, M., and Discher, D. (2004). Substrate Compliance versus Ligand Density in Cell on Gel Responses. *Biophysical Journal*, 86(1) :617–628.
- Eppell, S. J., Smith, B. N., Kahn, H., and Ballarini, R. (2006). Nano measurements with micro-devices : mechanical properties of hydrated collagen fibrils. *Journal of the Royal Society Interface*, 3(6) :117–121.
- Eslami, M. H., Gangadharan, S. P., Belkin, M., Donaldson, M. C., Whittemore, A. D., and Conte, M. S. (2001). Monocyte adhesion to human vein grafts : A marker for occult intraoperative injury ? *Journal of Vascular Surgery*, 34(5) :923–929.

- Everaerts, F., Torrianni, M., Hendriks, M., and Feijen, J. (2008). Biomechanical properties of carbodiimide crosslinked collagen : Influence of the formation of ester crosslinks. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 85 :547–555.
- Eyre, D. R., Paz, M. A., and Gallop, P. M. (1984). Cross-Linking in Collagen and Elastin. *Annual Review of Biochemistry*, 53(1) :717–748.
- Fahner, P. J., Idu, M. M., van Gulik, T. M., and Legemate, D. A. (2006). Systematic review of preservation methods and clinical outcome of infrainguinal vascular allografts. *Journal of Vascular Surgery*, 44(3) :518–524.
- Fathima, N. N., Suresh, R., Rao, J. R., and Nair, B. U. (2007). Effect of UV irradiation on the physicochemical properties of collagen stabilized using aldehydes. *Journal of Applied Polymer Science*, 104 :3642–3648.
- Feng, Z., Tateishi, Y., Nomura, Y., Kitajima, T., and Nakamura, T. (2006). Construction of fibroblast-collagen gels with orientated fibrils induced by static or dynamic stress : toward the fabrication of small tendon grafts. *Journal of Artificial Organs : the Official Journal of the Japanese Society for Artificial Organs*, 9(4) :220–5.
- Feng, Z., Yamato, M., Akutsu, T., Nakamura, T., Okano, T., and Umezumi, M. (2003). Investigation on the Mechanical Properties of Contracted Collagen Gels as a Scaffold for Tissue Engineering. *Artificial Organs*, 27(1) :84–91.
- Fietzek, P. P. and Kühn, K. (1976). The primary structure of collagen. *International Review Connective Tissue Research*, pages 1–60.
- Finlay, H. M., McCullough, L., and Canham, P. B. (1995). Three-dimensional collagen organization of human brain arteries at different transmural pressures. *Journal of vascular research*, 32(5) :301–12.
- Fischer, H., Polikarpov, I., and Craievich, A. F. (2004). Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, 13(10) :2825–8.
- Flory, P. J. and Garrett, R. R. (1958). Phase Transitions in Collagen and Gelatin Systems. *Journal of the American Chemical Society*, 80(18) :4836–4845.
- Fratzl, P. (2008a). *Collagen. Structure and Mechanics*. Springer US.
- Fratzl, P. (2008b). Collagen : Structure and Mechanics, an Introduction. In Fratzl, P., editor, *Collagen. Structure and Mechanics*, pages 1–13. Springer US.
- Freed, A. D. and Doehring, T. C. (2005). Elastic Model for Crimped Collagen Fibrils. *Journal of Biomechanical Engineering*, 127(4) :587.
- Freeman, J. W. and Silver, F. H. (2004). Analysis of mineral deposition in turkey tendons and self-assembled collagen fibers using mechanical techniques. *Connective tissue research*, 45(3) :131–41.

- Friedman, S. G., Lazzaro, R. S., Spier, L. N., Moccio, C., and Tortolani, A. J. (1995). A prospective randomized comparison of Dacron and polytetrafluoroethylene aortic bifurcation grafts. *Surgery*, 117(1) :7–10.
- Fujikawa, S., Nakamura, S., and Koga, K. (2006). Genipin, a New Type of Protein Crosslinking Reagent from Gardenia Fruits. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(3) :869–870.
- Fujimori, E. (1965). Ultraviolet light-induced change in collagen macromolecules. *Biopolymers*, 3 :115–119.
- Fujimori, E. (1985). Changes induced by ozone and ultraviolet light in type I collagen. Bovine Achilles tendon collagen versus rat tail tendon collagen. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 152 :299–306.
- Fujioka, K., Maeda, M., Hojo, T., and Sano, A. (1998). Protein release from collagen matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31 :247–266.
- Fukutomi, M., Kobayashi, S., Niwaya, K., Hamada, Y., and Kitamura, S. (1996). Changes in platelet, granulocyte, and complement activation during cardiopulmonary bypass using heparin-coated equipment. *Artificial Organs*, 20(7) :767–76.
- Fung, Y. C. (1991). What are the residual stresses doing in our blood vessels ? *Annals of Biomedical Engineering*, 19(3) :237–49.
- Fung, Y. C. (1993). *Biomechanics : Mechanical Properties of Living Tissues*, volume 12. Springer.
- Garcia, Y., Hemantkumar, N., Collighan, R., Griffin, M., Rodriguez-Cabello, J. C., and Pandit, A. (2009). In vitro characterization of a collagen scaffold enzymatically cross-linked with a tailored elastin-like polymer. *Tissue Engineering. Part A*, 15 :887–899.
- Gasser, T. C., Ogden, R. W., and Holzapfel, G. A. (2006). Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fibre orientations. *Journal of The Royal Society Interface*, 3(6) :15–35.
- Gauvin, R. (2010). *Optimisation des Substituts Cutanes et Vasculaires Reconstitués par Génie Tissulaire : Etude du Comportement Biomecanique*. PhD thesis, Université Laval.
- Ghezzi, C. E., Risse, P.-A., Marelli, B., Muja, N., Barralet, J. E., Martin, J. G., and Nazhat, S. N. (2013). An airway smooth muscle cell niche under physiological pulsatile flow culture using a tubular dense collagen construct. *Biomaterials*, 34(8) :1954–66.
- Gilbert, T. W., Stewart-Akers, A. M., Simmons-Byrd, A., and Badylak, S. F. (2007). Degradation and remodeling of small intestinal submucosa in canine Achilles tendon repair. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 89(3) :621–30.

- Girton, T. S., Barocas, V. H., and Tranquillo, R. T. (2002). Confined Compression of a Tissue-Equivalent : Collagen Fibril and Cell Alignment in Response to Anisotropic Strain. *Journal of Biomechanical Engineering*, 124(5) :568.
- Girton, T. S., Oegema, T. R., and Tranquillo, R. T. (1999). Exploiting glycation to stiffen and strengthen tissue equivalents for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 46(1) :87–92.
- Glowacki, J. and Mizuno, S. (2008). Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers*, 89(5) :338–44.
- Go, A. S., Mozaffarian, D., Roger, V. L., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B., Bravata, D. M., Dai, S., Ford, E. S., Fox, C. S., Franco, S., Fullerton, H. J., Gillespie, C., Hailpern, S. M., Heit, J. A., Howard, V. J., Huffman, M. D., Kissela, B. M., Kittner, S. J., Lackland, D. T., Lichtman, J. H., Lisabeth, L. D., Magid, D., Marcus, G. M., Marelli, A., Matchar, D. B., McGuire, D. K., Mohler, E. R., Moy, C. S., Mussolino, M. E., Nichol, G., Paynter, N. P., Schreiner, P. J., Sorlie, P. D., Stein, J., Turan, T. N., Virani, S. S., Wong, N. D., Woo, D., and Turner, M. B. (2013). Heart Disease and Stroke Statistics - 2013 Update : A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 127(1) :e6–e245.
- Gong, Z. and Niklason, L. E. (2008). Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). *The FASEB Journal*, 22(6) :1635–1648.
- Gong, Z. and Niklason, L. E. (2011). Use of human mesenchymal stem cells as alternative source of smooth muscle cells in vessel engineering. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 698 :279–94.
- Goyanes, J. (1906). Nuevos trabajos de cirugía vascular, substitucion plastica de las artérias por las venas o arterioplastia venosa aplicada como nuevo metodo al tratamiento de los aneurysmas. *El Siglo Medico*, 53 :446.
- Graham, L. M. (1980). Immediate Seeding of Enzymatically Derived Endothelium in Dacron Vascular Grafts. *Archives of Surgery*, 115(11) :1289.
- Grassl, E. D., Oegema, T. R., and Tranquillo, R. T. (2002). Fibrin as an alternative biopolymer to type-I collagen for the fabrication of a media equivalent. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60(4) :607–12.
- Grassl, E. D., Oegema, T. R., and Tranquillo, R. T. (2003). A fibrin-based arterial media equivalent. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 66(3) :550–61.
- Green, R. M., Abbott, W. M., Matsumoto, T., Wheeler, J. R., Miller, N., Veith, F. J., Money, S., and Garrett, H. E. (2000). Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting : five-year results of a randomized trial. *Journal of Vascular Surgery*, 31(3) :417–425.

- Gross, R. E., Hurwitt, E. S., Bill, A. H., and Peirce, E. C. (1948). Preliminary Observations on the Use of Human Arterial Grafts in the Treatment of Certain Cardiovascular Defects. *New England Journal of Medicine*, 239(16) :578–579.
- Guidry, C. and Grinnell, F. (1985). Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. *Journal of Cell Science*, 79 :67–81.
- Guillemette, M. D., Cui, B., Roy, E., Gauvin, R., Giasson, C. J., Esch, M. B., Carrier, P., Deschambeault, A., Dumoulin, M., Toner, M., Germain, L., Veres, T., and Auger, F. a. (2009). Surface topography induces 3D self-orientation of cells and extracellular matrix resulting in improved tissue function. *Integrative Biology*, 1(2) :196–204.
- Guillemette, M. D., Roy, E., Auger, F. A., and Veres, T. (2011). Rapid isothermal substrate microfabrication of a biocompatible thermoplastic elastomer for cellular contact guidance. *Acta Biomaterialia*, 7(6) :2492–2498.
- Habermehl, J., Skopinska, J., Boccafoschi, F., Sionkowska, A., Kaczmarek, H., Laroche, G., and Mantovani, D. (2005). Preparation of ready-to-use, stockable and reconstituted collagen. *Macromolecular Bioscience*, 5(9) :821–8.
- Hagerty, R. D., Salzmann, D. L., Kleinert, L. B., and Williams, S. K. (2000). Cellular proliferation and macrophage populations associated with implanted expanded polytetrafluoroethylene and polyethyleneterephthalate. *Journal of Biomedical Materials Research*, 49(4) :489–497.
- Halpern, W., Mulvany, M. J., and Warshaw, D. M. (1978). Mechanical properties of smooth muscle cells in the walls of arterial resistance vessels. *The Journal of Physiology*, 275 :85–101.
- Hardin-Young, J., Carr, R. M., Downing, G. J., Condon, K. D., and Termin, P. L. (1996). Modification of native collagen reduces antigenicity but preserves cell compatibility. *Biotechnology and Bioengineering*, 49 :675–682.
- Harris, A. K., Stopak, D., and Wild, P. (1981). Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature*, 290(5803) :249–251.
- Harskamp, R. E., Lopes, R. D., Baisden, C. E., de Winter, R. J., and Alexander, J. H. (2013). Saphenous Vein Graft Failure After Coronary Artery Bypass Surgery. *Annals of Surgery*, 257(5) :824–833.
- Hayward, P. A. and Buxton, B. F. (2013). Mid-term results of the Radial Artery Patency and Clinical Outcomes randomized trial. *Annals of Cardiothoracic Surgery*, 2(4) :2013.
- He, W., Yong, T., Teo, W. E., Ma, Z., and Ramakrishna, S. (2005). Fabrication and endothelialization of collagen-blended biodegradable polymer nanofibers : potential vascular graft for blood vessel tissue engineering. *Tissue Engineering*, 11 :1574–1588.

- Herlihy, J. T. (1980). Helically cut vascular strip preparation : geometrical considerations. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 238(1) :H107–H109.
- Hermawan, H., Moravej, M., Dubé, D., Fiset, M., and Mantovani, D. (2007). Degradation Behaviour of Metallic Biomaterials for Degradable Stents. *Advanced Materials Research*, 15-17 :113–118.
- Herring, M., Gardner, A., and Glover, J. (1978). A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery*, 84(4) :498–504.
- Herring, M., Gardner, A., and Glover, J. (1984). Seeding human arterial prostheses with mechanically derived endothelium. *Journal of Vascular Surgery*, 1(2) :279–289.
- Herring, M. B., Dilley, R., Jersild, R. a., Boxer, L., Gardner, A., and Glover, J. (1979). Seeding arterial prostheses with vascular endothelium. The nature of the lining. *Annals of Surgery*, 190(1) :84–90.
- Heyligers, J. M., Verhagen, H. J., Rotmans, J. I., Weeterings, C., de Groot, P. G., Moll, F. L., and Lisman, T. (2006). Heparin immobilization reduces thrombogenicity of small-caliber expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Journal of Vascular Surgery*, 43(3) :587–591.
- Hibino, N., McGillicuddy, E., Matsumura, G., Ichihara, Y., Naito, Y., Breuer, C., and Shinoka, T. (2010). Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 139(2) :431–6, 436.e1–2.
- Hirai, J. and Matsuda, T. (1996). Venous reconstruction using hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen : Tissue regeneration process. *Cell Transplantation*, 5(1) :93–105.
- Hoerstrup, S. (2001). Tissue engineering of small caliber vascular grafts. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 20(1) :164–169.
- Hoesli, C. A., Garnier, A., Juneau, P.-M., Chevallier, P., Duchesne, C., and Laroche, G. (2014). A fluorophore-tagged RGD peptide to control endothelial cell adhesion to micropatterned surfaces. *Biomaterials*, 35(3) :879–890.
- Holzapfel, G. A. (2008). Collagen in Arterial Walls : Biomechanical Aspects. In Fratzl, P., editor, *Collagen. Structure and Mechanics*, chapter 11, pages 285–324. Springer US.
- Hölzenbein, T. J., Pomposelli, F. B., Miller, A., Contreras, M. A., Gibbons, G. W., Campbell, D. R., Freeman, D. V., and LoGerfo, F. W. (1996). Results of a policy with arm veins used as the first alternative to an unavailable ipsilateral greater saphenous vein for infrainguinal bypass. *Journal of Vascular Surgery*, 23(1) :130–140.
- Huang, L. L. H., Sung, H. W., Tsai, C. C., and Huang, D. M. (1998). Biocompatibility study of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking reagent. *Journal of Biomedical Materials Research*, 42 :568–576.

- Huang-Lee, L. L. H., Cheung, D. T., and Nimni, M. E. (1990). Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks. *Journal of Biomedical Materials Research*, 24 :1185–1201.
- Hugl, B., Nevelsteen, A., Daenens, K., Perez, M. A., Heider, P., Railo, M., Schelzig, H., Gluecklich, B., Balzer, K., Vermassen, F., De Smit, P., and Fraedrich, G. (2009). PEPE II—a multicenter study with an end-point heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene vascular graft for above and below knee bypass surgery : determinants of patency. *The Journal of Cardiovascular Surgery*, 50(2) :195–203.
- Hurt, A. V., Batello-Cruz, M., Skipper, B. J., Teaf, S. R., and Sterling, W. A. (1983). Bovine carotid artery heterografts versus polytetrafluoroethylene grafts. *The American Journal of Surgery*, 146(6) :844–847.
- Huynh, T., Abraham, G., Murray, J., Brockbank, K., Hagen, P. O., and Sullivan, S. (1999). Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel. *Nature Biotechnology*, 17(11) :1083–6.
- Ingber, D. E., Dike, L., Hansen, L., Karp, S., Liley, H., Maniotis, A., McNamee, H., Mooney, D., Plopper, G., Sims, J., and Wang, N. (1994). Cellular Tensegrity - Exploring How Mechanical Changes in the Cytoskeleton Regulate Cell-Growth, Migration, and Tissue Pattern During Morphogenesis. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, 150 :173–224.
- Isenberg, B. C. and Tranquillo, R. T. (2003). Long-Term Cyclic Distention Enhances the Mechanical Properties of Collagen-Based Media-Equivalents. *Annals of Biomedical Engineering*, 31(8) :937–949.
- Isenberg, B. C., Williams, C., and Tranquillo, R. T. (2006). Small-diameter artificial arteries engineered in vitro. *Circulation Research*, 98(1) :25–35.
- Ito, S. (1997). Inhibitory effect of type 1 collagen gel containing α -elastin on proliferation and migration of vascular smooth muscle and endothelial cells. *Cardiovascular Surgery*, 5(2) :176–183.
- Jackson, M. R., Ali, A. T., Bell, C., Modrall, J. G., Welborn, M. B., Scoggins, E., Valentine, R. J., D'Addio, V. J., and Clagett, G. P. (2004). Aortofemoral bypass in young patients with premature atherosclerosis : is superficial femoral vein superior to Dacron ? *Journal of Vascular Surgery*, 40(1) :17–23.
- Jeremy, D., Mehta, A., Bryan, D., and Le, J. (1997). Platelets and saphenous vein graft failure following coronary artery bypass surgery. *Platelets*, 8(5) :295–310.
- Jeyapalina, S., Attenburrow, G. E., and Covington, A. D. (2007). Dynamic Mechanical Thermal Analysis (DMTA) of Leather Part 1 : Effect of Tanning Agent on the Glass Transition Temperature of Collagen. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 91(6) :236–242.

- Johnson, W. C. and Lee, K. K. (2000). A comparative evaluation of polytetrafluoroethylene, umbilical vein, and saphenous vein bypass grafts for femoral-popliteal above-knee revascularization : A prospective randomized Department of Veterans Affairs cooperative study. *Journal of Vascular Surgery*, 32(2) :268–277.
- Jorge-Herrero, E., Fonseca, C., Barge, A. P., Turnay, J., Olmo, N., Fernández, P., Lizarbe, M. A., and García Páez, J. M. (2010). Biocompatibility and calcification of bovine pericardium employed for the construction of cardiac bioprostheses treated with different chemical crosslink methods. *Artificial Organs*, 34.
- Jouan, M. (2005). *Conception et réalisation d'une structure synthétique compatible pour le remplacement ou la régénération du tissu vasculaire*. PhD thesis, Université Laval (Québec).
- Kadler, K. E., Holmes, D. F., Trotter, J. A., and Chapman, J. A. (1996). Collagen fibril formation. *The Biochemical Journal*, 316 :1–11.
- Kanda, K., Matsuda, T., and Oka, T. (1993). In Vitro Reconstruction of Hybrid Vascular Tissue Hierarchic and Oriented Cell Layers. *ASAIO Journal*, 39(3).
- Kannan, R. Y., Salacinski, H. J., Butler, P. E., Hamilton, G., and Seifalian, A. M. (2005). Current status of prosthetic bypass grafts : a review. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 74(1) :570–81.
- Katzman, H. E., Glickman, M. H., Schild, A. F., Fujitani, R. M., and Lawson, J. H. (2005). Multicenter Evaluation of the Bovine Mesenteric Vein Bioprostheses for Hemodialysis Access in Patients with an Earlier Failed Prosthetic Graft. *Journal of the American College of Surgeons*, 201(2) :223–230.
- Kaufman, H. E., Steinemann, T. L., Lehman, E., Thompson, H. W., Varnell, E. D., Jacob-LaBarre, J. T., and Gebhardt, B. M. (1994). Collagen-based drug delivery and artificial tears. *Journal of Ocular Pharmacology*, 10(1) :17–27.
- Kelleher, C. M., McLean, S. E., and Mecham, R. P. (2004). Vascular extracellular matrix and aortic development. *Current Topics in Developmental Biology*, 62 :153–88.
- Khew, S. T., Yang, Q. J., and Tong, Y. W. (2008). Enzymatically crosslinked collagen-mimetic dendrimers that promote integrin-targeted cell adhesion. *Biomaterials*, 29(20) :3034–45.
- Khot, U. N. (2004). Radial Artery Bypass Grafts Have an Increased Occurrence of Angiographically Severe Stenosis and Occlusion Compared With Left Internal Mammary Arteries and Saphenous Vein Grafts. *Circulation*, 109(17) :2086–2091.
- Kieffer, E., Gomes, D., Chiche, L., Fléron, M.-H., Koskas, F., and Bahnini, A. (2004). Allograft replacement for infrarenal aortic graft infection : early and late results in 179 patients. *Journal of Vascular Surgery*, 39(5) :1009–1017.

- Kielty, C. and Grant, M. (2002). The Collagen Family : Structure, Assembly, and Organization in the Extracellular Matrix. In *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*, chapter 2, pages 159–221. Wiley-Liss, Inc.
- Kim, B. S., Nikolovski, J., Bonadio, J., Smiley, E., and Mooney, D. J. (1999). Engineered smooth muscle tissues : regulating cell phenotype with the scaffold. *Experimental Cell Research*, 251(2) :318–328.
- Kitagawa, T., Yamaoka, T., Iwase, R., and Murakami, A. (2006). Three-dimensional cell seeding and growth in radial-flow perfusion bioreactor for in vitro tissue reconstruction. *Biotechnology and Bioengineering*, 93 :947–954.
- Kleinman, H. K., Klebe, R. J., and Martin, G. R. (1981). Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *The Journal of Cell Biology*, 88(3) :473–485.
- Kleinman, H. K., Philp, D., and Hoffman, M. P. (2003). Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(5) :526–532.
- Ko, H. C. H., Milthorpe, B. K., and McFarland, C. D. (2007). Engineering thick tissues—the vascularisation problem. *European Cells and Materials*, 14 :1–18.
- Koch, S., Flanagan, T. C., Sachweh, J. S., Tanios, F., Schnoering, H., Deichmann, T., Ellä, V., Kellomäki, M., Gronloh, N., Gries, T., Tolba, R., Schmitz-Rode, T., and Jockenhoevel, S. (2010). Fibrin-poly lactide-based tissue-engineered vascular graft in the arterial circulation. *Biomaterials*, 31(17) :4731–9.
- Konig, G., McAllister, T. N., Dusserre, N., Garrido, S. A., Iyican, C., Marini, A., Fiorillo, A., Avila, H., Wystrychowski, W., Zagalski, K., Maruszewski, M., Jones, A. L., Cierpka, L., de la Fuente, L. M., and L'Heureux, N. (2009). Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials*, 30(8) :1542–50.
- Koob, T. J. (2004). Collagen Fixation. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, chapter 53, pages 335–347. Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- Korossis, S., Bolland, F., Ingham, E., Fisher, J., Kearney, J., and Southgate, J. (2006). Review : tissue engineering of the urinary bladder : considering structure-function relationships and the role of mechanotransduction. *Tissue Engineering*, 12(4) :635–44.
- Kozowska, J. and Sionkowska, A. (2014). Effects of different crosslinking methods on the properties of collagen-calcium phosphate composite materials. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Krishnan, L., Weiss, J. A., Wessman, M. D., and Hoying, J. B. (2004). Design and application of a test system for viscoelastic characterization of collagen gels. *Tissue Engineering*, 10 :241–252.

- Kumar, V. A., Caves, J. M., Haller, C. A., Dai, E., Li, L., Grainger, S., and Chaikof, E. L. (2013). Collagen-Based Substrates with Tunable Strength for Soft Tissue Engineering. *Biomaterials science*, 1(11) :1193–1202.
- Kuo, S. M., Wang, Y. J., Weng, C. L., Lu, H. E., and Chang, S. J. (2005). Influence of alginate on type II collagen fibrillogenesis. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 16(6) :525–31.
- Laflamme, K., Roberge, C. J., Pouliot, S., D'orléans-Juste, P., Auger, F. A., and Germain, L. (2006). Tissue-Engineered Human Vascular Media Produced in Vitro by the Self-Assembly Approach Present Functional Properties Similar to Those of Their Native Blood Vessels. *Tissue Engineering*, 12(8) :2275–2281.
- Lai, V. K., Hadi, M. F., Tranquillo, R. T., and Barocas, V. H. (2013). A multiscale approach to modeling the passive mechanical contribution of cells in tissues. *Journal of Biomechanical Engineering*, 135(7) :71007.
- Lai, V. K., Lake, S. P., Frey, C. R., Tranquillo, R. T., and Barocas, V. H. (2012). Mechanical behavior of collagen-fibrin co-gels reflects transition from series to parallel interactions with increasing collagen content. *Journal of Biomechanical Engineering*, 134(1) :011004.
- Lamm, P., Juchem, G., Milz, S., Schuffenhauer, M., and Reichart, B. (2001). Autologous Endothelialized Vein Allograft : A Solution in the Search for Small-Caliber Grafts in Coronary Artery Bypass Graft Operations. *Circulation*, 104(Supplement 1) :I–108–I–114.
- Laterreur, V., Ruel, J., Auger, F. A., Vallières, K., Tremblay, C., Lacroix, D., Tondreau, M., Bourget, J.-M., and Germain, L. (2014). Comparison of the direct burst pressure and the ring tensile test methods for mechanical characterization of tissue-engineered vascular substitutes. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 34 :253–63.
- Lee, C., Singla, A., and Lee, Y. (2001a). Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, 221(1-2) :1–22.
- Lee, J. E., Park, J. C., Hwang, Y. S., Kim, J. K., Kim, J. G., and Suh, H. (2001b). Characterization of UV-irradiated dense/porous collagen membranes : morphology, enzymatic degradation, and mechanical properties. *Yonsei Medical Journal*, 42 :172–179.
- Lee, K. M., Tsai, K. Y., Wang, N., and Ingber, D. E. (1998). Extracellular matrix and pulmonary hypertension : control of vascular smooth muscle cell contractility. *The American Journal of Physiology*, 274(1 Pt 2) :H76–H82.
- Legant, W. R., Miller, J. S., Blakely, B. L., Cohen, D. M., Genin, G. M., and Chen, C. S. (2010). Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices. *Nature Methods*, 7(12) :969–71.

- Leikin, S., Parsegian, V. A., Yang, W.-H., and Walrafen, G. E. (1997). Raman spectral evidence for hydration forces between collagen triple helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(21) :11312–11317.
- Leikin, S., Rau, D. C., and Parsegian, V. A. (1994). Direct measurement of forces between self-assembled proteins : temperature-dependent exponential forces between collagen triple helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 :276–280.
- Leikin, S., Rau, D. C., and Parsegian, V. A. (1995). Temperature-favoured assembly of collagen is driven by hydrophilic not hydrophobic interactions. *Nature Structural Biology*, 2(3) :205–210.
- Leseche, G., Ohan, J., Bouttier, S., Palombi, T., Bertrand, P., and Andréassian, B. (1995). Above-knee femoropopliteal bypass grafting using endothelial cell seeded PTFE grafts : five-year clinical experience. *Annals of Vascular Surgery*, 9 Suppl :S15–23.
- Letourneur, D., Caleb, B. L., and Castellot, J. J. (1995). Heparin binding, internalization, and metabolism in vascular smooth muscle cells : I. Upregulation of heparin binding correlates with antiproliferative activity. *Journal of Cellular Physiology*, 165(3) :676–686.
- Levy, R. J., Schoen, F. J., Sherman, F. S., Nichols, J., Hawley, M. A., and Lund, S. A. (1986). Calcification of subcutaneously implanted type I collagen sponges. Effects of formaldehyde and glutaraldehyde pretreatments. *The American Journal of Pathology*, 122 :71–82.
- Lewis, F., Maheux-Lacroix, B., Turgeon, S., and Mantovani, D. (2007). Evaluation of the Adhesion of Ultra-Thin Teflon-Like Films Deposited by Plasma on 316L Stainless Steel for Long-Term Stable Drug-Eluting Stents. *Advanced Materials Research*, 15-17 :119–124.
- L'Heureux, N., Dusserre, N., Konig, G., Victor, B., Keire, P., Wight, T. N., Chronos, N. A. F., Kyles, A. E., Gregory, C. R., Hoyt, G., Robbins, R. C., and McAllister, T. N. (2006). Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nature Medicine*, 12(3) :361–5.
- L'Heureux, N., Germain, L., Labbe, R., and Auger, F. A. (1993). In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells : A morphologic study. *Journal of Vascular Surgery*, 17(3) :499–509.
- L'Heureux, N., McAllister, T. N., and de la Fuente, L. M. (2007). Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *The New England Journal of Medicine*, 357(14) :1451–3.
- L'Heureux, N., Pâquet, S., Labbé, R., Germain, L., and Auger, F. A. (1998). A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *The FASEB Journal*, 12(1) :47–56.
- Li, S., Van Den Diepstraten, C., D'Souza, S. J., Chan, B. M. C., and Pickering, J. G. (2003). Vascular smooth muscle cells orchestrate the assembly of type I collagen via alpha2beta1 integrin, RhoA, and fibronectin polymerization. *The American Journal of Pathology*, 163(3) :1045–1056.

- Liang, H.-C., Chang, Y., Hsu, C.-K., Lee, M.-H., and Sung, H.-W. (2004). Effects of crosslinking degree of an acellular biological tissue on its tissue regeneration pattern. *Biomaterials*, 25(17) :3541–52.
- Lieber, S. C. (2002). *Atomic Force Microscopy Used to Determine the Young's Modulus of Vascular Smooth Muscle Cells*. Master of science in mechanical engineering, Faculty of New Jersey Institute of Technology.
- Lin, P. H., Chen, C., Bush, R. L., Yao, Q., Lumsden, A. B., and Hanson, S. R. (2004). Small-caliber heparin-coated ePTFE grafts reduce platelet deposition and neointimal hyperplasia in a baboon model. *Journal of Vascular Surgery*, 39(6) :1322–1328.
- Liu, S. Q. (1998). Influence of tensile strain on smooth muscle cell orientation in rat blood vessels. *Journal of Biomechanical Engineering*, 120 :313–320.
- Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T. M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T. B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, P. M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M. M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Mussolino, M., Nichol, G., Roger, V. L., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Stafford, R., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N. D., and Wylie-Rosett, J. (2010). Heart disease and stroke statistics–2010 update : a report from the American Heart Association. *Circulation*, 121(7) :e46–e215.
- Löhler, J., Timpl, R., and Jaenisch, R. (1984). Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. *Cell*, 38(2) :597–607.
- Long, J. L. and Tranquillo, R. T. (2003). Elastic fiber production in cardiovascular tissue-equivalents. *Matrix Biology*, 22(4) :339–350.
- Lösel-Sadée, H. and Alefelder, C. (2009). Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene graft for infragenicular bypass : five-year results. *The Journal of Cardiovascular Surgery*, 50(3) :339–43.
- Lucas, P. A., Syftestad, G. T., Goldberg, V. M., and Caplan, A. I. (1989). Ectopic induction of cartilage and bone by water-soluble proteins from bovine bone using a collagenous delivery vehicle. *Journal of Biomedical Materials Research*, 23 :23–39.
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407(September) :233–241.
- Lynn, A. K., Yannas, I. V., and Bonfield, W. (2004). Antigenicity and immunogenicity of collagen. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 71 :343–354.
- Madhavan, K., Belchenko, D., and Tan, W. (2011). Roles of genipin crosslinking and biomolecule conditioning in collagen-based biopolymer : Potential for vascular media regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, pages 16–26.

- Magometschnigg, H., Kadletz, M., Vodrazka, M., Dock, W., Grimm, M., Grabenwoger, M., Minar, E., Staudacher, M., Fenzl, G., and Wolner, E. (1992). Prospective clinical study with in vitro endothelial cell lining of expanded polytetrafluoroethylene grafts in crural repeat reconstruction. *Journal of Vascular Surgery*, 15(3) :527–535.
- Mansfield, P. B., Wechezak, A. R., and Sauvage, L. R. (1975). Preventing thrombus on artificial vascular surfaces : true endothelial cell linings. *ASAIO Journal*, 21(1) :264–272.
- Matheve, C. (1996). Clinical evidence of improved biocompatibility using heparin-coated surfaces. *Perfusion*, 11(3) :264–269.
- Matia, I., Adamec, M., Varga, M., Janousek, L., Lipar, K., and Viklicky, O. (2008). Aortoiliac Reconstruction with Allograft and Kidney Transplantation as a One-stage Procedure : Long Term Results. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 35(3) :353–357.
- Matia, I., Janoušek, L., Marada, T., and Adamec, M. (2007). Cold-stored Venous Allografts in the Treatment of Critical Limb Ischaemia. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 34(4) :424–431.
- Matveev, Y. (2000). The plasticizing effect of water on proteins, polysaccharides and their mixtures. Glassy state of biopolymer, food and seeds. *Food Hydrocolloids*, 14(5) :425–437.
- McAllister, T. N., Maruszewski, M., Garrido, S. A., Wystrychowski, W., Dusserre, N., Marini, A., Zagalski, K., Fiorillo, A., Avila, H., Manglano, X., Antonelli, J., Kocher, A., Zembala, M., Cierpka, L., de la Fuente, L. M., and L'Heureux, N. (2009). Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft : a multicentre cohort study. *The Lancet*, 373(9673) :1440–6.
- McKee, J. A., Banik, S. S., Boyer, M. J., Hamad, N. M., Lawson, J. H., Niklason, L. E., and Counter, C. M. (2003). Human arteries engineered in vitro. *EMBO reports*, 4(6) :633–638.
- Meghezi, S., Chevallier, P., and Mantovani, D. (2011). Why Mechanical Properties of Collagen Scaffolds Should Be Tested in a Pseudo-Physiological Environment ? *Advanced Materials Research*, 409 :158–163.
- Meghezi, S., Couet, F., Chevallier, P., and Mantovani, D. (2012). Effects of a pseudophysiological environment on the elastic and viscoelastic properties of collagen gels. *International Journal of Biomaterials*, 2012 :319290.
- Meghezi, S., Seifu, D. G., Bono, N., Unsworth, L., Mequanint, K., and Mantovani, D. (2015). Engineering 3D Cellularized Collagen Gels for Vascular Tissue Regeneration. *Journal of Visualized Experiments*, (100) :e52812.
- Mehta, R. I., Mukherjee, A. K., Patterson, T. D., and Fishbein, M. C. (2011). Pathology of explanted polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Cardiovascular Pathology*, 20(4) :213–221.

- Meinhart, J., Deutsch, M., and Zilla, P. (1997). Eight years of clinical endothelial cell transplantation closing the gap between prosthetic grafts and vein grafts. *ASAIO journal*, 43(5) :M515–521.
- Menter, J. M., Williamson, G. D., Carlyle, K., Moore, C. L., and Willis, I. (1995). Photochemistry of type I acid-soluble calf skin collagen : dependence on excitation wavelength. *Photochemistry and Photobiology*, 62 :402–408.
- Michel, M., L'Heureux, N., Pouliot, R., Xu, W., Auger, F. a., and Germain, L. (1999). Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 35(6) :318–326.
- Miller, J. M., Zoll, D. R., and Brown, E. O. (1964). Clinical Observations on Use of an Extruded Collagen Structure. *Archives of Surgery*, 88 :167–174.
- Mitchell, S. L. and Niklason, L. E. (2003). Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovascular Pathology*, 12(2) :59–64.
- Mostefai, H. A., Bourget, J.-M., Meziani, F., Martinez, M. C., Leonetti, D., Mercat, A., Asfar, P., Germain, L., and Andriantsitohaina, R. (2013). Interleukin-10 controls the protective effects of circulating microparticles from patients with septic shock on tissue-engineered vascular media. *Clinical Science*, 125(2) :77–85.
- Mullins, R. J., Richards, C., and Walker, T. (1996). Allergic reactions to oral, surgical and topical bovine collagen. Anaphylactic risk for surgeons. *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology*, 24(3) :257–260.
- Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W., and Weil, A. (2013). La Matrice Extracellulaire. In *Biochimie de Harper*, pages 695–715. de boeck, 5e edition.
- Murray-Wijelath, J., Lyman, D. J., and Wijelath, E. S. (2004). Vascular graft healing. III. FTIR analysis of ePTFE graft samples from implanted bigrafts. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 70(2) :223–232.
- Neidert, M., Lee, E., Oegema, T., and Tranquillo, R. (2002). Enhanced fibrin remodeling in vitro with TGF- β 1, insulin and plasmin for improved tissue-equivalents. *Biomaterials*, 23(17) :3717–3731.
- Ng, B. H., Chou, S. M., and Krishna, V. (2005). The Influence of Gripping Techniques on the Tensile Properties of Tendons. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H : Journal of Engineering in Medicine*, 219(5) :349–354.
- Niklason, L. E., Gao, J., Abbott, W. M., Hirschi, K. K., Houser, S., Marini, R., and Langer, R. (1999). Functional arteries grown in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5413) :489–93.
- Nimni, M. E. and Harkness, R. D. (1988). Molecular structure and functions of collagen. In Raton, C. P. B., editor, *Collagen Biochemistry*, pages 3–77. I. CRP, 5th edition.

- Nobel Media AB (2014). Alexis Carrel - Biography and Nobel Lecture. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1912/carrel-bio.html.
- Noda, H. (1972). Partial Specific Volume of Collagen. *Journal of Biochemistry*, 71(4) :699–703.
- Ogle, B. M. and Mooradian, D. L. (1999). The Role of Vascular Smooth Muscle Cell Integrins in the Compaction and Mechanical Strengthening of a Tissue-Engineered Blood vessel. *Tissue Engineering*, 5(4) :387–402.
- Ogle, B. M. and Mooradian, D. L. (2002). Manipulation of Remodeling Pathways to Enhance the Mechanical Properties of a Tissue Engineered Blood Vessel. *Journal of Biomechanical Engineering*, 124(6) :724.
- Ohan, M. P. and Dunn, M. G. (2003). Glucose stabilizes collagen sterilized with gamma irradiation. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 67 :1188–1195.
- Ohan, M. P., Weadock, K. S., and Dunn, M. G. (2002). Synergistic effects of glucose and ultraviolet irradiation on the physical properties of collagen. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60(3) :384–91.
- Olde Damink, L. H. H., Dijkstra, P. J., Van Luyn, M. J. A., Van Wachem, P. B., Nieuwenhuis, P., and Feijen, J. (1996). Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials*, 17 :765–773.
- Orban, J. M., Wilson, L. B., Kofroth, J. A., El-Kurdi, M. S., Maul, T. M., and Vorp, D. A. (2004). Crosslinking of collagen gels by transglutaminase. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 68(4) :756–62.
- Owens, C. D., Wake, N., Jacot, J. G., Gerhard-Herman, M., Gaccione, P., Belkin, M., Creager, M. A., and Conte, M. S. (2006). Early biomechanical changes in lower extremity vein grafts - distinct temporal phases of remodeling and wall stiffness. *Journal of Vascular Surgery*, 44(4) :740–746.
- Panduranga Rao, K. (1996). Recent developments of collagen-based materials for medical applications and drug delivery systems. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 7(7) :623–645.
- Parry, D. A. and Craig, A. S. (1978). Collagen fibrils and elastic fibers in rat-tail tendon : an electron microscopic investigation. *Biopolymers*, 17(4) :843–5.
- Patel, D. J. and Fry, D. L. (1969). The elastic symmetry of arterial segments in dogs. *Circulation Research*, 24 :1–8.
- Paul, R. G. and Bailey, A. J. (1996). Glycation of collagen : The basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 28(12) :1297–1310.

- Pease, D. and Paule, W. (1960). Electron microscopy of elastic arteries ; the thoracic aorta of the rat. *Journal of Ultrastructure Research*, 3(4) :469–483.
- Peck, M., Gebhart, D., Dusserre, N., McAllister, T. N., and L'Heureux, N. (2012). The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. *Cells Tissues Organs*, 195(1-2) :144–158.
- Peng, H.-F., Liu, J. Y., Andreadis, S. T., and Swartz, D. D. (2011). Hair follicle-derived smooth muscle cells and small intestinal submucosa for engineering mechanically robust and vasoreactive vascular media. *Tissue Engineering. Part A*, 17(7-8) :981–90.
- Phillips, J. B. (2014). Building stable anisotropic tissues using cellular collagen gels. *Organogenesis*, 10 :6–8.
- Plopper, G. (2007). The extracellular matrix and cell adhesion. In Lewin, B., Cassimeris, L., Lingappa, V., and Plopper, G., editors, *Cells*. Sudbury, MA : Jones and Bartlett.
- Poh, M., Boyer, M., Solan, A., Dahl, S. L., Pedrotty, D., Banik, S. S., McKee, J. A., Klinger, R. Y., Counter, C. M., and Niklason, L. E. (2005). Blood vessels engineered from human cells. *The Lancet*, 365(9477) :2122–2124.
- Powell, H. M. and Boyce, S. T. (2006). EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. *Biomaterials*, 27 :5821–5827.
- Powell, H. M. and Boyce, S. T. (2009). Engineered human skin fabricated using electrospun collagen-PCL blends : morphogenesis and mechanical properties. *Tissue Engineering. Part A*, 15(8) :2177–87.
- Powell, J. T. and Gosling, M. (1998). Molecular and cellular changes in vein grafts : influence of pulsatile stretch. *Current Opinion in Cardiology*, 13(6) :453–458.
- Prager, M., Polterauer, P., Böhmig, H. J., Wagner, O., Fügl, A., Kretschmer, G., Plohner, M., Nanobashvili, J., and Huk, I. (2001). Collagen versus gelatin-coated Dacron versus stretch polytetrafluoroethylene in abdominal aortic bifurcation graft surgery : Results of a seven-year prospective, randomized multicenter trial. *Surgery*, 130(3) :408–414.
- Pricci, M., Bourget, J.-M., Robitaille, H., Porro, C., Soletti, R., Mostefai, H. A., Auger, F. A., Martinez, M. C., Andriantsitohaina, R., and Germain, L. (2009). Applications of Human Tissue-Engineered Blood Vessel Models to Study the Effects of Shed Membrane Microparticles from T-Lymphocytes on Vascular Function. *Tissue Engineering Part A*, 15(1) :137–145.
- Pulli, R., Dorigo, W., Castelli, P., Dorrucchi, V., Ferilli, F., De Blasis, G., Monaca, V., Vecchiati, E., and Pratesi, C. (2010). Midterm results from a multicenter registry on the treatment of infrainguinal critical limb ischemia using a heparin-bonded ePTFE graft. *Journal of Vascular Surgery*, 51(5) :1167–1177.e1.

- Puxkandl, R., Zizak, I., Paris, O., Keckes, J., Tesch, W., Bernstorff, S., Purslow, P., and Fratzl, P. (2002). Viscoelastic properties of collagen : synchrotron radiation investigations and structural model. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 357(1418) :191–7.
- Rajan, N., Habermehl, J., Coté, M.-F., Doillon, C. J., and Mantovani, D. (2006). Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nature Protocols*, 1(6) :2753–8.
- Ramachandran, G. N. and Kartha, G. (1954). Structure of collagen. *Nature*, 174(4423) :269–270.
- Ramachandran, G. N. and Kartha, G. (1955). Structure of Collagen. *Nature*, 176(4482) :593–595.
- Ratcliffe, A. (2000). Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biology*, 19(4) :353–357.
- Rensen, S. S. M., Doevendans, P. a. F. M., and van Eys, G. J. J. M. (2007). Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal*, 15(3) :100–8.
- Rich, A. and Crick, F. H. C. (1955). The Structure of Collagen. *Nature*, 176(4489) :915–916.
- Riesenfeld, J., Olsson, P., Sanchez, J., and Mollnes, T. E. (1995). Surface modification with functionally active heparin. *Medical Device Technology*, 6(2) :24–31.
- Roach, M. R. and Burton, A. C. (1957). The reason for the shape of the distensibility curves of arteries. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 35 :681–690.
- Roeder, B. A., Kokini, K., Sturgis, J. E., Robinson, J. P., and Voytik-Harbin, S. L. (2002). Tensile Mechanical Properties of Three-Dimensional Type I Collagen Extracellular Matrices With Varied Microstructure. *Journal of Biomechanical Engineering*, 124(2) :214–222.
- Rosenberg, N., Martinez, A., Sawyer, P. N., Wesolowski, S. A., Postlethwait, R. W., and Dillon, M. L. (1966). Tanned collagen arterial prosthesis of bovine carotid origin in man. Preliminary studies of enzyme-treated heterografts. *Annals of Surgery*, 164(2) :247–256.
- Rosenblatt, J., Devereux, B., and Wallace, D. G. (1992). Effect of electrostatic forces on the dynamic rheological properties of injectable collagen biomaterials. *Biomaterials*, 13(12) :878–86.
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s. *Nature*, 362(6423) :801–809.
- Rossler, B., Kreuter, J., and Scherer, D. (1995). Collagen Microparticles - Preparation and Properties. *Journal of Microencapsulation*, 12 :49–57.
- Rowe, S. L. and Stegemann, J. P. (2006). Interpenetrating collagen-fibrin composite matrices with varying protein contents and ratios. *Biomacromolecules*, 7 :2942–2948.

- Rubbens, M. P., Mol, A., Boerboom, R. A., Bank, R. A., Baaijens, F. P. T., and Bouten, C. V. C. (2009a). Intermittent straining accelerates the development of tissue properties in engineered heart valve tissue. *Tissue Engineering. Part A*, 15(5) :999–1008.
- Rubbens, M. P., Mol, A., van Marion, M. H., Hanemaaijer, R., Bank, R. a., Baaijens, F. P. T., and Bouten, C. V. C. (2009b). Straining mode-dependent collagen remodeling in engineered cardiovascular tissue. *Tissue Engineering. Part A*, 15(4) :841–9.
- Sarjeant, J. M. and Rabinovitch, M. (2002). Understanding and treating vein graft atherosclerosis. *Cardiovascular Pathology*, 11(5) :263–271.
- Sarkar, S., Salacinski, H. J., Hamilton, G., and Seifalian, A. M. (2006). The Mechanical Properties of Infrainguinal Vascular Bypass Grafts : Their Role in Influencing Patency. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 31(6) :627–636.
- Sarma, P. A. (2011). Effect of off-axis cell orientation on mechanical properties in smooth muscle tissue. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 04(01) :10–17.
- Sarra-Bournet, C., Turgeon, S., Mantovani, D., and Laroche, G. (2006). Comparison of Atmospheric-Pressure Plasma versus Low-Pressure RF Plasma for Surface Functionalization of PTFE for Biomedical Applications. *Plasma Processes and Polymers*, 3(6-7) :506–515.
- Sawhney, R. K. and Howard, J. (2002). Slow local movements of collagen fibers by fibroblasts drive the rapid global self-organization of collagen gels. *The Journal of Cell biology*, 157(6) :1083–91.
- Sayers, R. D., Raptis, S., Berce, M., and Miller, J. H. (1998). Long-term results of femorotibial bypass with vein or polytetrafluoroethylene. *The British Journal of Surgery*, 85(7) :934–8.
- Schmidt, C. E. and Baier, J. M. (2000). Acellular vascular tissues : natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*, 21(22) :2215–2231.
- Schussheim, A. E. and Fuster, V. (1998). Antithrombotic therapy and venous graft disease. *Current Opinion in Cardiology*, 13(6) :459–464.
- Seifter, S., Gallop, P. M., Klein, L., and Meilman, E. (1959). Studies on Collagen : II. Properties of Purified Collagenase and its Inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 234(2) :285–293.
- Seifu, D. G., Purnama, A., Mequanint, K., and Mantovani, D. (2013). Small-diameter vascular tissue engineering. *Nature Reviews. Cardiology*, 10(7) :410–21.
- Seliktar, D., Black, R. a., Vito, R. P., and Nerem, R. M. (2000). Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro. *Annals of Biomedical Engineering*, 28(4) :351–62.

- Seliktar, D., Nerem, R. M., and Galis, Z. S. (2001). The Role of Matrix Metalloproteinase-2 in the Remodeling of Cell-Seeded Vascular Constructs Subjected to Cyclic Strain. *Annals of Biomedical Engineering*, 29(11) :923–934.
- Seliktar, D., Nerem, R. M., and Galis, Z. S. (2003). Mechanical strain-stimulated remodeling of tissue-engineered blood vessel constructs. *Tissue Engineering*, 9(4) :657–66.
- Serruys, P., Grines, C., Stone, G., Garcia, E., Kiemeny, F., Morice, M., Sousa, J., Hamm, C., Costantini, C., Probst, P., Rutsch, W., Penn, I., Fernandez-Aviles, F., Vandormael, M., Bartorelli, A., Bilodeau, L., and Eijgelshoven, M. (1998). Stent implantation in acute myocardial infarction using a heparin-coated stent : a pilot study as a preamble to a randomized trial comparing balloon angioplasty and stenting. *International Journal of Cardiovascular Interventions*, 1(1) :19–27.
- Serruys, P. W., Emanuelsson, H., van der Giessen, W., Lunn, A. C., Kiemeny, F., Macaya, C., Rutsch, W., Heyndrickx, G., Suryapranata, H., Legrand, V., Goy, J. J., Materne, P., Bonnier, H., Morice, M.-C., Fajadet, J., Belardi, J., Colombo, A., Garcia, E., Ruygrok, P., de Jaegere, P., and Morel, M.-A. (1996). Heparin-Coated Palmaz-Schatz Stents in Human Coronary Arteries : Early Outcome of the Benestent-II Pilot Study. *Circulation*, 93(3) :412–422.
- Shah, P. J., Bui, K., Blackmore, S., Gordon, I., Hare, D. L., Fuller, J., Seevanayagam, S., and Buxton, B. F. (2005). Has the in situ right internal thoracic artery been overlooked ? An angiographic study of the radial artery, internal thoracic arteries and saphenous vein graft patencies in symptomatic patients. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 27(5) :870–875.
- Shahabeddin, L., Berthod, F., Damour, O., and Collombel, C. (1990). Characterization of skin reconstructed on a chitosan-cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix. *Skin Pharmacology : the Official Journal of the Skin Pharmacology Society*, 3 :107–114.
- Shen, Z. L., Kahn, H., Ballarini, R., and Eppell, S. J. (2011). Viscoelastic properties of isolated collagen fibrils. *Biophysical Journal*, 100(12) :3008–15.
- Shin'oka, T., Imai, Y., and Ikada, Y. (2001). Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *The New England Journal of Medicine*, 344(7) :532–3.
- Shin'oka, T., Matsumura, G., Hibino, N., Naito, Y., Watanabe, M., Konuma, T., Sakamoto, T., Nagatsu, M., and Kurosawa, H. (2005). Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 129(6) :1330–8.
- Silver, F. (2003). Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *Journal of Biomechanics*, 36(10) :1529–1553.
- Silver, F. H. and Birk, D. E. (1983). Kinetic analysis of collagen fibrillogenesis : I. Use of turbidity–time data. *Collagen and Related Research*, 3 :393–405.

- Silver, F. H. and Birk, D. E. (1984). Molecular structure of collagen in solution : comparison of types I, II, III and V. *International Journal of Biological Macromolecules*, 6(3) :125–132.
- Silver, F. H., Ebrahimi, A., and Snowhill, P. B. (2002a). Viscoelastic Properties of Self-Assembled Type I Collagen Fibers : Molecular Basis of Elastic and Viscous Behaviors. *Connective Tissue Research*, 43(4) :569–580.
- Silver, F. H., Horvath, I., and Foran, D. J. (2001). Viscoelasticity of the Vessel Wall : The Role of Collagen and Elastic Fibers. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 29(3) :279–302.
- Silver, F. H., Horvath, I., and Foran, D. J. (2002b). Mechanical implications of the domain structure of fiber-forming collagens : comparison of the molecular and fibrillar flexibilities of the alpha1-chains found in types I-III collagen. *Journal of Theoretical Biology*, 216(2) :243–54.
- Silver, F. H. and Landis, W. J. (2008). Viscoelasticity , Energy Storage and Transmission and Dissipation by Extracellular Matrices in Vertebrates. In Fratzl, P., editor, *Collagen. Structure and Mechanics*, chapter 6, pages 133–154. Springer US.
- Silver, F. H. and Siperko, L. M. (2003). Mechanosensing and mechanochemical transduction : how is mechanical energy sensed and converted into chemical energy in an extracellular matrix ? *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 31 :255–331.
- Silver, F. H., Snowhill, P. B., and Foran, D. J. (2003). Mechanical Behavior of Vessel Wall : A Comparative Study of Aorta, Vena Cava, and Carotid Artery. *Annals of Biomedical Engineering*, 31(7) :793–803.
- Sionkowska, A. and Wess, T. (2004). Mechanical properties of UV irradiated rat tail tendon (RTT) collagen. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34(1-2) :9–12.
- Sionkowska, A., Wisniewski, M., Skopinska, J., Poggi, G., Marsano, E., Maxwell, C., and Wess, T. (2006). Thermal and mechanical properties of UV irradiated collagen/chitosan thin films. *Polymer Degradation and Stability*, 91(12) :3026–3032.
- Sorokin, L. (2010). The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, 10(10) :712–23.
- Speer, D. P., Chvapil, M., Eskelson, C. D., and Ulreich, J. (1980). Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 14 :753–764.
- Spoerl, E., Wollensak, G., and Seiler, T. (2004). Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Current Eye Research*, 29(1) :35–40.
- Standring, S. (2005). Smooth muscle and the cardiovascular and lymphatic systems. In Standring, S., editor, *Gray's Anatomy : The Anatomical Basis of Clinical Practice*, volume 10, chapter 7, pages 137–155. Elsevier Inc., 39th edition.

- Statistics Canada (2010). Deaths, by cause, Chapter IX : Diseases of the circulatory system (I00 to I99), age group and sex, canada, annual (number), 2000 to 2006.
- Statistics Canada (2011). Mortality, summary list of causes 2008.
- Stegemann, J. P., Hong, H., and Nerem, R. M. (2005). Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *Journal of Applied Physiology*, 98 :2321–2327.
- Stopak, D. and Harris, A. K. (1982). Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. *Developmental Biology*, 90(2) :383–398.
- Stringa, E., Knäuper, V., Murphy, G., and Gavrilovic, J. (2000). Collagen degradation and platelet-derived growth factor stimulate the migration of vascular smooth muscle cells. *Journal of Cell Science*, 113 :2055–2064.
- Sudoh, K. and Noda, H. (1972). UV-Irradiation of Collagen and its Effect on Fibril Reconstitution. *Connective Tissue Research*, 1 :267–274.
- Sundararaghavan, H. G., Monteiro, G. A., Lapin, N. A., Chabal, Y. J., Miksan, J. R., and Shreiber, D. I. (2008). Genipin-induced changes in collagen gels : Correlation of mechanical properties to fluorescence. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 87 :308–320.
- Sung, H.-W., Chang, W.-H., Ma, C.-Y., and Lee, M.-H. (2003). Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 64 :427–438.
- Sung, H.-W., Chang, Y., Chiu, C.-T., Chen, C.-N., and Liang, H.-C. (1999a). Mechanical properties of a porcine aortic valve fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *Biomaterials*, 20 :1759–1772.
- Sung, H. W., Hsu, C. S., Chen, H. C., Hsu, H. L., Chang, Y., Lu, J. H., and Yang, P. C. (1997). Fixation of various porcine arteries with an epoxy compound. *Artificial Organs*, 21 :50–58.
- Sung, H. W., Huang, R. N., Huang, L. L., and Tsai, C. C. (1999b). In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterials Science. Polymer edition*, 10 :63–78.
- Sung, H. W., Huang, R. N., Huang, L. L. H., Tsai, C. C., and Chiu, C. T. (1998). Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 42 :560–567.
- Swartz, D. D., Russell, J. A., and Andreadis, S. T. (2005). Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 288(3) :H1451–60.

- Syedain, Z. H., Meier, L. A., Bjork, J. W., Lee, A., and Tranquillo, R. T. (2011). Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flow-stretch bioreactor with noninvasive strength monitoring. *Biomaterials*, 32(3) :714–22.
- Syedain, Z. H., Meier, L. A., Lahti, M. T., Johnson, S. L., and Tranquillo, R. T. (2014). Implantation of Completely Biological Engineered Grafts Following Decellularization into the Sheep Femoral Artery. *Tissue Engineering Part A*, 20(11-12) :1726–1734.
- Syedain, Z. H., Weinberg, J. S., and Tranquillo, R. T. (2008). Cyclic distension of fibrin-based tissue constructs : evidence of adaptation during growth of engineered connective tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(18) :6537–42.
- Tam, E. M., Moore, T. B., Butler, G. S., and Overall, C. M. (2004). Characterization of the distinct collagen binding, helicase and cleavage mechanisms of matrix metalloproteinase 2 and 14 (gelatinase A and MT1-MMP) : The differential roles of the MMP hemopexin C domains and the MMP-2 fibronectin type II modules in collage. *Journal of Biological Chemistry*, 279 :43336–43344.
- Tan, W., Twomey, J., Guo, D., Madhavan, K., and Li, M. (2010). Evaluation of nanostructural, mechanical, and biological properties of collagen-nanotube composites. *IEEE transactions on nanobioscience*, 9(2) :111–20.
- Tang, S. Y., Sharan, A. D., and Vashishth, D. (2008). Effects of collagen crosslinking on tissue fragility. *Clinical biomechanics (Bristol, Avon)*, 23(1) :122–3 ; author reply 124–6.
- Tatoulian, M., Gallino, E., Jafari, R., Arefi-Khonsari, F., Tatoulian, L., Borra, J., Lewis, F., and Mantovani, D. (2007). Plasma and Electro spray Deposition to Improve the Biocompatibility of Stents. *Materials Science Forum*, 539-543 :529–534.
- Taylor, L. M., Edwards, J. M., Brant, B., Phinney, E. S., and Porter, J. M. (1987). Autogenous reversed vein bypass for lower extremity ischemia in patients with absent or inadequate greater saphenous vein. *The American Journal of Surgery*, 153(5) :505–510.
- Taylor, L. M., Edwards, J. M., and Porter, J. M. (1990). Present status of reversed vein bypass grafting : Five-year results of a modern series. *Journal of Vascular Surgery*, 11(2) :193–206.
- Tenni, R., Sonaggere, M., Viola, M., Bartolini, B., Tira, M. E., Rossi, A., Orsini, E., Ruggeri, A., and Ottani, V. (2006). Self-aggregation of fibrillar collagens I and II involves lysine side chains. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 37(7) :640–7.
- Thie, M., Schlumberger, W., Semich, R., Rauterberg, J., and Robenek, H. (1991). Aortic smooth muscle cells in collagen lattice culture : effects on ultrastructure, proliferation and collagen synthesis. *European Journal of Cell Biology*, 55(2) :295–304.
- Thiriet, M. (2011). *Cell and Tissue Organization in the Circulatory and Ventilatory Systems*. Springer New York.

- Timkovich, R. (1977). Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins. *Analytical Biochemistry*, 79 :135–143.
- Tirella, A., Liberto, T., and Ahluwalia, A. (2012). Riboflavin and collagen : New crosslinking methods to tailor the stiffness of hydrogels. *Materials Letters*, 74 :58–61.
- Tortora, G. J. and Grabowski, S. R. (2001). Principes d’anatomie et de physiologie. In *Editions du Renouveau Pédagogique*, pages 709–779. ERPI, 2nd edition.
- Tranquillo, R. T., Girton, T. S., Bromberek, B. a., Tribes, T. G., and Mooradian, D. L. (1996). Magnetically orientated tissue-equivalent tubes : application to a circumferentially orientated media-equivalent. *Biomaterials*, 17(3) :349–57.
- Tsai, C. C., Huang, R. N., Sung, H. W., and Liang, H. C. (2000). In vitro evaluation of the genotoxicity of a naturally occurring crosslinking agent (genipin) for biologic tissue fixation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52 :58–65.
- Tschoeke, B., Flanagan, T. C., Koch, S., Harwoko, M. S., Deichmann, T., Ellå, V., Sachweh, J. S., Kellomäki, M., Gries, T., Schmitz-Rode, T., and Jockenhoewel, S. (2009). Tissue-engineered small-caliber vascular graft based on a novel biodegradable composite fibrin-poly lactide scaffold. *Tissue Engineering. Part A*, 15(8) :1909–18.
- Vallièrès, K., Petitclerc, E., and Laroche, G. (2007). Covalent grafting of fibronectin onto plasma-treated PTFE : influence of the conjugation strategy on fibronectin biological activity. *Macromolecular Bioscience*, 7(5) :738–45.
- van Geemen, D., Driessen-Mol, A., Baaijens, F. P. T., and Bouten, C. V. C. (2013). Understanding strain-induced collagen matrix development in engineered cardiovascular tissues from gene expression profiles. *Cell and Tissue Research*, 352(3) :727–37.
- van Luyn, M. J., van Wachem, P. B., Olde Damink, L. H., Dijkstra, P. J., Feijen, J., and Nieuwenhuis, P. (1992). Secondary cytotoxicity of cross-linked dermal sheep collagens during repeated exposure to human fibroblasts. *Biomaterials*, 13 :1017–1024.
- Vara, D. S., Salacinski, H. J., Kannan, R. Y., Bordenave, L., Hamilton, G., and Seifalian, A. M. (2005). Cardiovascular tissue engineering : state of the art. *Pathologie-Biologie*, 53(10) :599–612.
- Velegol, D. and Lanni, F. (2001). Cell traction forces on soft biomaterials. I. Microrheology of type I collagen gels. *Biophysical Journal*, 81(3) :1786–92.
- Villalona, G. a., Udelsman, B., Duncan, D. R., McGillicuddy, E., Sawh-Martinez, R. F., Hibino, N., Painter, C., Mirensky, T., Erickson, B., Shinoka, T., and Breuer, C. K. (2010). Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 16(3) :341–350.
- Voët, V. (2005). *Biochimie*. De Boeck, second edition.

- Vogel, A. and Venugopalan, V. (2003). Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chemical Reviews*, 103 :577–644.
- Vogel, H. G. (1977). Mechanical and Chemical Properties of Various Connective Tissue Organs in Rats as Influenced by Non-Steroidal Antirheumatic Drugs. *Connective Tissue Research*, 5(2) :91–95.
- von Hippel, P. H. and Wong, K.-Y. (1963). The Collagen - Gelatin Phase Transition. I. Further Studies of the Effects of Solvent Environment and Polypeptide Chain Composition. *Biochemistry*, 2(6) :1387–1398.
- Voorhees, A. B., Jaretzki, A., and Blakemore, A. H. (1952). The use of tubes constructed from Vinyon N cloth in bridging arterial defects A preliminary report. *Annals of Surgery*, 135(3) :332–336.
- Wagenseil, J. E., Wakatsuki, T., Okamoto, R. J., Zahalak, G. I., and Elson, E. L. (2003). One-Dimensional Viscoelastic Behavior of Fibroblast Populated Collagen Matrices. *Journal of Biomechanical Engineering*, 125(5) :719.
- Wang, X., Li, X., and Yost, M. J. (2005). Microtensile testing of collagen fibril for cardiovascular tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 74(2) :263–8.
- Weadock, K., Olson, R. M., and Silver, F. H. (1983). Evaluation of collagen crosslinking techniques. *Biomaterials, Medical devices, and Artificial Organs*, 11 :293–318.
- Weadock, K. S., Miller, E. J., Bellincampi, L. D., Zawadsky, J. P., and Dunn, M. G. (1995). Physical crosslinking of collagen fibers : Comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment. In *Journal of Biomedical Materials Research*, volume 29, pages 1373–1379.
- Weadock, K. S., Miller, E. J., Keuffel, E. L., and Dunn, M. G. (1996). Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *Journal of Biomedical Materials Research*, 32 :221–226.
- Wei, H.-J., Liang, H.-C., Lee, M.-H., Huang, Y.-C., Chang, Y., and Sung, H.-W. (2005). Construction of varying porous structures in acellular bovine pericardium as a tissue-engineering extracellular matrix. *Biomaterials*, 26(14) :1905–13.
- Weidenhamer, N. K. and Tranquillo, R. T. (2013). Influence of cyclic mechanical stretch and tissue constraints on cellular and collagen alignment in fibroblast-derived cell sheets. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 19(5) :386–95.
- Weinberg, C. and Bell, E. (1986). A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*, 231(4736) :397–400.
- Wiese, P., Blume, J., Mueller, H.-J., Renner, H., and Nonnast-Daniel, B. (2003). Clinical and Doppler ultrasonography data of a polyurethane vascular access graft for haemodialysis : a prospective study.

- Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 18(7) :1397–1400.
- Williams, S. K. (1998). Human clinical trials of microvascular endothelial cell seeding. In Zilla P, Greisler HP, E., editor, *Tissue Engineering of Vascular Prosthetic Grafts*, pages 143–148. Austin, USA : R G Landes.
- Wolff, S. P. and Dean, R. T. (1986). Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *The Biochemical Journal*, 234 :399–403.
- Wong, A. P., Nili, N., Jackson, Z. S., Qiang, B., Leong-Poi, H., Jaffe, R., Raanani, E., Connelly, P. W., Sparkes, J. D., and Strauss, B. H. (2008). Expansive remodeling in venous bypass grafts : Novel implications for vein graft disease. *Atherosclerosis*, 196(2) :580–589.
- Wong, J. Y., Velasco, A., Rajagopalan, P., and Pham, Q. (2003). Directed movement of vascular smooth muscle cells on gradient-compliant hydrogels. *Langmuir*, 19 :1908–1913.
- World Health Organization (2014). Global Health Estimates : Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012.
- Wu, X., Black, L., Santacana-Laffitte, G., and Patrick, C. W. (2007). Preparation and assessment of glutaraldehyde-crosslinked collagen-chitosan hydrogels for adipose tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 81 :59–65.
- Xu, B., Chow, M.-J., and Zhang, Y. (2011). Experimental and modeling study of collagen scaffolds with the effects of crosslinking and fiber alignment. *International Journal of Biomaterials*, 2011 :172389.
- Xu, F., Seffen, K. A., and Lu, T. J. (2008). Temperature-Dependent Mechanical Behaviors of Skin Tissue. *International Journal of Computer Science*, 35 :1–13.
- Yang, W., Fung, T. C., Chian, K. S., and Chong, C. K. (2006). Investigations of the Viscoelasticity of Esophageal Tissue using Incremental Stress-Relaxation Test and Cyclic Extension Test. *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*, 6(3) :261–272.
- Yunoki, S., Nagai, N., Suzuki, T., and Munekata, M. (2004). Novel biomaterial from reinforced salmon collagen gel prepared by fibril formation and cross-linking. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(1) :40–7.
- Zaman, N. (2013). *Influence of Loading and Matrix Stiffness on Airway Smooth Muscle Contractile Function and Phenotype within a 3D Microtissue Culture Model*. Master of applied science, Dalhousie University (Halifax), Canada.
- Zeeman, R., Dijkstra, P. J., Van Wachem, P. B., Van Luyn, M. J. A., Hendriks, M., Cahalan, P. T., and Feijen, J. (1999). Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. *Biomaterials*, 20 :921–931.

- Zeugolis, D. I., Paul, G. R., and Attenburrow, G. (2009). Cross-linking of extruded collagen fibers-A biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 89 :895–908.
- Zhang, W. J., Liu, W., Cui, L., and Cao, Y. (2007). Tissue engineering of blood vessel. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(5) :945–57.
- Zilla, P., Deutsch, M., Meinhart, J., Puschmann, R., Eberl, T., Minar, E., Dudczak, R., Lugmaier, H., Schmidt, P., and Noszian, I. (1994a). Clinical in vitro endothelialization of femoropopliteal bypass grafts : an actuarial follow-up over three years. *Journal of Vascular Surgery*, 19(3) :540–8.
- Zilla, P., Fasol, R., Dudeck, U., Siedler, S., Preiss, P., Fischlein, T., Müller-Glauser, W., Baitella, G., Sanan, D., Odell, J., and Reichart, B. (1990). In situ cannulation, microgrid follow-up and low-density plating provide first passage endothelial cell masscultures for in vitro lining. *Journal of Vascular Surgery*, 12(2) :180–189.
- Zilla, P., Fasol, R., Preiss, P., Kadletz, M., Deutsch, M., Schima, H., Tsangaris, S., and Groscurth, P. (1989a). Use of fibrin glue as a substrate for in vitro endothelialization of PTFE vascular grafts. *Surgery*, 105(4) :515–22.
- Zilla, P., Fasol, R., Preiss, P., Kadletz, M., Deutsch, M., Schima, H., Tsangaris, S., and Groscurth, P. (1989b). Use of fibrin glue as a substrate for in vitro endothelialization of PTFE vascular grafts. *Surgery*, 105 :515–522.
- Zilla, P., Preiss, P., Groscurth, P., Rosemeier, F., Deutsch, M., Odell, J., Heidinger, C., Fasol, R., and Vonoppell, U. (1994b). In-Vitro Lined Endothelium - Initial Integrity and Ultrastructural Events. *Surgery*, 116(3) :524–534.
- Zwolak, R. M., Adams, M. C., and Clowes, A. W. (1987). Kinetics of vein graft hyperplasia : Association with tangential stress. *Journal of Vascular Surgery*, 5(1) :126–136.

Annexe A

Protocole d'extraction du collagène des tendons de queue de rats et reconstitution en laboratoire

Cette annexe à la thèse présente la méthodologie d'extraction du collagène, de sa solubilisation, de sa purification, de sa stérilisation et de sa gélification à température ambiante en présence solutions tampons.

Le collagène est la protéine la plus abondante du tendon. De façon globale, les constituants majeurs du tendon sont l'eau (~ 55 % à 60 % du poids frais du tendon) et le collagène de type I (Vogel, 1977). La teneur en collagène du tendon de queue de rat est de 60 à 65 % de la matière sèche (Parry and Craig, 1978). La teneur en collagène du tendon peut cependant varier et représenter jusqu'à 90 % de la matière sèche principalement dans les régions soumises à de fortes tensions (Nimni and Harkness, 1988). Le pourcentage d'eau des tendons varie en fonction de l'espèce, du stade de développement, du site anatomique, de l'hydratation et de la condition physiopathologique du tissu (Elliott and Crawford, 1965).

Le collagène de type I est extrait de tendons de queues de rats âgés de 8 à 9 mois et stocké selon des protocoles élaborés au sein du laboratoire (Habermehl et al., 2005; Rajan et al., 2006). Les tendons sont prélevés des queues à l'aide de pinces et de ciseaux par désarticulation successive des vertèbres. Sous l'effet de la traction exercée, les tendons, essentiellement constitués de fibres de collagène, glissent le long de la gaine cutanée de la queue. Afin de pouvoir stocker le collagène et assurer la reproductibilité de nos expériences, les fibrilles de collagène sont solubilisées, puis cette solution est congelée et lyophilisée pour obtenir des éponges de collagène. Les éponges sont ensuite stockées et dissoutes à nouveau (et au besoin) dans de l'acide acétique pour obtenir une solution de collagène à une concentration fixée. La procédure se déroule comme suit :

A.1 Des tendons de queue de rats aux éponges de collagène

Les queues de rats sont rincées dans de l'eau ultra-pure. Les fibrilles sont extraites, en déchirant et en étirant les extrémités des queues de rats, et collectées dans du PBS. L'étape de lavage des fibres de collagène se fait en les faisant tremper successivement dans une solution d'acétone (5 min), puis dans une solution d'isopropanol (70 %, 5 min), et enfin dans une solution d'acide acétique (0,02 N) pendant 48 h. Les fibres de collagène ainsi obtenues sont solubilisées dans l'acide acétique 0,02 N en les fragmentant à l'aide d'un mixeur (entouré de glace) jusqu'à ce que la solution soit homogène. Cette solution est ensuite congelée à -20°C pendant 3 jours pour obtenir des blocs de collagène. Les éponges de collagène sont obtenues en entreposant les blocs dans un lyophilisateur jusqu'à ce que tout le solvant soit éliminé. Sous forme d'éponge, le collagène peut être conservé à -80°C pendant 18 mois ([Rajan et al., 2006](#)).

A.2 Des éponges aux solutions de collagène

Les éponges sont régulièrement dissoutes à nouveau dans de l'acide acétique 0,02 N de sorte à disposer d'une solution de collagène prête à l'emploi. À l'aide d'un mixeur utilisé de manière pulsée, les éponges de collagène sont dissoutes dans de l'acide acétique 0,02 N de sorte à obtenir une concentration finale de 4 g/L. Cette solution est alors centrifugée à 14000 rpm pendant 1 h pour éliminer les impuretés et les débris, principalement constitués de collagène de type autre que le type I. Après l'avoir dégazée dans un vide relativement poussé (10^{-3} Torr), cette solution est stérilisée par une technique de dialyse. À la fin de cette étape, une solution homogène et visqueuse contenant de petits agrégats de molécules de collagène dispersés dans l'acide acétique est obtenue. Sous cette forme, le collagène peut être conservé 6 à 8 mois ([Rajan et al., 2006](#)).

A.3 Des solutions aux gels de collagène

La gélification du collagène s'effectue dans des conditions précises de température, de pH et de force ionique ([Achilli and Mantovani, 2010](#); [Achilli, 2012](#)). Pour initier la gélification, la solution de collagène est alors mélangée avec des solutions tampons et des milieux de culture menant progressivement le mélange à un pH physiologique et apportant des nutriments aux éventuelles cellules ([Kadler et al., 1996](#)) tel que montré dans le Tableau A.1. Chacun des protocoles présentés dans ce Tableau est réalisé à basse température (0-4°C) afin de ralentir le processus de gélification ([Leikin et al., 1995](#)). Ainsi, le protocole de la première colonne du Tableau A.1 est utilisé dans les études portant sur les caractérisations des propriétés mécaniques et viscoélastiques des gels de collagène (en l'absence de cellules). Lors de l'étude sur l'effet du remodelage cellulaire sur le renforcement et la réorganisation des structures de collagène, les cellules sont ajoutées une fois que les solutions tampons et le collagène sont mélangés et que le pH est proche du pH physiologique, comme le montre le protocole de la deuxième

Composants	Quantités (% v/v)	
	Gel de collagène sans cellules	Gel de collagène avec cellules
DMEM 5X	17,5	17,5
NaOH (1 M)	1,5	1,5
Hepes (1 M)	2,0	2,0
H ₂ O mQ	4,0	4,0
Solution de collagène (4 g/L)	50,0	50,0
DMEM 1X sans cellules	25,0	-
Milieu complet avec cellules (10 ⁶ cellules/mL)	-	25,0

Tableau A.1 – Protocole de préparation des gels de collagène. La proportion de chaque composant est exprimée en pourcentage du volume final de gel à préparer. Le DMEM 1X (Dulbecco's Modified Eagle Medium Sigma Aldrich Inc. St.Louis, Mo, USA) correspond au milieu de culture standard de base. Le milieu complet correspond au DMEM complété par 10 % de sérum fœtal bovin (Gibco-Invitrogen, Grand Island, N.Y., USA), 10 % de sérum de porc (Gibco-Invitrogen, Auckland, N.Z.), et 1 % de pénicillin-streptomycine (PenStrep, 10 000 U pénicilline + 10 000 µg streptomycine par mL, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA).

colonne du Tableau A.1. La gélification est alors accélérée lorsque le mélange homogène est placé à température ambiante.

Annexe B

Publications Scientifiques

1. **Meghezi, S.**, Seifu, D. G. & Mantovani, D. Smooth Muscle Cells Remodeling of Collagen Scaffolds Yields Improved Anisotropic Mechanical Properties. *Tissue engineering. Part A* , Submitted (2015).
2. **Meghezi, S.**, Seifu, D. G., Bono, N., Unsworth, L., Mequanint, K. & Mantovani, D. Engineering 3D Cellularized Collagen Gels for Vascular Tissue Regeneration. *Journal of visualized experiments : JoVE* , In Press (2014).
3. **Meghezi, S.**, Couet, F., Chevallier, P. & Mantovani, D. Effects of a pseudophysiological environment on the elastic and viscoelastic properties of collagen gels. *International journal of biomaterials* 2012, 319290, doi :10.1155/2012/319290 (2012).
4. **Meghezi, S.**, Chevallier, P. & Mantovani, D. Why Mechanical Properties of Collagen Scaffolds Should Be Tested in a Pseudo-Physiological Environment ? *Advanced Materials Research* 409, 158-163, doi :10.4028/www.scientific.net/AMR.409.158 (2011).
5. Achilli, M., **Meghezi, S.** & Mantovani, D. On the Viscoelastic Properties of Collagen-Gel-Based Lattices under Cyclic Loading : Applications for Vascular Tissue Engineering. *Macromolecular Materials and Engineering* 297 (7), 724-734, doi :10.1002/mame.201100363 (2012).
6. Couet, F., **Meghezi, S.** & Mantovani, D. Fetal development, mechanobiology and optimal control processes can improve vascular tissue regeneration in bioreactors : An integrative review. *Medical engineering & physics* , 1-10, doi :10.1016/j.medengphy.2011.10.009 (2011).
7. Couet, F., **Meghezi, S.**, Levesque, L. & Mantovani, D. Monitoring Compliance and Elastic Modulus in a Bioreactor for Optimal Control of Vascular Tissue Growth. *Advanced Materials Research* 409, 123-128, doi :10.4028/www.scientific.net/AMR.409.123 (2011).
8. Seifu, D. G., **Meghezi, S.**, Mequanint, K., Unsworth, L. & Mantovani, D. Multiwall Cell-seeded Collagen Constructs Improved Mechanical Properties by Cell Remodelling and Collagen Fiber Orientation. *Tissue engineering. Part A* , Submitted (2015).

9. Loy, C., **Meghezi, S.**, Levesque, L., Kizhakkedathub, J. & Mantovani, D. Tri-Culture Of Vascular Cells Promotes Vascular Tissue Remodeling. Tissue engineering. Part A , Submission process (2015).
10. Seifu, D. G., **Meghezi, S.**, Mequanint, K., Unsworth, L. & Mantovani, D. Proteomics on Multiwall Cell-seeded Collagen Constructs. Tissue engineering. Part A , Submission process (2015).

Annexe C

Communications Scientifiques

C.1 Présentations internationales

Meghezi S. (2014) ASM Leadership Days 2014 : Présentation des activités du Chapitre de Québec de l'ASM, Congrès Annuel de la Société Américaine pour les Matériaux (ASM), Minneapolis MN (USA), du 17 au 21 juillet. (présentation orale).

Meghezi S., Seifu D.G., Mantovani D. (2013) Static maturation allows smooth muscle cells to effectively remodel collagen gel matrix prior to mechanical stimulation in a dynamic bioreactor, Termis-Americas 2013, Atlanta GA (USA), du 10 au 13 novembre. (présentation par affiche).

Meghezi S., Couët F., Chevallier P., Mantovani D. (2012) Viscoelastic characterization of collagen scaffolds for vascular tissue regeneration in a perfused bioreactor, 9^e Congrès Mondial des Biomateriaux, Chengdu (China), du 1er au 5 juin. (présentation orale).

Meghezi S., Chevallier P., Mantovani D. (2011), Should mechanical properties of collagen scaffolds be tested in a pseudo-physiological environment ?, 7^e Congrès Thermec, Conférence Internationale de Fabrication et de Transformation des Matériaux Avancés, Québec (Canada), du 1er au 5 août. (présentation orale).

Meghezi S., Mantovani D. (2009) A New Method to assess Collagen Gels Mechanical Properties by Tensile Tests in a Pseudo-physiological Environment, 3^e Conférence Internationale sur la Mécanique des Biomateriaux et des Tissus, Tampa (USA), du 13 au 17 décembre. (présentation orale).

C.2 Présentations nationales

Meghezi S., Seifu D. G, Mantovani D. (2014) Controlled structural tissue organization and mechanical properties of collagen gel scaffolds through cells remodeling, 31^e conférence annuelle de la Société Canadienne des Biomateriaux, Halifax (Canada), du 4 au 7 juin. (présentation orale).

Meghezi S., Seifu D.G., Mantovani D. (2013) Collagen scaffolds reinforcement through cells remo-

deling for vascular tissue engineering, 1^{ère} Rencontre Annuelle des Utilisateurs des Solutions Bose, Montréal (Canada), 17 juillet. (présentation orale).

Meghezi S., Seifu D.G., Mantovani D. (2013) Collagen scaffolds reinforcement through cells remodeling for vascular tissue engineering, 30^e conférence annuelle de la Société Canadienne des Biomateriaux, Ottawa (Canada), du 29 mai au 1er juin. (présentation orale).

Meghezi S., Lagueux J., Mantovani D. (2009) Effects of ribofavin on UV-induced crosslinking of collagen gels, 27^e conférence annuelle de la Société Canadienne des Biomateriaux, Québec (Canada), du 20 au 23 mai. (présentation par affiche).

Couët F., Achilli M., **Meghezi S.**, Mantovani D. (2007) A new method to assess collagen gels mechanical properties by indentation tests and numerical modeling, 26^e conférence annuelle de la Société Canadienne des Biomateriaux, London (Canada), du 25 au 27 mai. (présentation par affiche).

C.3 Présentations provinciales

Meghezi S. (2014) Présentation du chapitre étudiants de Québec de la Société Canadienne des Biomateriaux, Université Laval, Québec (Canada), 28 octobre. (présentation orale).

Meghezi S., Mantovani D. (2013) The use of collagen gels for the in vitro fabrication of blood vessels ? ! ?, Compétition "Votre soutenance en 180 secondes" du 81^e Congrès de l'Association Francophone pour le Savoir, Québec (Canada), du 6 au 9 mai. Lauréat du 4^e prix (présentation orale).

Meghezi S. (2012) Présentation des activités et des avantages à être membre de l'ASM, Université Laval, Québec (Canada), 4 octobre. (présentation orale).

Meghezi S., Klak M.C., Mantovani D. (2012) Research activities of the Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, 4^e colloque annuel du Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels, Québec (Canada), 1er et 2 novembre. (présentation par affiche).

Meghezi S., Mantovani D. (2011) Research activities of the Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, 3^e colloque annuel du Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels, Québec (Canada) 2 et 3 novembre. (présentation par affiche).

Meghezi S. (2010) Le Laboratoire de Biomateriaux et Bioingénierie de l'Université Laval, Centre de Recherche du CHU de Québec, Québec (Canada), 19 février. (présentation orale).

Meghezi S., Couët F. (2009) Un bioréacteur pour imiter le miracle de la vie, Lab-Oratoire public (AELIES), Québec (Canada), 13 et 14 octobre. (présentation orale).

Meghezi S., Achilli M., Mantovani D. (2008) The attractive properties of collagen gels as scaffolds for vascular tissue regeneration, 78^e Congrès de l'Association Francophone pour le Savoir, Québec (Canada), 5 et 6 mai. (présentation par affiche).

Annexe D

Activités complémentaires à la formation doctorale

Lors de ces années d'études doctorales, j'ai eu l'opportunité à plusieurs reprises d'enseigner notamment dans le cadre du **cours de "Matériaux pour l'ingénieur"** dispensé par le professeur Diego Mantovani. L'enseignement m'apparaît comme une activité essentielle et complémentaire au métier de chercheur. La recherche en tant que telle ne peut être valorisée que par le partage et la transmission de connaissance. De plus, cette activité permet d'acquérir une certaine confiance lors de la prise de parole en public et de développer des aptitudes de vulgarisation de concepts scientifiques parfois difficiles à intégrer de prime abord. Dans ce sens, enseigner fut un réel plaisir de pouvoir transmettre des connaissances aux étudiants et de reconnaissance de la part de ces derniers. Je remercie le professeur Mantovani de m'avoir offert cette opportunité.

Parallèlement à cela et par la suite, je me suis attaché à m'impliquer de mon mieux **dans la vie étudiante et la vie scientifique** en m'investissant dans les diverses associations suivantes :

- Chapitre étudiant de Québec de la Société Canadienne de Biomateriaux (CBS-QCSC) - président et fondateur (2014-2015).
- American Society for Materials (ASM) - trésorier (2008-2014).
- Centre de Recherche sur les Matériaux Avancés (CERMA) - représentant étudiant (2012-2014) et président du colloque étudiant (2013).
- Thermec - membre du comité étudiant organisateur (2011).
- Société Canadienne des Biomateriaux (SCB) - membre du comité étudiant organisateur (2009).

Ces activités complémentaires à ma formation doctorale m'ont permis de développer certaines compétences personnelles, telles que des habiletés en gestion, en coordination et en planification, en communication, en capacité à travailler en équipe mais également à faire preuve d'autonomie et de créa-

tivité. Ces activités furent autant d'opportunités de d'enrichir mes connaissances dans des domaines multidisciplinaires et connexes, de nouer des relations à la fois professionnelles et amicales avec des personnes aux parcours et aux horizons très variés. **Cette implication étudiante a été reconnue à travers une attestation délivrée par le vice-recteur aux études et aux activités internationales de l'Université Laval (2014)** afin de souligner mon "esprit d'initiative, [...] de leadership et de [...] bon sens critique".