

Sciences du Vivant

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Simon Rinckenbach

**MODIFICATIONS DE SURFACES DE PROTHÈSES VASCULAIRES EN
POLYÉTHYLÈNE DE TÉREPHTALATE : OPTIMISATION DE
L'ÉTANCHÉITÉ ET DE L'ENDOTHÉLIALISATION.**

Soutenue le 17 décembre 2007

Unité De Recherche : **Inserm Umr-S 595 / Ert 10-61**

Directeur De Thèse : **Nabil Chakfé**

Co-Directeur De Thèse : **Dominique Vautier**

Rapporteur interne : Professeur Gero Decher

Rapporteur externe : Docteur Patrick Menu

Rapporteur externe : Professeur Gabriel Camelot

Examineur : Professeur Dominique Stephan

REMERCIEMENTS.

À Dominique Vautier,

Ce travail est une histoire de rencontres. Premièrement entre le monde de la recherche (que je ne connaissais pas), et le monde clinique : ce genre de rencontre qui donne les bonnes idées.

C'est surtout une rencontre entre deux personnes avec ce petit plus qui simplifie tout et qui transforme le difficile en facile, le pénible en léger.

Tu as fait preuve de persévérance, de ténacité, tu as été le véritable moteur de ce travail, jusqu'à son terme. Et comme à ton habitude, cette masse de travail tu l'as abattue avec le sourire, en toute discrétion, sans en revendiquer les mérites, ce qui est tout à ton honneur.

J'ai eu beaucoup de chance d'avoir travaillé avec toi. J'espère que cette alchimie se prolongera encore pour les projets à venir.

Merci pour tout.

À Nabil Chakfé,

Tu es à l'origine de ce projet, sans cet aspect mécanique que tu as voulu explorer, ce travail ne serait pas aussi innovant.

Malgré tes très nombreuses obligations, tu a pu trouver aux bons moments le temps pour rediriger le tir, insister sur un point ou donner un coup de pouce.

Tu suis depuis de nombreuses années mon parcours et je t'en suis très reconnaissant. Le soutien que tu m'apportes (même sur un lit d'hôpital!) m'est extrêmement important et je t'en remercie.

Je suis très sensible à l'honneur que me font

Mr le Professeur Gero Decher,

Mr le docteur Patrick Menu,

Mr le Professeur Dominique Stephan,

Mr le Professeur Gabriel Camelot,

d'accepter de juger mon travail, j'espère être à la hauteur de leurs attentes.

À toute l'équipe du laboratoire INSERM 595 et son directeur Jean-Claude Voegel, je souhaite vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir accepté au sein de votre équipe et m'avoir soutenu tout au long de ce projet.

À toute l'équipe du laboratoire GEPROVAS, Mr le Professeur Bernard Durand, les Docteurs Florence Dieval, Frédéric Heim, Jean-François Lemagnen, Andréi Ivanienko, et les autres. Vos très grandes compétences, votre aide technique et logistique, votre disponibilité m'ont permis d'aboutir. Je vous en suis extrêmement reconnaissant.

À Mr le Docteur Jean-Hervé Lignot,

Ta bonne humeur constante et ton immense curiosité rivalisent avec tes grandes compétences. Je te remercie très chaleureusement pour les séances passionnantes de microscopie (et les cours d'herpétologie appliquée !) que tout nous a fait vivre.

A Virginie, Margaux et Lucas,

Grâce à vous je ne connais plus l'ennui ! Merci d'être à mes cotés et de me soutenir, au jour le jour, sur tous les fronts.

A mes parents,

C'est votre soutien indéfectible qui me donne l'assurance nécessaire pour mener à bout ce que j'entreprends. Merci pour ça.

LISTE DES ABRÉVIATIONS *(Par ordre alphabétique).*

AAA	:	Anévrisme de l'Aorte Abdominale sous rénale.
ADN	:	Acide DésoxyriboNucléique
AFM	:	Atomic Force Microscopy (Microscopie de Force Atomique).
AOMI	:	Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs.
bFGF	:	beta Fibroblast Growth Factor.
CE	:	Cellule Endothéliale.
EDC	:	EthylCarboDiimide.
ECBM	:	Endothelial Cell Basal Medium
EGF	:	Epidermal Growth Factor
ePTFE	:	PolyTétraFluoroEthylène expansé.
ESEM	:	Environmental Scanning Electronic Microscopy.
FCS	:	Fœtal Calf Serum
FGF	:	Fibroblast Growth Factor.
FITC	:	Fluorescéine IsoThioCyanate.
GAG	:	GlycosAminoGlycane.
GEPROVAS	:	Groupe Européen de recherche sur les PROthèses appliquées à la chirurgie VASculaire
HMI	:	Hyperplasie MyoIntimale.
HUVEC	:	Human Umbilical Vein Endothelial Cell.
ICC	:	Ischémie Critique Chronique.
IgG	:	ImmunoGlobuline G.
LBL	:	Layer By Layer (films multicouches).
LDL	:	Low Density Lipoprotein.
MMP	:	MétalloProtéinases Matricielles.
PBS	:	Phosphate Buffer Saline (solution tampon phosphatée saline)
PC	:	Phosphatidyl Choline.
PDMS	:	PolyDiMethylSyloxane.
PEG	:	PolyEthylène Glycol.
PEI	:	Poly(Ethylène Imine).
PET	:	PolyEthylène de Téréphtalate.
PLL/HA	:	Poly(L-Lysine) / acide hyaluronique.
PLL/PGA	:	Poly(L-Lysine) / poly(acide-L-glutamique).
PMA	:	Poly(Métacrylique Acide).
pNPP	:	p-NitroPhenyl Phosphate
PSS/PAH	:	Poly(Styrène Sulfonate) / Poly(Allylamine Hydrochloride).
PTFE	:	PolytétraFluoroEthylène.
RGD	:	Arginine-Glycine-Aspartate.
RGTA	:	ReGeneraTing Agent.
SEM	:	Scanning Electronic Microscopy (Microscopie Electronique à Balayage)
TNF α	:	Tumor Necrosis Factor α .
VEGF	:	Vascular Endothelial Growth Factor.

TABLE DES MATIÈRES.

REMERCIEMENTS.....	2
LISTE DES ABRÉVIATIONS	4
TABLE DES MATIÈRES.....	5
AVANT PROPOS.....	7
CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	10
1.1. LA PATHOLOGIE VASCULAIRE.....	10
1.1.1. <i>L'athérosclérose</i>	10
1.1.1.1. Définitions.....	10
1.1.1.2. Épidémiologie.....	10
1.1.1.3. Physiopathologie.....	11
1.1.1.4. L'ischémie critique chronique.....	12
1.1.1.5. Prise en charge.....	13
1.1.2. <i>La pathologie anévrysmale</i>	14
1.1.2.1. Définition.....	14
1.1.2.2. Épidémiologie.....	14
1.1.2.3. Physiopathologie.....	14
1.1.2.4. Prise en charge.....	15
1.2. LA CHIRURGIE DE REVASCULARISATION.....	16
1.2.1. <i>Le principe</i>	16
1.2.2. <i>Les étapes</i>	16
1.3. LES SUBSTITUTS PROTHETIQUES.....	19
1.3.1. <i>Les prothèses commercialisées</i>	19
1.3.1.1. Les prothèses en polyéthylène de téréphthalate.....	19
1.3.1.2. Les prothèses en polytétrafluoroéthylène.....	21
1.3.2. <i>Les prothèses en PET en pratique clinique</i>	21
1.3.2.1. Perméabilité.....	21
1.3.2.2. Les complications évolutives.....	21
1.3.3. <i>Les traitements de surface</i>	21
1.3.3.1. Lutte contre la thrombose.....	21
1.3.3.1.1. Lutte contre l'adhésion.....	21
1.3.3.1.2. Recherche d'une endothélialisation.....	21
1.3.3.2. Lutte contre l'infection des prothèses.....	21
1.3.3.2.1. Les antibiotiques.....	21
1.3.3.2.2. Le chitosan.....	21
1.3.3.2.3. Les sels d'argent.....	21
1.3.3.2.4. Le carbone.....	21
1.3.3.2.5. Le cuivre.....	21
1.4. LES FILMS MULTICOUCHES.....	21
1.4.1. <i>Historique</i>	21
1.4.2. <i>Principe</i>	21
1.4.3. <i>Propriétés physicochimiques</i>	21
1.4.3.1. Nature des interactions.....	21
1.4.3.2. Types de croissance.....	21
1.4.4. <i>Propriétés biologiques</i>	21
1.4.4.1. Interactions protéiques.....	21
1.4.4.2. Interactions cellulaires.....	21
1.4.4.3. Stabilité, dégradabilité.....	21
1.4.5. <i>Applications : fonctionnalisation des multicouches</i>	21
1.4.5.1. Fonctionnalisations protéiques ou peptidiques.....	21
1.4.5.2. Fonctionnalisation par adjonction d'ADN.....	21
1.4.5.3. Activité anticoagulante.....	21
1.4.6. <i>Applications sur le polyéthylène de téréphthalate</i>	21

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	21
2.1. LES FILMS MULTICOUCHES.....	21
2.2. LE POLYETHYLENE DE TEREPHTALATE.....	21
2.3. METHODES D'APPLICATION DES MULTICOUCHES AU PET.....	21
2.3.1 Principe du dipping robot.....	21
2.3.2. Les portoirs.....	21
2.4. LES METHODES D'OBSERVATION.....	21
2.4.1. La Microscopie Electronique.....	21
2.4.1.1. La Microscopie Electronique à Balayage (SEM).....	21
2.4.1.2. La Microscopie Electronique à Balayage Environnementale (ESEM).....	21
2.4.2. La Microscopie Confocale.....	21
2.4.2.1. Le principe.....	21
2.4.2.2. Fonctionnement du microscope confocal à balayage laser.....	21
2.4.2.3 Les fluorophores.....	21
2.4.2.4 Protocole expérimental.....	21
2.4.3. La Microscopie de Force Atomique (AFM).....	21
2.4.3.1. Principes de la Microscopie à Force Atomique.....	21
2.4.3.2. Description de la Microscopie à Force Atomique.....	21
2.5. LES METHODES DE CONTRAINTES MECANIQUES.....	21
2.5.1. La traction longitudinale.....	21
2.5.1.1. La dynamométrie.....	21
2.5.1.2. La traction longitudinale embarquée sous ESEM.....	21
2.5.2. Les forces de cisaillement : le flux pulsé.....	21
2.6. L'ÉTANCHEITE.....	21
2.7. LA CULTURE CELLULAIRE.....	21
2.7.1. Le principe de la culture cellulaire.....	21
2.7.2. Tests d'adhésion et de viabilité cellulaire.....	21
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS DISCUSSIONS.....	21
3.1. ARTICLE 1.....	21
3.1.1. Introduction.....	21
3.1.2. Article 1.....	21
3.1.3. Discussion.....	21
3.2. ARTICLE 2.....	21
3.2.1. Introduction.....	21
3.2.2. Article 2.....	21
3.2.3. Discussion.....	21
CONCLUSIONS.....	21
RÉFÉRENCES.....	21

AVANT PROPOS.

Les pathologies cardiovasculaires représentent le premier facteur de mortalité dans les pays occidentaux. Dans la prise en charge de l'athérosclérose invalidante des membres inférieurs, le seul traitement actuel efficace est la revascularisation des territoires affectés par le biais de greffes veineuses autologues (procédé le plus favorable en termes de perméabilité). En l'absence de greffon veineux satisfaisant, les chirurgiens ont recours à des substituts artériels prothétiques. Le polymère couramment utilisé dans la fabrication de substituts vasculaires de large diamètre est le polyéthylène de téréphtalate (PET).

Une prothèse vasculaire en PET est une prothèse textile tissée ou tricotée à partir de fils de PET, unités élémentaires d'environ 0,1 mm de diamètre, eux-mêmes constitués de filaments d'environ 10 µm de diamètre. La texture à porosité élevée de la prothèse se révèle favorable aux mécanismes de cicatrisation. Cependant cette porosité peut être source de complications hémorragiques majeures.

Pour rendre ces structures étanches, les prothèses vasculaires en PET ont été dans un premier temps trempées dans le sang du patient au moment de l'implantation. Des matrices bio-résorbables, notamment à base de collagène bovin ont été proposées secondairement et sont toujours actuellement utilisées en application clinique. Elles apportent certainement un gain en terme d'ergonomie mais n'ont pas pour le moment résolu les problèmes liés directement aux prothèses, à savoir la thrombose et l'infection.

A partir des travaux de Decher [1-3], de nombreuses équipes de recherche travaillent sur le principe de construction de films multicouches. Cette nouvelle méthode de traitement des surfaces est en pleine phase de développement en raison des nombreux avantages qu'elle procure : elle est simple d'utilisation, elle s'applique à toutes les géométries du support et présente une grande versatilité. La facilité d'association des polyélectrolytes quelle que soit leur nature permet d'incorporer à l'intérieur des couches des substances fonctionnellement actives : protéines, peptides, ADN, médicaments....

Les possibilités de construire différents systèmes sont considérables et les applications *in vivo* offrent de ce fait des perspectives très vastes. Dans le domaine de la chirurgie vasculaire, la possibilité de

fonctionnaliser des traitements de surfaces et ainsi d'augmenter les taux actuels de perméabilité des pontages ou de mieux lutter contre les infections, apporterait un progrès notable pour des milliers de patients.

Toutefois ces traitements de surface doivent respecter de manière impérative un cahier des charges assez lourd. Les contraintes mécaniques que les prothèses subissent sont multiples et certaines permanentes : contraintes de flexion-extension en fonction des mouvements du patient et contraintes de cisaillement imposées à chaque systole par le flux sanguin. Avant tout test *in vivo*, il était indispensable d'évaluer le comportement mécanique des systèmes multicouches appliqués sur les prothèses en PET.

Ce travail présente un aspect tout à fait novateur dans la mesure où nous avons privilégié cet aspect mécanique. Pour mieux comprendre le comportement des films sous contraintes, nous sommes partis de l'élément constitutif initial, le filament, auquel nous avons appliqué une traction longitudinale. Pour réaliser cette première étape, il a été nécessaire de concevoir un modèle permettant d'appliquer de manière reproductible cette traction, tout en autorisant l'observation directe du film multicouche sur le filament. A partir des résultats obtenus sur le filament nous avons pu observer sous cette même contrainte le fil et la prothèse, le protocole expérimental validé devenant de ce fait un véritable banc d'essai pour différents types de support.

Durant cette même étape nous avons exploré l'autre versant de cette partie mécanique à savoir le comportement du filament après application d'un film multicouche : ce nouveau type de traitement modifiait-il la résistance du filament à une traction longitudinale?

Pour simuler les contraintes de cisaillement nous avons adapté à nos besoins un banc d'essai simulant le régime circulatoire à l'aide d'une pompe hydraulique. Nous avons ainsi pu soumettre des segments de prothèses traitées dans leur globalité à un flux identique au flux sanguin et donc évaluer la résistance des films multicouches. Cet aspect constituait une étape clé dans notre travail.

L'obtention d'une étanchéité suffisante était également un objectif à remplir dans l'idée de substituer un film multicouche aux matrices actuelles. Une étape suivante a donc été d'évaluer par le biais d'un test normalisé, utilisé en pratique industrielle, les possibilités qu'offraient les trois systèmes.

Enfin la biocompatibilité des systèmes devait également respectée dans l'idée d'une application clinique ultérieure. Nous avons donc analysé le comportement de cellules endothéliales (HUVEC) mis en culture sur des segments de prothèses traitées.

Les systèmes poly(allylamine hydrochloride)/poly(sodium 4-styrènesulfonate), poly(L-lysine)/acide hyaluronique et poly(L-lysine)/poly(L-acide glutamique), respectivement (PAH/PSS), (PLL/HA) et (PLL/PGA), font partie des systèmes les mieux connus actuellement du point de vue de leur mode de construction et de leurs propriétés physicochimiques. L'expérience acquise par notre équipe sur ces trois systèmes nous a été précieuse et nous a permis une approche rapide sur les aspects plus spécifiques de notre travail et explique de ce fait le choix des trois systèmes testés dans le cadre d'une première approche.

Les objectifs de ce travail étaient donc multiples : dans un premier temps nous avons cherché à évaluer la faisabilité d'application des constructions multicouches sur du PET, puis nous avons essayé de déterminer parmi les trois systèmes testés lequel semblait le plus adéquate pour une application ultérieure, au vue de ses qualités mécaniques et biologiques.

CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

1.1. La pathologie vasculaire.

La pathologie vasculaire regroupe l'ensemble des atteintes de la paroi artérielle et veineuse. Les étiologies de ces atteintes sont multiples et la plupart ne sont que partiellement élucidées : pathologie inflammatoires, atteintes immunologiques... L'objet de ce chapitre est d'évoquer les deux principales atteintes artérielles responsables de l'essentiel des prises en charge médicochirurgicales actuelles pour une pathologie vasculaire : l'artériopathie oblitérante et la maladie anévrysmale.

1.1.1. L'athérosclérose.

1.1.1.1. Définitions.

La définition date de 1958 et reste d'actualité : « association variable de remaniements de l'intima des grosses et moyennes artères consistant en une accumulation segmentaire de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires, le tout accompagné de modifications de la média » [4].

1.1.1.2. Épidémiologie.

L'athérosclérose est la première cause de mortalité et de morbidité dans les pays occidentaux, avec, chaque année, en France, 120 000 infarctus du myocarde et 130 000 accidents vasculaires cérébraux [5]. Le vieillissement de la population et l'absence de résultats probants dans la lutte contre les facteurs de risque (sédentarité galopante, tabagisme notamment chez les femmes et les jeunes) sont des facteurs prédictifs d'une augmentation persistante de l'incidence de la pathologie. Il en résulte un prix à payer majeur pour notre système de santé, de ce fait l'athérosclérose constitue un enjeu considérable en terme de santé publique.

1.1.1.3. Physiopathologie.

L'athérosclérose résulte d'un trouble du métabolisme des lipides qui aboutit à leur accumulation sous forme de plaque (l'athérome) au niveau de l'intima.

Les mécanismes ne sont pas encore complètement élucidés mais un trouble du métabolisme des lipides aboutit à une circulation de LDL dans la circulation sanguine. Les molécules de LDL franchissent la barrière endothéliale et subissent un phénomène d'oxydation. Des phénomènes d'adhésion se produisent entre les LDL et des cellules endothéliales activées, et des cellules circulantes, notamment des monocytes et des lymphocytes. Il en résulte une réaction inflammatoire et la transformation des monocytes en macrophages. Les macrophages vont stocker les LDL pour ensuite se transformer en cellules spumeuses. Dans un deuxième temps, les cellules musculaires lisses de la média migrent vers l'intima pour constituer, par production de matrice extracellulaire, une chape fibreuse autour des cellules spumeuses regroupées en « core » lipidique : la chape et le core constituent la plaque athéromateuse.

Cette plaque évolue en augmentant de taille avec au départ un phénomène de remodelage artériel. La lumière artérielle est maintenue constante par augmentation du calibre global de l'artère comprenant la plaque athéromateuse. Ce phénomène de compensation permet de limiter les conséquences hémodynamiques pendant toute une phase de croissance asymptomatique de la plaque [6].

Plus la plaque augmente de taille, plus elle devient vulnérable, avec risque progressif de complications (Figure 1.1.1.3a). Lorsque la plaque ne fait que réduire la lumière interne de l'artère, on parle de sténose. Au stade ultime de l'évolution elle oblitère complètement l'artère, on parle d'oblitération.

Les complications peuvent se localiser au niveau de la plaque elle-même, avec survenue d'une thrombose locale, ou à distance, par migration, soit de fragments de plaque (en cas de rupture de celle-ci) soit de thrombi décollés de la paroi. Le type de symptômes cliniques consécutifs à ces phénomènes est variable en fonction de la localisation de la plaque (Figure 1.1.1.3a). La maladie athéromateuse est une maladie

ubiquitaire avec des sites privilégiés de développement au niveau des bifurcations artérielles, sièges de plus grandes perturbations hémodynamiques.

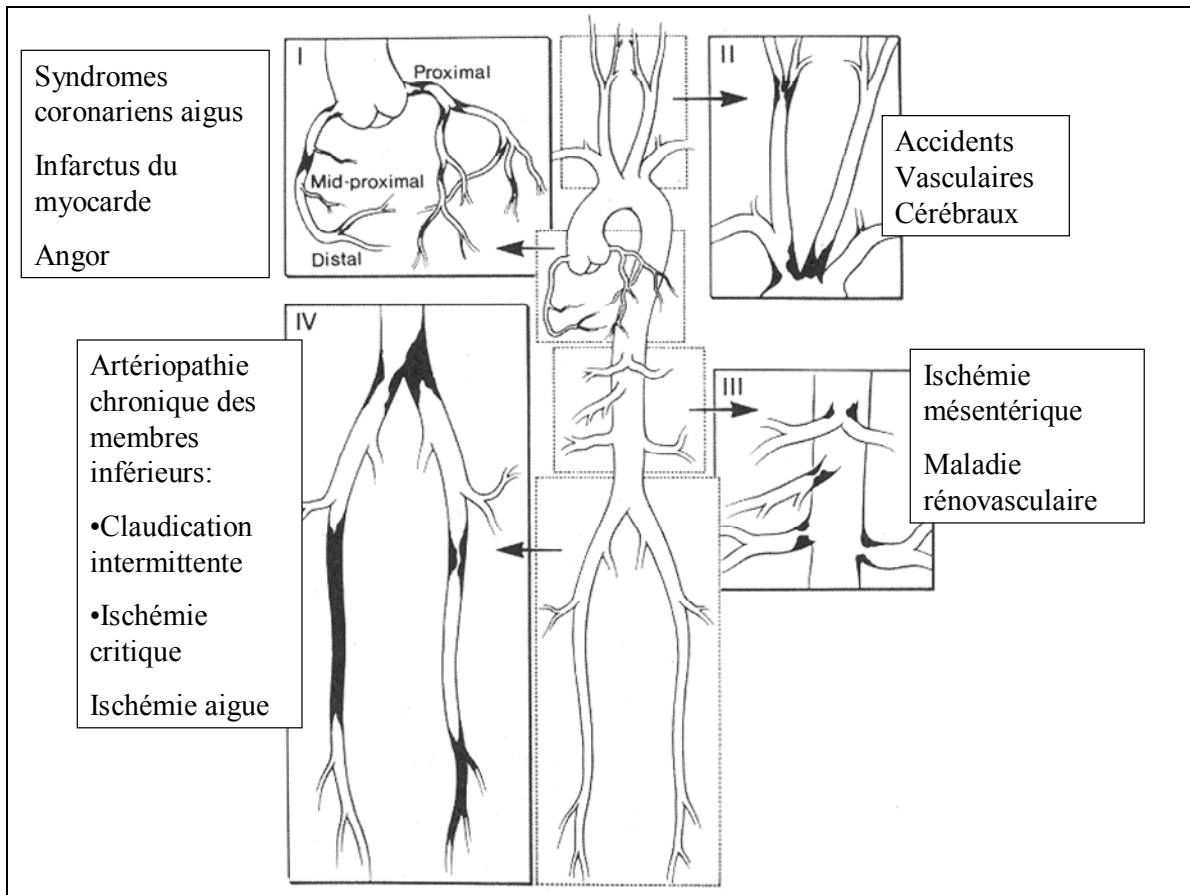


Figure 1.1.1.3a : Sièges de prédilection de la maladie athéromateuse avec les pathologies induites. Territoires représentés : I, réseau coronaire ; II, troncs supraaortiques ; III, artères digestives et rénales ; IV, artères des membres inférieurs.

1.1.1.4. L'ischémie critique chronique.

L'oblitération chronique des artères au niveau des membres inférieurs (artères iliaques, fémorales, poplitées et jambières) aboutit à une ischémie des tissus en aval de cette obstruction : l'Ischémie Critique Chronique (ICC).

Le principe physiopathologique des symptômes est lié à la baisse de la pression de perfusion sanguine distale. La lumière circulante des artères est graduellement diminuée, en rapport à l'évolution de la maladie athéromateuse. Ce phénomène aboutit à la baisse de la pression de perfusion sanguine en aval des oblitérations. Les symptômes apparaissent en dessous d'un seuil de pression de perfusion. Leur mode de

survenue peut donc être progressif, consécutif à la progression athéromateuse, ou bien brutal, par la survenue d'une complication évolutive de la plaque (hémorragie, thrombose, rupture).

L'ICC correspond à l'ensemble des symptômes liés à la baisse de pression de perfusion d'aval :

- Douleurs chroniques, insomniantes, extrêmement difficiles à calmer, térébrantes, imposant aux patients une position verticale permanente pour augmenter cette pression distale.
- Troubles trophiques à type de nécroses localisées plus moins étendus, à risque de surinfection et de mise à nus des éléments profonds (tendons, os).

Les patients souffrant d'ICC ont une mortalité globale de 70% à 5 ans, 50% d'entre eux devront subir une amputation du membre atteint à 5 ans [7]. La population atteinte en Grande-Bretagne est de l'ordre de 20 000 patients, avec 50 000 admissions en service hospitalier par an en rapport avec une artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) [8]. L'incidence estimée aux Etats-Unis est de l'ordre de 500 à 1000 par million d'habitants [9].

1.1.1.5. Prise en charge.

L'importance de la mortalité et de la morbidité induite par cette pathologie explique les efforts considérables qui lui sont alloués actuellement.

Le principe de la prise en charge consiste à améliorer et, si possible, restaurer une pression de perfusion sanguine distale physiologique. En pratique il s'agit de procéder à des revascularisations des membres inférieurs, soit par méthodes endovasculaires (dilatation, recanalisation des artères associées ou non à la mise en place de stent), soit par méthode chirurgicale conventionnelle : les pontages, qui représentent la méthode de référence (cf chapitre 1.2.). Ces pontages nécessitent des substituts prothétiques qui feront l'objet de notre travail.

1.1.2. La pathologie anévrysmale

1.1.2.1. Définition.

Un anévrysme se définit comme la perte de parallélisme des parois d'un vaisseau. Les anévrysmes de l'aorte abdominale (AAA) représentent 90% des anévrysmes artériels et correspondent, par définition, à une dilatation de plus de 30mm de l'aorte sous le départ des artères rénales chez l'homme et plus de 25mm chez la femme [10].

La pathologie anévrysmale touche les trois tuniques de la paroi artérielle, dans le cas contraire il s'agit de faux-anévrysmes ou pseudo-anévrysmes. Il existe des anévrysmes fusiformes avec une dilatation de toute la circonférence de l'aorte, et des anévrysmes sacciformes où la dilatation reste localisée à une partie de la paroi.

1.1.2.2. Epidémiologie.

L'incidence des AAA a augmenté ces 20 dernières années, en rapport avec : le vieillissement de la population, l'augmentation du tabagisme, l'amélioration des techniques de dépistage. La rupture d'AAA est responsable de 8000 décès par an en Grande-Bretagne et de 15000 aux Etats-Unis [11, 12].

La prévalence actuelle est de l'ordre de 1,3% à 8,9% chez les hommes et de 1,0% à 2,2% chez la femme [13, 14], avec un diagnostic posé 10 ans plus tard chez la femme par rapport à l'homme. L'augmentation de l'intoxication tabagique chez la femme va probablement modifier ce ratio, le tabac jouant un rôle fondamental dans la genèse des AAA [15].

1.1.2.3. Physiopathologie.

Les phénomènes aboutissant à une dégénérescence anévrysmale sont complexes et que partiellement élucidés. Le début du processus est indéniablement la destruction des fibres élastiques de la paroi artérielle, le maintien de la résistance pariétale n'étant progressivement plus qu'assuré par le collagène. En

phase ultime les mécanismes de synthèses de collagène sont dépassés par les collagénases avec fragilisation de la paroi jusqu'à la rupture [16, 17].

La maladie anévrysmale est caractérisée par un infiltrat cellulaire inflammatoire intrapariétal [18]. Les cellules de l'inflammation produisent des protéases qui vont dégrader les fibres élastiques. Ces protéases ont été identifiées comme étant des métalloprotéinases de type MMP9 et MMP12 [17].

En parallèle à ces phénomènes, se produit une raréfaction des cellules musculaires lisses qui sont des facteurs limitant la réaction inflammatoire et donc protectrices [17].

Au total la pathogenèse anévrysmale résulte d'une réaction inflammatoire dont les origines sont inconnues et prêtent à hypothèses :

- Athérosclérose extensive.
- Production locale de cytokines [19].
- Réponse immune, contre un agent infectieux [20] ou un composant de la paroi.
- Libération de produits de dégradation de la matrice extracellulaire [21].

1.1.2.4. *Prise en charge.*

Il en résulte un développement d'abord progressif et linéaire puis exponentiel du diamètre de l'AAA jusqu'à la rupture du sac anévrysmal, complication évolutive ultime [10]. La rupture est un accident aux conséquences dramatiques, avec un taux de mortalité de 100% sans prise en charge chirurgicale adaptée, avec celle-ci, la mortalité diminue difficilement à 80%.

Tous les ans aux Etats-Unis 15 000 personnes décèdent d'une rupture d'AAA [22].

Le meilleur traitement est donc préventif avec mise à plat de l'AAA et restauration de la circulation artérielle par le biais d'un pontage. Le taux de mortalité à 30 jours de ce type d'intervention est de l'ordre de 1,7% à 7% selon les auteurs [10, 23].

1.2. La chirurgie de revascularisation.

1.2.1. Le principe.

Le principe d'un pontage en vue d'une chirurgie de revascularisation est identique quel que soit la localisation du geste prévu : une artère « donneuse » et une artère « receveuse » sont définies, ainsi que le trajet du greffon.

L'artère donneuse doit être, par définition, en amont de l'artère lésée, et doit pouvoir assurer un débit sanguin suffisant pour une mise en charge efficace du pontage. Elle doit pouvoir être clampée, manœuvre qui permet l'interruption du flux sanguin pendant la réalisation de l'anastomose, et pour cela elle doit être suffisamment élastique, donc saine.

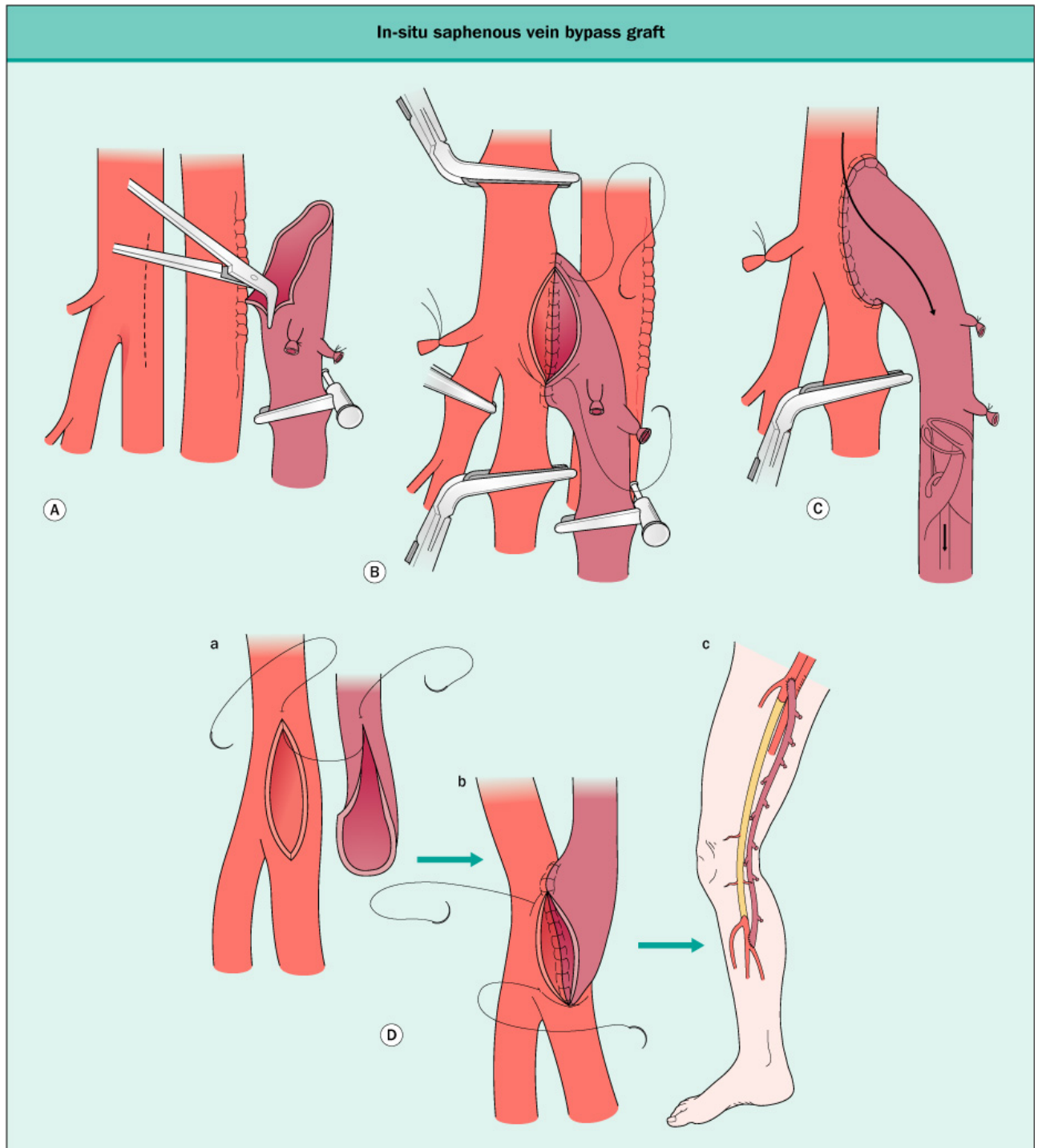
L'artère receveuse doit également ne pas être trop atteinte pour permettre le clamage et surtout doit déboucher sur un lit d'aval libre. La qualité du réseau d'aval est une condition fondamentale pour le devenir du pontage.

1.2.2. Les étapes

Nous prendrons d'une revascularisation fémoropoplité sous articulaire à l'aide d'un greffon veineux en position in situ.

- D'une manière générale, une chirurgie de revascularisation débute par l'exploration de l'artère receveuse pour confirmer la faisabilité de l'intervention. Si les conditions ne sont pas satisfaisantes, l'intervention est interrompue, d'où l'importance d'un bilan préopératoire le plus complet possible.
- L'artère donneuse est exposée dans un deuxième temps ainsi que la crosse de la grande veine saphène (Figure 1.2.2a).
- Une anticoagulation efficace est instaurée par voie générale à l'aide d'une dose de charge d'héparine en intraveineux.

- L'artère donneuse est clampée, une incision est réalisée à sa surface (l'artériotomie), la prothèse est recoupée en palette de taille comparable à l'artériotomie. L'incision est latérale sur l'artère et terminale sur la prothèse, d'où la définition d'anastomose latéroterminale (Figure 1.2.2b).
- La suture de la veine sur l'artère est réalisée par un surjet d'un fil en monofilament non résorbable (Prolène® par exemple) (Figure 1.2.2b). L'air est évacué, et les lumières sont lavées par un rinçage au sérum physiologique : ce sont les manœuvres de purges.
- L'artère est déclampée, avec mise en charge de la veine qui elle reste clampée à son extrémité. Cela permet de vérifier l'étanchéité de l'anastomose (Figure 1.2.2c). Dans le cas contraire des points supplémentaires d'hémostase sont réalisés.
- Les valvules du greffon veineux sont arrachées, en charge, de façon à permettre un flux craniocaudal dans la veine (Figure 1.2.2c).
- L'anastomose sur l'artère receveuse est effectuée selon les mêmes principes que pour l'anastomose proximale (Figure 1.2.2d).



Hallett et al: Comprehensive Vascular and Endovascular Surgery © 2004 Elsevier Ltd.

Figure 1.2.2a à d : étapes d'une revascularisation fémoropoplitée veineuse in situ sous articulaire. a : dissection et recoupe de la crosse de la grande veine saphène. b : anastomose en latéroterminale sur la partie terminale de l'artère fémorale commune par un surjet de monofilament. c : déclampage et dévalvulation du greffon veineux. d : anastomose terminolatérale distale par un surjet de monofilament avec aspect final du pontage [24].

1.3. Les substituts prothétiques.

1.3.1. Les prothèses commercialisées.

1.3.1.1. Les prothèses en polyéthylène de téréphtalate.

Le polyéthylène de téréphtalate (PET) fut découvert en 1941 par deux chimistes anglais Whinfield et Dickson [25] qui obtinrent une fibre résistante à la chaleur et à l'abrasion. En 1946 fut mise au point par la société Dupont de Nemours une nouvelle fibre baptisée Dacron®, qui reste encore le matériau de base des prothèses vasculaires en PET.

La première implantation d'un substitut prothétique en Dacron® date de 1957 par De Backey [26], son utilisation est toujours courante en pratique clinique. Les prothèses en Dacron® sont des structures textiles. L'unité fondamentale est représenté par le filament, qui, réuni en 10 à 20 éléments, constitue le fil, celui-ci sera tissé ou tricoté selon la prothèse. Le filament constitue l'unité élémentaire de la prothèse vasculaire, il s'agit d'un polymère réalisé à partir de l'acide téréphtalique et de l'éthylène glycol [25]. La polymérisation se déroule en autoclave pendant 5 à 8 heures sous 300°C pour former un polycondensat, découpé secondairement en grain. Le filament est obtenu par la suite après filage sous pression des grains fondus.

Les prothèses sont produites par tricotage ou tissage des fils de polyester. Le tissage est utilisé mais présenterait les inconvénients d'une plus grande rigidité et d'un effilochage aux extrémités [27]. Il existe deux types de tricot : le tricot chaîne et le tricot trame, les tricots chaîne présentent une stabilité dimensionnelle plus grande et sont maintenant les seuls utilisés pour la confection des prothèses vasculaires [27](Figure 1.3.1.1a). Les prothèses vasculaires sont principalement des tubes simples et des tubes bifurqués (Fig. 1.3.1.1b), certaines prothèses spécifiques, conçues pour une implantation particulière, répondent à un schéma déterminé (crosse aortique, axillobifémorale).

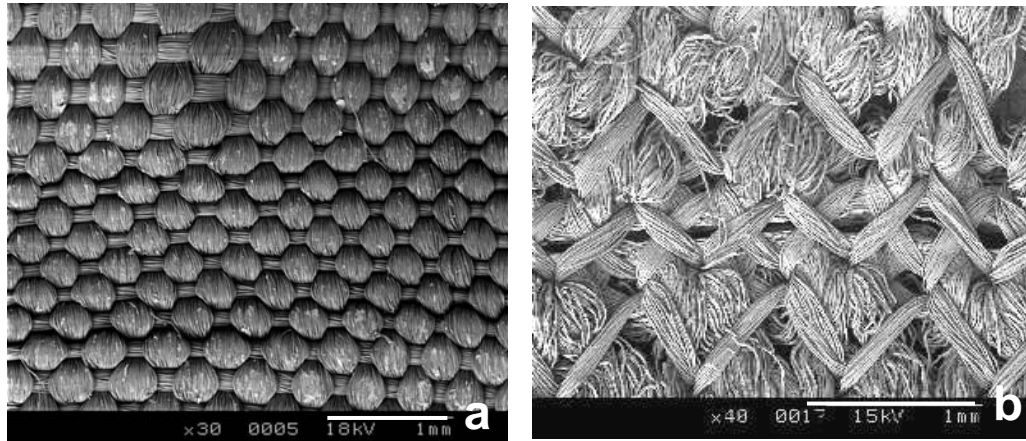


Figure 1.3.1.1a : Photos en microscopie électronique à balayage d'une prothèse en PET a) tissée (barre = 1 mm) et b) tricotée (barre 1mm).

Le PET présente l'avantage d'une structure amorphe, neutre du point de vue électrostatique, relativement compliant et présente de grandes qualités en terme de résistance mécanique à long terme ce qui en a fait un substitut de choix pour la chirurgie vasculaire. Du point de vue physicochimique, il est capable de développer des liaisons hydrogènes, il peut être hydrolysé avec développement de groupement carboxyles, enfin sa surface peut réagir avec des groupements amines [28].

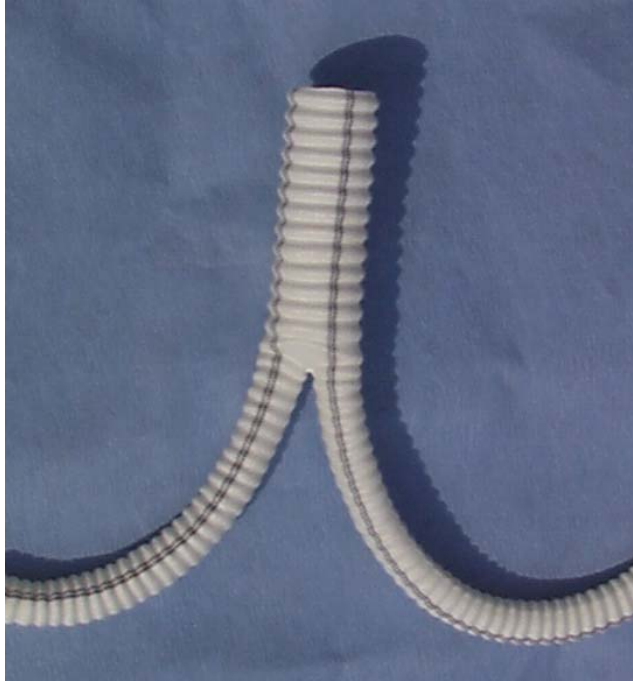


Figure 1.3.1.1b : Prothèse bifurquée en PET.

1.3.1.2. Les prothèses en polytétrafluoroéthylène.

Le polytétrafluoroéthylène (PTFE) est un polymère de tétrafluoroéthylène. Il a été découvert en 1937, il est connu sous le terme de Teflon. Sa forme expansée (ePTFE) a été brevetée par la société W.L. Gore en 1969 sous la dénomination Gore Tex. La première expérience clinique en tant que prothèse vasculaire date de 1976 par Campbell [29].

La structure du ePTFE correspond à un agencement de nodules et de fibrilles (Figure 1.3.1.2a).

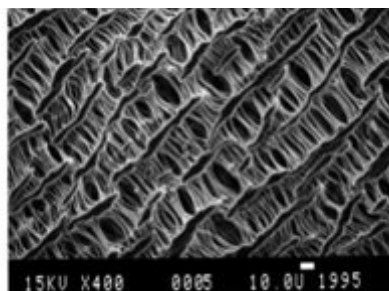


Figure 1.3.1.2a : ePTFE au microscope électronique à balayage.

Le ePTFE est biologiquement inerte, hydrophobe, non résorbable et présente une microporosité favorable à une cicatrisation in vivo. Autant de caractéristiques qui font du ePTFE l'autre matériau avec le PET utilisé en chirurgie vasculaire.

1.3.2. Les prothèses en PET en pratique clinique.

Le marché des prothèses vasculaires représente plus de 100 000 prothèses implantées aux États-Unis par an et plus de 75 000 en Europe [30]. Le PET est utilisé de manière préférentielle pour les reconstructions à l'étage aortoiliaque de manière routinière de puis les années 60, ce qui représente une expérience colossale. La perméabilité à moyen et à long terme du PET est tout à fait acceptable pour des diamètres de moyens et de gros calibres mais les résultats obtenus pour des diamètres inférieurs ou égaux à 5mm n'autorisent pas son utilisation dans ces indications. L'étude à long terme des prothèses implantées a permis d'individualiser un certain nombre de complications qui sont toutefois communes au PET et au ePTFE.

1.3.2.1. Perméabilité.

L'obtention d'une perméabilité optimale reste l'objectif principal d'une chirurgie de revascularisation, où la prothèse remplace fonctionnellement un segment artériel malade. L'évaluation de cette perméabilité est donc fondamentale pour les chirurgiens vasculaires. Plusieurs facteurs entre en ligne de compte :

- L'axe donneur : une artère donneuse de gros calibre avec un bon débit est une condition *sine qua none* de revascularisation.
- L'axe receveur : le lit d'aval conditionne directement la survie d'une revascularisation. L'absence de lit d'aval de qualité suffisante contre-indique une chirurgie de revascularisation, le risque de thrombose à court et moyen étant trop important.
- Le trajet : plus le pontage est long, moins il sera perméable. De même un trajet différent de celui du vaisseau ponté (trajet « extra-anatomique ») influence également le devenir de

la prothèse. Le franchissement d'un pli de flexion, surtout au niveau du genou, diminue significativement le taux de perméabilité [31].

- La thrombogénicité intrinsèque du pontage : le matériau prothétique est connu pour être plus thrombogène qu'un substitut veineux [32].
- Les facteurs rhéologiques : le débit cardiaque, la fluidité du sang (absence de pathologie thrombophile, hémodilution suffisante...) sont autant de facteurs jouant un rôle dans la perméabilité.

Les différents taux de perméabilité observés dépendent donc du siège de la revascularisation, les taux représentés ci-dessous correspondent à des pontages en PET:

- Etage aortoiliaque : taux de perméabilité de 70 à 95% à 10 ans [33-35].
- Etage fémoropoplité au dessus de l'interligne articulaire du genou: taux de perméabilité primaire de 44 % à 71 % à 5 ans [36, 37].
- Etage fémoropoplité en dessous de l'interligne articulaire du genou: taux de perméabilité primaire de 41 à 57 % à 5 ans [38].

Il n'existe pas de différence notable avec le PTFE [39], avec une nette supériorité dans le cas des pontages fémoropoplités pour les pontages veineux : le risque de réintervention est 2,6 fois plus important en cas de pontage prothétique qu'en cas de pontage veineux [32].

En pratique courante, l'utilisation d'une prothèse, quel que soit son type, est dictée par l'absence d'un greffon veineux autologue. Cette situation est malheureusement courante, en cas de chirurgie itérative où le greffon a déjà été utilisé, ou en cas de veine non utilisable (diamètre trop petit, altérations pariétales...).

1.3.2.2. Les complications évolutives.

Les complications évolutives rencontrées par l'utilisation de substituts prothétiques sont multiples et aspécifiques.

- L'hyperplasie myointimale (HMI): elle est le principal facteur de thrombose à distance d'une revascularisation (80 % des causes) [40]. Elle correspond en fait à une réponse localisée à l'agression que représente entre autre, la mise en place des clans sur les artères et la confection des anastomoses. Au départ, il se produit une prolifération des cellules musculaires lisses de la média, avec migration secondaire jusqu'à l'intima et production associée de matrice extracellulaire. Les mécanismes aboutissant à ces phénomènes ne sont pas encore élucidés, mais il est reconnu de longue date que des facteurs de risque tels que le tabac, le diabète, l'hypertension artérielle et l'hypercholestérolémie stimulent l'HMI.
- La dégradation du PET: l'avènement du tricot chaîne dans la fabrication des prothèses a considérablement amélioré la résistance du Dacron®. Les cas de dégradation des prothèses en elle-même sont devenus anecdotiques : 2 à 3 % des patients [41]. Les altérations subies par les prothèses sont multiples, liées à des contraintes mécaniques associées à des phénomènes physicochimiques pendant la période d'implantation, mais aussi en rapport avec les processus de fabrication [42]. Les cas de ruptures décrits dans la littérature sont localisés au niveau des points faibles, liés à la fabrication, des prothèses : la ligne guide et la ligne de suture.

1.3.3. Les traitements de surface.

Le principe d'appliquer un traitement de surface à une prothèse en PET avait pour but initial d'améliorer l'ergonomie des prothèses en PET. En effet celles-ci correspondent à des structures textiles tissées ou tricotées avec une macroporosité qui n'offre pas une étanchéité suffisante en application clinique. En parallèle avec le développement expérimental des traitements de surface [43], l'unique solution applicable était de précoaguler lors de l'intervention la prothèse avec le sang du patient avant implantation. Certains auteurs ont proposés de standardiser la technique [44, 45], avec une grande variabilité en pratique clinique et un temps opératoire prolongé.

L'obtention d'une étanchéité immédiate a donc été le premier objectif recherché avec enduction de matrices à bases de protéines naturelles ou dérivées : collagène [46], gélatine [47]. De nombreuses études

cliniques comparant les prothèses imprégnées aux prothèses précoagulées n'ont jamais démontré la supériorité des imprégnations [48]. Mais les prothèses imprégnées présentaient de multiples avantages : une grande facilité d'usage, pas de manipulation intempestives et donc pas de risque de contamination bactérienne ni de granulomatose liée au talc des gants chirurgicaux [48 , 49, 50]

L'enduction complémentaire des prothèses par des matrices protéiques a ainsi ouvert la voie à la recherche d'améliorations potentielles au niveau de leurs performances et de diminuer les écueils rencontrés en pratique courante : la thrombose et l'infection.

La thrombose reste actuellement la principale cause des échecs des pontages [51] et représente, au regard des conséquences qui en résultent, un problème de santé publique. Parallèlement, l'infection d'un substitut prothétique constitue également un problème majeur, malgré une incidence heureusement beaucoup plus faible.

1.3.3.1. Lutte contre la thrombose.

Plusieurs axes se sont développés dans la recherche d'une thromborésistance.

1.3.3.1.1. Lutte contre l'adhésion.

Le mécanisme de la thrombose consiste en une cascade d'évènements avec pour départ des phénomènes d'adsorptions protéiques [51]. Les prothèses en PET sont naturellement thrombogènes par stimulation de l'agrégation plaquettaire [52], d'autant plus après précoagulation [53]. Il a semblé intéressant de lutter contre ces phénomènes d'adhésion en modifiant la surface des prothèses. Cette modification ne pouvait se porter sur le polymère en lui-même puisque la structure du Dacron® consiste en une répétition d'un même monomère.

1.3.3.1.1.1. LE COLLAGÈNE.

Le collagène est à l'origine de la première imprégnation proposée, avec ou non réticulation [46]. Il est toujours utilisé commercialement. Le collagène est le composant principal des aponévroses, ligaments,

tendons, os, dents. Il existe 28 types de collagènes répertoriés. Le collagène de type I est le plus important chez l'homme, présent notamment dans les tendons, les muscles et les os. Le collagène de type 2 représente 50 % des protéines des structures cartilagineuses. Le collagène présente plusieurs avantages : il est abondant (présent chez tous les mammifères), il est dégradé par les fibroblastes et présente d'intéressantes propriétés de chimiotactisme [54, 55]. Sa fixation sur le PET peut se faire par réticulation avec du formaldéhyde ou du glutaraldéhyde. Le formaldéhyde crée une liaison méthylène stable [56] mais décrite comme cytotoxique [57]. Le glutaraldéhyde crée une liaison imine, le nombre de liaisons créées augmentant en fonction de la température, du pH et de la concentration initiale en glutaraldéhyde [58]. Quelques soient le tissu ou la matrice protéique impliqués, la fixation par le glutaraldéhyde modifie leurs propriétés : diminution de la biodégradabilité, de l'antigénicité et de la thrombogénicité [59]. Le glutaraldéhyde est lui aussi réputé cytotoxique [60].

Une autre voie de réticulation a été proposée par Noishiki *et al.* par succinylation [61]. L'implantation chez le chien de prothèses en PET enduites de collagène traitées par succinylation a permis d'observer une bonne cicatrisation à 3 semaines.

Toutefois des prothèses de PET enduites de collagène implantées sur des chiens ont permis de démontrer un retard de cicatrisation, une augmentation de la fixation plaquettaire, une capsule interne plus épaisse par rapport aux prothèses précoagulées. Ces résultats ont été considérés comme incompatibles avec une application aux prothèses de petit calibre [62].

1.3.3.1.1.2. LA GELATINE.

La gélatine, produit dérivé du collagène, est extrait de la moelle ou de la peau par une succession de réactions chimiques et thermiques (production facile, peu coûteuse [48]). La gélatine peut être réticulée avec du formaldéhyde ou du glutaraldéhyde. Elle est toujours largement utilisée pour l'imprégnation de certains types de prothèses. Expérimentée sur le chien à l'aide de prothèses réticulées par carbodiimides, elle a présenté une moindre thrombogénicité que le collagène, avec une résorption équivalente aux prothèses précoagulées [63]. Son implantation chez l'homme a provoqué une réaction inflammatoire à la

deuxième semaine, supérieure à celle observée pour des prothèses imprégnées de collagène, s'atténuant par la suite [64]. Pour moduler cette action inflammatoire les prothèses en PET ont préalablement été traitées par fluoropassivation. Ainsi une diminution de l'inflammation avec une amélioration de la cicatrisation a été obtenue [65]. Chinn *et al.* ont aussi observé une baisse de la thrombogénicité du PET traité par fluoropassivation [66].

1.3.3.1.1.3. L'ALBUMINE.

L'albumine, protéine également de production aisée, est largement utilisée pour l'imprégnation de prothèses commercialisées. Marois *et al.* ont montré, par une étude expérimentale chez le rat, une cicatrisation très satisfaisante, équivalente aux contrôles précocagulés [67]. Chang *et al.* faisaient état d'une faible thrombogénicité, avec également une bonne encapsulation [68]. Toutefois la résorption complète semble être variable selon l'espèce : 3 mois chez le cochon [69], 5 mois chez le chien [70]. Une étude à partir d'explants humains a démontré une résorption augmentée, de 6 mois minimum, avec une cicatrisation seulement partielle même après 2 ans d'implantation [71].

Plusieurs équipes se sont efforcées d'adsorber des molécules biologiquement actives sur le PET, associées ou non avec une matrice protéique, avec pour principe qu'elle puissent conserver leurs propriétés d'origine, permettant ainsi d'obtenir l'effet escompté *in vivo*.

1.3.3.1.1.4. L'HIRUDINE.

L'hirudine, peptide aux propriétés anticoagulantes connues, agit par inhibition directe de la thrombine. Il a été démontré que l'hirudine, fixée de manière covalente à du PET réticulé avec de l'albumine, a une action inhibitrice sur la thrombine [72].

1.3.3.1.1.5. LE DIPYRIDAMOLE.

Le dipyridamole est un dérivé pyrimidique utilisé en pratique clinique pour ses propriétés vasodilatatrices coronariennes et antiagrégantes. Couplé à une prothèse en polyuréthane et implanté à des chèvres,

Aldenhoff *et al.* ont reporté une action antithrombotique du dipyridamole en même temps qu'une baisse de l'adhésion plaquettaire ainsi qu'un recouvrement endothélial de la lumière interne de la prothèse [73]. Pour des raisons de stabilité *in vivo* du polyuréthane, ce type de prothèse n'a pas été développé plus en avant [74].

1.3.3.1.1.6. LES PHOSPHATIDYLCHOLINES.

Les phosphatidylcholines (PC) sont des molécules de types phospholipides, les plus abondantes à la surface des globules rouges et des plaquettes. Dans une étude *in vitro* Campbell *et al.* ont rapporté une baisse de l'adhésion plaquettaire, avec une bonne stabilité des PC [75]. Yoneyama *et al.* ont implanté des prothèses en polyuréthane couplé avec un type de PC et a observé à 8 semaines l'absence de formation de thrombus ainsi que de recouvrement endothélial [76].

1.3.3.1.1.7. LES POLYETHYLENES GLYCOLS.

Les polyéthylènes glycols auraient une action inhibitrice sur l'immunogénicité des matériaux. En effet, fixés aux matériaux, les polyéthylènes limitent la fixation d'anticorps à leur surface, leur conférant ainsi une « action de camouflage » [77]. Ils auraient également une action diminuant l'adhésion plaquettaire [78].

1.3.3.1.1.8. LES DEXTRANS.

Le dextran est un polysaccharide aux multiples propriétés, notamment il diminuerait l'adhésion cellulaire et la fixation protéique de la même manière que les polyéthylènes glycols [79]. Machy *et al.* ont couplé le dextran à du PET par réticulation et ont observé l'absence de toxicité, ainsi qu'une baisse de l'activation du complément. Les dérivés du dextran sont fonctionnalisables : il est possible de leur attribuer une action anticomplément, antithrombotiques, antiinflammatoires... [80-83]

1.3.3.1.2. Recherche d'une endothélialisation.

D'autres équipes ont posé l'hypothèse inverse : plutôt que de lutter contre les phénomènes d'adhésion, au contraire, elles se sont intéressées à favoriser l'adhésion d'éléments naturellement thromborésistants, notamment les cellules endothéliales (CE).

Les premières tentatives d'endothélialisation ont consisté à des essais d'ensemencement des CE sur le PET et se sont soldées par des échecs en partie liés à une trop faible adhésion des CE sur ces surfaces, en raison de l'insuffisance de sites de fixation [84]. En outre, il fallait également constituer un environnement favorable à la prolifération secondaire des CE. Pour répondre à cet objectif, il a été proposé de traiter les surfaces des prothèses avec des molécules déjà bien connues pour leurs propriétés adhésives.

Dans un deuxième temps, pour aider l'adhésion et la prolifération des CE, certaines équipes ont développé le principe d'associer dans le même traitement différents types de molécules modulant la prolifération cellulaire [85-87].

1.3.3.1.2.1. LES MATRICES PROTEIQUES.

Curti *et al.* ont comparé l'adhésion des EC sur plusieurs prothèses commercialisées, enduites par différentes matrices protéiques, notamment du collagène, de l'albumine et de la gélatine. Quantitativement, cette dernière matrice offrirait la meilleure capacité à une endothélialisation *in vitro* [88]. Du point de vue qualitatif, Vohra *et al.* ont rapporté une meilleure colonisation des CE dans le Dacron® enduite de gélatine. De plus, après avoir soumis la prothèse à un flux laminaire, cette endothélialisation semblait stable [89, 90].

1.3.3.1.2.2. FIBRONECTINE.

La fibronectine fixée sur une prothèse en PTFE présenterait de meilleures aptitude à l'endothélialisation par rapport à la gélatine [88]. Toutefois, dans une autre étude comparant des prothèses en PET enduites

de collagène, de fibronectine et de PET précoagulées, la prothèse précoagulée présentait une meilleure endothélialisation [90].

1.3.3.1.2.3. L'HEPARINE.

L'héparine est une GAG possédant des propriétés anticoagulantes par inhibition de l'antithrombine III. Ces propriétés sont à l'origine de sa très large utilisation en pratique clinique. Du point de vue expérimental, l'héparine a démontré des capacités à inhiber la formation de l'hyperplasie myointimale [91-94]. Par une réticulation de type carbodiimide, l'héparine peut se fixer sur les matrices protéiques à base de collagène, d'albumine ou de gélatine.

Cette molécule est également capable de se lier à des protéines d'adhésion cellulaire. Bos *et al.*, dans une étude expérimentale, ont fixé de l'héparine sur de l'albumine et ont observé une adhésion et une prolifération cellulaire des CE. Cependant cette prolifération cellulaire était inégalement obtenue. Pour rendre cette prolifération plus régulière, l'auteur suggérait d'adjoindre à l'héparine-albumine de la fibronectine [95]. Wissinck a associé de l'héparine et du bFGF sur du collagène par réticulation à l'EDC et a observé une prolifération prolongée des CE par rapport au contrôle non héparinisé [96].

Devine *et al.* ont comparé, dans une étude clinique, la perméabilité de pontages d'une prothèse en PET à celle observée pour une prothèse en ePTFE sur laquelle était fixée de l'héparine. Sur 3 ans, le taux de perméabilité semblait plus élevé pour les prothèses en PET, mais cette différence s'estompait après 5 ans de suivi [97, 98].

1.3.3.1.2.4. LA SEQUENCE RGD.

La séquence d'acides aminés RGD est présente dans plusieurs protéines de la matrice extracellulaire comme par exemple la fibronectine, la fibrine ou la laminine. Cette séquence RGD est très connue pour sa forte implication dans l'adhésion cellulaire. Massia *et al.* ont couplé cette séquence au PET et ont observé une nette augmentation de l'adhésion des HUVEC sur ces surfaces [99]. Tiwari *et al.* ont associé

de l'héparine et des séquences RGD sur une prothèse en polyuréthane et ont constaté une meilleure adhésion des CE après les avoir soumises à un flux physiologique [100]. Meinhart *et al.* ont traité des prothèses en PTFE avec une matrice de fibrine couplée à des concentrations variables de séquences RGD. L'adhésion des CE a augmenté sur des matrices contenant une faible concentration de séquence RGD. L'auteur a conclu pour les résultats de la matrice à haute concentration de RGD, à une possible adhésion compétitive entre les CE et des RGD non couplés à la matrice de fibrine [101].

1.3.3.1.2.5. LES FACTEURS DE CROISSANCE.

Pour la recherche d'une endothélialisation, les facteurs de croissance ont été largement exploités. Le facteur de croissance Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est une glycoprotéine bien connue pour ses propriétés de néoangiogénèse et de stimulation de la prolifération de cellules endothéliales. Le VEGF se fixe aux récepteurs membranaires des CE via une glycoprotéine transmembranaire. Ainsi, par l'intermédiaire des CE adhérentes aux prothèses vasculaires, le VEGF peut être indirectement lié à des surfaces. Le VEGF présente également une haute affinité avec l'héparine [102]. Le fibroblast Growth Factor (bFGF), une autre glycoprotéine à haute affinité avec l'héparine, possède aussi des propriétés de stimulation et de prolifération des CE. Dans les mécanismes d'angiogénèse, il agit fortement en synergie avec le VEGF [103].

Masuda *et al.* ont implanté sur des aortes de rat des prothèses en polyuréthane sur lesquelles étaient associées de l'héparine, de la gélatine et du VEGF. Il a observé à 4 semaines une endothélialisation des prothèses traitées mais pas sur les prothèses contrôles non traitées [104]. Stone a constaté que l'effet du VEGF sur les CE n'est pas modifié après sa fixation covalente à de l'albumine [105].

Doi *et al.* ont réalisé la même étude que Masuda *et al.* mais en remplaçant le VEGF par le bFGF. Ils constatèrent une meilleure endothélialisation, avec régénération d'un tissu sous-endothélial, pour le groupe de prothèses traitées comparé au groupe de prothèses non traitées [106].

Desgranges *et al.* ont appliqué sur du PET, imprégné de collagène, du FGF et de l'héparine. Il y était associé ou non du RGTA 11, un agent stabilisant la liaison du FGF à l'héparine. Il a été observé une

meilleure endothélialisation dans les conditions « FGF et héparine » et « FGF et héparine et RGTA 11 », par rapport aux éléments isolés [107].

1.3.3.1.2.6. LES POLYURETHANES.

Les polyuréthanes sont des polymères d'uréthane, qui est le produit de la réaction d'une molécule d'isocyanate avec une molécule d'alcool. Ils ont été utilisés comme polymères de base pour la création de prothèses vasculaires avec d'intéressantes propriétés de cicatrisation et de thromborésistance [73, 74, 104, 106]. Cependant leur développement a été momentanément stoppé en raison de problème de stabilité après implantation [74]. Phaneuf a proposé de traiter des prothèses en PET avec des polyéthers d'uréthane dans l'idée d'obtenir une étanchéité immédiate. En terme de perméabilité, les résultats se sont avérés encourageants. Enfin, une imprégnation avec des polyéthers d'uréthane comporte également des sites potentiels de fixations protéiques [108].

1.3.3.2. Lutte contre l'infection des prothèses.

L'infection d'une prothèse vasculaire reste un événement rare de l'ordre de 1 à 6% des revascularisations [109] mais ses conséquences sont souvent dramatiques. Le traitement conventionnel impose la dépose de la prothèse. Une revascularisation doit alors être effectuée par le biais d'un trajet différent, à distance du foyer infectieux (le plus souvent en position extra-anatomique) [110]. Ce type de chirurgie cumule les problèmes suivants 1) reprise chirurgicale hémorragique chez des patients affaiblis 2) difficultés techniques telles que le substitut à employer pour le pontage, la position des implantations proximale et distale du pontage et enfin le trajet à utiliser. Aboutir à une prothèse résistante à l'infection aurait donc plusieurs intérêts : prévention des sepsis par une utilisation systématique d'une telle prothèse, et, en cas de sepsis avéré, curatif en simplifiant le geste avec dépose de la prothèse infectée et revascularisation directement dans le site.

Pour assurer une résistance efficace à l'infection, un agent antimicrobien doit remplir les conditions suivantes 1) posséder une action bactéricide sur l'agent microbien, 2) ne pas être allergénique ni toxique, 3) l'activité antibactérienne doit être la plus longue possible pour permettre une cicatrisation satisfaisante sans infection et 4) la technique de couplage de l'agent antimicrobien doit être facile en pratique clinique [111].

1.3.3.2.1. Les antibiotiques.

Plusieurs antibiotiques ont été testés [112-115]. Magnan *et al.* ont testé plusieurs types d'antibiotiques sur du PET associé à du collagène. C'est la rifampycine qui a donné les meilleurs résultats [115].

D'autres études ont également démontré l'efficacité expérimentale de la rifampicine associée à une prothèse enduite de gélatine [116] [117], en prévention de l'infection [118] et en tant que traitement in situ [119], avec des premiers résultats chez l'homme encourageants [120-122].

Plus récemment Blanchemain *et al.* ont proposé l'utilisation d'oligosaccharides, les cyclodextrines [123]. Les cyclodextrines présentent un core hydrophobe et une surface externe hydrophile, ce qui leur confère

une propriété de réservoir. Plusieurs types d'antibiotiques ont ainsi été encapsulés dans des cyclodextrines, fixés sur du PET, et ont été relargués progressivement [123-126].

Toutefois l'utilisation des prothèses enduites d'antibiotiques pose plusieurs problèmes. Notamment, la nécessité d'une imprégnation homogène dans toute l'épaisseur de la prothèse. Dans le cadre d'une utilisation préventive, le risque théorique de développer une résistance aux antibiotiques utilisés surtout pour les fluoroquinolones et la rifampicine persiste [127].

1.3.3.2.2. Le chitosan.

Le chitosan, dérivé de la chitine, est un polymère polysaccharidique cationique, capable de se lier aux glycosaminoglycanes (GAG). Fu l'a associé avec de l'héparine en construction multicouches sur du PET et a observé une activité antiadhésive et antibactérienne [128]. L'adjonction de nanoparticules d'argent a augmenté cette activité antibactérienne [129].

1.3.3.2.3. Les sels d'argent.

Les molécules de sels d'argent ont démontré in vitro une action antibactérienne par prévention de la réplication bactérienne et par inhibition des enzymes métaboliques bactériennes [130]. Hardmann *et al.* ont testé une prothèse imprégnée de sels d'argent sur plusieurs bactéries et a observé une activité anti gram positif plus marquée [131]. Dans une étude multicentrique, Ricco a évalué l'efficacité en terme de prévention d'infection de prothèses imprégnées de sels d'argent commercialisées, et a observé un taux correct d'infection, sans possibilité de le comparer à un groupe contrôle [132].

Des prothèses imprégnées d'argent ont également été utilisées en cas de sepsis de prothèse, avec remplacement in situ, avec des résultats favorables [133].

1.3.3.2.4. *Le carbone.*

Le carbone peut se fixer sur le PET sous plusieurs formes : sous forme de carbone pyrolytique, avec diminution de l'activation du complément [134], ou sous forme de carbone amorphe (par plasma immersion ion implantation) avec une activité antibactérienne par effet antiadhésif [135].

1.3.3.2.5. *Le cuivre.*

Le cuivre présente également une activité antibactérienne lorsqu'il est déposé sur du PET par plasma immersion ion implantation [136].

1.4. Les films multicouches.

1.4.1. *Historique.*

Les premiers films minces nanostructurés ont été élaborés au début du siècle dernier selon la technique « Langmuir-Blodgett », qui consiste à construire un film monocouche par le dépôt de molécules tensioactives ou amphiphile, à une interface air/eau. Cette monocouche est récupérée par adsorption sur un substrat solide [137, 138]. Cette méthode présente de nombreux inconvénients, en particulier les restrictions de topographie liées au substrat et l'instabilité des films.

Dans les années 1980, d'autres méthodes d'auto-assemblage vont suppléer la technique de « Langmuir-Blodgett ». Ainsi, la chimie de coordination [139] et la chimie covalente [140] constitueront des premières alternatives dans la construction de films minces organiques. Bien que très efficaces, ces deux techniques sont contraignantes, car elles font appel à la chimie covalente ou de coordination qui restreint la conception de films multicouches à un petit nombre de molécules. Le recours à une méthode basée sur des interactions faibles de type électrostatique se révèle être la solution pour obtenir des films multicouches comportant une densité de groupements fonctionnels actifs élevée.

Il faudra attendre les années 1990, avec les travaux de Decher et al. [2], pour que la méthode d'assemblage couche par couche, notamment des polyélectrolytes, révolutionne le domaine des films multicouches [1, 3]. La méthode d'assemblage couche par couche repose sur un phénomène physicochimique : la physisorption, phénomène caractérisé par des interactions électrostatiques.

1.4.2. Principe.

Le principe consiste à alterner des polyélectrolytes anioniques avec des polyélectrolytes cationiques, les forces de cohésion les unissant étant de types électrostatiques. Sur une surface donnée chargée positivement est déposé un polyanion, par trempage pendant 5 à 30 minutes (Figure 1.4.2a).

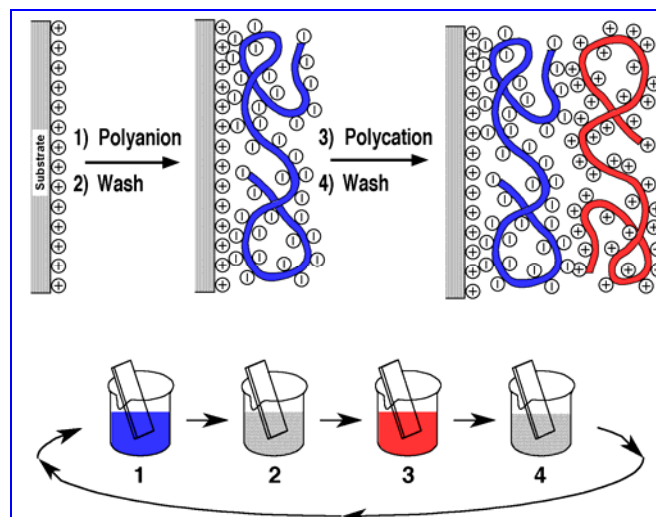


Figure 1.4.2a : principe de construction des films multicouches. Le substrat chargé positivement (ou négativement) est plongé pendant quelques minutes dans une solution de polyélectrolytes de charges opposées. Les polyélectrolytes présents dans la solution s'adsorbent à la surface du substrat. L'excédent de polyélectrolytes est éliminé à l'aide d'un rinçage. La surcompensation des charges durant cette première adsorption entraîne une inversion de la charge totale de la surface. Après lavage, le cycle peut être répété autant de fois nécessaire pour obtenir le nombre de couches voulu.

Après lavage, il existe un phénomène de surcompensation de charge avec en surface des charges anioniques résiduelles comme cela a été démontré par des mesures de potentiel zêta [141-143]. Cet excès

de charges en surface permet l'attraction des charges opposées, par trempage successif dans une solution de polycations, puis à nouveau lavage. Le cycle de trempage dans des solutions de charges opposées peut ainsi se répéter en fonction du nombre de paires de couches souhaité.

Cette méthode est la plus répandue mais il existe d'autres techniques de déposition des polyélectrolytes. Par spray, à l'aide d'un procédé aérosol, ce qui présenterait l'avantage d'un dépôt plus rapide au prix d'une consommation plus importante de polyélectrolytes [144]. Des mesures par spectroscopie infrarouge, par microscopie à force atomique et par ellipsométrie ont montré que les films réalisés par « spray » sont quasiment identiques aux films construits par trempage [145].

Une autre méthode est le « spin coating », qui consiste à déposer une gouttelette de polyélectrolytes au centre d'une surface en rotation et à l'étaler par la force centrifuge. Le temps de dépôts est réduit et dans certaines conditions (solvants très volatils) il est possible de construire des films sans rinçage [146, 147].

La technique par impression consiste à l'application par un moule en polydiméthylsyloxane (PDMS), au préalablement trempé dans une solution de polyélectrolytes, sur une surface de charge opposée [148]. Ce qui présente l'avantage de créer des zones de nature et de charge différentes sur une même surface.

1.4.3. Propriétés physicochimiques.

1.4.3.1. Nature des interactions.

- Les interactions électrostatiques.

Elles correspondent aux principales forces responsables de la construction des films multicouches. Des polyélectrolytes de types forts et de types faibles ont été testés, avec constatation pour ces derniers d'une variation de l'épaisseur des couches en fonction du pH [149]. En effet, dans le cas de polyélectrolytes faibles associés à une faible densité de charge, un certain nombre de groupements ne sont pas ionisés et les polyélectrolytes adoptent une configuration plus repliée, par baisse de la répulsion électrostatique [150].

- Autres interactions.

Dans le cas de fixations de polyélectrolytes sur des polymères non chargés, les interactions sont de types Van der Waals, ou hydrophobes ou les deux associées. C'est notamment le cas sur le PET [151]. Les liaisons hydrogènes peuvent également aboutir à la construction des films multicouches [152], la nature du solvant utilisé étant très importante pour obtenir une telle construction [153].

1.4.3.2. Types de croissance.

- Croissance linéaire.

Par définition l'épaisseur de chaque bicouche déposée reste identique, l'exemple le plus typique et le plus étudié étant probablement le Poly(Styrène Sulfonate)/PolyAllylamine Hydrochloride (PSS/PAH). La croissance de l'épaisseur du film construit reste linéaire parce que les polyélectrolytes ne diffusent pas au sein de la structure du film. Il a été décrit trois zones au sein du film (Figure 1.4.3.2a), la zone I est en contact avec le substrat, la zone III avec l'extérieur et la zone II est intermédiaire. Après formation des trois couches, seule la zone II s'épaissit [154].

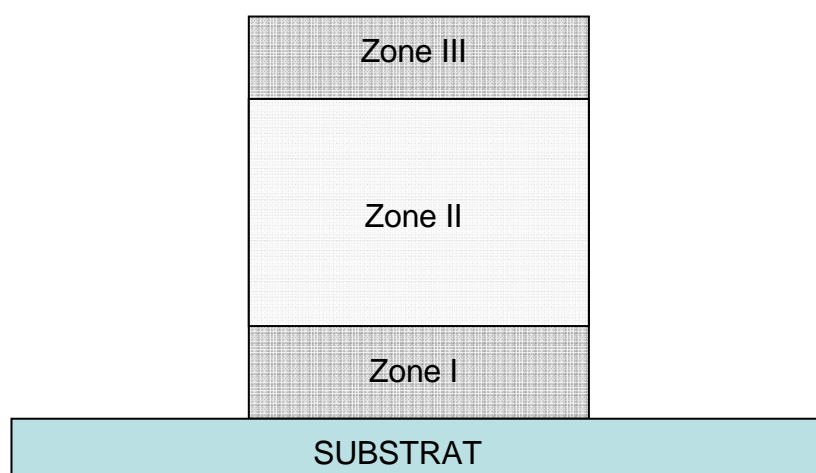


Figure 1.4.3.2a : schéma d'un film multicouche à croissance linéaire. Les limites des trois zones sont diffuses contrairement à cette représentation [154].

- Croissance exponentielle.

Certains films adoptent une croissance exponentielle, comme le Poly(L-Lysine)/acide poly(L-glutamique) (PLL/PGA) et le Poly(L Lysine)/acide hyaluronique (PLL/HA), deux types de films testés lors de ce travail. L'observation en microscopie confocale de polyélectrolytes fluorescents a permis de constater des mécanismes de diffusion dans le film construit, de l'un, voir des deux polyélectrolytes appliqués (Figure 1.4.3.2b) [155].

Les molécules d'un premier polyélectrolyte diffusent en excès dans le film, une barrière de potentiel qui résulte de l'excès des charges résiduelles en surface de ce même polyélectrolyte les empêchent de ressortir lors du rinçage. Lorsque le polyélectrolyte de charge opposée est au contact, les molécules peuvent sortir et elles se complexent avec lui. L'épaisseur de la couche déposée est ainsi fonction du nombre de couches précédentes [156].

Au-delà de 12 paires de couches, un film de type PLL/HA passerait d'une croissance exponentielle à une croissance linéaire, en raison d'une restructuration du film empêchant les phénomènes de diffusion [157].

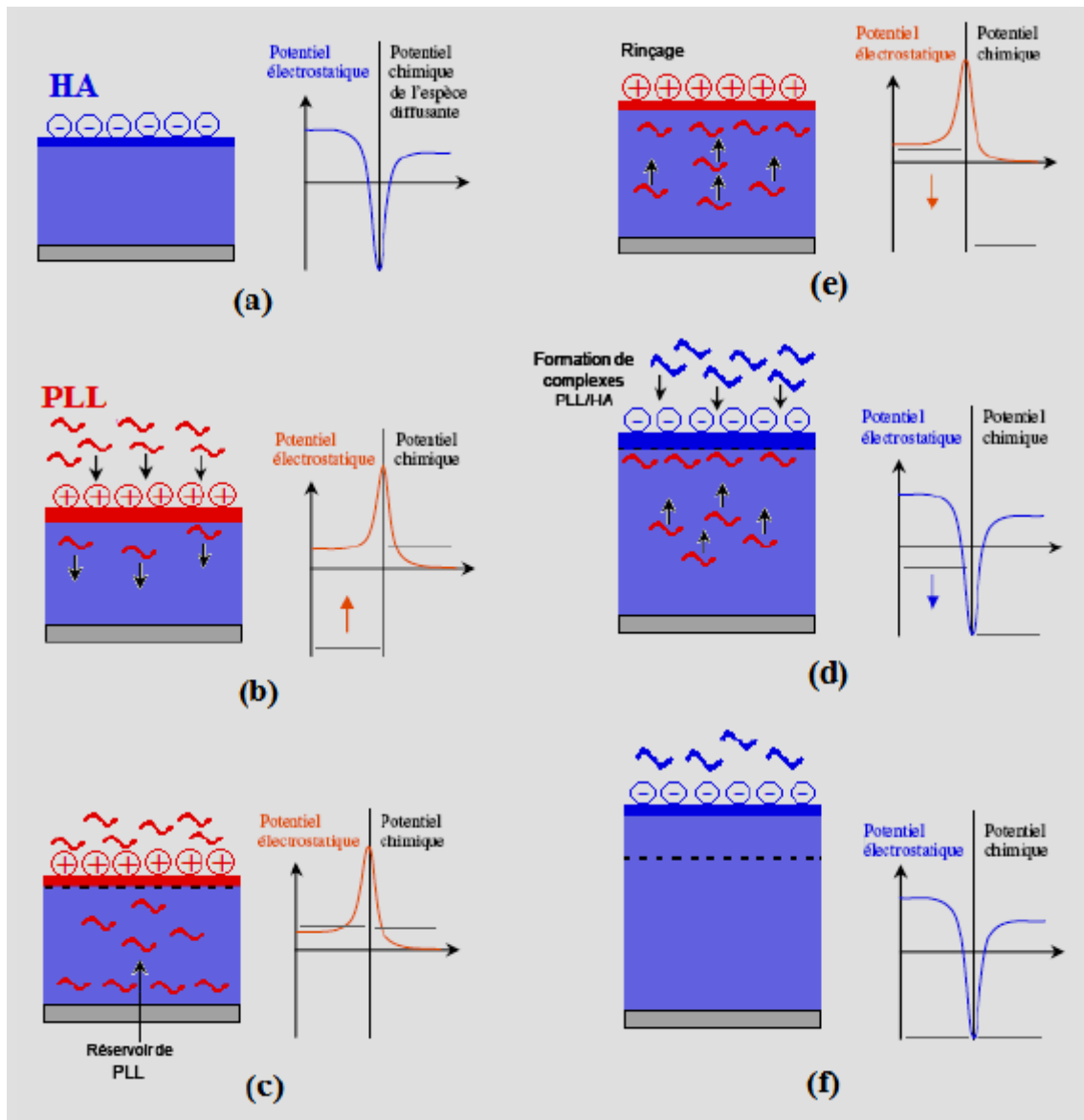


Figure 1.4.3.2b : Représentation schématique du mécanisme de croissance exponentielle. Une diffusion en excès des molécules de PLL aboutit à la création d'un réservoir dans le film. Le dépôt suivant de molécule de HA va permettre à ces molécules en excès de PLL de ressortir du film (rupture de la barrière de potentielle) et complexation avec les molécules de HA.

1.4.4. Propriétés biologiques.

La mise en contact des films multicouches avec le milieu biologique déclenche une cascade d'évènements régulée par les protéines et les cellules. L'étude de ces interactions, avec l'analyse de la stabilité et de la dégradation *in vivo* des films, sont des objectifs fondamentaux dans l'élaboration ultérieure d'applications biomédicales à partir des films multicouches.

1.4.4.1. Interactions protéiques.

L'adhésion protéine-substrat peut se produire quelque soient les charges impliquées dans cette interaction [158]. En effet, pour des charges protéine-substrat de même signe, l'adhésion pourra se réaliser par d'autres types de liaisons comme les liaisons hydrophobes, hydrogènes ou de Van der Waals...

L'hétérogénéité des charges sur les protéines sont également à l'origine de ces mécanismes d'adhésion. Par exemple, en cas de charges protéine-substrat opposées, l'adhésion protéique sera proportionnelle aux nombres de couches de polyélectrolytes [159].

L'adhésion est meilleure en cas de surface hydrophobe [160]. Boulmedais *et al.* ont diminué l'adhésion bactérienne en associant une molécule hydrophile (PEG) au système de polyélectrolytes (PLL/PGA) [161].

Dans l'objectif de fonctionnaliser les films par des protéines, une étape importante a été de vérifier si la structure de ces molécules est préservée après insertion dans un film multicouche [162, 163], et donc de démontrer le maintien de leur activité. Il a été ainsi démontré que des cellules de mélanome sont capables de répondre à un peptide dérivé d'une hormone « α melanocyte-stimulating hormone » (α -MSH) couplé de façon covalente à des molécules de PLL et inséré dans un film constitué de PLL/Poly-(L-glutamic acid) [164].

Jessel *et al.* ont également observé l'activation de macrophage (production de TNF α) au contact de la protéine A enfouie dans le système multicouche PLL/PGA [165].

1.4.4.2. Interactions cellulaires.

L'adhésion cellulaire sur un film multicouche est plurifactorielle. Elle dépend, entre autre, du type de cellule, du type de film (notamment du polyélectrolyte présent en surface), des propriétés mécaniques du film, du pH de construction du film...

Mendelsohn *et al.* en 2003 ont observé une modification de l'adhésion cellulaire en fonction du pH de construction du film. Ils ont montré que les films résistent à l'adhésion lorsqu'ils ont été construits à pH 2, sans qu'il y ait corrélation entre l'adhésion cellulaire et l'adhésion protéique [166].

Les propriétés mécaniques, en particulier l'élasticité des films, interviennent aussi dans l'adhésion cellulaire. En effet l'adhésion augmente d'autant plus que le module d'élasticité est important [167].

Les possibilités d'anti-adhésions (surfaces antibactériennes...) comme les possibilités d'adhésion (endothélialisations...) offrent des perspectives intéressantes et sont des voies actuelles de recherche en ingénierie tissulaire.

Un certain nombre de films ont été construits à la recherche d'une diminution de l'adhésion cellulaire. Boulmedais *et al.* ont constaté une diminution de l'adhésion d'*Escherichia Coli* sur un film de PLL/PGA, avec une baisse d'autant plus importante que le nombre de couche augmente [161]. Fu en 2005 a observé une diminution de la viabilité bactérienne sur un film alternant chitosan et héparine, déposé sur du PET, avec une diminution plus marquée pour un film construit sous pH acide [128]. Yang *et al.* ont obtenu une adhésion limitée des fibroblastes sur un film associant des molécules de poly-(acide acrylique) et de poly-(acide métacrylique) et réticulé [168].

Un autre aspect important est la stabilité du phénotype des cellules en contact avec les multicouches de polyélectrolytes. Ainsi Tryoen-Toth *et al.* ont montré que pour des cellules ostéoblastiques (Sa-OS)2 et pour des cultures primaires de fibroblastes du ligament péri-dentaire (PDL-Fs), l'expression des marqueurs phénotypiques (phosphatase alcaline, ostéocalcine) est maintenue après 48h de culture sur des multicouches de polyélectrolytes se terminant par PSS et PGA. Cependant, une diminution de

l'expression de ces marqueurs est détectée lorsque les cellules sont cultivées 48h sur des multicouches se terminant par PEI et PAH.

Richert *et al.* ont mesuré une force d'adhésion des chondrocytes nettement supérieure à celle obtenue sur des films se terminant par PLL plutôt que par PGA. Cependant, cette force d'adhésion diminue lorsque le nombre de couches constituant le film augmente [169]. Pour ces cellules, les surfaces se terminant par des charges négatives (PSS et PGA), sont favorables à la formation de filaments d'actine et de contacts focaux. Au contraire, sur des surfaces se terminant par des charges positives (Poly(Ethylène Imine)(PEI), PAH et PLL), les cellules ne présentent pas de réorganisation du cytosquelette.

Boura *et al.* en 2005 ont constaté une bonne adhésion des cellules endothéliales sur des films se terminant par PAH et PSS, après les avoir soumis à des forces de cisaillement comparables à celles rencontrées dans des conditions physiologiques [170].

1.4.4.3. Stabilité, dégradabilité.

Différents paramètres jouent sur la stabilité des films, comme le pH, la taille et la nature du polyélectrolyte.

La plupart des films multicouches utilisés sont des polyélectrolytes dits faibles, c'est-à-dire que leur densité de charge se modifie avec le pH. Ainsi une faible variation locale du pH peut modifier l'épaisseur du film et donc sa structure [149]. Une augmentation de la concentration en sel, dans le milieu, va également modifier la structure du film par un changement de l'écrantage des charges des polyélectrolytes et peut finalement conduire à une destructuration totale du film.

Un polyélectrolyte, associé à une protéine, peut d'autant mieux se solubiliser que sa chaîne est courte. S'il est trop faiblement chargé, son interaction avec une protéine sera alors moins stable qu'avec les couches de polyélectrolytes sous jacentes [171].

Les polyélectrolytes de type polypeptidiques sont sensibles à la dégradation enzymatique. Par exemple, le chitosan et l'acide hyaluronique sont dégradés par de l'amylase et du lysosyme [172]. Cependant, cette dégradation est fortement ralentie après réticulation du film [173].

1.4.5. Applications : fonctionnalisation des multicouches.

1.4.5.1. Fonctionnalisations protéiques ou peptidiques.

Les films multicouches peuvent être fonctionnalisés par adsorption de protéines en surface d'un film ou par insertion d'une ou plusieurs protéines (identiques ou différentes) à plusieurs niveaux de la construction. Les protéines conservent une structure proche de celle de leur forme native [162]. Cette propriété permet ainsi de préserver leurs activités biologiques et aboutit à la fonctionnalisation potentielle par les protéines et/ou les peptides des constructions multicouches.

Jessel *et al.* ont démontré qu'une protéine A enfouie dans un film PLL/PGA stimule effectivement l'activation des cellules macrophages localisées en surface, avec production de TNF α [174].

Une hormone, l' α -mélancortine, a été couplée de manière covalente à un polyelectrolyte, le PLL. Cette liaison a permis d'intégrer l' α -mélancortine dans une construction multicouche de type (PLL/PGA), dans laquelle elle a été placée sur la couche la plus superficielle, avec mise en évidence de la conservation de son activité biologique [164].

De même, la préservation de l'activité immunologique des IgG au sein d'un film multicouche a également été démontrée, avec reconnaissance par des anticorps anti IgG localisés en surface, des IgG enfouies. Inversement, des molécules d'IgG localisées en surface d'une construction multicouche ont reconnues des molécules anti IgG enfouies [175].

L'internalisation dans un film multicouches d'une molécule anti-inflammatoire, le pyroxicam, a montré leurs possibilités thérapeutiques, avec constatation d'une inhibition de la production de TNF α par les monocytes de type THP-1, préalablement stimulés par une endotoxine bactérienne liposaccharidique [176].

1.4.5.2. Fonctionnalisation par adjonction d'ADN.

Les molécules d'ADN correspondent à des polyanions et de ce fait peuvent être intégrées dans un film multicouche, par exemple en combinaison avec PLL, PEI ou PAA [177-179].

Zhang *et al.* en 2004 ont enfoui un ADN plasmidique dans un film multicouche, et ont observé, après relargage par électrophorèse, un ADN fonctionnel capable d'une activité de transcription [180]. La libération de molécules d'ADN par un champ électrique, au préalable associées à un cation (PEI) en construction multicouches, a été également observé [181].

1.4.5.3. Activité anticoagulante.

Une des premières molécules testées en tant que film multicouche à la recherche d'une action anticoagulante était naturellement l'héparine, associée à de l'albumine [182], le film étant construit sur du PET. Les auteurs ont constaté à 3 semaines une stabilité du film.

Par la suite l'héparine a été associée au PEI sur de l'acier inoxydable [183], un des matériaux régulièrement utilisé dans la fabrication de stents. L'auteur a constaté une activité anticoagulante ainsi qu'une bonne stabilité à 3 semaines.

Serizawa *et al.* ont associé des molécules de chitosan et de dextran, réciproquement pro et anticoagulants, et ils ont mis en évidence de manière alternative des activités antagonistes en fonction du type de molécule placé en dernière couche [184].

1.4.6. Applications sur le polyéthylène de téréphtalate.

Comme décrit au chapitre 1.3. le PET est l'objet de nombreuses recherches dans le but d'améliorer ses performances dans deux domaines principaux : la thromborésistance et la lutte contre l'infection. La grande facilité de construction des films multicouches et les possibilités infinies d'associations des polyélectrolytes représentent d'énormes potentiels d'amélioration du PET. Plusieurs auteurs se sont déjà axés sur ce principe comme base de recherche

- Dès 1996, Chen *et al.* ont construit sur du PET un film multicouche PAH/PSS. Le PET était soit non modifié (neutre) soit modifié avec des groupements carboxyles ou ammoniums. Les trois types de PET ont supporté la construction avec mise en évidence d'une stratification [28].
- En 1997 Delcorte *et al.* ont appliqué sur différents polymères des films multicouches à base de PSS/poly(choline métacrylate)[151]. La construction des films sur des surfaces non chargées étant liée à des interactions hydrophobes. Le PET correspondrait au polymère le plus adapté à un traitement multicouche.
- Liu *et al.* en 2005 puis en 2007 ont travaillé sur un PET hydrolysé sur lequel ils ont construit un film chitosan/chondroïtine sulfate. Ils ont observé une bonne adhésion de cellules endothéliales avec notamment préservation de la fonction des cellules, après 8 jours de cultures [185, 186].
- Fu *et al.* en 2005 ont appliqué sur une membrane en PET un film associant des molécules d'héparine et de chitosan et ont observé une moindre adhésion d'*Escherichia Coli* [128]. Dans une autre étude les mêmes ont associé au même film des nanoparticules d'Argent avec constatation d'une amélioration de l'effet bactérien [129].

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.

2.1. Les films multicouches.

Dans cette étude, pour la construction de films multicouches sur le PET (filament, fil et prothèse), trois types de systèmes de polyélectrolytes ont été choisis, correspondant aux trois familles de films les mieux caractérisés *in vitro*: 1) un film à base de polypeptides synthétiques, poly-(L-lysine) (PLL) et polysaccharides, acide hyaluronique (HA) : (PLL-HA)₂₄ qui suit un mécanisme de croissance exponentiel et peut atteindre une épaisseur de plusieurs microns [155], 2) un film composé de polypeptides synthétiques biodégradables PLL et Poly-(L-glutamic acid) PGA : (PLL-PGA)₂₄ qui dépend aussi d'un mécanisme de croissance exponentielle [187] et 3) un film constitué de polyélectrolytes non biodégradables poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) et poly(allylamine hydrochloride) (PAH): (PSS-PAH)₂₄ qui répond à un mécanisme de croissance linéaire mais d'une plus faible épaisseur [187].

Les multiélectrolytes Poly(L-lysine) (PLL, MW = 5.7×10^4 Da), poly(L-lysine) marquée par de l'isothiocyanate de fluorescéine (PLL^{FTIC}, MW = 5.0×10^4 Da), le poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS, MW = 7.0×10^4 Da), le Poly(L-glutamic acid) (PGA, MW = 7.2×10^4 Da), le poly(allylamine hydrochloride) (PAH, MW = 7.0×10^4 Da) le poly(allylamine hydrochloride) marqué par l'isothiocyanate de fluorescéine (PAH^{FTIC}, MW = 7.0×10^4 Da), ont été fournis par la société Sigma (St. Quentin Fallavier, France). L'acide hyaluronique (HA, MW = 4.0×10^5 Da) était fourni par la société BioIberica (Barcelone, Espagne).

Les solutions de polyélectrolytes étaient préparées par dilution dans des proportions adéquates de poudres de polyélectrolyte et de solution de Chlorure de Sodium (NaCl) à 0.15 Molaire. Toutes les solutions étaient préparées à partir d'eau ultrapure (MilliQ-plus système, Millipore) avec une résistivité de 18.2 MΩ cm.

2.2. Le polyéthylène de téréphtalate.

Le polyéthylène de téréphtalate utilisé dans ce travail a été fourni, sous plusieurs formes, par la société Cardial (Saint-Etienne, France). Une bobine de fil de tissage de PET nous a servis pour les filaments et les fils. Nous avons séparé manuellement des segments de ce fil sous contrôle d'une loupe binoculaire, pour obtenir des échantillons de filaments. Il a été nécessaire de tremper pendant quelques minutes les fils dans de l'acétone, pour éliminer les dépôts nécessaires à la conservation des bobines. Des segments de tubes de 22 mm de diamètre, tout à fait analogue aux prothèses utilisées en pratique clinique, mais sans aucun traitement de surface, ont également été fournis.

2.3. Méthodes d'application des multicouches au PET.

2.3.1 Principe du dipping robot.

Les films multicouches ont été élaborés selon la méthode de construction par trempage (« dipping »). Les échantillons (filaments, fils ou segments de prothèse vasculaire) sont immergées pendant 10 minutes dans une solution de polycation (étape1), puis rincées dans une solution à 150mM NaCl (étape 2 et 4)(Figure 2.3.1a).



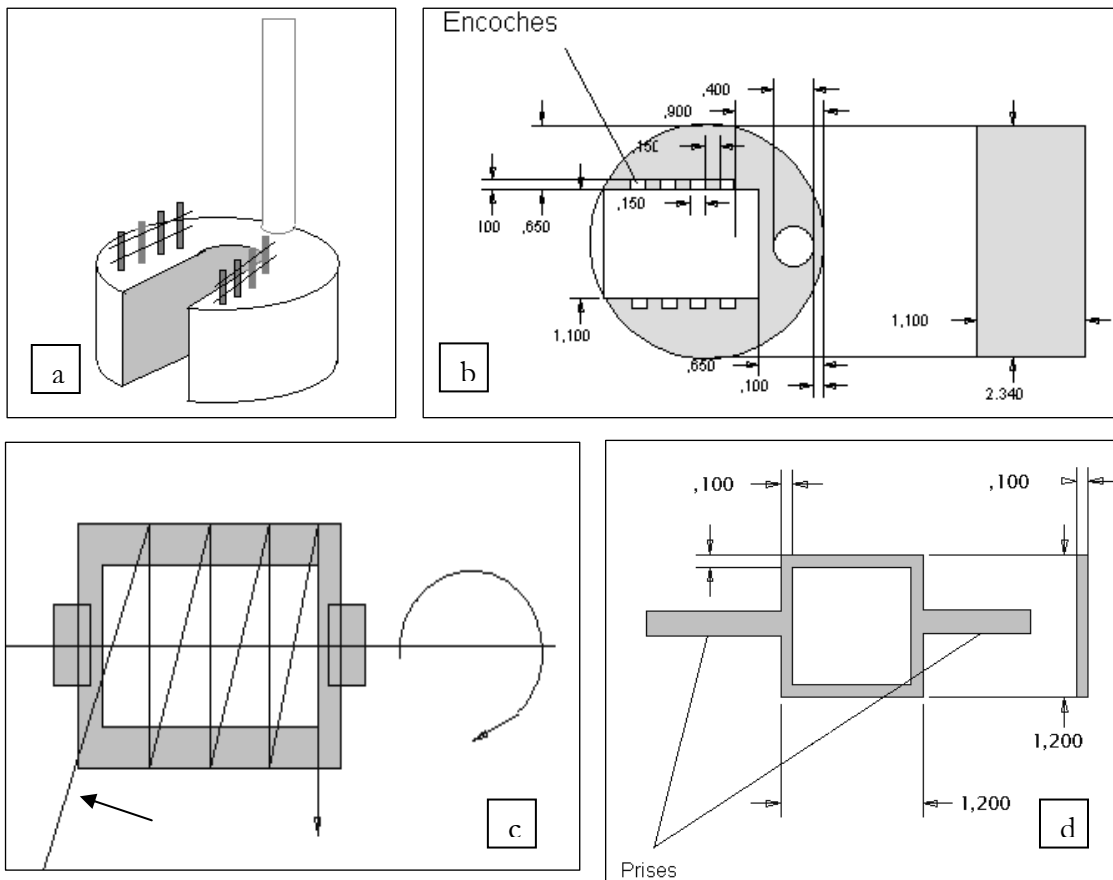
Figure 2.3.1a : Trempage par le dipping robot d'une prothèse fixée sur le portoir.

2.3.2. Les portoirs.

Le principe de ce travail était d'appliquer le traitement multicouche à chaque élément constitutif d'une prothèse en PET c'est-à-dire le filament, le fil et la prothèse. Pour cela, il a été développé des systèmes de portoirs adaptés au dipping robot, sur lesquels sont placés les cadres porteurs des fils et filaments. Plusieurs types de portoirs (Figures 2.3.2a et b) ont été fabriqués. Nous avons opté pour le portoir représenté Figure 2.3.2b qui s'adapte au bras de trempage du robot et qui possède des encoches prévues pour l'emplacement des cadres supportant les fils ou filaments (Figures 2.3.2c et d).

Le cadre a été conçu afin de permettre le trempage individualisé d'une longueur utile de fil/filament (Figure 2.3.2c). Il se place sur le portoir dans les encoches prévues à cet effet. La mise en place des fils/filaments sur le cadre est réalisée par enroulement à l'aide de deux prises latérales (Figure 2.3.2d). Les fils/filaments sont fixés sur le cadre par un point de cyanoacrylate.

Les dimensions du cadre définitif (12x12x1mm) permettent l'analyse statique des fils/filaments directement à partir du cadre positionné sous l'objectif du microscope confocale ou dans la chambre d'analyse du SEM. L'observation par AFM a nécessité de détacher les fils/filaments pour les placer sous le cantilever contenu dans la tête de l'AFM.



Figures 2.3.2a à d: Schémas de portoirs adaptés au robot a) premier modèle, non retenu b) modèle définitif, vu de haut, avec des encoches prévues pour insérer des cadres c) cadres sur lesquels les fils/filaments (flèche) sont directement enroulés d) cadres avec les prises pour l'enroulement des filaments/fils. Unités en cm.

Pour la prothèse en entier, un segment de 5 cm de long d'un tube de 22mm de diamètre était fixé sur le montant vertical des portoirs à l'aide de 2 nœuds (Figure 2.3.2e).



Figure 2.3.2e : Visualisation du système en place sur le dipping robot. En avant un portoir a été laissé vacant, au fond un segment de prothèse est fixé sur l'autre portoir, en bas, les bacs de trempage.

2.4. Les méthodes d'observation.

2.4.1. La Microscopie Electronique.

2.4.1.1. La Microscopie Electronique à Balayage (SEM).

Le microscope électronique à balayage (SEM pour Scanning Electronic Microscopy) utilise un faisceau d'électrons très fin qui balaie point par point la surface de l'échantillon explorée par ligne successive. Sous l'impact du faisceau d'électrons accélérés, des électrons rétrodiffusés et des électrons secondaires émis par l'échantillon sont recueillis sélectivement par des détecteurs qui transmettent un signal à un écran cathodique (Figure 2.4.1.1a). L'image obtenue est constituée de zones brillantes et

sombres donnant un aspect tridimensionnel. Cette technique qui est couramment utilisée pour observer des tissus et cellules intacts, nécessite une métallisation et une déshydratation au préalable des échantillons qui seront examinés sous vide.

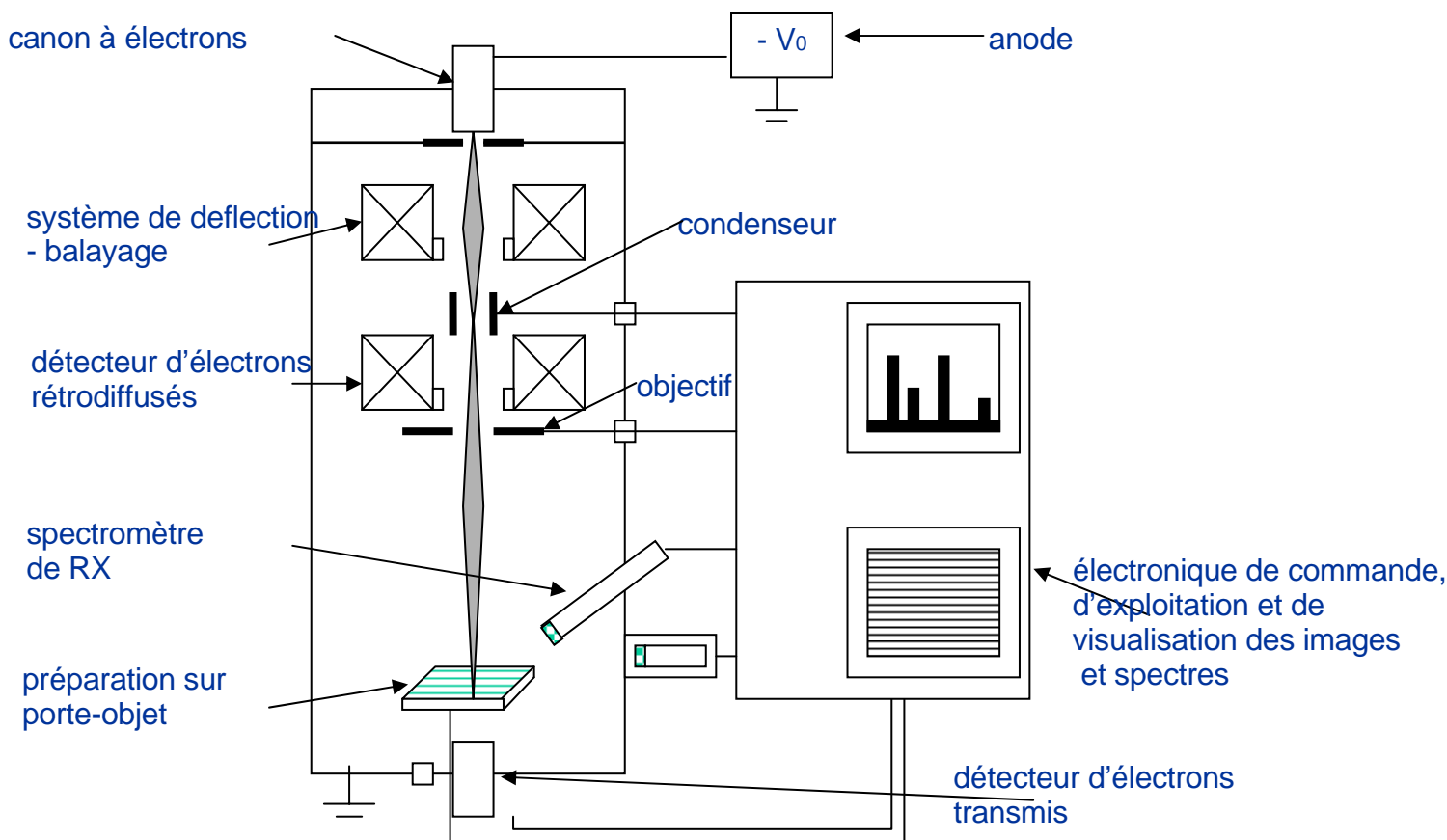


Figure 2.4.1.1a : schéma de principe d'un microscope électronique à balayage (SEM).

2.4.1.2. La Microscopie Electronique à Balayage Environnementale (ESEM).

L'origine de la microscopie électronique à balayage environnementale (ESEM pour Environmental Scanning Electron Microscopy) était liée à la volonté d'éliminer la nécessité de maintenir un haut vide dans les microscopes électroniques. En effet, pour certains échantillons délicats, ce haut vide engendre des restrictions concernant les méthodes de préparation et les conditions d'imagerie. Cependant, il est important de prendre en compte que l'ESEM, comme tout autre SEM, peut uniquement donner des informations venant de la proche surface des échantillons [188]. Il peut donc être nécessaire de compléter ces informations par d'autres techniques, pénétrant plus à l'intérieur du volume de l'échantillon (microscopie confocale par exemple).

Les microscopes à pression contrôlée diffèrent des SEM conventionnels principalement par la présence d'un gaz dans l'enceinte où se placent les échantillons. Ces derniers ne sont pas observés sous haut-vide, mais sous un vide que l'on qualifie de « dégradé ». Dans le cas de l'ESEM, ceci est possible grâce à une structure spécifique de la colonne électronique (figure 2.4.1.2a).

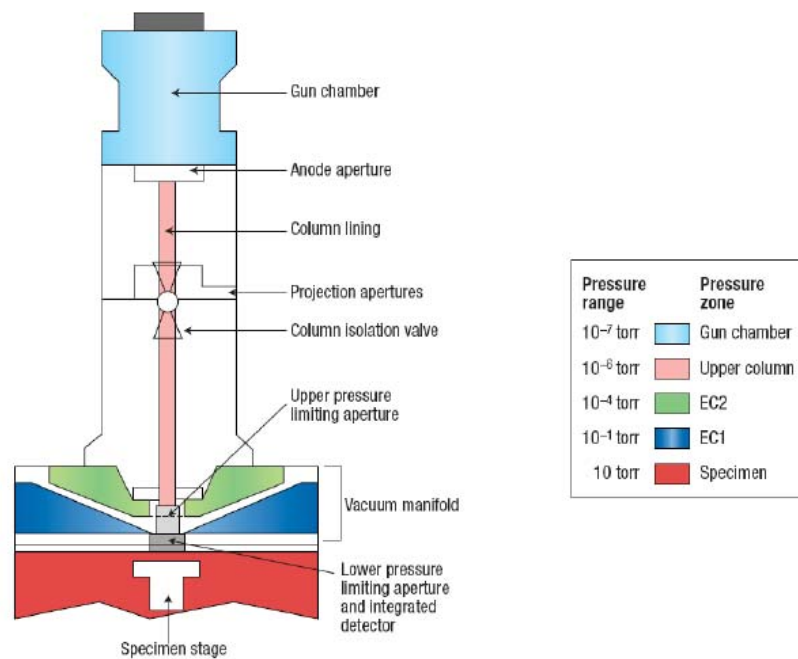


Figure 2.4.1.2a: Représentation de la colonne d'un ESEM : le canon à électron est maintenu sous haut-vide, alors qu'un système de vide différentiel (des diaphragmes ouverts limitant les échanges de pression entre les différentes zones) permet de maintenir une certaine pression de gaz dans la chambre de l'échantillon (1 Torr = 133Pa) [189].

La colonne électronique est divisée en plusieurs zones de pression différente, délimitées par des diaphragmes ouverts limitant les échanges de pression entre les zones [190]. La faible pression de gaz se trouvant autour de l'échantillon, ou « environnement » qui a inspiré le terme de SEM « environnemental », peut jouer deux rôles. Le premier est électronique, c'est-à-dire que le gaz peut être vu comme un conducteur de charges électriques et un amplificateur avant détection. Ce premier rôle est schématisé à la figure 2.4.1.2b : les collisions entre électrons et molécules de gaz induisent la création d'ions positifs, qui peuvent compenser l'accumulation de charges négatives à la surface des échantillons, et d'électrons de cascade qui prennent part à l'amplification du signal collecté par le détecteur environnemental d'électrons secondaires (GSED).

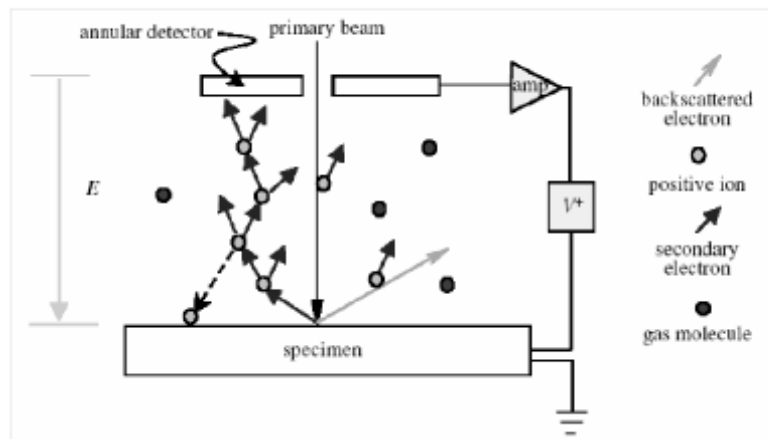


Figure 2.4.1.2b : Représentation schématique du procédé d'amplification utilisant les collisions entre les électrons secondaires et les molécules de gaz [191].

Le second rôle que peut jouer l'environnement est thermodynamique, c'est-à-dire que le gaz est le milieu de conditionnement, empêchant la déshydratation d'objets hydratés, ou l'évaporation d'échantillons liquides [192], pourvu que les pressions atteintes dans l'enceinte soient suffisantes.

Grâce à l'apparition de ce nouveau type de microscopes, une gamme d'échantillons délicats, de matériaux isolants, liquides, etc., peut être observée dans des conditions d'équilibre ou au cours d'évolutions *in situ*.

La gamme de pression accessible en ESEM peut correspondre à la pression de vapeur saturante de l'eau si la température de l'échantillon est abaissée de quelques degrés par rapport à l'ambiante. Typiquement, une platine de refroidissement par effet Peltier est utilisée pour maintenir l'échantillon à environ 3°C. Par exemple dans le cas d'une pression de 4,5 Torr de vapeur d'eau dans la chambre (Figure 2.4.1.2c), ce qui permet d'assurer la stabilité thermodynamique de l'échantillon et la qualité des images ainsi obtenues. En ESEM, on peut ainsi observer des métaux, mais aussi sans métallisation ni fixation, des céramiques, des polymères, des échantillons biologiques, des liquides, des huiles et graisses.

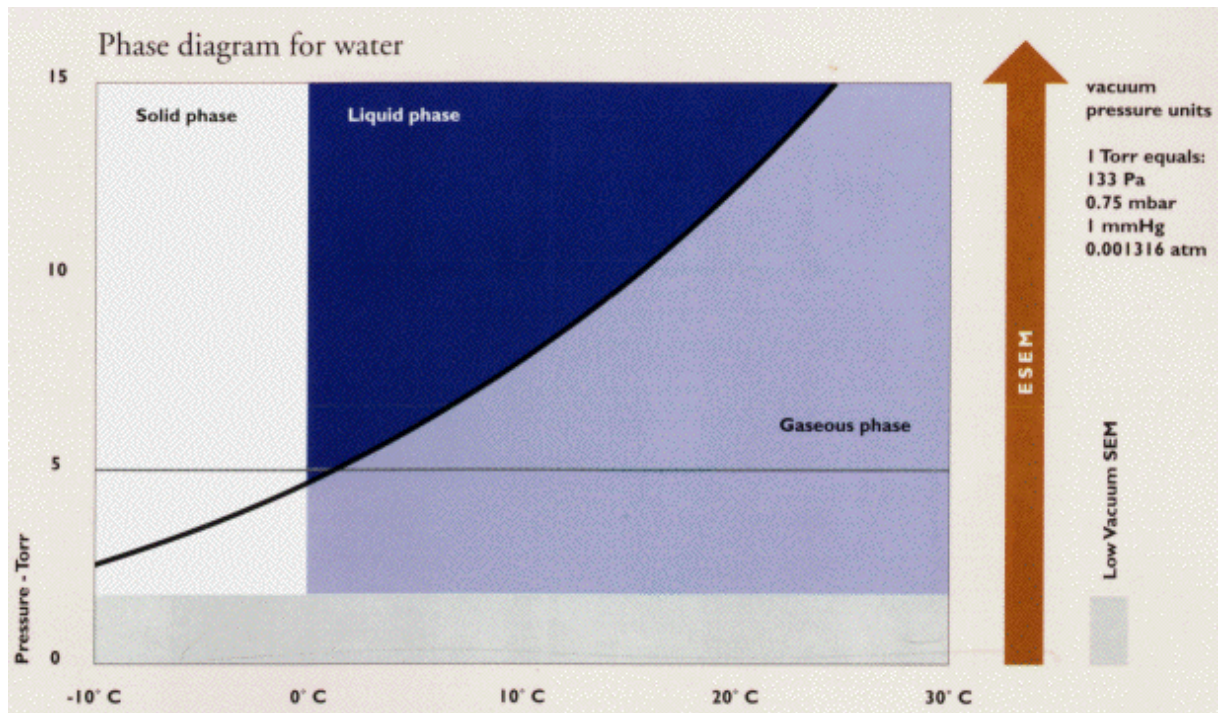


Figure 2.4.1.2c : Diagramme de phase de l'eau en fonction de la pression et de la température.

2.4.2. La Microscopie Confocale.

2.4.2.1. Le principe.

En 1953, Minsky a breveté le principe d'un nouveau microscope optique dans lequel l'image était formée par un sondage point par point du spécimen (balayage). Les dispositifs essentiels étaient une source lumineuse (aujourd'hui un rayon laser) et un collimateur (trou de filtrage) [193]. Le principe fondamental de la microscopie confocale est d'éliminer la fluorescence provenant de plans défocalisés qui parasitent le signal récupéré en ne laissant passer que la lumière provenant du point focal, d'où le nom confocal (lumière conjugué au plan focal) (Figure 2.4.2.1a)

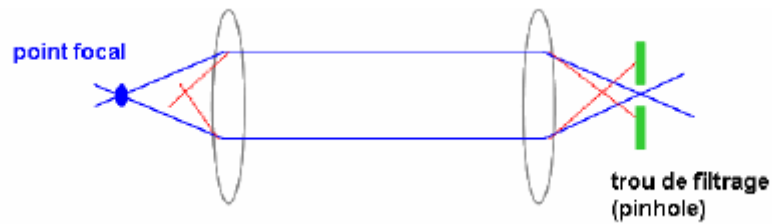


Figure 2.4.2.1a : Schéma de principe du microscope confocal. Seul le signal provenant du plan focal (bleu) est transmis au détecteur grâce au trou de filtrage placé sur le trajet optique.

2.4.2.2. Fonctionnement du microscope confocal à balayage laser.

Dans le système d'imagerie confocale, un seul point à la fois est balayé à travers l'échantillon. Pour obtenir une image de l'échantillon correspondant au point focal (plan xy), le microscope utilise des miroirs disposés sur le trajet optique du laser. Pour un balayage complet dans l'axe z, l'objectif du microscope dispose d'un moteur piézo-électrique permettant un déplacement au niveau de plans focaux successifs. Alors qu'un seul point est illuminé, l'intensité lumineuse couvre la zone environnante au plan focal réduisant ainsi l'excitation de la fluorescence examinée. Un trou de filtrage (pinhole) permet alors la discrimination axiale selon l'axe z, laissant passer uniquement la lumière provenant directement du point irradié à un capteur qui enregistre l'image pixelisée (Figure 2.4.2.2a)

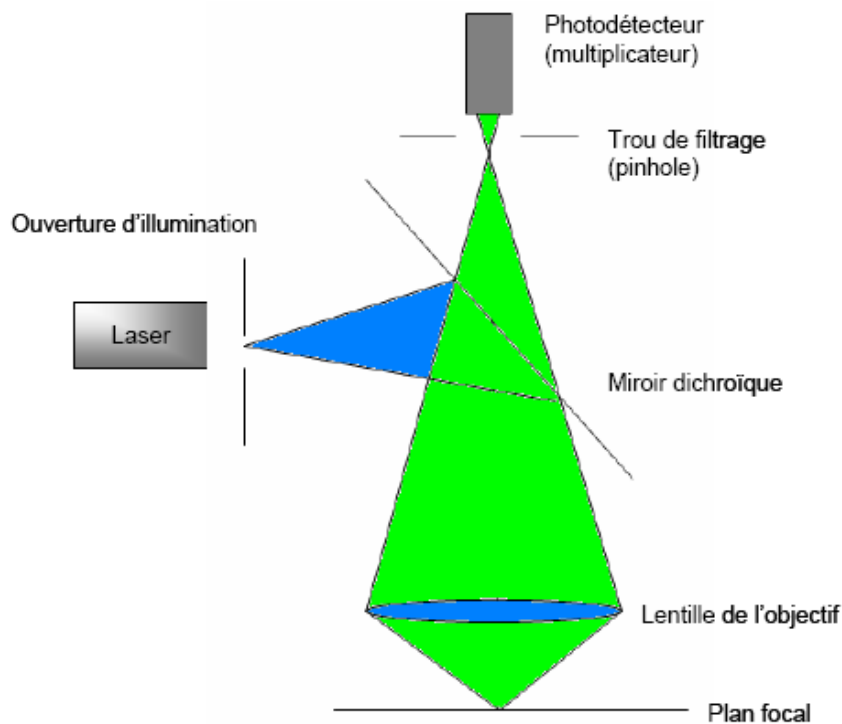


Figure 2.4.2.2a : Schéma de fonctionnement du microscope confocal à balayage laser.

Les lasers utilisés le plus habituellement sont les suivants :

- le laser Argon contenant trois raies : 459 nm (la plus faible), 488 nm (bleu) et 514 nm (bleu vert).
- Le laser Hélium Néon I (543 nm)
- Le laser Hélium Néon II (633 nm). (Pawley 1995).

Au cours de nos expériences, l'excitation par la raie à 488 nm de laser Argon et l'excitation à 543 nm par le laser Hélium Néon I seront utilisées.

2.4.2.3 Les fluorophores.

Les colorants fluorescents sont des agents modificateurs relativement petits qui peuvent être couplés de façon covalente à différents groupes fonctionnels. Les spectres des sondes peuvent être de deux types : chromogéniques ou fluorescents. Les agents chromogéniques sont réservés normalement à de grandes molécules et sont couplés de façon non covalente. Les agents chromogéniques sont réservés normalement

à de grandes molécules et sont couplé de façon non covalente. Les chromogènes ont cependant une faible sensibilité à basse concentration. En raison de leur large rendement quantique de fluorescence, les sondes fluorescentes peuvent quant à elles fournir une très grande sensibilité de détection.

Une molécule fluorescente a la capacité d'adsorber de l'énergie à une longueur d'onde déterminée et d'émettre ultérieurement cette énergie à une longueur d'onde différente. Le processus d'adsorption est nommé excitation. Le coefficient d'extinction ϵ , (en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) reflète la probabilité d'adsorption. Plus ϵ est grand, plus la fluorescence sera élevée, ceci pour des conditions dites *ambiantes*. Quand une molécule se trouve à l'état excité, elle tend à retrouver son équilibre et dans certains cas ce processus s'effectue en plusieurs étapes. Ce retour à l'état initial est lent et la molécule peut alors émettre à son tour un photon (de plus basse énergie, donc de longueur d'onde plus élevée que celle de la lumière excitatrice) (Figure 2.4.2.3a)

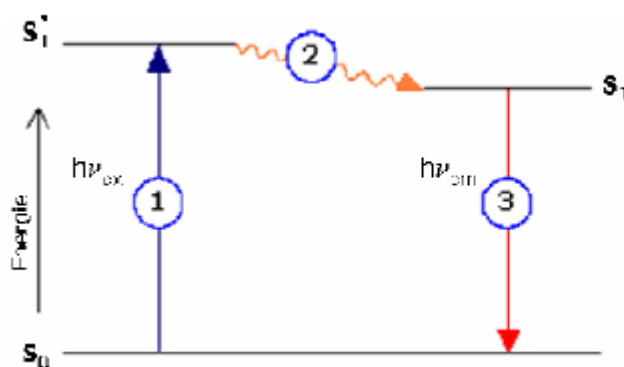


Figure 2.4.2.3a : un électron du fluorophore adsorbe de l'énergie sous forme lumineuse (1) et se retrouve à l'état excité S_1' . Lors de la relaxation (2), il y a tout d'abord perte de l'énergie par conversion interne (vibration, chocs). La molécule se retrouve à l'état d'excitation inférieur (S_1) et retrouve ensuite son état stable (S_0). Cette transition libre de l'énergie sous forme lumineuse (3), correspondant à une longueur d'onde plus élevée (car l'énergie est plus faible).

Pour qu'une fluorescence soit assurée notamment pour des études analytiques, différentes conditions doivent être remplies. La première est le rendement quantique de fluorescence (Q). Cette valeur qui varie de 0 à 1, représente le ratio entre l'émission et l'absorption totale d'une molécule donnée. Plus la valeur de Q est grande, plus la fluorescence est forte. Un autre paramètre primordial est le déplacement de Stokes,

c'est-à-dire la séparation des longueurs d'ondes des pics d'absorption et d'émission. Plus le déplacement de Stokes est important, plus le signal récupéré est isolé et donc mesurable (Figure 2.4.2.3b).

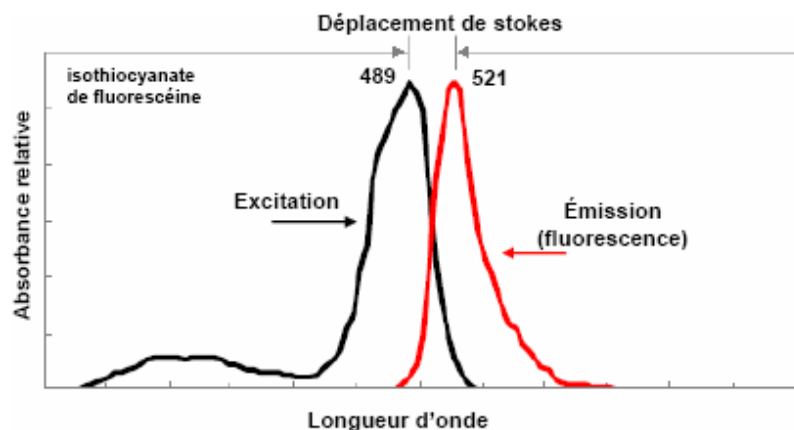


Figure 2.4.2.3b : Spectres d'excitation et d'émission de l'isothiocyanate de fluorescéine. La valeur du déplacement de Stokes est donnée par la séparation de pics d'excitation et d'émission de la molécule fluorescente.

2.4.2.4 Protocole expérimental.

Nous avons utilisé un microscope Zeiss LSM 510 avec un objectif de grandissement 20 fois. La fluorescence due à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) a été détectée après excitation à l'aide du laser Argon (488 nm) avec un filtre d'émission ayant une bande passante de 505 à 530 nm. Les images obtenues de l'échantillon fluorescent correspondent à un empilement de tranches virtuelles en (x, y). Le logiciel Zeiss LSM Image Browser (version 3) reconstitue alors un objet tridimensionnel. Il est possible de réaliser des coupes transversales virtuelles de l'échantillon (x, z) ou (y, z) permettant ainsi d'avoir accès à l'épaisseur du film.

2.4.3. La Microscopie de Force Atomique (AFM).

2.4.3.1. Principes de la Microscopie à Force Atomique.

La microscopie à force atomique AFM (Atomic Force Microscopy) a été développée en 1986 [194]. Elle dérive des principes du microscope à effet tunnel STM (Scanning Tunneling Microscope) [195-197]. Cet outil d'investigation permet l'étude de surface de matériaux à l'échelle atomique. Cette technique de microscopie est à l'origine d'une nouvelle famille de microscopes qui a apporté des progrès notables de nos connaissances de la matière : la microscopie à sonde locale qui repose sur la détection d'une interaction entre une pointe de dimension nanométrique et une surface. Elle est devenue la technique d'analyse de référence pour caractériser les propriétés physicochimiques et mécaniques de surfaces et de matériaux dans de nombreux domaines.

2.4.3.2. Description de la Microscopie à Force Atomique.

La microscopie à force atomique fait partie des microscopes à champ proche ou microscopie à sonde locale. Elle repose sur l'interaction entre une sonde de taille nanométrique et une surface. Cette interaction dépend d'une part de la distance entre la sonde et la surface, et d'autre part de la nature physicochimique des deux protagonistes. La distance sonde-surface est contrôlée par un actuateur piézoélectrique dont le déplacement est contrôlé avec une précision de l'ordre du dixième de nanomètre. Généralement, la sonde utilisée est une pointe pyramidale très fine, fixée à l'extrémité d'une lame-ressort ou microlevier (cantilever) de constante de raideur k_c . Lors du balayage de la surface, des forces d'interactions provoquent la déflexion du cantilever (la sonde), une céramique piézoélectrique permet de contrôler le déplacement de la surface dans trois directions de l'espace (x, y, z) . La déflexion du cantilever est enregistrée par un photodétecteur. Un faisceau laser est focalisé sur le cantilever et les variations de position du faisceau réfléchi sont détectées par un photodétecteur à quatre quadrants.

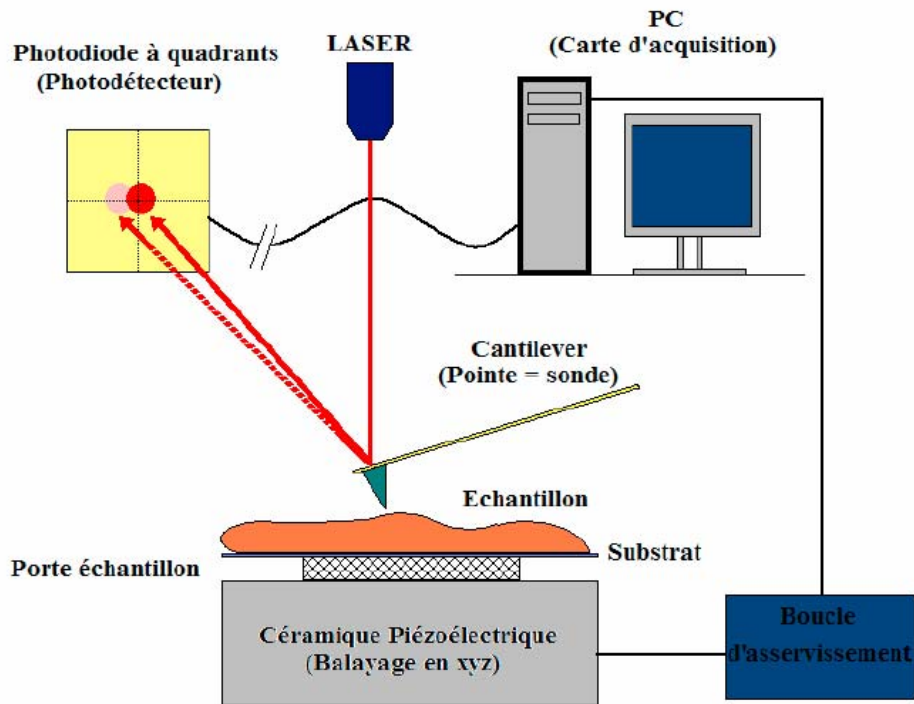


Figure 2.4.2.2a : Schémas de fonctionnement de l'AFM.

Lorsque le faisceau réfléchi est dévié, l'intensité du signal reçue par chacun des quadrants du détecteur change. Pour des faibles déflexions, il existe une relation linéaire entre le déplacement du cantilever et la différence entre les intensités reçues par les différents quadrants. L'intensité lumineuse, convertie en signal électrique et la tension appliquée à l'actuateur piézoélectrique sont enregistrées par une carte d'acquisition et transmises via un ordinateur à un logiciel de traitement des données. La conversion des signaux électriques (en volts) en déplacement (nm) est réalisée directement par le logiciel. Ce prétraitement des données nécessite la détermination des constantes de calibration du cantilever et de la céramique piézoélectrique par l'expérimentateur.

Il existe deux modes principaux d'obtention des images avec un microscope à force atomique : le mode « contact » (mode utilisé dans nos expérimentations) et mode « contact intermittent ». Les cantilevers utilisés pour former les images en mode contact sont le plus souvent constitués de nitrure de silicium (Si_3N_4) ; leur face supérieure est dorée afin de les rendre réfléchissants. Les constantes de raideur varient en général de 0,01 à 0,50N/m, selon les ressorts. Le plus souvent les chips d'AFM comportent plusieurs

microleviers de raideurs différentes, ce qui permet à l'expérimentateur d'utiliser le levier le plus approprié aux propriétés de la surface qu'il souhaite imager (Figure 2.4.2.2b).

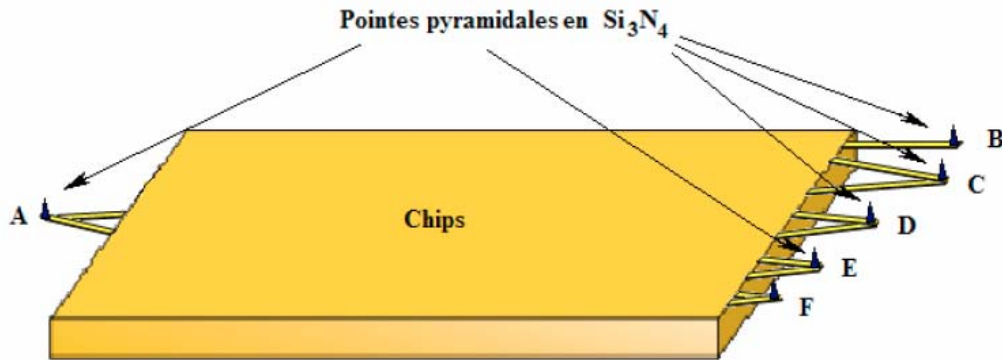


Figure 2.4.2.2b : Schéma d'une microplaquette (« chip ») comportant 6 cantilevers.

Un système d'asservissement commande le déplacement vertical du cristal piézoélectrique afin de maintenir la déflexion du ressort (et donc la force appliquée) constante. Ce signal de régulation rétroactive permet d'imager la topographie de la surface balayée. Une autre méthode consiste à balayer la surface à hauteur constante, tout en mesurant la déflexion du ressort. Mais cette méthode risque de casser ou de dégrader l'échantillon, surtout si la surface présente une rugosité importante. L'appareil utilisé est un AFM Nanoscope IV, de la société Digital Instruments (Veeco, Californie, Etats-Unis)(Figure 2.4.2.2c).

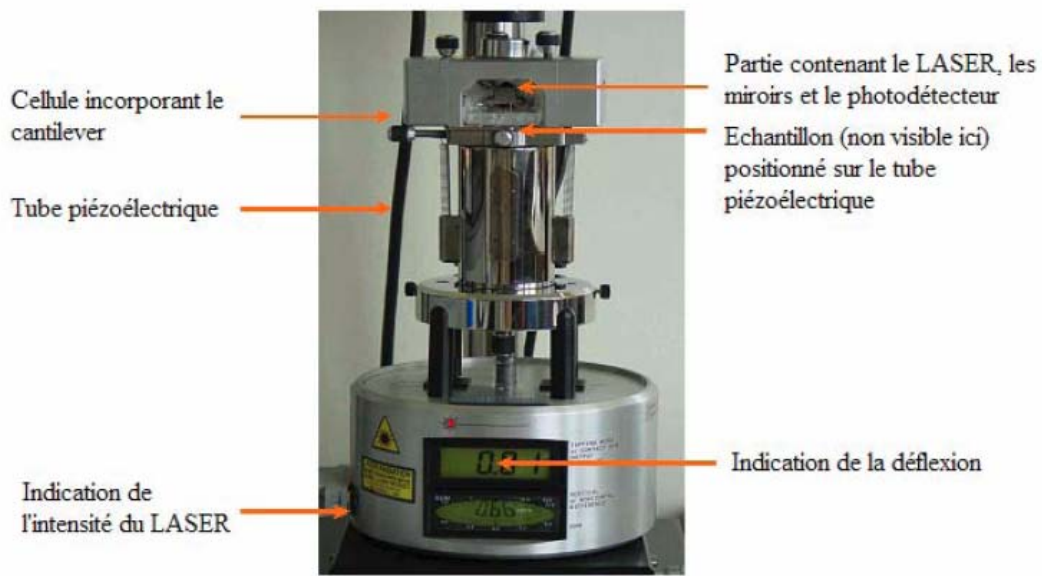


Figure 2.4.2.2c : AFM commercial.

2.5. Les méthodes de contraintes mécaniques.

Dans ce travail, deux types de contraintes ont été étudiées : la traction longitudinale et la force de cisaillement (test de flux pulsé). Chacune représente une approche des contraintes appliquées aux prothèses *in vivo* : les contraintes externes lors des mouvements des patients (flexion, extension) et internes par le flux sanguin (contraintes de cisaillement).

2.5.1. La traction longitudinale.

2.5.1.1. La dynamométrie.

Le comportement mécanique du filament, évalué par dynamométrie, est une propriété fondamentale en raison de l'importance des contraintes de flexion/extension auxquelles il sera soumis après implantation. Le comportement mécanique du filament est bien connu et son étude est réalisée notamment par une traction longitudinale. L'industrie du textile a normalisé les tests et respecte la norme NF EN ISO 5079 [27].

Nous avons réalisé le test de traction longitudinale à l'aide de la machine de traction MTS 20/M. Les filaments, d'une longueur de 20mm, étaient placés entre deux pinces. Le capteur utilisé était le « 10 Newton », la vitesse de traction était de 30mm/min. Pour réaliser le test il a été nécessaire de concevoir un support supplémentaire autorisant des tests sur des filaments d'aussi petite longueur.

Le filament sous contrainte longitudinale présente classiquement un rhéogramme à trois domaines (Figure 2.5.1.1a) : le domaine élastique, le domaine viscoélastique et le domaine plastique allant jusqu'au point de rupture [198].

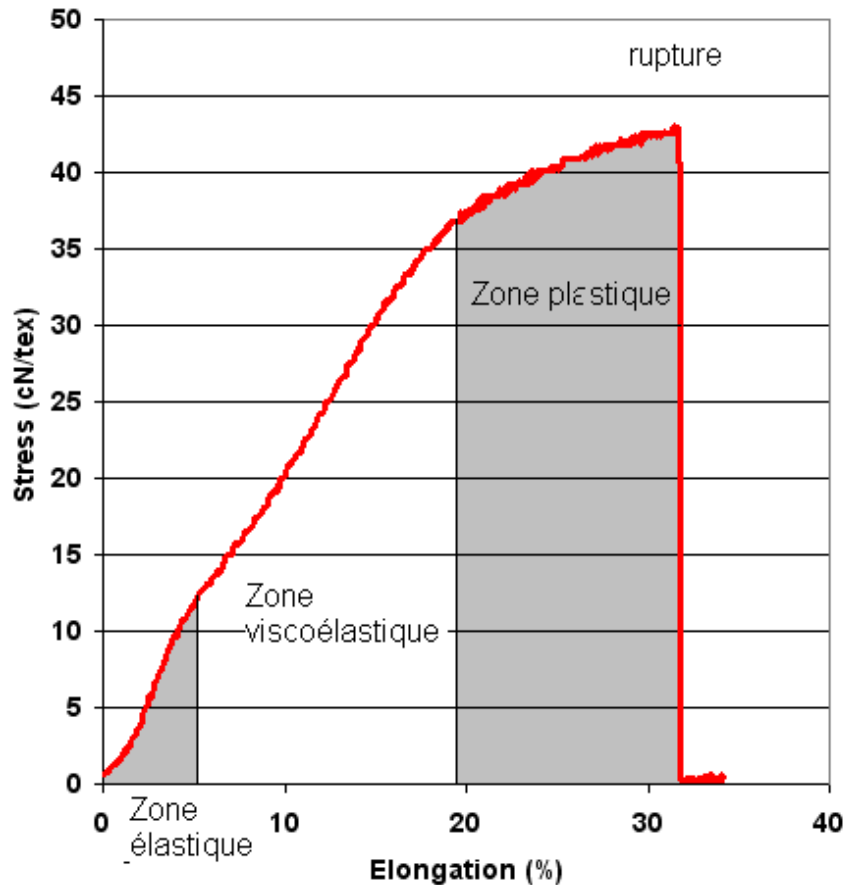


Figure 2.5.1.1a : Rhéogramme d'une traction longitudinale d'un filament PET, à trois zone de comportement, élastique, viscoélastique et plastique [198].

Il a été démontré que les processus actuels de fabrication des prothèses modifient le comportement mécanique des filaments [27, 42]. Le but de cette analyse a été d'évaluer si l'application d'un traitement multicouche de polyélectrolytes sur le filament modifiait le rhéogramme obtenu sous déformation longitudinale pour des filaments non traités.

Pour étudier le comportement mécanique des filaments, nous avons pris en compte la force à la rupture, avec comparaison entre filament non traité et filament traité.

Nous avons utilisé le test statistique ANOVA à un facteur, seuil de significativité à 5% (logiciel SPSS 10.0, SPSS inc. Chicago, Illinois).

2.5.1.2. La traction longitudinale embarquée sous ESEM.

Le but de cette expérience était d'analyser le comportement mécanique des trois traitements multicouches appliqués à un filament et à un fil, soumis à une traction longitudinale. Dans un premier temps, nous avons conçu un portoir permettant une traction manuelle du filament ou du fil positionner sur celui-ci (Figure 2.5.1.2a).

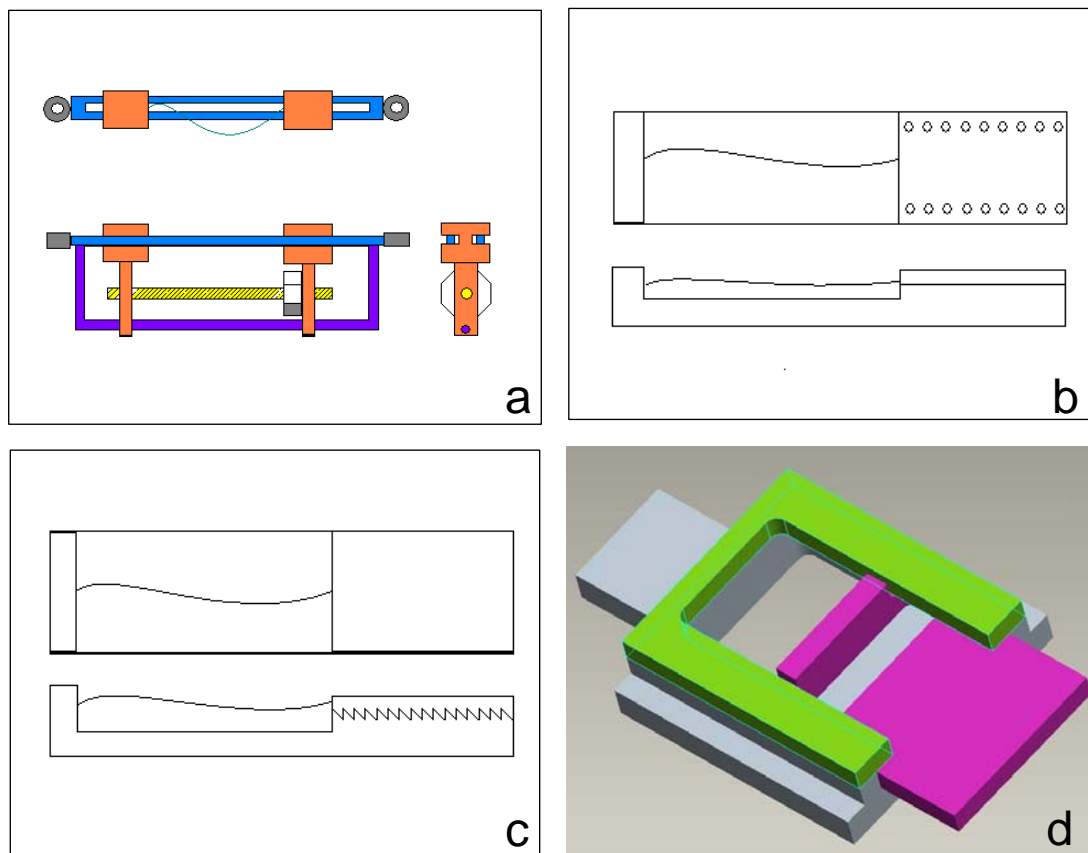


Figure 2.5.1.2a : Schémas de différents prototypes de portoirs prévus pour exercer une traction longitudinal sur le filament : système à vis a), système à perforation b), système à crémaillère c) et système par glissement d). Nous avons choisi et réalisé le portoir par glissement d).

L'analyse des résultats obtenus nous a permis de constater dans le protocole les faiblesses suivantes 1) la traction réalisée était manuelle et non reproductible, 2) les échantillons étaient analysés sous SEM (Figure 2.5.1.2b).

La tenue d'un film (PLL/PGA)₂₄, sous tension, ne semble pas très différente de celle observée en condition statique. Cependant, des fissures d'environ 5µm de longueurs, très isolées, apparaissent perpendiculaire, plutôt au niveau où le filament forme un "bourrelet" (tête de flèche: Fig. 2.5.1.2b et insert: grossissement de la fissure, observé au SEM). La métallisation sous vide peut être à l'origine de ces fissures aussi bien que la traction appliqué au filament. L'une ou l'autre de ces deux hypothèses pourraient être confirmées en appliquant la tension sur le filament dans des conditions aqueuses proches de celle d'un milieu physiologique (sans déshydratation et dans un vide partiel).

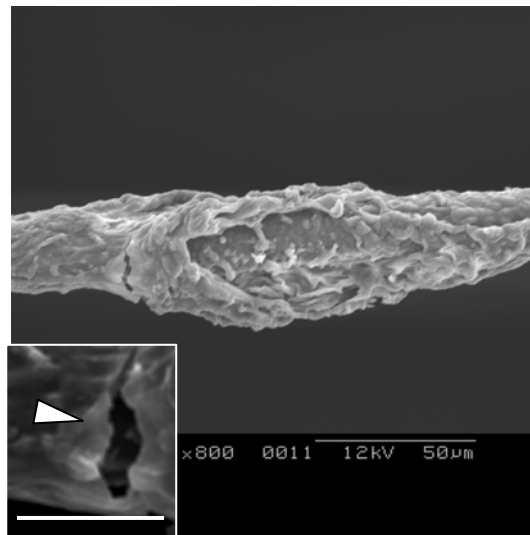


Figure 2.5.1.2b : Filament traité par un film (PLL/PGA)₂₄ soumis à une traction manuelle, observé au SEM, tête de flèche : fissure. Barre = 50µm, insert : barre = 10µm.

Le microscope électronique environnemental à balayage permet de travailler dans de telles conditions et évite ces étapes de préparation des SEM classiques.

Nous avons donc mis au point un système de traction motorisé, pouvant être commandé à distance, placé directement dans la chambre d'observation d'un ESEM (Figure 2.5.1.2c à e). Ainsi le fait d'utiliser un moteur de traction a permis de systématiser exactement la vitesse de traction, pour l'appliquer à l'identique à tous les exemplaires testés. L'utilisation d'un système pouvant être placé dans la chambre

d'observation et actionné à distance a permis de limiter au maximum les manipulations avant l'observation, avec prises d'images systématiquement après chaque nouvel étirement.

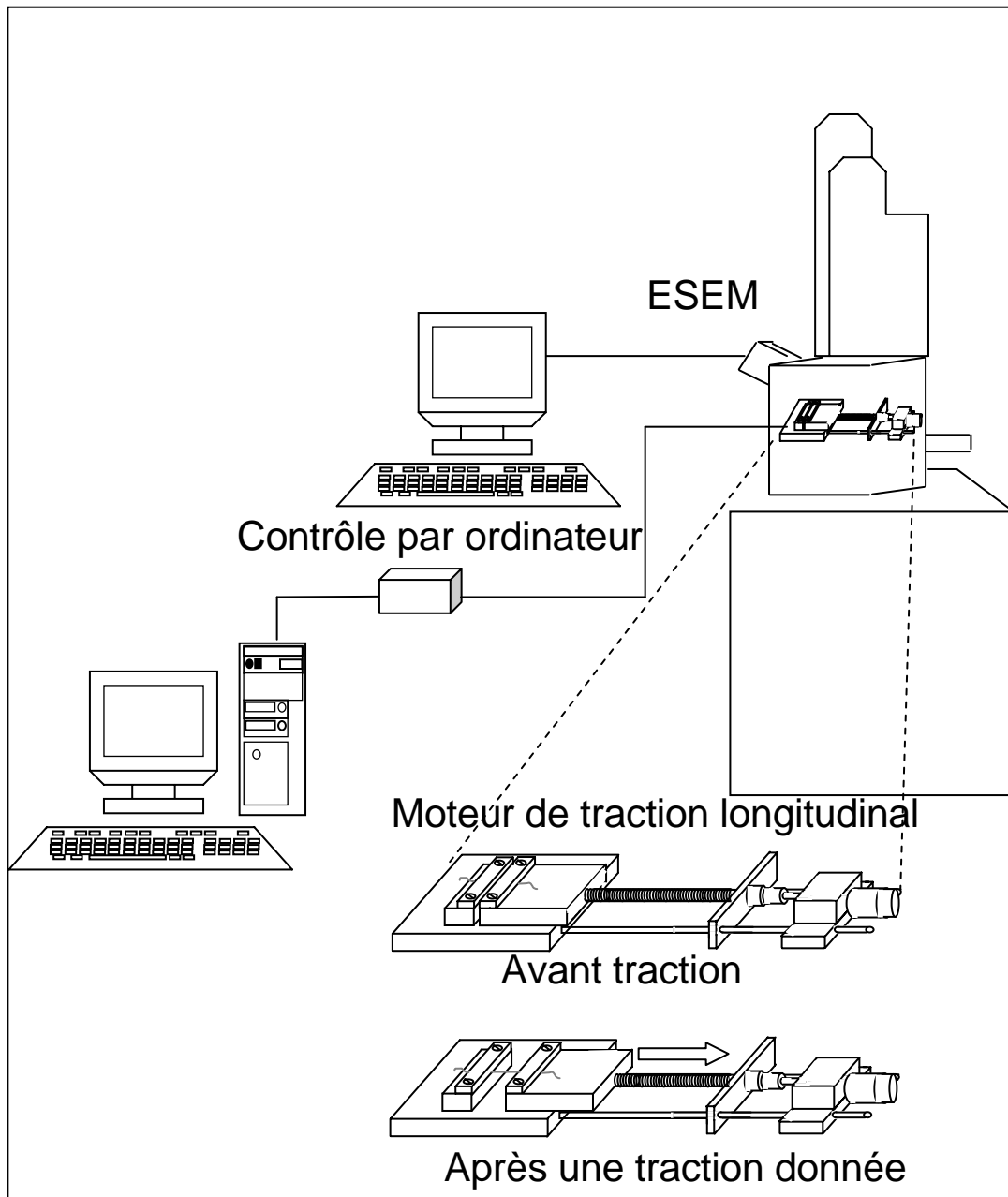


Figure 2.5.1.2c : Schéma représentant le système de traction longitudinale embarqué dans l'ESEM. Les fils, filaments et prothèses étaient fixés sur le système puis l'ensemble était placé dans la chambre d'observation de l'ESEM.

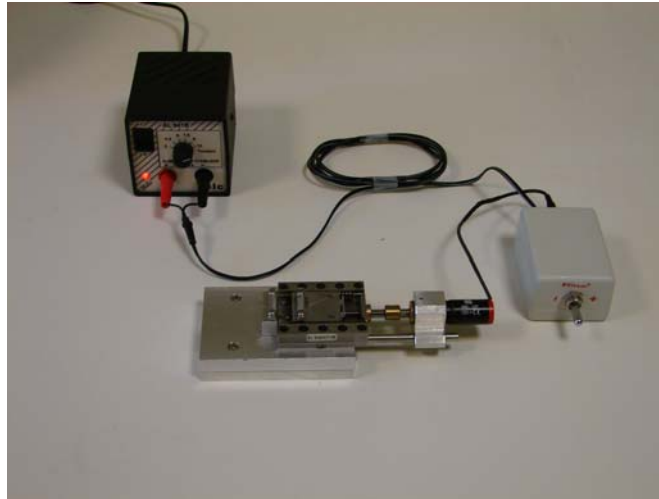


Figure 2.5.1.2d : Le système de traction.

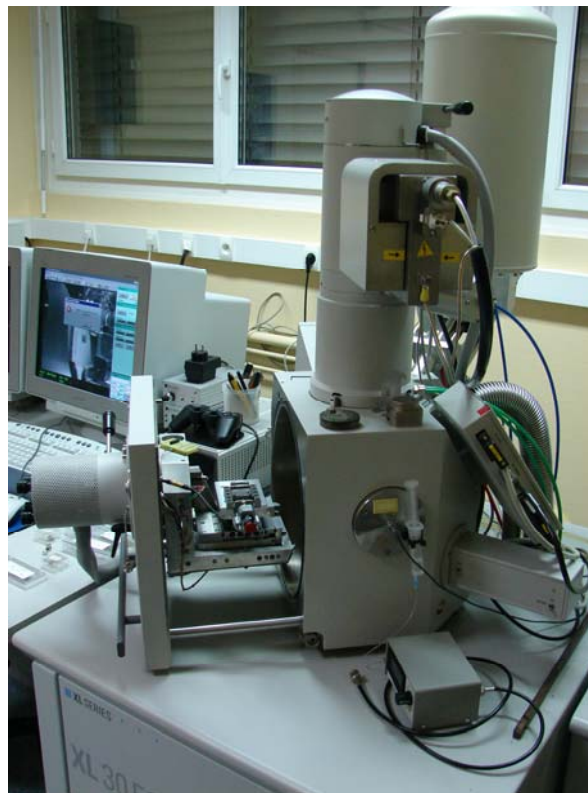


Figure 2.5.1.2e : Le système de traction dans l'ESEM.

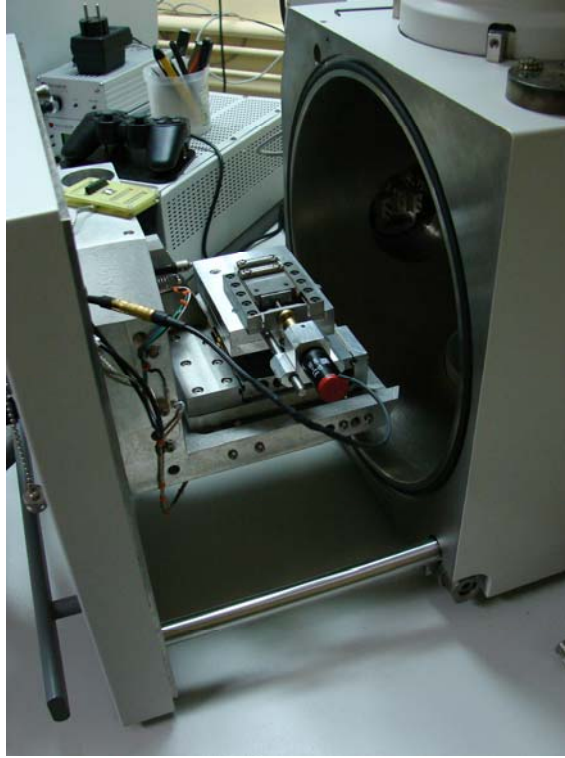


Figure 2.5.1.2f : Détail du système de traction placé sur la platine d'observation de l'ESEM.

Les segments de filaments et de fils avaient 10mm de long. La contrainte initiale devait être standardisée pour chaque exemplaire. Pour cela, un poids donné (100 μ g pour les filaments, 200 μ g pour les fils) était placé à l'extrémité libre du filament (ou du fil), l'autre extrémité étant solidarisée à la partie fixe de la platine. La mise en position verticale de la platine appliquait une traction par phénomène de gravité, identique pour tous les exemplaires. La fixation de l'extrémité libre sous cette traction définissait la précontrainte de la manipulation (Figure 2.5.1.2g).

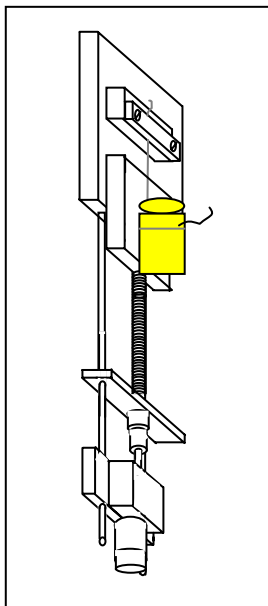


Figure 2.5.1.2g : principe de l'application d'une précontrainte standardisée. Un filament ou un fil est fixé à l'extrémité fixe de la platine. A l'extrémité libre est appliqué un poids donné (en jaune), la mise en position verticale de l'ensemble aboutit à une traction. La deuxième extrémité est fixée à la partie mobile de la platine sous cette traction, définissant ainsi la précontrainte.

La vitesse de traction mesurée était de $210\mu\text{m/s}$. Elle n'était pas modifiée selon les échantillons : respectivement $210\mu\text{m/s}$, $209\mu\text{m/s}$ et $193\mu\text{m/s}$ pour les filaments, fils et prothèses (différence non significative). Pour chaque type de films multicouches et pour chaque type d'échantillons, trois manipulations ont été réalisées.

Nous avons analysé sous ESEM le comportement des films multicouches après une traction longitudinale. Il s'agissait ici de mesurer le pourcentage d'étirement exercé sur les échantillons (fils, filaments, prothèse) pour observer une première craquelure du film multicouche. La traction longitudinale pouvait conduire à la rupture du filament ou du fil. Pour les prothèses, la traction a été stoppée au-delà de 200% d'élongation par rapport à leur longueur initiale.

2.5.2. Les forces de cisaillement : le flux pulsé.

Les prothèses mises en charge dans un régime circulatoire subissent des forces de cisaillement. Il a semblé intéressant d'évaluer les capacités de résistance des films multicouches appliqués à une prothèse soumise à ces forces. Une simulation *in vitro* a été proposée à l'aide d'un banc d'essai mis au point dans le laboratoire GEPROVAS [199].

Le système vasculaire est modélisé selon le modèle de Windkessel, modèle à paramètres globaux où le réseau vasculaire est considéré dans son ensemble. L'élasticité vasculaire est simulée par une chambre d'accumulation élastique, ici il s'agit d'une enceinte rigide contenant un certain volume d'air. La résistance vasculaire est représentée par la résistance hydraulique, le cœur par la pompe hydraulique et le système valvulaire par la valve antiretour (Figure 2.5.2a).

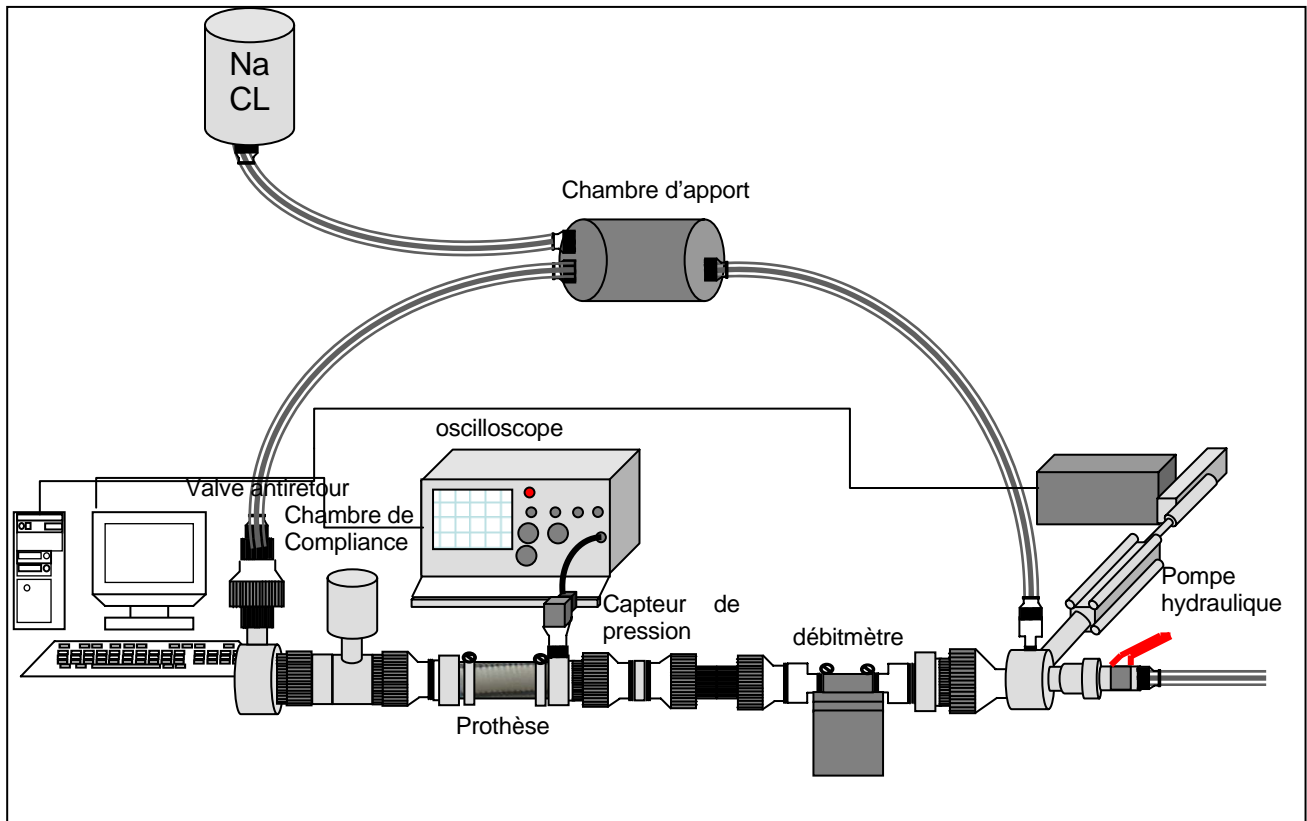


Figure 2.5.2a : Schéma représentatif du banc d'essai simulant le régime circulatoire artériel selon le modèle de Windkessel. La pompe hydraulique et la valve antiretour représentent la pompe cardiaque et le système valvulaire, l'élasticité est modulée par la chambre de compliance, la résistance hydraulique représente la résistance vasculaire périphérique [199].

Le banc d'essai était prévu à l'origine pour tester des valves cardiaques en PET. Pour tester les prothèses vasculaires, nous avons été amené à concevoir un support adapté à ce montage. La longueur maximale de prothèse traitée par des multicouches de polyélectrolytes était de 5cm (traitement par la technique du dipping robot). Ce support devait donc respecter ces impératifs de longueur tout en assurant une bonne fixation de la prothèse soumise à un flux comparable à celui d'un flux sanguin (5l/min)(Figure 2.5.2b).

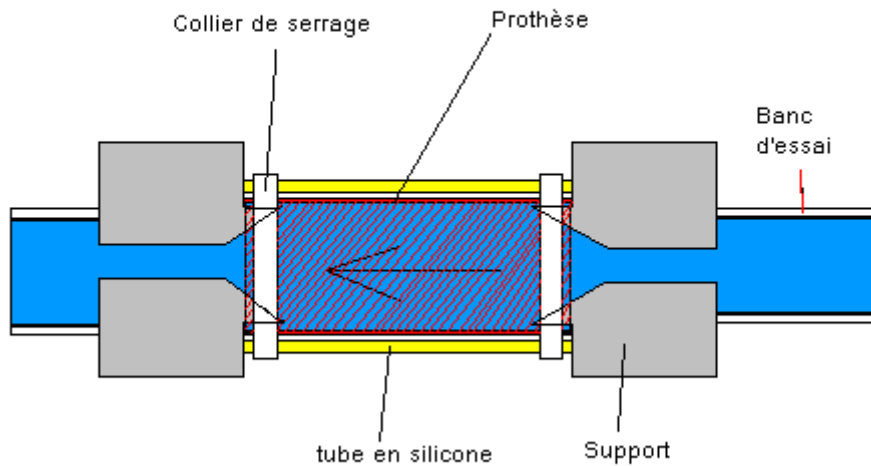


Figure 2.5.2b : Support permettant de soumettre une prothèse au banc d'essai. Les supports présentent des embouts coniques pour éviter les perturbations liées à la différence de calibre.

La pompe hydraulique est commandée par ordinateur. Il est possible de faire varier le cycle de la pompe pour arriver à un rythme comparable au rythme cardiaque physiologique de repos : 70 batt/min. La pression moyenne correspond également à celle observée physiologiquement : 100mmHg. Le débit obtenu reproduit le débit cardiaque moyen de 5 litres/min.

Nous avons testé des segments de prothèses traités par $(PAH/PSS)_{24}$, $(PLL/PGA)_{24}$ et $(PLL/HA)_{24}$ placés sous flux pendant 5 minutes et 30 minutes. Les segments testés ont été analysés sous ESEM. D'autres segments ont été traités avec des films fluorescents, permettant une analyse en microscopie confocale : $(PAH^{FITC}/PSS)_{24}$, $(PLL^{FITC}/PGA)_{24}$ et $(PLL^{FITC}/HA)_{24}$. Ils ont également été soumis à 5 et 30 minutes de flux.

2.6. L'étanchéité.

Le traitement de surface de prothèse en PET était proposé à l'origine pour augmenter l'étanchéité immédiate des prothèses. La macroporosité des prothèses textiles obligeait les chirurgiens à une précoagulation peropératoire: ils trempaient la prothèse dans le sang prélevé du patient pour obtenir une étanchéité efficace. L'avènement des imprégnations à base de matrices protéiques animales (collagène bovin, gélatine...) a permis d'arrêter ces manipulations, qui augmentaient le temps opératoire et qui étaient autant de sources potentielles d'infection.

La recherche d'une étanchéité dans l'évaluation d'un nouveau traitement de surface est fondamentale. Il existe deux types de mesure standardisées: l'étanchéité sur une portion de prothèse et l'étanchéité totale [198, 200-202].

Nous avons évalué l'étanchéité sur un segment de prothèse. Le principe consiste à isoler 1 cm² de prothèse et à mesurer le volume d'eau passant à travers cette surface sous une pression constante de 120mmHg pendant 1 minute (Figure 2.6a).

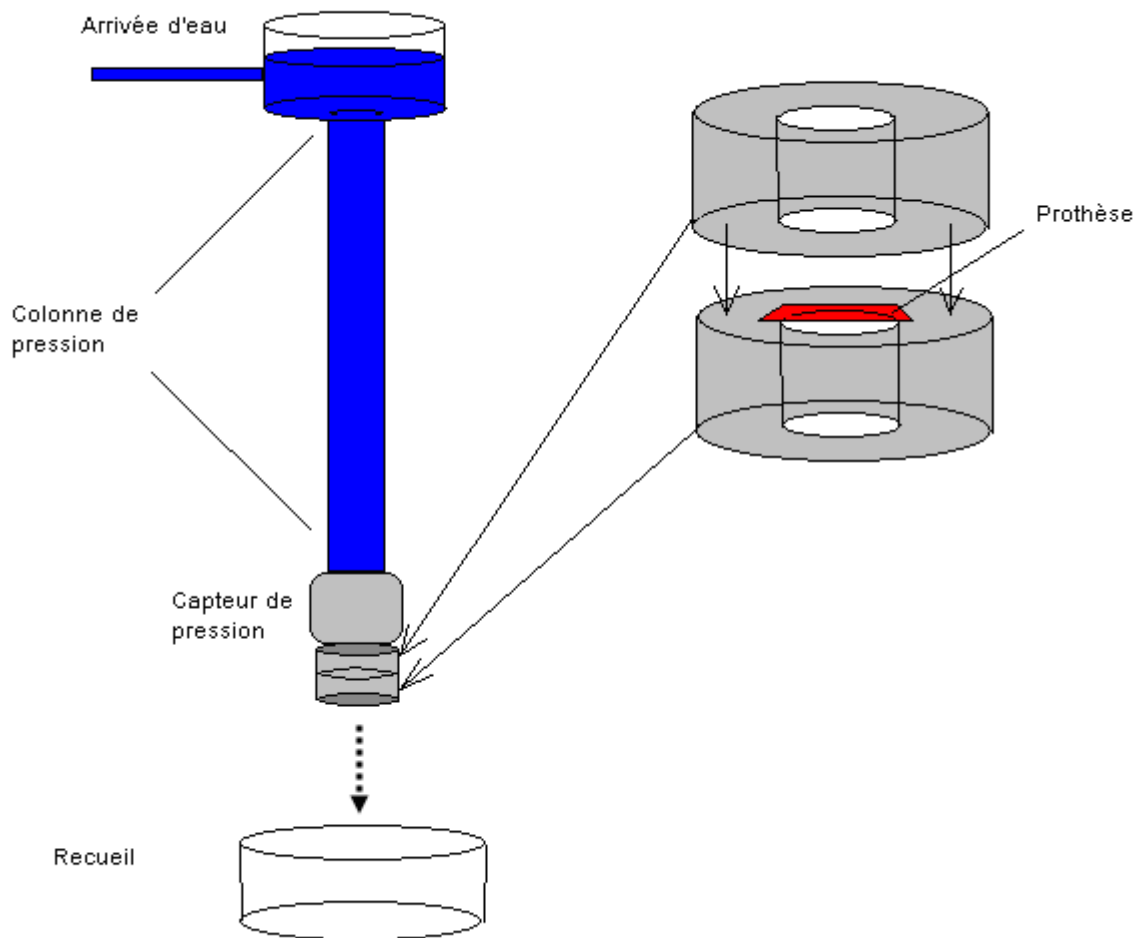


Figure 2.6a : Principe de la mesure de l'étanchéité d'un segment de prothèse. Un segment de prothèse est soumis à une colonne de pression d'eau de 120mmHg pendant une minute. Le volume d'eau ayant traversé la prothèse est recueilli et mesuré.

Nous avons pratiqué ce test sur des segments de prothèses traités par les systèmes (PSS/PAH), (PLL/PGA) et (PLL/HA). Pour chaque type de multicouches nous avons testé l'étanchéité avec 24, 48 et 72 paires de couches. Le but de cette expérience était de déterminer 1) lequel des trois types de multicouches était le plus efficace en terme d'étanchéité, 2) l'effet du nombre de paires de couches appliqués sur l'étanchéité des segments prothétiques.

2.7. La culture cellulaire.

La cellule primaire endothéliale issue de veine ombilicale humaine (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) est un des modèles cellulaires les plus utilisés pour étudier *in vitro* les mécanismes impliqués dans la régulation de l'angiogenèse [203-205].

2.7.1. Le principe de la culture cellulaire.

Les cellules HUVEC ont été mises en culture à 37°C, sous atmosphère humide avec 5% de CO₂, dans un milieu de culture « Endothelial Cell Basal Medium (ECBM) » complété avec 2% de sérum de veau foetal (FCS-10, Fetal Calf Factor), 0,4% de « Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin » (ECGS/H), 0,1 ng/ml d'EGF (Epidermal Growth Factor), 1 µg/ml d'hydrocortisone et 1 ng/ml de bFGF. Les cellules, le milieu de culture et les compléments ont été fournis par PromoCell, (Heidelberg, Allemagne).

A confluence, les cellules étaient lavées 1 fois avec 10 mL de PBS préchauffé à 37°C. Les cellules étaient alors rincées avec 5 mL de Triplex (solution à base de trypsine, Invitrogen) puis détachées en laissant agir 1 mL de Triplex pendant 2 minutes à 37°C. La digestion était ensuite arrêtée avec 10 mL de milieu complet (ECBM complété). La suspension cellulaire était recueillie dans des tubes coniques de 15 mL, puis centrifugée à 1000 rpm pendant 3 minutes. Après avoir été lavées, les cellules étaient remises en suspension dans 15 mL de milieu pour des flasques de 75 cm². Conformément aux instructions du fournisseur pour garantir le phénotype des HUVEC, les cellules étaient cultivées jusqu'au sixième passage. Les cellules ont été cultivées sur des segments de prothèse vasculaire en PET, ces supports étaient soit non traités soit recouverts de multicouches de polyélectrolytes.

2.7.2. Tests d'adhésion et de viabilité cellulaire.

La mesure de la viabilité par la méthode de la phosphatase acide permet de quantifier le nombre de cellules vivantes avec une grande sensibilité. Cette méthode consiste à détecter et quantifier par mesure colorimétrique la phosphatase acide dont l'activité augmente proportionnellement au nombre de cellules viables.

Après rinçage au PBS (300µL/puits), les cellules cultivées sur plaque 24 puits ont été incubées en présence d'un « tampon PNPP » (600µL/puits) (dissolution d'une pastille 10 mM de *p*-nitrophényl phosphate dans une solution d'acétate de sodium 0,1M, pH 5.5 et 0,1% triton X-100) pendant 3h à 37°C, dans une atmosphère humide, avec 5% de CO₂. La réaction a été arrêtée par addition de 10 µL de solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 1 N. Une lecture en plaque de 96 puits (100 µl/puits, 6 mesures par puits) a alors été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre, mesurant la densité optique à une longueur d'onde de 405 nm.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS DISCUSSIONS.

3.1. Article 1.

3.1.1. Introduction.

La pathologie vasculaire, de type athéromateuse occlusive ou anévrysmale, en l'absence de greffon veineux adéquat, nécessite l'utilisation de substituts prothétiques pour assurer la vascularisation des territoires atteints. Les substituts prothétiques de type PET sont les substituts les plus utilisés en pratique courante. Leur nature textile présente l'inconvénient d'une macroporosité incompatible avec une utilisation tel quel, sans l'apport d'un traitement adjuvant. Pour obtenir une étanchéité adéquate, les chirurgiens ont procédé tout d'abord à une précoagulation de la prothèse avec le sang du patient. Cette méthode présentait de multiples contraintes : elle allongeait le temps opératoire et n'était pas sans risque de contamination d'agents infectieux peropératoires. L'imprégnation par des matrices, dans un second temps à partir de protéines animales, a présenté un grand progrès en terme d'ergonomie d'utilisation. Mais quelque soit le type d'imprégnation, aucune matrice n'a démontré une supériorité, que ce soit en terme de perméabilité ou de lutte contre l'infection, par rapport aux anciennes prothèses précoagulées.

Le principe de construction de films multicouches s'est développé depuis quelques années. Cette méthode de traitement des surfaces présente de nombreux avantages : elle est simple d'utilisation, elle s'applique à toutes les géométries du support et présente une grande versatilité. L'intérêt majeur des films multicouches de polyélectrolytes est de permettre la fonctionnalisation de supports par insertion de facteurs biologiques (protéines, peptides, ADN, médicaments...) dans l'architecture au cours de la construction.

Les applications *in vivo* des films multicouches de polyélectrolytes dans le domaine des biomatériaux sont encore assez rares mais offrent des perspectives très prometteuses. Notamment, le

recouvrement d'artères par un film multicouche de polyélectrolytes fonctionnalisés par des molécules bioactives a été décrit comme moyen de prévention de lésions artérielles et de contrôle de processus de cicatrisation [206]. L'utilisation des films multicouches comme traitement de surface d'une prothèse en PET offre ainsi d'intéressantes perspectives : amélioration de l'étanchéité des prothèses à l'aide de molécules synthétiques (sans risque de transmission infectieuse), promotion de l'endothélialisation des prothèses *in vivo*.

Avant d'entreprendre une fonctionnalisation des prothèses vasculaires en PET, en vue d'une application clinique, il nous a paru essentiel de tester la résistance mécanique des films multicouches de polyélectrolytes appliqués à ces substituts. Les chercheurs s'intéressent de plus en plus à la réponse du traitement de surface à un stress mécanique, en particulier à un étirement longitudinal. Il y a très peu de donnée dans la littérature concernant ce type de contrainte mécanique sur un support plan et a fortiori sur un substrat tridimensionnel. Le groupe de M \ddot{o} hwald a étudié de telles contraintes sur des microcapsules de multicouches de polyélectrolytes [207]. Dans ce cas, l'étirement est appliqué par augmentation de la pression osmotique dans les microcapsules. Sur film plan, Hemmerlé *et al.* ont conçu deux types de traitements de surface capables de répondre différemment à une contrainte mécanique. Ils ont montré que le recouvrement de surface change réversiblement d'un état hydrophobe à hydrophobique respectivement sous étirement et relaxation [208]. Mertz *et al.* ont élaboré des films multicouches de polyélectrolytes constitués de deux compartiments séparés par une barrière. Cette barrière peut s'ouvrir réversiblement, par l'application d'un étirement générant des nanopores [209]. Un échange de molécules entre les deux compartiments est alors possible via ces nanostructures.

Dans notre étude, un premier travail a consisté à caractériser le comportement mécanique des films multicouches de polyélectrolytes (PAH/PSS)₂₄, (PLL/PGA)₂₄ et (PLL/HA)₂₄ appliqués aux trois éléments constituant la prothèse vasculaire en PET (filament, fil, prothèse). Ces analyses ont été réalisées dans un environnement aqueux (affranchissement des artefacts pouvant se produire lors du séchage des échantillons). Pour cela, les échantillons sont montés sur une platine motorisée, elle-même positionnée dans la chambre d'un microscope électronique à balayage environnemental (ESEM). La platine est pilotée

par un ordinateur permettant d'exercer sur les échantillons une traction longitudinale. Il est alors possible d'imager directement les changements structuraux subis par les films multicouches de polyélectrolytes dans des conditions hydratées. En parallèle, nous avons procédé à des tests de dynamométrie sur des filaments traités par les trois systèmes de multicouches de polyélectrolytes. Ce test avait pour objectif de déterminer si les traitements multicouches modifiaient le comportement élastique des filaments, comme c'est le cas pour d'autres traitements de surface actuellement appliqués.

Les résultats de ce travail sont détaillés dans l'article N°1 qui suit. Seules les conclusions les plus significatives seront exposées dans la partie discussion de cet article.

3.1.2. Article 1.

Characterization of polyelectrolyte multilayer films on polyethylene terephthalate vascular prostheses under mechanical stretching

Simon RINCKENBACH^{1,2,3}, Joseph HEMMERLÉ^{1,4}, Florence DIEVAL⁵, Youri ARNTZ^{1,4}, Jean-Georges KRETZ^{3,5,7}, Bernard DURAND⁵, Nabil CHAKFE^{3,5,7}, Pierre SCHAAF⁶, Jean-Claude VOEGEL^{1,4}, Dominique VAUTIER^{1,3,4*}.

¹INSERM, U 595, Strasbourg, F-67085 France ;

²Service de Chirurgie Vasculaire, CHU Besançon, Besançon, F-25030 France ;

³ « Equipe de Recherche Technologique » ERT 10-61, Strasbourg, F-67085 France ;

⁴Université Louis Pasteur, Faculté de Chirurgie Dentaire, Strasbourg, F-67085 France ;

⁵Laboratoire de Physique et Mécanique Textile/EGBM, GEPROVAS, Mulhouse, F-68093 France ;

⁶Institut Charles Sadron, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, F-67083 France ;

⁷Service de Chirurgie Vasculaire, Les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, F-67091 France.

*Corresponding author: Dominique Vautier

INSERM, UMR S 595, Université Louis Pasteur, Faculté de Chirurgie Dentaire, 11 rue Humann, F-67085 Strasbourg Cedex, France.

Tel.: + 33-3-90-24-30-61; Fax.: +33-3-90-24-33-79

E-mail address: Dominique.Vautier@medecine.u-strasbg.fr

Paru dans Journal of Biomedical Material Research. Part A. 2007 July 6 (Epub)

Abstract

Layer-by-layer (LBL) polyelectrolyte films offer extensive potentials to enhance surface properties of vascular biomaterials. From the time of implantation, PET prostheses are continuously subjected to multiple mechanical stresses such as important distortions and blood pressure. In this study, three LBL films, namely 1) poly(sodium 4-styrenesulfonate) / poly (allylamine hydrochloride), 2) poly(L-lysine) / hyaluronan and 3) poly (L-lysine) / poly (L-glutamic acid) were built on to isolated PET filaments, thread and vascular prostheses. The three LBL films uniformly covered the surface of the PET samples with rough, totally smooth and “wrinkled” appearances respectively for (PAH/PSS)₂₄, (PLL/HA)₂₄ and (PLL/PGA)₂₄ systems. We then assessed the behaviour of these LBL films, in an aqueous environment (by environmental scanning electronic microscopy, ESEM), when subjected to unidirectional longitudinal stretches. We found that stretching induces ruptures in the multilayer films on isolated filaments for longitudinal stretches of 14% for (PSS/PAH)₂₄, 13% for (PLL/PGA)₂₄ and 30% for (PLL/HA)₂₄ films. On threads, the rupture limit is enhanced to be respectively 26%, 20% and 28%. Most interestingly, we found that on vascular prosthesis no rupture is visible in any of the three multilayers types, even for elongations of 200% (200% undergone by the PET prostheses is representative of those encountered during graft deployment) which by far exceeds elongations observed under physiological conditions (10-20%, blood pressure). In term of mechanical behaviours, these preliminary data constitute a first step toward the possible use of LBL film to coat and functionalize vascular prosthesis.

Keywords: PET vascular prostheses, polyelectrolyte multilayers, mechanical behaviours

Characterization of polyelectrolyte multilayer films on polyethylene terephthalate vascular prostheses under mechanical stretching

Simon RINCKENBACH, Joseph HEMMERLÉ, Florence DIEVAL, Youri ARNTZ, Jean-Georges KRETZ, Bernard DURAND, Nabil CHAKFE, Pierre SCHAAF, Jean-Claude VOEGEL, Dominique VAUTIER

Journal of biomedical materials research. Part A, 2007, Vol. 84A, N° 3, Pages 576-588

Pages 84-116 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.31333>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

3.1.3. Discussion.

L'originalité de ce travail a résidé dans l'application du principe de construction des films multicouches sur un PET non traité, de forme filamentaire, de caractériser cette construction selon le type de film déposé et d'analyser les différents comportements sous une contrainte en traction longitudinale.

En effet les autres travaux appliquant des films multicouches sur du PET l'ont fait jusqu'à maintenant sur des surfaces planes [28, 185, 186]. Nous avons constaté que les trois types de multicouches construits présentaient les mêmes caractéristiques à l'observation (en AFM, en ESEM et en microscopie confocale) lorsqu'ils étaient construits sur une structure de type filament et sur une structure plane : le (PSS/PAH)₂₄ est fin et présente une surface légèrement rugueuse, le (PLL/HA)₂₄ est plus épais avec un aspect très lisse et engainant et le (PLL/PGA)₂₄ présente un aspect tout à fait typique de « rides » à sa surface [187]. Le principe de construction des multicouches semble donc identique sur ces deux types de support. Il est à noter que les mécanismes aboutissant à l'aspect ridé du système (PLL/PGA)₂₄ ne sont pas encore élucidés et font probablement intervenir des phénomènes de redistribution des polyélectrolytes après trempage, avec rétraction du film par séchage.

Les traitements de surface appliqués actuellement sur le PET pour la production de prothèses vasculaires sont connus pour provoquer des modifications du comportement mécanique de celui-ci [27, 42]. L'intérêt de l'analyse dynamométrique était de démontrer que les trois types de films n'ont pas cette action sur le PET, probablement en raison du mode relativement simple d'application (par trempage), et du type d'interactions en jeu (hydrophobes et forces de Van der Waals).

Les contraintes de flexion extension auxquelles les prothèses sont soumises pendant et après leur implantation dans l'organisme impliquaient la nécessité d'une bonne tenue des films sur le PET. Chen *et al.* ont évalué cette tenue sur un PET hydrolysé par l'application sur le film d'un papier adhésif, ils avaient conclu à une bonne tenue [28]. Le modèle de traction longitudinale que nous proposons permet une analyse objective et reproductible du comportement du film sous traction. L'apparition de craquelures

après un seuil d'élongation démontre de manière indirecte l'adhérence du film sur le filament : la traction du filament sur lequel se trouve un film non adhérent ne provoque pas de craquelure puisque le film va glisser sur filament, jusqu'à la rupture de celui-ci. La variation des seuils d'apparition de ces craquelures selon le type de films démontre une élasticité spécifique de chaque film. Le protocole d'analyse permet donc d'évaluer cette élasticité et ainsi d'apporter des données objectives pour le choix d'un film donné en vue d'applications ultérieures.

L'absence de craquelures après élongation à 200 % de la prothèse s'explique par la structure tricotée de celle-ci. L'élongation n'a pas aboutie à une traction efficace des fils composant cette prothèse en raison de leur longueur supérieure à la longueur totale de la prothèse. La tenue exacte des films sur la prothèse est donc mal évaluée par cette méthode. De plus, elle ne reproduit pas l'ensemble des contraintes subies par une prothèse et notamment les forces de cisaillement imposées par le flux sanguin en permanence.

Ces résultats ont donc représenté une première étape dans la perspective de proposer un film multicouche, comme nouveau traitement de surface d'une prothèse en PET.

La suite de notre travail comportait plusieurs aspects. Dans un premier temps, il nous fallait approfondir l'aspect mécanique avec simulation des forces de cisaillement par l'utilisation d'un banc d'essai spécifique (décrit dans le chapitre 2.5.2.).

Nous devons également évaluer les possibilités d'étanchéifications que procuraient les films multicouches sur une prothèse, à l'aide d'un test standardisé utilisé dans l'industrie (chapitre 2.6.).

L'aspect biologique était un aspect totalement différent, jusque là non évoqué, mais représentant un enjeu majeur. Il nous fallait évaluer la biocompatibilité des prothèses, par mise en culture de cellules HUVEC sur des prothèses traitées (chapitre 2.7.).

L'ensemble de ces éléments va être présenté dans la suite de ce mémoire.

3.2. Article 2.

3.2.1. Introduction.

Les résultats préliminaires des réponses des films multicouches de polyélectrolytes à une élongation longitudinale ont été complétés par un test plus proche des conditions « cliniques opératoires ». Il s'agissait ici de simuler les forces de cisaillement générées par le flux sanguin. A l'aide d'un banc d'essai mis au point dans le laboratoire GEPROVAS (Mulhouse), les prothèses sont mises en charge dans un régime circulaire pour subir de telles forces de cisaillement. Ainsi, il a été possible d'évaluer les capacités de résistance du traitement multicouches de polyélectrolytes à ces contraintes multidirectionnelles. Les trois mêmes systèmes (PSS/PAH)₂₄, (PLL/HA)₂₄ et (PLL/PGA)₂₄ ont été également choisis pour cette nouvelle expérimentation. Leurs capacités de rendre étanche les prothèses en PET ont également été évaluées par un test standardisé utilisé dans l'industrie.

Cette première partie s'était intéressée aux propriétés fonctionnelles des films multicouches, nous avons évalué dans un deuxième temps leurs propriétés de biocompatibilités vis-à-vis du sang. Pour cela nous avons mis en culture des cellules endothéliales (HUVEC) sur des prothèses traitées et évalué leur viabilité par analyse de leurs morphologies et de leurs activités enzymatiques.

Les résultats de ces expérimentations sont détaillés dans l'article N°2 (en préparation) qui suit. Dans la partie discussion de cet article, nous mentionnerons les résultats et les conclusions les plus marquantes de ces travaux.

3.2.2. *Article 2.*

Polyelectrolyte multilayers on polyethylene terephthalate vascular prostheses as shear stress resistant films.

Simon RINCKENBACH^{1,2,3}, Frédéric HEIM⁴, Bernard DURAND⁴, Nabil CHAKFE^{3,4,5}, Jean-Claude VOEGEL^{1,6}, Philippe LAVALLE^{1,6}, Dominique VAUTIER^{1,3,6*}

¹INSERM, U 595, Strasbourg, F-67085 France ;

²Service de Chirurgie Vasculaire, CHU Besançon, Besançon, F-25030 France ;

³« Equipe de Recherche Technologique » ERT 10-61, Strasbourg, F-67085 France ;

⁴Laboratoire de Physique et Mécanique Textile/EGBM, GEPROVAS, Mulhouse, F-68093 France ;

⁵Service de Chirurgie Vasculaire, Les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, F-67091 France

⁶Université Louis Pasteur, Faculté de Chirurgie Dentaire, Strasbourg, F-67085 France ;

**Corresponding author: Dominique Vautier*

INSERM, UMR S 595, Université Louis Pasteur, Faculté de Chirurgie Dentaire, 11 rue Humann, F-67085 Strasbourg Cedex, France.

Tel.: + 33-3-90-24-30-61; Fax.: +33-3-90-24-33-79

E-mail address: Dominiq.Vautier@medecine.u-strasbg.fr

Abstract.

Surface modification of vascular polyethylene terephthalate (PET) prosthesis constitutes an essential way to improve their durability according to local hemodynamic stress. The behaviors of three different polyelectrolyte multilayer films deposited on PET vascular grafts subjected to shear stress mimicking the blood pressure and the cardiac rhythm were investigated : (PAH/PSS)₂₄, (PLL/HA)₂₄ and (PLL/PGA)₂₄ films (PAH: poly(allylamine); PSS: poly(styrene sulfonate); PLL: poly(L-lysine); poly (L-glutamic acid); HA: hyaluronic acid). Interestingly, the three multilayers systems resisted to physiological shear stress applied during 30 min. Then, the LBL films were investigated *in vitro* to evaluate their potential to reduce the water sealing of the prosthesis. No significant decreases of sealing were observed for (PLL/HA)₂₄, (PLL/PGA)₂₄ and (PAH/PSS)₂₄. While no improvement was shown for (PLL/HA)_{48 or 72}, partial water-tightness was found for (PLL/PGA)₇₂ with a more pronounced effect with (PAH/PSS)₇₂ films. However, no-improvement of permeability was found both for (PAH/PSS)₉₆ and (PAH/PSS)₁₄₄ films. For these two films, the critical level of water-tightness obtained was correlated with rupture formations of the film at the thread interstice areas. Finally, *in vitro* endothelial cell culture on coated vascular samples revealed enhancement of cell proliferation on (PLL/PGA)₂₄ and (PAH/PSS)₂₄ compared to (PLL/HA)₂₄ films. Combination of shear stress resistant system with water-tightness and biocompatible systems could be a judicious option for vascular graft coating.

Keywords: PET vascular prostheses; polyelectrolyte multilayers, shear stress behaviors; porosity; endothelial cells.

INTRODUCTION.

Currently, polyethylene terephthalate (PET) prostheses are used successfully in replacing large-sized suprainguinal vessels. Prostheses have been made from a woven or knitted textile with high porosity facilitating both healing and encapsulation (Nunn *et al.* 1999). One main disadvantage of highly porous PET vascular grafts is their important lack of sealing to blood during implantation, which may result a major risk of haemorrhage. Originally, to make the textile structure impervious, prosthesis was pre-coagulated with the patient's blood at time of the implantation (Guidon *et al.* 1987). Most commonly, bioresorbable substances (for example bioresorbable matrix made of collagen or albumin, Amiji *et al.* 1992) was used to impregnate the prosthesis at time of the manufacturing process. Once the matrix of impregnation has been resorbed, the synthetic porous structure allowed ingrowth of periprosthetic tissue (Cohn *et al.* 1988). However the risk of thrombosis still remains mainly due to intimal hyperplasia (excessive tissue ingrowth) and immunoreaction towards the implanted materials (Thomas *et al.* 2003; Matsuda *et al.* 2004). Thus, ideal vascular prosthesis should satisfy several conditions: low permeability, low thrombogenicity, optimal healing, resistance to infection, adapted compliance. To afford such properties, functionalized prostheses are proposed.

During the last decades, considerable efforts were made to obtain active surfaces either by covalent incorporation (Marchand-Brynaert *et al.* 1999) or by chemical coating by active molecules (Crombez *et al.* 2005). The layer-by-layer (LBL) build-up of polyelectrolyte films from oppositely charged polyelectrolytes (Decher *et al.* 1997) represents potential strategies for the preparation of functionalized biomaterial coatings (Lvov *et al.* 2002; Hiller *et al.* 2002; Schultz *et al.* 2005) This approach has already been used to enhance the surface properties of vascular biomaterials. For example, it was shown that LBL can be used for the incorporation and release of drugs that prevent platelet adhesion and smooth-muscle cell proliferation (Serzawa *et al.* 2000; Thierry *et al.* 2003a; Thierry *et al.* 2003b; Nakayama *et al.* 2003). Polyelectrolyte multilayers were also used to provide enhanced re-endothelization modified surfaces (Boura *et al.* 2005; Kerdjoudj *et al.* 2006; Liu *et al.* 2007). Furthermore, it is possible to incorporate various molecules such as bioactive drugs (Hiller *et al.* 2002; Thierry *et al.* 2005; Wood *et al.* 2005), peptides and

proteins (i.e. adhesion and growth factors) or nucleic acids (Jessel *et al.* 2003; Vazquez *et al.* 2002; Jessel *et al.* 2006; Jewell *et al.* 2006).

In this study, the three following polyelectrolytes multilayers systems were chosen: i) (poly(allylamine hydrochloride) / poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PAH/PSS)_n films are known to grow linearly with the number of deposition steps (Lavalle *et al.* 2002) and to behave more or less as a glassy material as observed with the surface force apparatus (Kulcsar *et al.* 2005). ii) the (poly(L-lysine / hyaluronan polysaccharide) (PLL/HA)_n film (Lavalle *et al.* 2004) grow exponentially (Picart *et al.* 2001) *i.e.* their thickness increases exponentially with the number of deposition steps and they seem to behave as gels as first suggested by Cohen-Stuart *et al.* (Kovacevic *et al.* 2003). These exponentially growing films can reach rapidly thicknesses of the order of several micrometers when the number *n* of bilayers exceeds 15. The explanation of their build-up process is based on the diffusion “in” and “out” of the whole film during each bilayer depositions step of at least one of the polyelectrolytes constituting the film. In the case of PLL / HA it was found that during each deposition step HA interacts only with the upper layer of the film, whereas PLL diffuses in and out of the entire film structure (Picart *et al.* 2005). HA is a natural linear polysaccharide chain found in the extracellular matrix of mammalian connective tissues. The inhibitive action of HA toward hyperplasia suggests that HA had antiproliferative effects known to be associated with its anti-inflammatory properties (Heublein *et al.* 2002). iii) the (poly(L-lysine / poly(L-glutamic acid) (PLL/PGA) system which also shows an exponential growth mechanism (Lavalle *et al.* 2002). This system has been widely used, particularly for the incorporation of bioactive factors (Benkirane-Jessel *et al.* 2004, Schultz *et al.* 2005).

During and after implantation, a vascular prosthesis undergoes multiple mechanical strains such as blood shear stress. Consequently, multilayers polyelectrolytes films coatings should resist to this stress. Recently, researchers started to investigate responsive coatings to mechanical stresses in particular stretching. There are few reports in the literature relative to this type of stress on planar films (Genzer *et al.* 2000; Genzer *et al.* 2003). Such stresses were also investigated on polyelectrolyte multilayer microcapsules by the group of M \ddot{o} hwald (Gao *et al.* 2003). In this case the stretching was applied by increasing the osmotic pressure in

the microcapsules. In the case of planar films, Hemmerlé *et al.* described two types of coatings able to respond in two different ways to a mechanical stress: first they designed coatings that change reversibly from hydrophobic to hydrophilic under stretching and slacking off (respectively) (Hemmerlé *et al.* 2005). Mertz *et al.* also designed films made of two compartments separated by a barrier which opens reversibly by forming nanopores under stretching and thus acting as nanovalves (Mertz *et al.* 2007). The barrier prevents the diffusion of biomolecules between neighbouring compartments in the absence of stretching and becomes permeable once a critical stretching degree is applied. Both coatings were based on polyelectrolyte multilayers which were deposited on silicone sheets.

Toward the possible use of the polyelectrolyte multilayers to coat and functionalize PET vascular prostheses, there are to our knowledge, only one report in the literature relative to the mechanical behaviors of these coatings under stretching, certainly due to the encountered experimental difficulties to perform such studies on “difficult” textile surfaces. It concerns a preliminary work performed in our group by Rinckenbach (Rinckenbach *et al.* 2007). In this paper, we developed a model test of unidirectional, longitudinal stretch allowing us to follow the microstructural behaviour of the multilayer film coating PET samples in an aqueous environment (by environmental scanning electronic microscopy). PET grafts are constituted of knitted polymer threads. Each thread is, in its turn, composed of a large number of individual filaments. We found that whereas the structural response of the film to a mechanical stress is very similar for filaments and threads, it is completely different for the whole prosthesis (Rinckenbach *et al.* 2007).

Exposition of polyelectrolyte films coated PET vascular prostheses to flow induced shear stresses and to quantify the influence of stress on the coatings is an essential prerequisite for understanding and controlling the performance of this new generation of implants.

The aim of this work was to investigate responsive of polyelectrolyte multilayers on PET vascular prostheses submitted to shear stress mimicking the blood pressure and the cardiac rhythm. The LBL polyelectrolyte films were next investigated *in vitro* to evaluate their potential to reduce the porosity of the

prosthesis. Finally, endothelial cell culture was performed *in vitro* to assess their viability on these modified surfaces.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Segments of non treated woven PET prostheses, 22 mm diameter large, have been provided by Cardial Society (Saint-Etienne, France). Samples were similar to commercial prosthesis used in clinical applications.

Polyelectrolytes, solutions and polyelectrolyte multilayer architectures

Poly(L-lysine) (PLL, MW = 5.7×10^4 Da), fluorescein isothiocyanate labelled poly(L-lysine) (PLL^{FTIC}, MW = 5.0×10^4 Da), poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS, MW = 7.0×10^4 Da), Poly(L-glutamic acid) (PGA, MW = 7.2×10^4 Da), poly(allylamine hydrochloride) (PAH, MW = 7.0×10^4 Da) and fluorescein isothiocyanate labelled poly(allylamine hydrochloride) (PAH^{FTIC}, MW = 7.0×10^4 Da) were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France), and hyaluronic acid (HA, MW = 4.0×10^5 Da) from BioIberica (Barcelona, Spain). Polyelectrolyte solutions were prepared by dissolution of adequate amounts of polyelectrolyte powders in 0.15 M NaCl solution. All solutions were prepared using ultrapure water (MilliQ-plus system, Millipore) with a resistivity of 18.2 MΩ cm. The following three architectures were built with an automatized dipping robot (Riegler & Kirstein GmbH, Berlin, Germany). (1) (PAH/PSS)₂₄, (2) (PLL/HA)₂₄ and (3) (PLL/PGA)₂₄ and deposited on the different polyethylene terephthalate (PET) specimens. The number of LBL was chosen to be ascertain to cover fully the surfaces (Lavalle *et al.* 2002).

Environnemental scanning electronic microscopy (ESEM) and Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Samples were washed in distilled water and were viewed in the “environmental” mode by a Philips XL 30 ESEM (FEI company) equipped with a Lanthanum hexaboride (LaB_6) filament and a patented gaseous secondary electron detector (GSED). In ESEM conditions, images were realized with a chamber under a pressure of 4 Torr, under various temperatures (4°C to 25°C) allowing to maintain a relative humidity ranging from 25% to 70%. In these conditions no structural LBL films modifications were observed, whatever the architecture (data not shown). CLSM observations were carried out on a Zeiss LSM 510 microscope. FITC fluorescence was detected after excitation at 488 nm, cutoff dichroic mirror of 488 nm, and emission band pass filter of 505-530 nm (green). Observations were realized with a 20x/0.50 objective lens. All the observations were performed on two independently prepared samples.

Pulsative flow essay

The pulsative flow essay was carried out on a hydraulic circuit which has been conceptualized for simulate the cardiac outflow and the vascular system. This circuit is localised on the GEPROVAS unit (Groupe Européen de recherche sur les PROthèses appliqués à la chirurgie VASculaire, Mulhouse, France). The circuit is based on a Windkessel modelization: the vascular elasticity is simulated by a compliance room, and the cardiac activity is simulated by a hydraulic pump and an anti backflow valve simulates the valvular system (figure 1). The model was designed to approach physiological parameters in terms of outflow (70 beat/min rhythm) and pressure (130 mm Hg pressure).

Water sealing

The measurement of water sealing was performed according to the technique described by Guidoin et al (Guidoin *et al.* 1988). Briefly, water sealing was measured as the amount of water leaked per unit area (1 cm^2) and time (1 minute) under a physiologic pressure of 120 mm Hg. The water sealing of the untreated

prosthesis and (PAH/PSS)_n, (PLL/PGA)_n and (PLL/HA)_n films coated prostheses were compared for different build-ups for n values equal to 24, 48 and 72 (n represent the number of LBL tested, 24, 48 and 72).

Cell culture

HUVEC (PromoCell) were grown in endothelial cell basal medium (ECBM) complemented with endothelial cell growth supplement/heparin (0.4%), fetal calf serum (FCS, 2%), epidermal growth factor (0.1 ng.mL⁻¹), basic fibroblast growth factor (1 ng.mL⁻¹) and hydrocortison (1 µg.mL⁻¹) (all from PromoCell), at 37°C in a 5% CO₂-humidified atmosphere. Cells were used between passages 3 and 4.

Cell viability experiments

For the effects of polyelectrolyte multilayer films on HUVEC viability, cells were seeded on samples coated by polyelectrolyte multilayer films or on bare samples (1 cm² PET vascular segment) placed in 24-well plates at a density of 6 x 10⁵ cells/well and cultured in complete medium for 24h. Measurement of cell viability was performed using the colorimetric *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) assay based on the titration of the acid phosphatase activity. Briefly, after cell culture, samples were washed with 1 mL PBS and then incubated with *p*NPP (Sigma, Steinheim, Germany) dissolved at 1mg.mL⁻¹ in a buffer containing 0.1 M sodium acetate (pH 5.5) and 0.1% X-100 Triton. The samples were placed for 3 h at 37 C in a 5% CO₂-humidified atmosphere. The reaction was stopped by the addition of 1N sodium hydroxide and the absorbance, directly correlated to the number of viable cells, was determined at 405 nm using a spectrophotometer (iEMS & Multiskan Ex, Thermo electron corporation, Finland). For SEM observation, cells attached to the substrates (6.10⁵ cells / cm² PET vascular segment) were washed in PBS (37°C, 2 washes of 2 min each) and fixed for 20 min in 2.5% glutaraldehyde (TAAB, Berkes) in PBS at room temperature. Samples were rinsed in PBS (3 washes of 10 min each) and dehydrated in solutions with increasing ethanol content (70, 95%, 10 min each and 100%, 3 times of 5 min each). Samples were then dehydrated in hexamethyldidilazane (2 times of 30 sec each) and finally air dried. Specimens were

mounted on sample holders with silver print, sputter-coated with a gold-palladium alloy in an Hummer JR (SIEMENS, Karlsruhe, Germany) unit and observed with the Philips XL 30 (FEI companyTM, Or, USA) scanning electron microscope used in the “high vacuum” mode using the Thornly-Everhart Secondary detector.

RESULTS AND DISCUSSION

Shear stress essay

Immediately after implantation, PET prostheses are continuously subjected to multiple mechanical stresses such as important distortions and blood pressure variation. To follow the mechanical behaviors of LBL film-coated prostheses close to the physiological conditions, we submitted the samples (5 to 30 minutes) to a pulsatile flow stimulating the blood pressure (130 mmHg pressure) and the cardiac rhythm (70 beat/min. rhythm) (Figure 1). The film was then observed either by environmental scanning electronic microscopy or confocal laser scanning microscopy. $(PLL^{FITC}/HA)_{24}$, $(PLL^{FITC}/PGA)_{24}$, $(PAH^{FITC}/PSS)_{24}$ films were deposited on the “naked” prostheses and lead to coatings having respectively smooth, “wrinkled”, or rough appearances to the surface of the filaments constituting the PET vascular substitutes (Fig. 2a and 2c for $(PLL^{FITC}/HA)_{24}$, Fig. 3a and 3c for $(PLL^{FITC}/PGA)_{24}$ and Fig. 4a and 4c for $(PAH^{FITC}/PSS)_{24}$). Very interestingly, prosthesis film coatings remained perfectly homogeneous without any indication of rupture formation for all three coatings after applying 5 minutes stress (data not shown). The same observations were found for shear stresses applied for 30 minutes (Fig. 2b and 2d for $(PLL^{FITC}/HA)_{24}$, Fig. 3b and 3d for $(PLL^{FITC}/PGA)_{24}$ and Fig. 4b and 4d for $(PAH/PSS)_{24}$) demonstrating that these three coatings resist to such mechanical stresses. Previous studies analyzed the microstructural behaviour of these same multilayer film coating PET grafts submitted to unidirectional longitudinal stretch, performed in aqueous environment (Rinckenbach et al. 2007). While stretching induces ruptures in the multilayer films on isolated filaments for longitudinal stretches of 14% for $(PSS/PAH)_{24}$, 13% for $(PLL/PGA)_{24}$ and 30% for $(PLL/HA)_{24}$ films (on threads, the rupture limit is enhanced to be respectively 26%, 20% and 28%), on the whole prosthesis satisfactory mechanical behaviors were found even for

elongation of 200% (200% elongations is representative of those encountered during graft deployment). In accordance with this preliminary longitudinal stretch essay (Rinckenbach *et al.* 2007), multidirectional shear stress experiments confirmed the satisfactory mechanical behaviors of all the three coating systems on whole vascular PET prostheses. The present test represents an essential multidirectional mechanical stress mimicking physiological shear stress exerted by the blood. The early resistance of the three multilayer polyelectrolyte system coating PET grafts constitute very encouraging results that should be completed by later time pulsative flow (for example, time requested to obtain adhesion of endothelial cells on the internal surface of vascular prosthesis).

Water sealing

Another important point, dealing with the properties of vascular prosthesis, concerns their sealing which means a major requirement in the early stages of implantation. The water sealing was carried out measuring the amount of water leaked per 1 cm² vascular prosthesis area during 1 minute under physiologic pressure of 120 mm Hg. Whereas 1100mL water goes through naked prostheses (Fig. 5, no multilayer), no permeability was observed for commercially available collagen-impregnated grafts (data not shown). No significant decreases of permeability were observed for (PLL/HA)₂₄, (PLL/PGA)₂₄ and (PAH/PSS)₂₄ film coated prostheses segments (Fig. 5 : respectively 1000mL, 800mL and 750mL). In order to reduce the porosity of the coated prostheses, the number of polyelectrolyte layers was increased. Thicker films led to a increase of the sealing with a decrease of the water losses: for (PLL/HA)₄₈, (PLL/PGA)₄₈ and (PAH/PSS)₄₈ film coated prostheses segments came respectively 900mL, 700mL and 650mL (Fig. 5). Interestingly, a more significant increase of sealing was found for the PET prostheses coated by a (PLL/PGA)₇₂ film (Fig. 5 : less 500mL). A more pronounced effect was found for (PAH/PSS)₇₂ film (Fig. 5 : 350mL) whereas no significant improvement was shown for (PLL/HA)₇₂ (Fig. 5 : 800mL). To investigate the origin of the important loss of water, we observed the LBL coatings after 1 minute of water flow by CLSM. For (PLL^{FITC}/HA)₄₈ (Fig. 6a) and (PLL^{FITC}/HA)₇₂ (Fig. 6c), films seem to fill up totally the filament interstices and fully cover and partially mask the prosthesis threads. Prosthesis

film coatings did not exhibit any rupture once coated by $(\text{PLL}^{\text{FITC}}/\text{HA})_{48}$ (Fig. 6b) or $(\text{PLL}^{\text{FITC}}/\text{HA})_{72}$ films (Fig. 6d) after applying 1 minute of water flow, demonstrating that the water loss through the prosthesis segment did not modify the film features. The important water loss during the flow experiment can certainly not only be explained by simple water diffusion through such “soft” architectures. The gel like nature of the coating (Collin *et al.* 2004) could lead pore formation which closes again once the applied pressure is strangely reduced. $(\text{PLL}^{\text{FITC}}/\text{PGA})_{48}$ film displayed comparable structure (Fig. 7a before and Fig. 7b after water flow) to $(\text{PLL}^{\text{FITC}}/\text{PGA})_{24}$ film (Fig. 3d). The $(\text{PLL}^{\text{FITC}}/\text{PGA})_{72}$ film fully cover the prosthesis threads and also totally fill up the filament interstices (Fig. 7c). After 1 minute of flow, rupture of the film occurred precisely in such areas (Fig. 7d: $(\text{PLL}^{\text{FITC}}/\text{PGA})_{72}$, arrowhead). These ruptures seem not to be too critical with $(\text{PLL}^{\text{FITC}}/\text{PGA})_{72}$ film and the sealing does not strongly decrease. The $(\text{PAH}^{\text{FITC}}/\text{PSS})_{48}$ and $(\text{PAH}^{\text{FITC}}/\text{PSS})_{72}$ films remained perfectly homogeneous after 1 minute flow (respectively Fig. 8b and 8d) ($(\text{PAH}^{\text{FITC}}/\text{PSS})_{48}$ (Fig. 8a) and $(\text{PAH}^{\text{FITC}}/\text{PSS})_{72}$ (Fig. 8c) before water flow). It has to be noticed that a $(\text{PAH}^{\text{FITC}}/\text{PSS})$ film, which was quite thinner because of its linear growth regime (Lavalle *et al.* 2002) appeared to be better water-tight compared to $(\text{PLL}/\text{HA})_{72}$. This is probably due to the fact that (PLL/HA) films, whose increasing exponentially with the number of deposition steps, behave more or less as gels (Collin *et al.* 2004) or even liquids. In order to determine if the film permeability could be further decreased, we have increased the number of PAH/PSS pairs of layers to 96 and 144 bilayers. No further decrease of permeability were observed both with $(\text{PAH}/\text{PSS})_{96}$ and $(\text{PAH}/\text{PSS})_{146}$ film compared to $(\text{PAH}/\text{PSS})_{72}$ (Fig. 5) indicating that (PAH/PSS) film reached a critical level to reduce sealing at 72 bilayers. Figure 9 revealed that in fact it was not possible to set up the PET prostheses coated by $(\text{PAH}/\text{PSS})_{96}$ (Fig. 9a, c) and $(\text{PAH}/\text{PSS})_{144}$ (Fig. 9e, g) films within the flow water device without breaking them, particularly at the thread interstice areas. Same ruptures were observed at the thread interstitial regions after 1 minute water flow for $(\text{PAH}/\text{PSS})_{96}$ and $(\text{PAH}/\text{PSS})_{146}$ films (respectively Fig. 9b,d and f, h). This could be due to the local stresses submitted to the film when it is put in the pressure device and to the higher fragility of the films which are difficult to handle without breaking. $(\text{PAH}/\text{PSS})_n$ films are brittle and probably behave as glasses, specially in these interstitial areas

(not directly supported by the substrata). Such a behavior is in accordance with the glassy nature of (PAH/PSS)_n multilayers as determined by surface force apparatus (SFA) (Kulcsar *et al.* 2005).

It is crucial to make the prosthesis tight blood during the first weeks after implantation. This present test is not performed in the physiological conditions corresponding to blood, in particular with respect to the viscosity properties. However, it allows comparisons of permeability between untreated prosthesis and prosthesis treated with various surface coatings. The proposed polyelectrolyte systems revealed an interesting sealing property of the (PAH/PSS) film for prostheses coated by 72 pairs of layers. This system allowed significant decrease of the prosthesis permeability. Moreover, a critical level of water-tightness was observed for (PAH/PSS)₇₂, probably correlated with the mechanical instability observed for (PAH/PSS)₉₆ and (PAH/PSS)₁₄₄ films (presence of cracks in the interstitial tread areas). The use of other system of LBL could be a possible alternative to obtain a satisfactory water-tightness. For example, recently composite films made of (PLL/HA)_m-(PSS/PAH)_n-PSS films were built up, showing that both the elastic modulus and the viscosity increase with the number of PSS and PAH adsorption steps (Francius *et al.* 2007). The gradual modification of the mechanical properties of this composite substrate (between a gel-like and glass nature) could offer better mechanical behaviour and consequently could improve prostheses water-tightness. One other way to harden (PLL/HA)_m film may consist of cross-linking it using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and *N*-hydrosulfosuccinimide. This cross-linking reaction was accompanied by a change in the viscoelastic properties of the films leading to more rigid films (Richert *et al.* 2004).

Effect of LBL film-coated prosthesis on endothelial cell survival and morphology.

After the first hours of PET vascular prosthesis implantation, blood-tight is ensured by coagulation and prosthesis cell colonization. For LBL film-coated prostheses, the treatment should render the surface biocompatible and lead to good cell viability. We investigated the survival of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) seeded on LBL film-coated prostheses. As seen in Figure 10a, survival of cells cultured onto (PAH/PSS)₂₄ and (PLL/PGA)₂₄ films is almost the same as that observed with bare

vascular prostheses ($OD_{405} = 2.6$ for $(PAH/PSS)_{24}$ and $(PLL/PGA)_{24}$ versus 2.3 for the control). A decrease of cell viability was observed when cells are seeded onto $(PLL/HA)_{24}$ films (50% decrease, $DO_{405} = 1.4$). These results clearly demonstrate the resistance of PLL/HA films toward endothelial cell adhesion. In contrast $(PAH/PSS)_{24}$ and $(PLL/PGA)_{24}$ films allowed good cell adhesion. Boura *et al.* reported similar results with endothelial cells seeded onto LBL film modified glass substrates (Boura *et al.* 2005) but after the deposition of a quite lower number of layer pairs. We next observed by SEM the morphology of HUVEC seeded on uncoated and coated vascular prostheses. On uncoated, $(PAH/PSS)_{24}$ and $(PLL/PGA)_{24}$ coated prostheses, HUVEC displayed spreading morphology with visible pseudopods (respectively Fig. 10Ba, c, and d). In contrast, on $(PLL/HA)_{24}$ cells displayed spherical morphology (Fig. 10Bb). Based on these results, one can conclude that $(PAH/PSS)_{24}$ and $(PLL/PGA)_{24}$ films can create on PET vascular prostheses a good endothelial response. To mimic physiological conditions, further studies should be realized in shear stress conditions to evaluate the cell retention on these coatings.

CONCLUSIONS.

In this work we have assessed that $(PLL/HA)_{24}$, $(PLL/PGA)_{24}$ and $(PAH/PSS)_{24}$ multilayer films can resist on PET prosthesis to physiological-like shear stress during 30 minutes. In term of mechanical behaviours, those results are encouraging in the idea of a new surface treatment in clinical application. The effect on the water transwall sealing showed a partial water-tightness for $(PLL/PGA)_{72}$ with a more pronounced effect with $(PAH/PSS)_{72}$ films. No improvement was reached with adding more layers in the build up; this critical level of water-tightness obtained was correlated with ruptures formations at the thread interstice areas. In term of biocompatibility the $(PAH/PSS)_{24}$ and the $(PLL/PGA)_{24}$ system showed good properties to stimulate adhesion and proliferation of endothelial cells. These data define specific properties which distinguish each film. An association of shear stress resistant system with water-tightness and biocompatible systems could be a judicious option for vascular graft coating.

Acknowledgements

We wish to acknowledge Dr. Jean-Hervé Lignot, CNRS-CEPE (Strasbourg, France) for the stimulating discussions. We are grateful to Christophe Tezenas du Moncel for generously providing PET vascular prostheses, Cardial/Bard (Saint-Etienne, France). This work was supported by grants from the “Ligue contre le Cancer (Région Alsace)”. We are grateful to Jérôme Mutterer of the Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS/ULP (Strasbourg, France) and Jean-François Le MAGNEN for his technical support, GEPROVAS (Mulhouse, France).

The CLSM platform used in this study was co-financed by the Région Alsace, the Université Louis Pasteur, and the Association pour la Recherche sur le Cancer.

References

- Amiji M, Park H, Park K. Study on the prevention of surface induced platelet activation by albumin coating. *J Biomater Sci Polymer*. 1992; 83: 1774-1777.
- Benkirane-Jessel N, Lavalle P, Audouin F, Frisch B, Schaaf P, Ogier J, Decher G, Voegel JC. Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti-inflammatory agent. *Adv Mater*. 2004; 16: 1507-1511.
- Boura C, Muller S, Vautier D, Dumas D, Schaaf P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Endothelial cell-interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials*. 2005; 26: 4568-4575.
- Cohn D, Younes H, Appelbaum Y, Uretzky. "A selectively biodegradable vascular graft," in *Polymers in Medicine III: Progress in Biomedical Engineering*, Migliaresi C, Nicolais L, Guisti P, and Chiellini E. (eds.), Elsevier, Amsterdam, 1988, pp. 73-79.
- Collin D, Lavalle P, Garza JM, Voegel JC, Schaaf P, Martinoty P. Mechanical properties of cross-linked hyaluronic acid/poly-(L-lysine) multilayer films. *Macromolecules*. 2004, 37, 10195-10198.
- Crombez M, Chevallier P, Gaudreault RC, Petitelerc E, Mantovani D, Laroche G. Improving arterial prosthesis neo-endothelialization : application of a proactive VEGF construct onto PTFE surfaces. *Biomaterials*. 2005; 26: 7402-7409.
- Decher G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science*. 1997; 277: 1232-1237.

Francius G, Hemmerlé J, Ball V, Lavalle P, Picart C, Voegel J-C, Schaaf P, Senger B. Stiffening of soft polyelectrolyte architectures by multilayer capping evidence by viscoelastic analysis of AFM indentation measurements. *J. Phys. Chem.C* 2007, 111, 8299-8306.

Genzer J, Etimenco K. Creating long-lived super hydrophobic polymer surfaces through mechanically assembled monolayers. *Science*, 2000; 290: 2130-2133.

Genzer J, Fischer DA, Efimenko. Fabricating two-dimensional molecular gradients via asymmetric deformation of uniformly-coated elastomer sheets. *Adv Mater.* 2003, 15; 1545-1547.

Guidoin R, Downs A, Verhaeghe JL, Roy PE, Marceau D, Fieve G, Frisch R. Preoperative bleeding at polyester (Dacron®) arterial prosthesis implantation. *Int J Artif Organs.* 1987; 10: 393-398.

Guidoin R, King M, Marceau D, Cardou A. "Textile arterial prosthesis: is water permeability equivalent to porosity?" *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* 1988, 34, 95-100.

Hemmerlé J, Roucoules V, Fleith G, Nardin M, Ball V, Lavalle Ph, Marie P, Voegel JC, Schaaf P. Mechanically responsive films of variable hydrophobicity made of polyelectrolyte multilayers. *Langmuir.* 2005; 21: 10328-10331.

Heublein B, Evagorou EG, Rohde R, Ohse S, Meliss RR, Barlach S, Haverich A. Polymerized degradable hyaluronan-a platform for stent coating with inherent inhibitory effects on neointimal formation in a porcine coronary model. *Int J Artif Organs.* 2002; 25: 1166-1173.

Hiller J, Mendelsohn JD, Rubner MF. Reversibly erasable nanoporous anti-reflection coatings from polyelectrolyte multilayers. *Nat Mater.* 2002 ; 1: 59-63.

Jessel N, Atalar F, Lavallo P, Mutterer J, Decher G, Schaaf P, Voegel JC. Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *Adv Mater.* 2003; 15: 692-695.

Jessel N, Oulab-Abdelghani M, Meyer F, Lavallo P, Haïkel P, Schaaf P, Voegel JC. Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by β -cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103: 8618-8621.

Jewell CM, Zhang J, Fredin J, Wolff MR, Hacker TA, Lynn DM. Release of plasmid DNA from intravascular stents coated with ultrathin multilayered polyelectrolyte films. *Biomacromolecules.* 2006, (in press).

Kerdjoudj H, Boura C, Marchal L, Dumas D, Schaff P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Decellularized umbilical artery treated with thin polyelectrolyte multilayer films: potential use in vascular engineering. *Biomed Mater Eng.* 2006; 16: 123-129.

Kovacevic D, Van der Burgh S, de Keizer A, Cohen-Stuart MA. Specific ionic effects on weak polyelectrolyte multilayer formation. *J Phys. Chem. B.* 2003, 107; 7998-8002.

Kulcsar A, Voegel JC, Schaaf P, Kekicheff P. Glassy state of polystyrene sulfonate / polyallylamine polyelectrolyte multilayers revealed by the surface force apparatus. *Langmuir.* 2005, 21; 1166-1170.

Lavallo P, Gergely C, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, Voegel JC, Picart C. Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: an in situ atomic force microscopy study. *Macromolecules.* 2002; 35: 4458-4465.

Lavalle P, Picart C, Mutterer J, Gergely C, Reiss H, Voegel JC, Senger B, Schaaf P. Modeling the buildup of polyelectrolyte multilayer films having exponential growth. *J Phys Chem B*. 2004; 108: 635-648.

Liu Y, He H, Gao C. Layer-by-layer assembly of biomacromolecules on poly(ethylene terephthalate) films and fiber fabrics to promote endothelial cell growth. *J Biomed Mater Res* 81A: 692-704, 2007.

Lvov Y, Onda M, Ariga K, Kunitake T. Ultrathin films of charged polysaccharides assembled alternately with linear polyions. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998; 9: 345-355.

Marchand-Brynaert J, Detrait E, Noiset O, Boxus T, Schneider YJ, Remacle C. Biological evaluation of RGD peptidomimetics, designed for the covalent derivatization of cell culture substrata, as potential promoters of cellular adhesion. *Biomaterials*. 1999; 20: 1773-1782.

Matsuda T. Recent progress of vascular graft engineering in Japan. *Artif Organs*. 2004; 28: 64-71.

Mertz D, Hemmerle J, Mutterer J, Ollivier S, Voegel JC, Schaaf P, Lavalle P. Mechanically responding nanovalves based polyélectrolyte multilayers. *Nano Lett*. 2007, 7, 657-662.

Nakayama Y, Nishi S, Ueda-Ishibashi H, Matsuda T. Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents and acute-phase performances. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 64: 52-61.

Nunn DB. Structural failure of Dacron arterial grafts. *Semin Vasc Surg*. 1999; 12: 83-91.

Picart C, Lavalle P, Hubert P, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, Voegel P. Buildup mechanism for poly(L-lysine) / hyaluronic acid films onto a solid surface. *Langmuir*. 2001, 17; 7414-7424.

Picart C, Mutterer J, Arntz Y, Voegel JC, Schaaf P, Senger B. Application of fluorescence recovery after photobleaching to diffusion of a polyelectrolyte in a multilayer film. *Microsc Res Tech.* 2005, 66; 73-57.

Richert L, Boulmedais F, Lavalle P, Mutterer J, Ferreux E, Decher G, Schaaf P, Voegel J-C, Picart C. Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules.* 2004, 5, 284-294.

Rinckenbach S, Hemmerle J, Dieval F, Arntz Y, Kretz JG, Durand B, Chakfe N, Schaaf P, Voegel JC, Vautier D. Characterization of polyelectrolyte multilayer films on polyethylene terephthalate vascular prostheses under mechanical stretching. *J Biomed Mater Res A.* 2007 July 6; [Epub ahead of print].

Schultz P, Vautier D, Richert L, Jessel N, Haikel Y, Schaaf P, Voegel JC, Ogier J, Debry C. Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, alpha-MSH, for coating a tracheal prosthesis. *Biomaterials.* 2005; 26: 2621-2630.

Serizawa T, Yamaguchi M, Matsuyama T, Akashi M. Alternating bioactivity of polymeric layer-by-layer assemblies: anti-vs procoagulation of human blood on chitosan and dextran layers. *Biomacromolecules* 2000; 1: 306-309.

Thierry B, Winnik FM, Merhi Y, Tabrizian M. Nanocoatings onto arteries via layer-by-layer deposition: toward the in vivo repair of damaged blood vessels. *J Am Chem Soc.* 2003a; 125: 7494-7495.

Thierry B, Winnik FM, Merhi Y, Silver J, Tabrizian M. Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules.* 2003b; 4:1564-1571.

Thierry B, Kujawa P, Tkaczyk C, Winnik FM, Bilodeau L, Tabrizian M. Delivery platform for hydrophobic drugs: prodrug approach combined with self-assembled multilayers. *J Am Chem Soc.* 2005; 127: 1626-1627.

Thomas AC, Campbell GR, Campbell JH. Advances in vascular tissue engineering. *Cardiovasc Pathol.* 2003; 12: 217-276.

Vazquez E, Dewitt DM, Hammond PT, Lynn DM. Construction of hydrolytically-degradable thin films via layer-by-layer deposition of degradable polyelectrolytes. *J Am Chem Soc.* 2002; 124: 13992-13993.

Wood KC, Boedicker JQ, Lynn DM, Hammond PT. Tunable drug release from hydrolytically degradable layer-by-layer thin films. *Langmuir.* 2005; 15: 1603-1609.

Figure 1

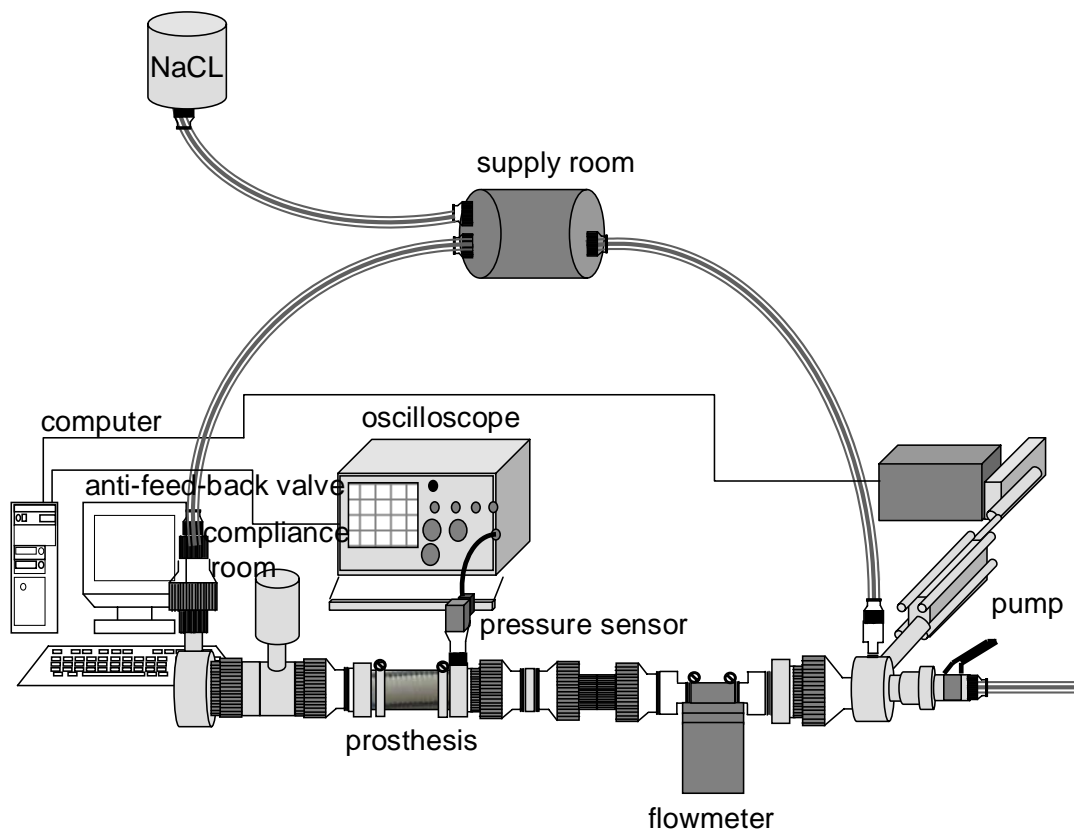


Figure 2

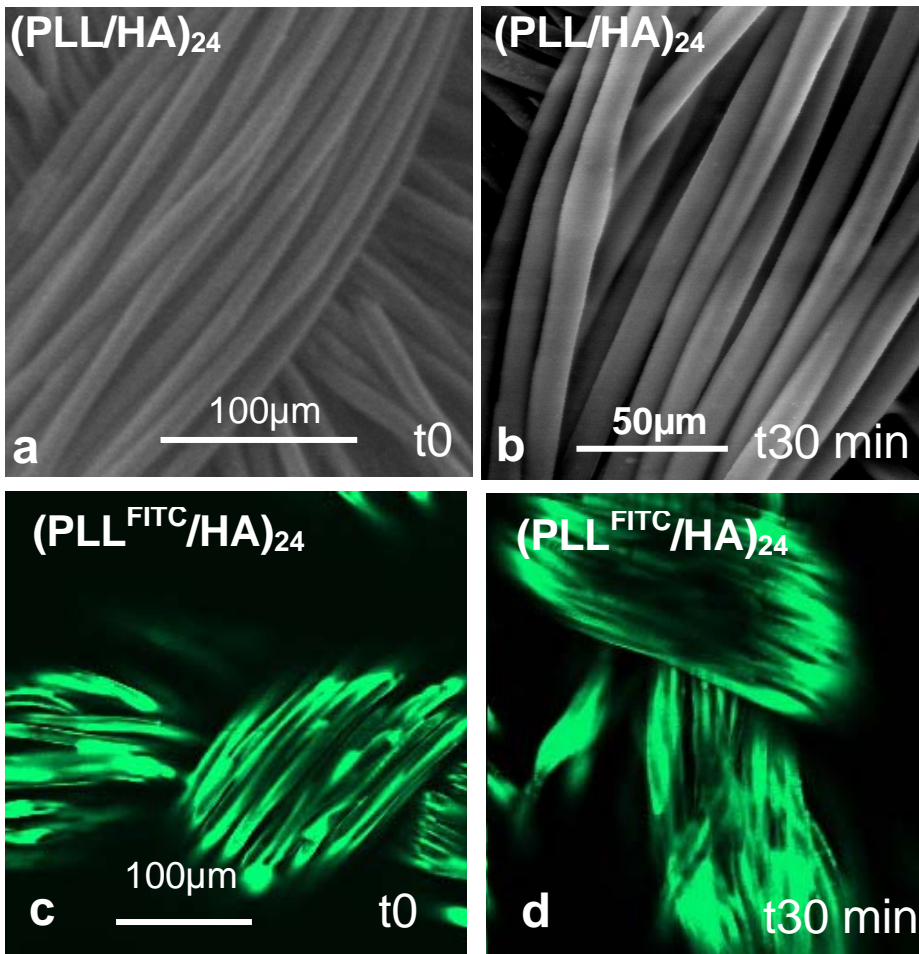


Figure 3

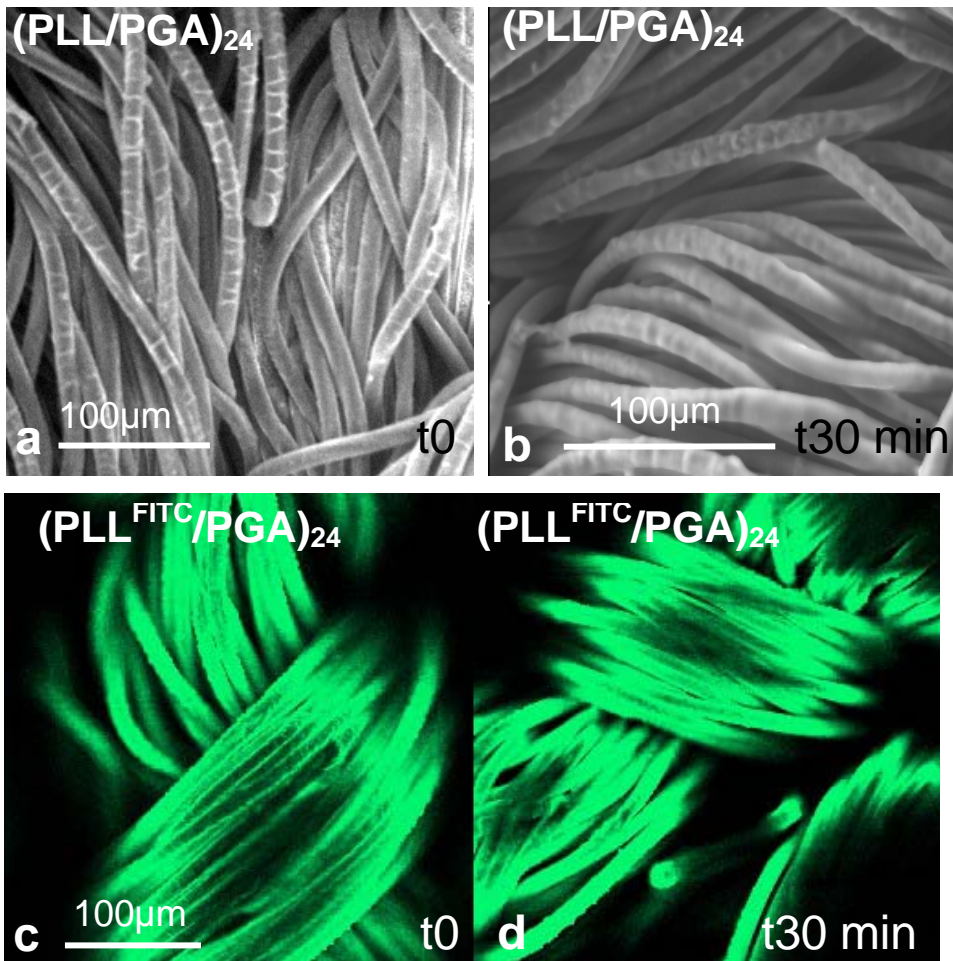


Figure 4

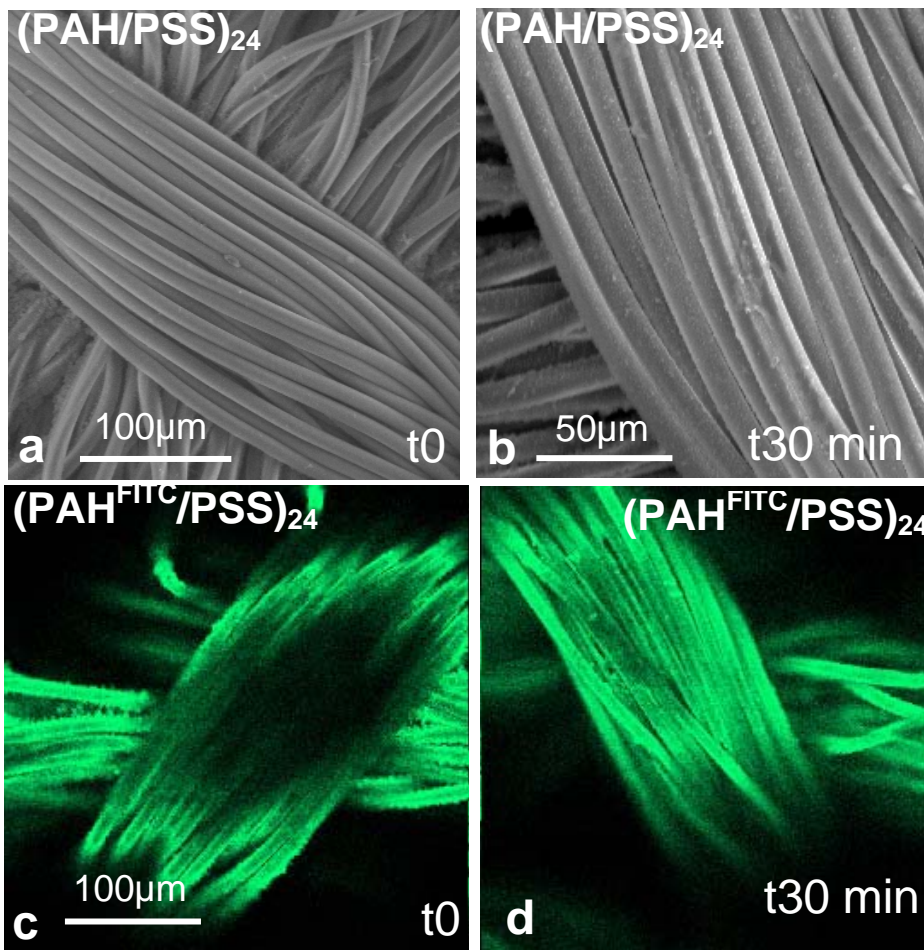


Figure 5

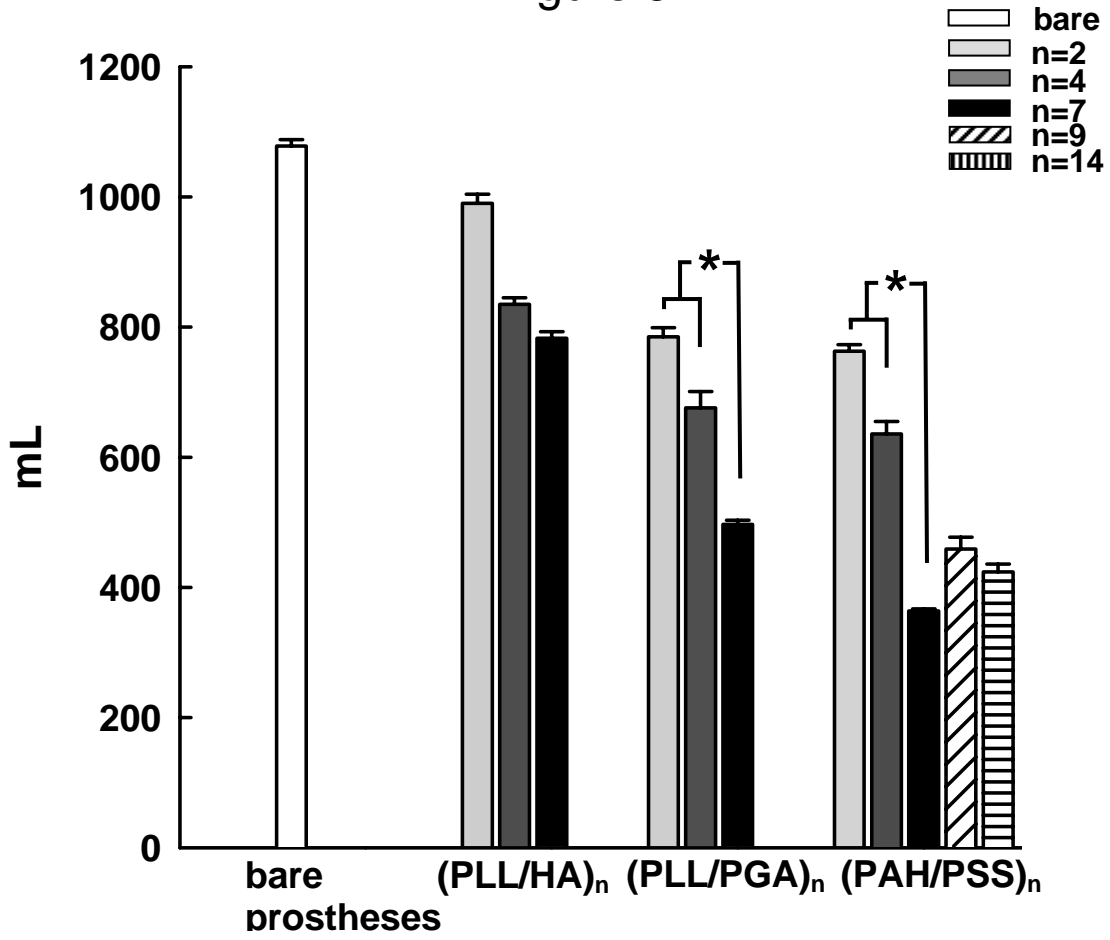


Figure 6

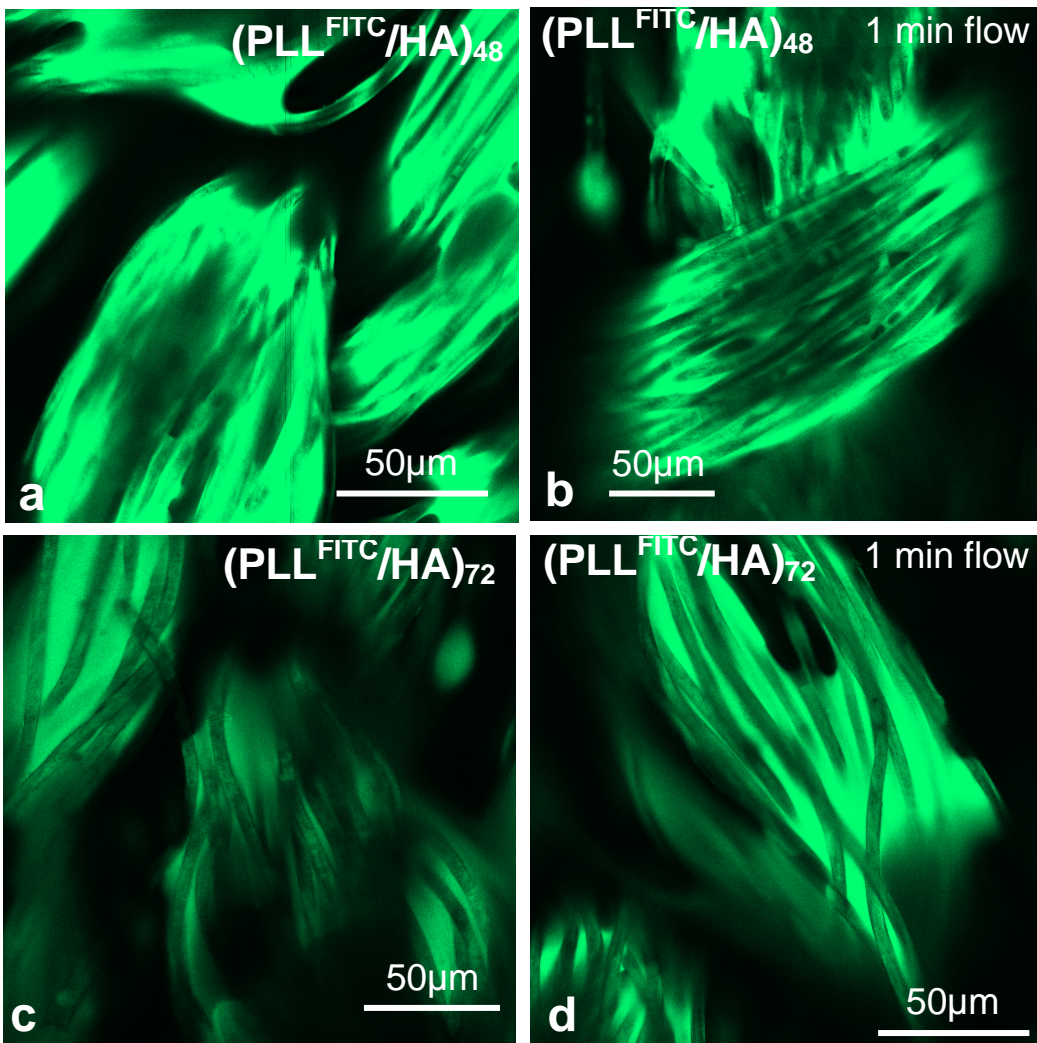


Figure 7

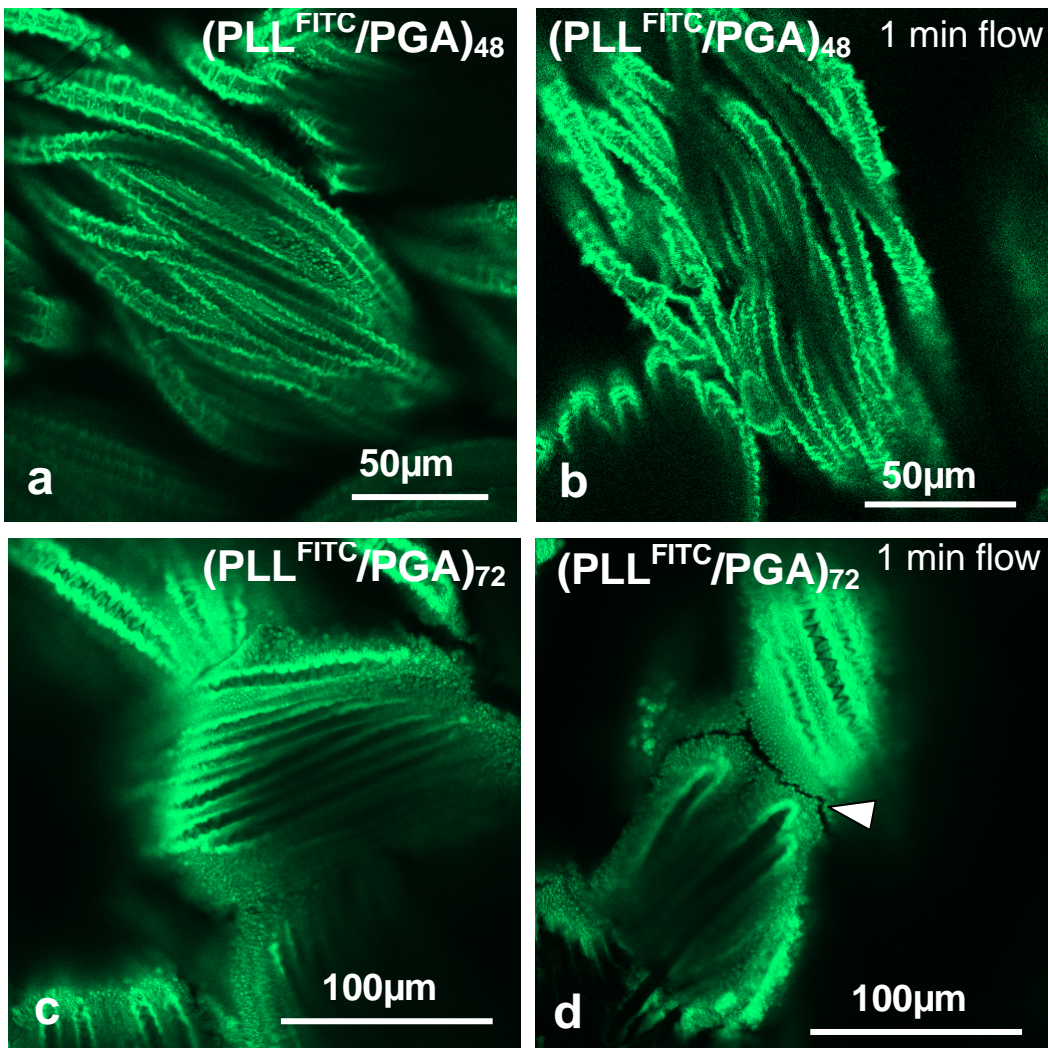


Figure 8

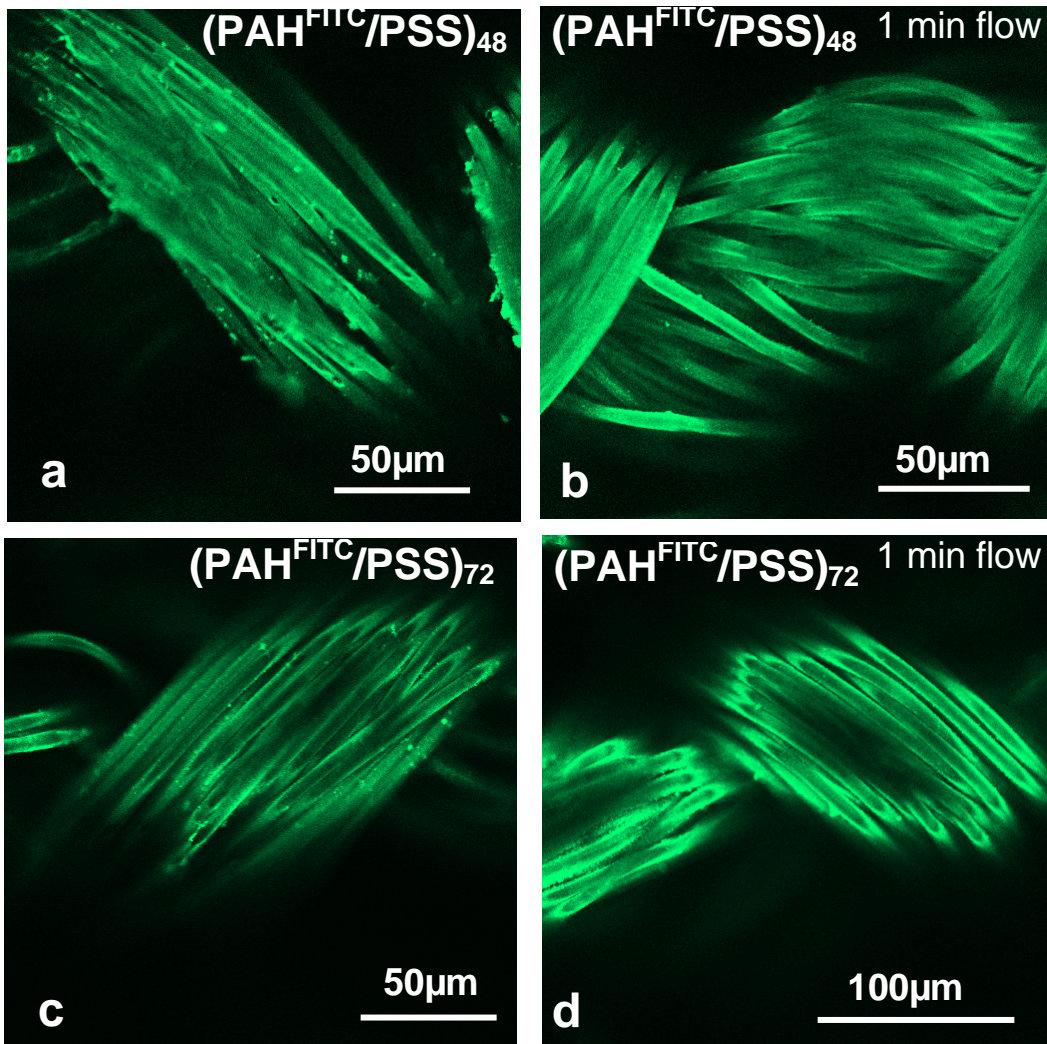


Figure 9

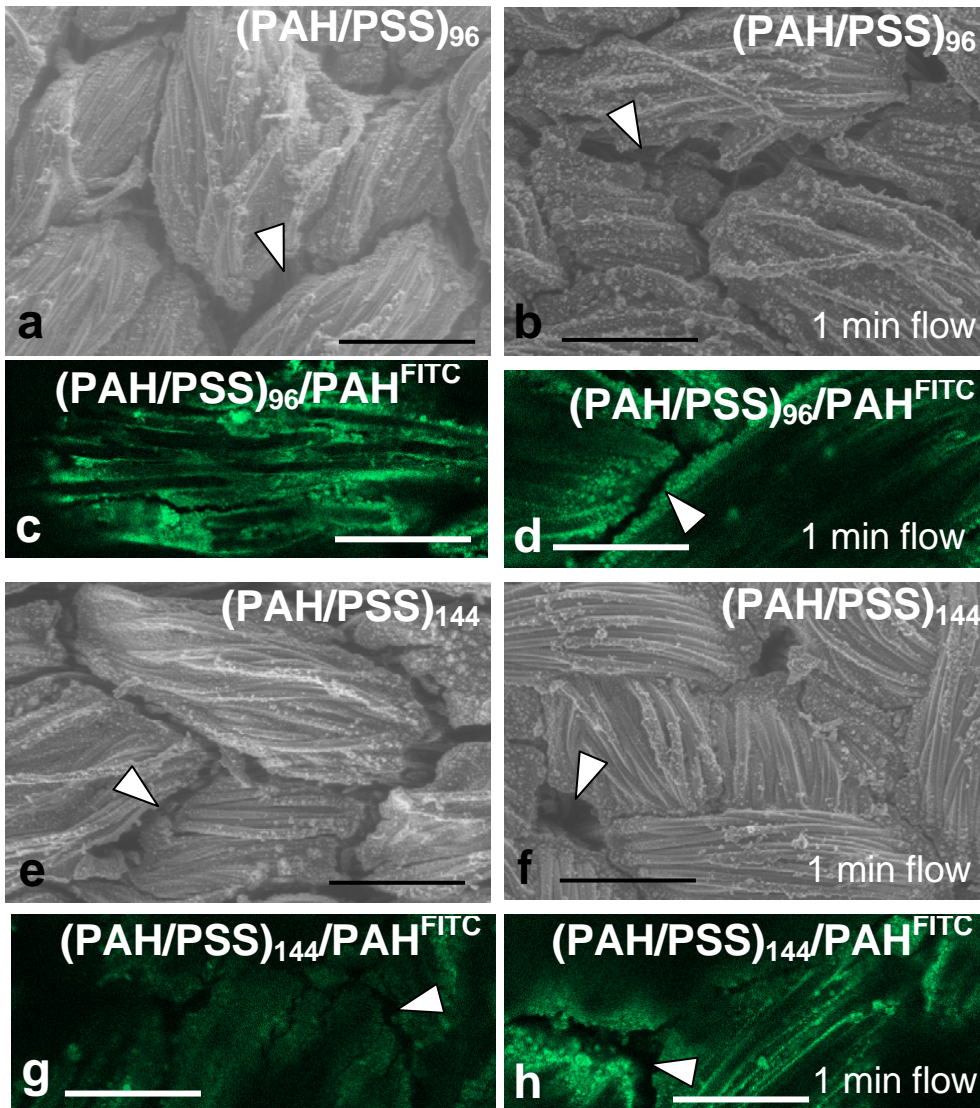
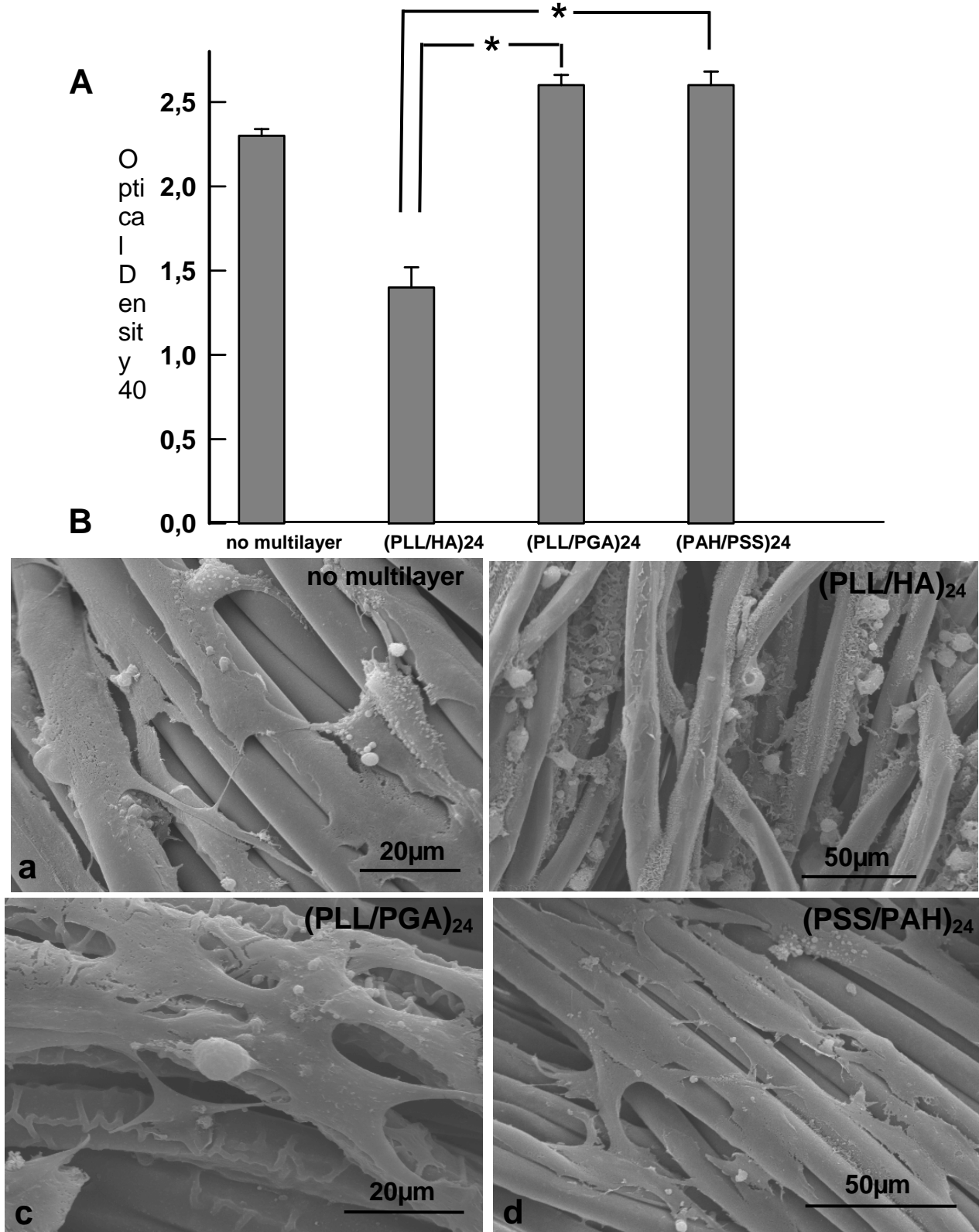


Figure 10



Legends

Fig. 1. Schematic view of the pulsative flow essay.

Fig 2. (PLL^{FITC}/HA)₂₄ coated PET vascular prostheses (a, c): t0, before pulsative flow, (b, d): t30, 30 minutes pulsative flow. CLSM images (a and b), ESEM images (c and d).

Fig 3. (PLL^{FITC}/PGA)₂₄ coated PET vascular prostheses (a, c): t0, before pulsative flow, (b, d): t30, 30 minutes pulsative flow. CLSM images (a and b), ESEM images (c and d).

Fig 4. (PAH^{FITC}/PSS)₂₄ coated PET vascular prostheses (a, c): t0, before pulsative flow, (b, d): t30, 30 minutes pulsative flow. CLSM images (a and b), ESEM images (c and d).

Fig 5. Graph of the permeability test showing the prosthetic treated with (PLL/HA) (PLL/PGA) and (PSS/PAH) transwall volume and controle (bare prostheses) after 1 minute under 120 mmHg pression. Light grey bar: 24 bilayers, grey bar: 48 bilayers, black bar: 72 bilayers, stripe bar: 96 bilayers and horizontal stripe bar: 144 bilayers. Results are means of 8 samples (four measurements per samples, results are constant during each minute). The error bars represent the Standard Errors Mean. The groups (PLL/PGA)_{24, 48} and (PAH/PSS)_{24, 48}, have been compared to the groups (PLL/PGA)₇₂ and (PAH/PSS)₇₂ using the Kruskal-Wallis One Way Analysis. *(PLL/PGA)₇₂ and (PAH/PSS)₇₂ groups differ significantly ($P < 0.05$) from these other groups tested.

Fig 6. CLSM images of (PLL^{FITC}/HA) film coated PET vascular prostheses (a, c) before water flow, (b, d) after 1 minute water flow. (a and b): 48 bilayers, (c and d): 72 bilayers.

Fig 7. CLSM images of (PLL^{FITC}/PGA) film coated PET vascular prostheses (a, c) before water flow, (b, d) after 1 minute water flow. (a and b): 48 bilayers, (c and d): 72 bilayers. arrowhead: rupture of the film at the filament interstice.

Fig 8. CLSM images of (PAH^{FITC}/PSS) film coated PET vascular prostheses (a, c) before water flow, (b, d) after 1 minute water flow. (a and b): 48 bilayers, (c and d): 72 bilayers.

Fig 9 a) and b) ESEM images of (PAH/PSS) film coated PET vascular prostheses, 96 bilayers. c) and d) CLSM images of (PAH^{FITC}/PSS)₉₆. e) and f) ESEM images of (PAH/PSS)₁₄₄. g) and h) CLSM images of (PAH^{FITC}/PSS)₁₄₄. arrowhead: rupture of the film at the filament interstice. a) b) e) and f) bar = 200 μm ; c) d) g) and h) bar = 50 μm .

Fig 10A: Proliferation of HUVEC on PET vascular prostheses coated with various architectures. Cells were seeded on bare prostheses (no multilayer) or on prostheses coated with (PLL/HA)₂₄, (PLL/PGA)₂₄ or (PAH/PSS)₂₄ at a density of 6×10^5 cells/well in 24-well plates. Cell proliferation was evaluated after 24h of culture through optical density (OD) measurements using *p*NPP assay. Results are means of triplet well (three measurements per well) determinations from two independent experiments. The error bars represent the Standard Errors Mean. The three groups (PLL/HA)₂₄, (PLL/PGA)₂₄ and (PAH/PSS)₂₄ have been compared to the control group (no multilayer) using the Kruskal-Wallis One Way Analysis. *(PLL/PGA)₂₄ and (PAH/PSS)₂₄ groups differ significantly ($P < 0.05$) from group (PLL/HA)₂₄. Fig 10B: SEM images of HUVEC seeded on bare prostheses (no multilayer) (a), on prostheses coated with (PLL/HA)₂₄ (b), (PLL/PGA)₂₄ (c) or (PAH/PSS)₂₄ (d) films. Cells were seeded at a density of 6×10^5 cells/well in 24-well plates and cultured for 24h.

3.2.3. Discussion.

Discussion au vu des résultats concernant la résistance à des forces de cisaillement, porosité et biocompatibilité des films multicouches de polyélectrolytes appliqués aux prothèses vasculaires en PET.

La deuxième étape de ce travail a permis d'apporter des données essentielles pour l'évaluation des systèmes multicouches comme nouveau traitement de surface potentiels pour les prothèses en PET. D'une manière très remarquable, le test de force de cisaillement révèle que les trois systèmes de multicouches de polyélectrolytes $(PLL/HA)_{24}$, $(PLL/PGA)_{24}$ et $(PAH/PSS)_{24}$ restent parfaitement homogènes, sans la formation de rupture du film après 30 minutes de test. Ces résultats démontrent que les trois types de système résistent à de telles contraintes mécaniques. Le banc d'essai utilisé avait été conçu pour simuler le régime circulatoire dans des conditions de débit physiologique et donc de reproduire assez fidèlement les contraintes de cisaillement. L'hypothèse d'une bonne tenue devait être prouvée clairement et ce banc d'essai nous a permis de démontrer une résistance suffisante des films multicouches aux forces de cisaillement. Cette étape était indispensable pour la suite du projet.

Les tests d'étanchéité se sont déroulés dans des conditions standardisées respectant les normes industrielles. L'étanchéité obtenue pour des prothèses traitées par $(PLL/HA)_{24}$, $(PLL/PGA)_{24}$ et $(PAH/PSS)_{24}$ n'est significativement pas différente de celle obtenue pour des prothèses non traitées (respectivement 1000mL, 800mL et 750mL comparé au 1100 mL/min.cm² pour une prothèse non traitée). Alors qu'aucune amélioration n'est mesuré pour les films $(PLL/HA)_{48}$ et $(PLL/HA)_{72}$ (respectivement 900 et 800mL/min.cm²), une étanchéité partielle est trouvée pour le système $(PLL/PGA)_{72}$ (500mL/min.cm²) avec un effet plus prononcé avec le film $(PAH/PSS)_{72}$ films (350mL/min.cm²). Cependant, l'augmentation du nombre de paire de couche de ce système à 96 et 144, n'entraîne aucune amélioration d'étanchéité ($(PAH/PSS)_{96}$: 459 mL/min.cm² et $(PAH/PSS)_{144}$: 423 mL/min.cm²). Il semble donc qu'un seuil critique d'étanchéité pour le système (PAH/PSS) soit atteint pour 96 paires de couche. Ce seuil d'étanchéité semble être corrélé à une plus grande fragilité du film

lorsqu'il est constitué de 96 paires de couche. En effet, bien que les films (PAH/PSS)₉₆ et (PAH/PSS)₁₄₄ recouvrent entièrement les filaments et fils constituant la prothèse et surtout combler les interstices entre les fils, il apparaît à ces endroits des craquelures du film, précisément là où le film n'est plus supporté par les filaments de PET.

L'application du film multicouche (PAH/PSS)₇₂ sur une prothèse a permis de modifier de manière significative l'étanchéité, ce qui est un élément encourageant. Cependant nous n'avons obtenu qu'une étanchéité partielle en comparaison avec les traitements de surface proposés dans le commerce (étanchéité totale obtenue par traitement des prothèses avec du collagène bovin de type I). Le choix d'autres constructions de polyélectrolytes pourrait être une alternative pour aboutir à une étanchéité satisfaisante. Par exemple, nous pourrions envisager de faire des mélanges constitués du système (PLL/HA) (propriété mécanique se rapprochant d'un gel) avec le système (PAH/PSS) (système plus rigide), ou encore de réticuler le système (PLL/HA).

Les tests de biocompatibilité sont également une étape indispensable dans cette évaluation. Les différences constatées après culture *in vitro* de cellules HUVECs sur prothèses PET traitées par (PLL/HA)₂₄, (PLL/PGA)₂₄ et (PAH/PSS)₂₄, permettent de sélectionner un film multicouche parmi les trois testés. En effet le film (PSS/PAH)₂₄ est celui qui offre manifestement un substrat le plus favorable à l'endothélialisation. Ce choix est également validé par les données de la littérature [170] qui confirment notamment que le PAH appliqué sur de la silice permet une bonne adhésion des cellules endothéliales. A la différence de ce travail, notre étude avait pour support une prothèse en PET, ce qui correspond à une étape plus proche de l'application clinique et avec un nombre plus important de paire de couche du système (PSS/PAH).

Au terme de ces résultats de multiples perspectives se présentent. En effet la recherche d'un film garantissant une étanchéité efficace pourrait être une priorité, avec sélection de polyélectrolytes plus adéquats dans ce sens. Les possibilités offertes par les films multicouches permettent aussi d'envisager de les fonctionnaliser dans l'idée de garantir une endothélialisation.

L'intérêt principal de ce travail réside probablement dans le fait que les expériences réalisées se complètent et déterminent un faisceau de données objectives indispensable pour le choix ultérieur d'un film spécifique

CONCLUSIONS.

La pathologie vasculaire, oblitérante ou anévrysmale, nécessite dans la grande majorité des cas des gestes de revascularisations. Ces interventions, en l'absence de greffon veineux autologues adéquats, nécessite l'emploi de substituts prothétiques. Malgré plusieurs décennies de recherches basées sur une expérience clinique conséquente, aucune avancée a permis de limiter les complications conséquentes à l'implantation de ces prothèses : la thrombose du pontage et/ou son infection. Ces complications sont redoutables en termes de morbidité et atteignent chaque jour un nombre très important de patient.

Les multicouches de polyélectrolytes sont actuellement en pleine phase de développement en raison de leurs multiples qualités : le nombre considérable d'associations autorisées, les possibilités d'incorporer toutes sortes de substances actives à l'intérieur des couches. Tout naturellement l'idée d'appliquer des constructions multicouches sur des prothèses vasculaires, dont le PET, s'impose comme une alternative offrant de très vastes opportunités en terme de fonctionnalisations.

L'originalité de notre travail a été de se focaliser principalement sur l'aspect mécanique : les multicouches de polyélectrolytes supporteraient-ils les contraintes multiples imposées à une prothèse implantées ?

Les premières étapes se sont focalisées à caractériser méthodiquement le comportement mécanique du composant élémentaire d'une prothèse en PET : le filament. Nous avons estimé nécessaire d'observer en premier l'unité élémentaire, pour pouvoir mieux appréhender par la suite le comportement des échantillons plus élaborés (fils et prothèses).

Ainsi nous avons pu démontrer que pour les trois systèmes testés ((PAH/PSS)₂₄, (PLL/HA)₂₄ et (PLL/PGA)₂₄) il existait une adhésion sur le filament et qu'à partir d'une certaine élongation des craquelures apparaissaient.

Dans le même esprit d'acquisition progressive des observations nous avons constaté que les trois systèmes multicouches ne modifiaient pas le comportement mécanique du filament en lui-même (test de dynamométrie), et donc sa résistance.

Il a été intéressant de constater dans un deuxième temps que les fils étaient plus tolérants à la traction avec des craquelures apparaissant plus tardivement. Enfin les films multicouches de polyélectrolyte appliqués aux prothèses n'ont présenté aucune craquelure malgré une élongation maximale : la structure tricotée, avec les excès de longueur qu'elle implique à l'échelle du filament empêchait d'aboutir au seuil de traction des filaments isolés.

L'analyse de la résistance des films aux forces de cisaillement a nécessité l'emploi d'un banc d'essai spécifique mettant en jeu un système de pompe hydraulique. Nous avons testé des segments entiers de prothèses traitées et nous avons constaté une excellente tenue des trois systèmes multicouches soumis à 30 minutes d'un régime circulatoire comparable au débit sanguin physiologique.

Cette première phase d'analyse du comportement mécanique des films multicouches appliqués aux prothèses nous a permis, par la suite, d'aborder des propriétés essentielles pour ces prothèses : la recherche d'une bonne étanchéité des prothèses et une bonne biocompatibilité.

Les tests d'étanchéité se sont déroulés à partir d'un protocole standardisé utilisé dans l'industrie. Les trois systèmes testés aboutissent à une amélioration significative de l'étanchéité par rapport à la prothèse contrôle.

La culture de cellules HUVEC sur des segments de prothèses traitées a abouti à des résultats différents selon le type de film multicouche. En effet, le système (PAH/PSS)₂₄ appliqué au PET semblait être l'environnement le plus favorable à une croissance et une adhésion cellulaire.

Nous avons donc dans ce travail pu démontrer la faisabilité d'appliquer le principe des constructions multicouches aux prothèses vasculaires en PET. Cette démonstration s'est faite à partir de l'aspect mécanique, cela s'expliquant par la particularité du milieu dans lequel les films seront placés. Les perspectives sont multiples : compléter l'obtention d'une étanchéité efficace, évaluer les possibilités de fonctionnalisation. L'ensemble du protocole d'analyse utilisé dans ce travail permettra dans cette optique d'apporter des arguments objectifs pour la sélection du type de système multicouche le plus adapté en vue d'une application clinique.

RÉFÉRENCES.

- [1] Decher G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science*. 1997;277:1232-7.
- [2] Decher G, Hong J, Schmitt J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process .3. consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*. 1992;210:831-5.
- [3] Decher G, Lvov Y, Schmitt J. Proof of multilayer structural organization in self-assembled polycation polyanion molecular films *Thin Solid Films*. 1994;244:772-7.
- [4] Classification of atherosclerotic lesions; report of a study group. World Health Organization technical report series. 1958;57(143):1-20.
- [5] Bonnet J. Atherosclerosis. *EMC*. Paris: Elsevier 2005:436-58.
- [6] Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *The New England journal of medicine*. 1987 May 28;316(22):1371-5.
- [7] Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzler NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation*. 2006 Mar 21;113(11):e463-654.
- [8] Polak JF, Karmel MI, Mannick JA, O'Leary DH, Donaldson MC, Whittemore AD. Determination of the extent of lower-extremity peripheral arterial disease with color-assisted duplex sonography: comparison with angiography. *Ajr*. 1990 Nov;155(5):1085-9.
- [9] Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Brit Med J*. 2002 Jan 12;324(7329):71-86.
- [10] Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*. 2005 Apr 30-May 6;365(9470):1577-89.
- [11] Gillum RF. Epidemiology of aortic aneurysm in the United States. *Journal of clinical epidemiology*. 1995 Nov;48(11):1289-98.
- [12] Thompson MM. Controlling the expansion of abdominal aortic aneurysms. *The British journal of surgery*. 2003 Aug;90(8):897-8.

- [13] Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Hye RJ, Makaroun MS, et al. The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *Archives of internal medicine*. 2000 May 22;160(10):1425-30.
- [14] Singh K, Bonna KH, Jacobsen BK, Bjork L, Solberg S. Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study : The Tromso Study. *American journal of epidemiology*. 2001 Aug 1;154(3):236-44.
- [15] Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE. Abdominal aortic aneurysm in women. *J Vasc Surg*. 2001 Jul;34(1):122-6.
- [16] Sakalihan N, Heyeres A, Nusgens BV, Limet R, Lapiere CM. Modifications of the extracellular matrix of aneurysmal abdominal aortas as a function of their size. *European journal of vascular surgery*. 1993 Nov;7(6):633-7.
- [17] Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK. Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. *Current problems in surgery*. 2002 Feb;39(2):110-230.
- [18] Holmes DR, Liao S, Parks WC, Thompson RW. Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications. *J Vasc Surg*. 1995 May;21(5):761-71; discussion 71-2.
- [19] Pearce WH, Sweis I, Yao JS, McCarthy WJ, Koch AE. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release in normal and diseased human infrarenal aortas. *J Vasc Surg*. 1992 Nov;16(5):784-9.
- [20] Lindholt JS, Juul S, Vammen S, Lind I, Fasting H, Henneberg EW. Immunoglobulin A antibodies against *Chlamydia pneumoniae* are associated with expansion of abdominal aortic aneurysm. *The British journal of surgery*. 1999 May;86(5):634-8.
- [21] Hance KA, Tataria M, Ziporin SJ, Lee JK, Thompson RW. Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *J Vasc Surg*. 2002 Feb;35(2):254-61.
- [22] Thompson RW, Baxter BT. MMP inhibition in abdominal aortic aneurysms. Rationale for a prospective randomized clinical trial. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999 Jun 30;878:159-78.
- [23] Rinckenbach S, Hassani O, Thaveau F, Bensimon Y, Jacquot X, Tally SE, et al. Current outcome of elective open repair for infrarenal abdominal aortic aneurysm. *Annals of vascular surgery*. 2004 Nov;18(6):704-9.
- [24] Reed A, Donaldson MC. Claudication. Surgical intervention. In: Hallet JW, Mills JL, Earnshaw JJ, Reekers JA, eds. *Comprehensive vascular and endovascular surgery*. Edinburg, London, New York, Oxford, Philadelphia: Mosby 2004:110.
- [25] Dieval F. Contribution à la détermination de la structure des fibres et microfibrilles de polyester. Mulhouse: Université de Haute Alsace; 1998.
- [26] De Bakey ME, Cooley DA, Crawford ES, Morris GC, Jr. Clinical application of a new flexible knitted dacron arterial substitute. *AMA*. 1958 Nov;77(5):713-24.

- [27] Wang L. Contribution à l'étude du vieillissement des prothèses vasculaires textiles. Mulhouse: Université de Haute Alsace; 2001.
- [28] Chen W, McCarthy TJ. Layer-by-layer deposition: A tool for polymer surface modification. *Macromolecules*. 1997 Jan 13;30(1):78-86.
- [29] Campbell CD, Brooks DH, Webster MW, Bahnson HT. The use of expanded microporous polytetrafluoroethylene for limb salvage: a preliminary report. *Surgery*. 1976 May;79(5):485-91.
- [30] Machy D. Impregnated vascular prostheses: synthetic matrices. In: Chakfé N, Durand B, Kretz JG, eds. *New technologies in vascular biomaterials : polytetrafluoroethylene prostheses, impregnated vascular prostheses and surface treatment of vascular prostheses* Strasbourg: Europrot 2003:67-80.
- [31] Chakfé N, Jahn C, Nicolini P, Kretz JG, Edah-Tally S, Beaufigeau M, et al. The impact of knee joint flexion on infrainguinal vascular grafts: an angiographic study. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1997 Jan;13(1):23-30.
- [32] Dawson I, van Bockel JH. Reintervention and mortality after infrainguinal reconstructive surgery for leg ischaemia. *The British journal of surgery*. 1999 Jan;86(1):38-44.
- [33] Nevelsteen A, Wouters L, Suy R. Long-term patency of the aortofemoral Dacron graft. A graft limb related study over a 25-years period. *The Journal of cardiovascular surgery*. 1991 Mar-Apr;32(2):174-80.
- [34] Friedman SG, Lazzaro RS, Spier LN, Moccio C, Tortolani AJ. A prospective randomized comparison of Dacron and polytetrafluoroethylene aortic bifurcation grafts. *Surgery*. 1995 Jan;117(1):7-10.
- [35] Quarmby JW, Burnand KG, Lockhart SJ, Donald AE, Sommerville KM, Jamieson CW, et al. Prospective randomized trial of woven versus collagen-impregnated knitted prosthetic Dacron grafts in aortoiliac surgery. *The British journal of surgery*. 1998 Jun;85(6):775-7.
- [36] Pevac WC, Darling RC, L'Italien GJ, Abbott WM. Femoropopliteal reconstruction with knitted, nonvelour Dacron versus expanded polytetrafluoroethylene. *J Vasc Surg*. 1992 Jul;16(1):60-5.
- [37] Green RM, Abbott WM, Matsumoto T, Wheeler JR, Miller N, Veith FJ, et al. Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: five-year results of a randomized trial. *J Vasc Surg*. 2000 Mar;31(3):417-25.
- [38] Dahl T, Lange C, Myhre H. Restaurations artérielles sous crurale en Dacron. In: Branchereau A, Jacobs M, eds. *Résultats à long terme des reconstructions artérielles*. New York: Futura Media Service inc. 1997:286-92.
- [39] Cao P, Parente B, De Rango P, Verzini F. Dacron versus PTFE. Is there still a competition? The true results. In: Chakfé N, Durand B, Kretz JG, eds. *New technologies in vascular biomaterials : polytetrafluoroethylene prostheses, impregnated vascular prostheses and surface treatment of vascular prostheses* Strasbourg: Europrot 2003:115-24.
- [40] Taylor PR, Wolfe JH, Tyrrell MR, Mansfield AO, Nicolaidis AN, Houston RE. Graft stenosis: justification for 1-year surveillance. *The British journal of surgery*. 1990 Oct;77(10):1125-8.

- [41] Sladen JG, Gerein AN, Miyagishima RT. Late rupture of prosthetic aortic grafts. Presentation and management. *American journal of surgery*. 1987 May;153(5):453-8.
- [42] Riepe G, Loos J, Imig H, Schroder A, Schneider E, Petermann J, et al. Long-term in vivo alterations of polyester vascular grafts in humans. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1997 Jun;13(6):540-8.
- [43] Halpert B, De Bakey ME, Jordan GL, Jr., Henly WS. The fate of homografts and prostheses of the human aorta. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1960 Dec;111:659-74.
- [44] Snooks SJ, Croft RJ, Wagner C. How should we preclot knitted Dacron grafts? *J Vasc Surg*. 1988 Apr;7(4):538-42.
- [45] Sauvage LR. Controlled preclotting--a simplified technique proved by time. *ASAIO transactions / American Society for Artificial Internal Organs*. 1988 Oct-Dec;34(4):921-2.
- [46] Humphries AW, Hawk WA, Cuthbertson AM. Arterial prosthesis of collagen-impregnated Dacron tulle. *Surgery*. 1961 Dec;50:947-54.
- [47] Bascom JU. Gelatin sealing to prevent blood loss from knitted arterial grafts. *Surgery*. 1961 Sep;50:504-12.
- [48] Chakfé N, Bizonne SC, Beaufigeau M, Urban E, Cardon A, Doillon C, et al. Impregnated polyester arterial prostheses: performance and prospects. *Annals of vascular surgery*. 1999 Sep;13(5):509-23.
- [49] Wooster DL, Louch RE, Krajden S. Intraoperative bacterial contamination of vascular grafts: a prospective study. *Canadian journal of surgery*. 1985 Sep;28(5):407-9.
- [50] Tolbert TW, Brown JL. Surface powders on surgical gloves. *Arch Surg*. 1980 Jun;115(6):729-32.
- [51] Mantovani D, Vermette P, Guidoin R, Laroche G. Lipid uptake in synthetic vascular prostheses explanted from humans. *Biomaterials*. 1999 Jun;20(11):1023-32.
- [52] Shoenfeld NA, Connolly R, Ramberg K, Valeri CR, Eldrup-Jorgensen J, Callow AD. The systemic activation of platelets by Dacron grafts. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1988 May;166(5):454-7.
- [53] Kottke-Marchant K, Anderson JM, Rabinovitch A. The platelet reactivity of vascular graft prostheses: an in vitro model to test the effect of preclotting. *Biomaterials*. 1986 Nov;7(6):441-8.
- [54] Houck J, Chang C. The chemotactic properties of the products of collagenolysis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1971 Oct;138(1):69-75.
- [55] Chang C, Houck JC. Demonstration of the chemotactic properties of collagen. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1970 May;134(1):22-6.
- [56] Barker H, Oliver R, Grant R, Stephen L. Formaldehyde as a pre-treatment for dermal collagen heterografts. *Biochim Biophys Acta*. 1980 Nov 3;632(4):589-97.
- [57] Cooke A, Oliver RF, Edward M. An in vitro cytotoxicity study of aldehyde-treated pig dermal collagen. *Br J Exp Pathol*. 1983 Apr;64(2):172-6.

- [58] Rasmussen KE. The influence of pH, temperature, and buffering on the polymerization rate. *Histochemistry*. 1974;38:19-26.
- [59] Okamura K, Chiba C, Iriyama T, Itoh T, Maeta H, Ijima H, et al. Antigen depressant effect of glutaraldehyde for aortic heterografts with a valve, with special reference to a concentration right fit for the preservation of grafts. *Surgery*. 1980 Feb;87(2):170-6.
- [60] Speer DP, Chvapil M, Eskelson CD, Ulreich J. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *Journal of biomedical materials research*. 1980 Nov;14(6):753-64.
- [61] Noishiki Y, Ma XH, Yamane Y, Satoh S, Okoshi T, Takahashi K, et al. Succinylated collagen crosslinked by thermal treatment for coating vascular prostheses. *Artif Organs*. 1998 Aug;22(8):672-80.
- [62] Guidoin R, Marois Y, Deng X, Chakfé N, Marois M, Roy R, et al. Can collagen impregnated polyester arterial prostheses be recommended as small diameter blood conduits? *ASAIO J*. 1996 Nov-Dec;42(6):974-83.
- [63] Marois Y, Chakfé N, Deng X, Marois M, How T, King MW, et al. Carbodiimide cross-linked gelatin: a new coating for porous polyester arterial prostheses. *Biomaterials*. 1995 Oct;16(15):1131-9.
- [64] Utoh J, Goto H, Hirata T, Hara M, Kitamura N. Postoperative inflammatory reactions to sealed Dracon prostheses: a comparison of Gelseal and Hemashield. *The Journal of cardiovascular surgery*. 1997 Jun;38(3):287-90.
- [65] Guidoin R, Marois Y, Zhang Z, King M, Martin L, Laroche G, et al. The benefits of fluoropassivation of polyester arterial prostheses as observed in a canine model. *ASAIO J*. 1994 Jul-Sep;40(3):M870-9.
- [66] Chinn JA, Sauter JA, Phillips RE, Jr., Kao WJ, Anderson JM, Hanson SR, et al. Blood and tissue compatibility of modified polyester: thrombosis, inflammation, and healing. *Journal of biomedical materials research*. 1998 Jan;39(1):130-40.
- [67] Marois Y, Chakfé N, Guidoin R, Duhamel RC, Roy R, Marois M, et al. An albumin-coated polyester arterial graft: in vivo assessment of biocompatibility and healing characteristics. *Biomaterials*. 1996 Jan;17(1):3-14.
- [68] Chang TM. Platelet-surface interaction: effect of albumin coating or heparin complexing on thrombogenic surfaces. *Can J Physiol Pharmacol*. 1974 Apr;52(2):275-85.
- [69] Hake U, Gabbert H, Iversen S, Jakob H, Schmiedt W, Oelert H. Healing parameters of a new albumin-coated knitted Dacron graft. *Thorac Cardiovasc Surg*. 1991 Aug;39(4):208-13.
- [70] Kang SS, Petsikas D, Murchan P, Cziperle DJ, Ren D, Kim DU, et al. Effects of albumin coating of knitted Dacron grafts on transinterstitial blood loss and tissue ingrowth and incorporation. *Cardiovascular surgery (London, England)*. 1997 Apr;5(2):184-9.
- [71] Chakfé N, Gasser B, Lindner V, Rouyer N, Rooke R, Kretz JG, et al. Albumin as a sealant for a polyester vascular prosthesis: its impact on the healing sequence in humans. *The Journal of cardiovascular surgery*. 1996 Oct;37(5):431-40.

- [72] Phaneuf MD, Berceci SA, Bide MJ, Quist WC, LoGerfo FW. Covalent linkage of recombinant hirudin to poly(ethylene terephthalate) (Dacron): creation of a novel antithrombin surface. *Biomaterials*. 1997 May;18(10):755-65.
- [73] Aldenhoff YB, van Der Veen FH, ter Woorst J, Habets J, Poole-Warren LA, Koole LH. Performance of a polyurethane vascular prosthesis carrying a dipyridamole (Persantin) coating on its luminal surface. *Journal of biomedical materials research*. 2001 Feb;54(2):224-33.
- [74] Marois Y, Paris E, Zhang Z, Doillon CJ, King MW, Guidoin RG. Vascugraft microporous polyesterurethane arterial prosthesis as a thoraco-abdominal bypass in dogs. *Biomaterials*. 1996 Jul;17(13):1289-300.
- [75] Campbell EJ, O'Byrne V, Stratford PW, Quirk I, Vick TA, Wiles MC, et al. Biocompatible surfaces using methacryloylphosphorylcholine laurylmethacrylate copolymer. *ASAIO J*. 1994 Jul-Sep;40(3):M853-7.
- [76] Yoneyama T, Sugihara K, Ishihara K, Iwasaki Y, Nakabayashi N. The vascular prosthesis without pseudointima prepared by antithrombogenic phospholipid polymer. *Biomaterials*. 2002 Mar;23(6):1455-9.
- [77] Scott MD, Murad KL. Cellular camouflage: fooling the immune system with polymers. *Curr Pharm Des*. 1998 Dec;4(6):423-38.
- [78] Deible CR, Petrosko P, Johnson PC, Beckman EJ, Russell AJ, Wagner WR. Molecular barriers to biomaterial thrombosis by modification of surface proteins with polyethylene glycol. *Biomaterials*. 1999 Jan;20(2):101-9.
- [79] Massia SP, Stark J, Letbetter DS. Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. *Biomaterials*. 2000 Nov;21(22):2253-61.
- [80] Machy D, Carteron P, Jozefonvicz J. A new vascular polyester prosthesis impregnated with cross-linked dextran. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2002;13(8):963-75.
- [81] Letourneur D, Champion J, Slaoui F, Jozefonvicz J. In vitro stimulation of human endothelial cells by derivatized dextrans. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1993 Jan;29A(1):67-72.
- [82] Mauzac M, Maillet F, Jozefonvicz J, Kazatchkine MD. Anticomplementary activity of dextran derivatives. *Biomaterials*. 1985 Jan;6(1):61-3.
- [83] Fischer AM, Mauzac M, Tapon-Breaudiere J, Jozefonvicz J. Anticoagulant activity of dextran derivatives. Part II: Mechanism of thrombin inactivation. *Biomaterials*. 1985 May;6(3):198-202.
- [84] Herring M, Baughman S, Glover J, Kesler K, Jesseph J, Campbell J, et al. Endothelial seeding of Dacron and polytetrafluoroethylene grafts: the cellular events of healing. *Surgery*. 1984 Oct;96(4):745-55.
- [85] Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnology Progress*. 1998;14(3):356-63.
- [86] Gallant ND, Capadona JR, Frazier AB, Collard DM, Garcia AJ. Micropatterned surfaces to engineer focal adhesions for analysis of cell adhesion strengthening. *Langmuir*. 2002;18(14):5579-84.

- [87] Chevallier P, Mantovani D, Laroche G. Fonctionnalization of vascular biomaterials luminal surfaces. In: Chakfé N, Durand B, Kretz J-G, eds. *New technologies in vascular biomaterials : polytetrafluoroethylene prostheses, impregnated vascular prostheses and surface treatment of vascular prostheses* ESVB ed. Strasbourg: Europrot 2003:87-101.
- [88] Curti T, Pasquinelli G, Preda P, Freyrie A, Laschi R, D'Addato M. An ultrastructural and immunocytochemical analysis of human endothelial cell adhesion on coated vascular grafts. *Annals of vascular surgery*. 1989 Oct;3(4):351-63.
- [89] Vohra R, Thomson GJ, Carr HM, Sharma H, Welch M, Walker MG. In vitro adherence and kinetics studies of adult human endothelial cell seeded polytetrafluoroethylene and gelatin impregnated Dacron grafts. *European journal of vascular surgery*. 1991 Feb;5(1):93-103.
- [90] Vohra R, Thomson GJ, Carr HM, Sharma H, Walker MG. Comparison of different vascular prostheses and matrices in relation to endothelial seeding. *The British journal of surgery*. 1991 Apr;78(4):417-20.
- [91] Castellot JJ, Jr., Pukac LA, Caleb BL, Wright TC, Jr., Karnovsky MJ. Heparin selectively inhibits a protein kinase C-dependent mechanism of cell cycle progression in calf aortic smooth muscle cells. *The Journal of cell biology*. 1989 Dec;109(6 Pt 1):3147-55.
- [92] Laemmel E, Penhoat J, Warocquier-Clerout R, Sigot-Luizard MF. Heparin immobilized on proteins usable for arterial prosthesis coating: growth inhibition of smooth-muscle cells. *Journal of biomedical materials research*. 1998 Mar 5;39(3):446-52.
- [93] Koyama N, Kinsella MG, Wight TN, Hedin U, Clowes AW. Heparan sulfate proteoglycans mediate a potent inhibitory signal for migration of vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 1998 Aug 10;83(3):305-13.
- [94] Becquemin JP, Riff Y, Kovarsky S, Ardaillou N, Benhaien-Sigaux N. Evaluation of a polyester collagen-coated heparin bonded vascular graft. *The Journal of cardiovascular surgery*. 1997 Feb;38(1):7-14.
- [95] Bos GW, Scharenborg NM, Poot AA, Engbers GH, Terlingen JG, Beugeling T, et al. Adherence and proliferation of endothelial cells on surface-immobilized albumin-heparin conjugate. *Tissue Eng*. 1998 Fall;4(3):267-79.
- [96] Wissink MJ, Beernink R, Poot AA, Engbers GH, Beugeling T, van Aken WG, et al. Improved endothelialization of vascular grafts by local release of growth factor from heparinized collagen matrices. *J Control Release*. 2000 Feb 14;64(1-3):103-14.
- [97] Devine C, Hons B, McCollum C. Heparin-bonded Dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass grafting: a multicenter trial. *J Vasc Surg*. 2001 Mar;33(3):533-9.
- [98] Devine C, McCollum C. Heparin-bonded Dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass: five-year results of a prospective randomized multicenter clinical trial. *J Vasc Surg*. 2004 Nov;40(5):924-31.
- [99] Massia SP, Hubbell JA. Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials. *Journal of biomedical materials research*. 1991 Feb;25(2):223-42.

- [100] Tiwari A, Salacinski HJ, Punshon G, Hamilton G, Seifalian AM. Development of a hybrid cardiovascular graft using a tissue engineering approach. *Faseb J*. 2002 Jun;16(8):791-6.
- [101] Meinhart JG, Schense JC, Schima H, Gorlitzer M, Hubbell JA, Deutsch M, et al. Enhanced endothelial cell retention on shear-stressed synthetic vascular grafts precoated with RGD-cross-linked fibrin. *Tissue Eng*. 2005 May-Jun;11(5-6):887-95.
- [102] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989 Dec 8;246(4935):1306-9.
- [103] Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA, Martin JF, Erusalimsky JD. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation*. 1995 Jul 1;92(1):11-4.
- [104] Masuda S, Doi K, Satoh S, Oka T, Matsuda T. Vascular endothelial growth factor enhances vascularization in microporous small caliber polyurethane grafts. *ASAIO J*. 1997 Sep-Oct;43(5):M530-4.
- [105] Stone D, Phaneuf M, Sivamurthy N, LoGerfo FW, Quist WC. A biologically active VEGF construct in vitro: implications for bioengineering-improved prosthetic vascular grafts. *Journal of biomedical materials research*. 2002 Jan;59(1):160-5.
- [106] Doi K, Matsuda T. Enhanced vascularization in a microporous polyurethane graft impregnated with basic fibroblast growth factor and heparin. *Journal of biomedical materials research*. 1997 Mar 5;34(3):361-70.
- [107] Desgranges P, Caruelle JP, Carpentier G, Barritault D, Tardieu M. Beneficial use of fibroblast growth factor 2 and RGTA, a new family of heparan mimics, for endothelialization of PET prostheses. *Journal of biomedical materials research*. 2001;58(1):1-9.
- [108] Phaneuf MD, Dempsey DJ, Bide MJ, Quist WC, LoGerfo FW. Coating of Dacron vascular grafts with an ionic polyurethane: a novel sealant with protein binding properties. *Biomaterials*. 2001 Mar;22(5):463-9.
- [109] Bandyk DF, Esses GE. Prosthetic graft infection. *The Surgical clinics of North America*. 1994 Jun;74(3):571-90.
- [110] Bunt TJ. Vascular graft infections: an update. *Cardiovascular surgery (London, England)*. 2001 Jun;9(3):225-33.
- [111] Goeau-Brissonniere O, Coggia M, Favre D, Leflon-Guibout V, Javerliat I, Nicolas-Chanoine MH. Can metal treatment improve vascular prostheses. In: Chakfé N, Durand B, Kretz J-G, eds. *New technologies in vascular biomaterials : polytetrafluoroethylene prostheses, impregnated vascular prostheses and surface treatment of vascular prostheses* ESVB ed. Strasbourg: Europrot 2003:45-52.
- [112] Harvey RA, Tesoriero JV, Greco RS. Noncovalent bonding of penicillin and cefazolin to dacron. *American journal of surgery*. 1984 Feb;147(2):205-9.
- [113] Greco RS, Harvey RA, Smilow PC, Tesoriero JV. Prevention of vascular prosthetic infection by a benzalkonium-oxacillin bonded polytetrafluoroethylene graft. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1982 Jul;155(1):28-32.

- [114] Haverich A, Hirt S, Karck M, Siclari F, Wahlig H. Prevention of graft infection by bonding of gentamycin to Dacron prostheses. *J Vasc Surg.* 1992 Jan;15(1):187-93.
- [115] Magnan PE, Seyral P, Raoult D, Branchereau A. In vitro antistaphylococcal activity of collagen-sealed Dacron vascular prostheses bonded with rifampin, vancomycin, or amikacin. *Annals of vascular surgery.* 1994 May;8(3):243-7.
- [116] Gahtan V, Esses GE, Bandyk DF, Nelson RT, Dupont E, Mills JL. Antistaphylococcal activity of rifampin-bonded gelatin-impregnated Dacron grafts. *The Journal of surgical research.* 1995 Jan;58(1):105-10.
- [117] Powell TW, Burnham SJ, Johnson G, Jr. A passive system using rifampin to create an infection-resistant vascular prosthesis. *Surgery.* 1983 Nov;94(5):765-9.
- [118] Goeau-Brissonniere O, Leport C, Bacourt F, Lebrault C, Comte R, Pechere JC. Prevention of vascular graft infection by rifampin bonding to a gelatin-sealed Dacron graft. *Annals of vascular surgery.* 1991 Sep;5(5):408-12.
- [119] Goeau-Brissonniere O, Mercier F, Nicolas MH, Bacourt F, Coggia M, Lebrault C, et al. Treatment of vascular graft infection by in situ replacement with a rifampin-bonded gelatin-sealed Dacron graft. *J Vasc Surg.* 1994 Apr;19(4):739-41.
- [120] Torsello G, Sandmann W, Gehrt A, Jungblut RM. In situ replacement of infected vascular prostheses with rifampin-soaked vascular grafts: early results. *J Vasc Surg.* 1993 Apr;17(4):768-73.
- [121] Bandyk DF, Novotney ML, Johnson BL, Back MR, Roth SR. Use of rifampin-soaked gelatin-sealed polyester grafts for in situ treatment of primary aortic and vascular prosthetic infections. *The Journal of surgical research.* 2001 Jan;95(1):44-9.
- [122] Hayes PD, Nasim A, London NJ, Sayers RD, Barrie WW, Bell PR, et al. In situ replacement of infected aortic grafts with rifampicin-bonded prostheses: the Leicester experience (1992 to 1998). *J Vasc Surg.* 1999 Jul;30(1):92-8.
- [123] Blanchemain N, Haulon S, Boschini F, Marcon-Bachari E, Traisnel M, Morcellet M, et al. Vascular prostheses with controlled release of antibiotics Part 1: Surface modification with cyclodextrins of PET prostheses. *Biomol Eng.* 2007 Feb;24(1):149-53.
- [124] Blanchemain N, Haulon S, Boschini F, Traisnel M, Morcellet M, Martel B, et al. Vascular prostheses with controlled release of antibiotics Part 2. In vitro biological evaluation of vascular prostheses treated by cyclodextrins. *Biomol Eng.* 2007 Feb;24(1):143-8.
- [125] Blanchemain N, Haulon S, Martel B, Traisnel M, Morcellet M, Hildebrand HF. Vascular PET prostheses surface modification with cyclodextrin coating: development of a new drug delivery system. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005 Jun;29(6):628-32.
- [126] Blanchemain N, Laurent T, Haulon S, Traisnel M, Neut C, Kirkpatrick J, et al. In vitro study of a HP gamma-cyclodextrin grafted PET vascular prosthesis for application as anti-infectious drug delivery system. *J Incl Phenom Macro.* 2007;57(1-4):675-81.

- [127] Christmann D, Hansmann Y, Remy V. An infectious resistant vascular prosthesis: the infectiologist point of view. In: Chakfé N, Durand B, Kretz J-G, eds. *New technologies in vascular biomaterials : polytetrafluoroethylene prostheses, impregnated vascular prostheses and surface treatment of vascular prostheses* Strasbourg: Europrot 2003:39-43.
- [128] Fu J, Ji J, Yuan W, Shen J. Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. *Biomaterials*. 2005 Nov;26(33):6684-92.
- [129] Fu J, Ji J, Fan D, Shen J. Construction of antibacterial multilayer films containing nanosilver via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan-silver ions complex. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Dec 1;79(3):665-74.
- [130] Illingworth BL, Tweden K, Schroeder RF, Cameron JD. In vivo efficacy of silver-coated (Silzone) infection-resistant polyester fabric against a biofilm-producing bacteria, *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of heart valve disease*. 1998 Sep;7(5):524-30.
- [131] Hardman S, Cope A, Swann A, Bell PR, Naylor AR, Hayes PD. An in vitro model to compare the antimicrobial activity of silver-coated versus rifampicin-soaked vascular grafts. *Annals of vascular surgery*. 2004 May;18(3):308-13.
- [132] Ricco JB. InterGard silver bifurcated graft: features and results of a multicenter clinical study. *J Vasc Surg*. 2006 Aug;44(2):339-46.
- [133] Batt M, Magne JL, Alric P, Muzj A, Ruotolo C, Ljungstrom KG, et al. In situ revascularization with silver-coated polyester grafts to treat aortic infection: early and midterm results. *J Vasc Surg*. 2003 Nov;38(5):983-9.
- [134] Cenni E, Granchi D, Ciapetti G, Stea S, Verri E, Gamberini S, et al. In vitro complement activation after contact with pyrolytic carbon-coated and uncoated polyethylene terephthalate. *J Mater Sci Mater Med*. 1997 Dec;8(12):771-4.
- [135] Wang J, Huang N, Yang P, Leng YX, Sun H, Liu ZY, et al. The effects of amorphous carbon films deposited on polyethylene terephthalate on bacterial adhesion. *Biomaterials*. 2004 Jul;25(16):3163-70.
- [136] Zhang W, Zhang YH, Ji JH, Zhao J, Yan Q, Chu PK. Antimicrobial properties of copper plasma-modified polyethylene. *Polymer*. 2006 Oct;47(21):7441-5.
- [137] Blodgett KB. Monomolecular films of fatty acid on glass. *J Am Chem Soc*. 1934;56:534.
- [138] Blodgett KB, Langmuir I. Built-up films of Barium Stereate and their optical properties. *Phys Rev*. 1937;51:964-82.
- [139] Cao G, Hong HG, Mallouk TE. Layered metal phosphates and phosphonates: from crystals to monolayers. *Acc Chem Res*. 1992;25:420-5.
- [140] Netzer L, Sagiv J. A new approach to construction of artificial monolayers assemblies. *Am Chem Soc*. 1983;105:674-6.
- [141] Hoogeveen NG, Stuart MAC, Flerer GJ, Bohmer MR. Formation and stability of multilayers of polyelectrolytes. *Langmuir*. 1996;12:3675-81.

- [142] Caruso F, Furlong DN, Ariga K, Ichinose I, Kunitake T. Characterization of polyelectrolyte-protein multilayer films by atomic force microscopy, scanning electron microscopy, and Fourier transform infrared reflection-absorption spectroscopy. *Langmuir*. 1998;14(16):4559-65.
- [143] Ladam G, Gergely C, Senger B, Decher G, Voegel JC, Schaaf P, et al. Protein interactions with polyelectrolyte multilayers: interactions between human serum albumin and polystyrene sulfonate/polyallylamine multilayers. *Biomacromolecules*. 2000 Winter;1(4):674-87.
- [144] Schlenoff JB, Dubas ST, T. F. Sprayed polyelectrolyte multilayers. *Langmuir*. 2000;16 9968-9.
- [145] Porcel CH, Izquierdo A, Ball V, Decher G, Voegel JC, Schaaf P. Ultrathin coatings and (poly(glutamic acid)/polyallylamine) films deposited by continuous and simultaneous spraying. *Langmuir*. 2005 Jan 18;21(2):800-2.
- [146] Chiarelli PA, Johal MS, Casson JL, Roberts JB, Robinson JM, Wang H-L. Controlled Fabrication of Polyelectrolyte Multilayer Thin Films Using Spin-Assembly. *Advanced Materials*. 2001;13:1167-70.
- [147] Cho J, Char K, Hong J-D, Lee K-B. Fabrication of Highly Ordered Multilayer Films Using a Spin Self-Assembly Method. *Advanced Materials*. 2001;13(14):1076-8.
- [148] Jiang X, Zheng H, Gourdin S, Hammond PT. Polymer-on-Polymer Stamping: Universal Approaches to Chemically Patterned Surfaces. *Langmuir*. 2002;18(7):2607-15.
- [149] Sui ZJ, Salloum D, Schlenoff JB. Effect of molecular weight on the construction of polyelectrolyte multilayers: Stripping versus sticking. *Langmuir*. 2003 Mar 18;19(6):2491-5.
- [150] Mendelsohn JD, Barrett CJ, Chan VV, Pal AJ, Mayes AM, Rubner MF. Fabrication of Microporous Thin Films from Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*. 2000;16:5017-23.
- [151] Delcorte A, Bertrand P, Wischerhoff E, Laschewsky A. Adsorption of polyelectrolyte multilayers on polymer surfaces. *Langmuir*. 1997;13(19):5125-36.
- [152] Sukhishvili SA, Granick S. Polyelectrolyte adsorption onto an initially-bare solid surface of opposite electrical charge. *J Chem Phys*. 1998;109:6861-8.
- [153] Wang L, Cui S, Wang Z, Zhang X. Multilayer Assemblies of Copolymer PSOH and PVP on the Basis of Hydrogen Bonding. *Langmuir*. 2000;16:10490-4.
- [154] Ladam G, Schaad P, Voegel JC, Schaaf P, Decher G, Cuisinier FJ. In Situ Determination of the Structural Properties of Initially Deposited Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*. 2000;16:1249-55.
- [155] Picart C, Mutterer J, Richert L, Luo Y, Prestwich GD, Schaaf P, et al. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Oct 1;99(20):12531-5.
- [156] Lavalley P, Picart C, Mutterer J, Gergely C, Reiss H, Voegel J, et al. Modeling the buildup of polyelectrolyte multilayer films having exponential growth. *J Phys Chem B*. 2004;108(2):635-48.
- [157] Porcel C, Lavalley P, Ball V, Decher G, Senger B, Voegel J, et al. From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers. *Langmuir*. 2006;22(9):4376-83.

- [158] Ladam G, Schaaf P, Cuisinier FGJ, Decher G, Voegel JC. Protein Adsorption onto Auto-Assembled Polyelectrolyte Films. *Langmuir*. 2001;17(3):878-82.
- [159] Salloum DS, Schlenoff JB. Protein adsorption modalities on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules*. 2004 May-Jun;5(3):1089-96.
- [160] Prime KL, Whitesides GM. Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science*. 1991 May 24;252(5010):1164-7.
- [161] Boulmedais F, Frisch B, Etienne O, Lavallo P, Picart C, Ogier J, et al. Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials. *Biomaterials*. 2004 May;25(11):2003-11.
- [162] Schwinte P, Ball V, Szalontai B, Haikel Y, Voegel JC, Schaaf P. Secondary structure of proteins adsorbed onto or embedded in polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules*. 2002 Nov-Dec;3(6):1135-43.
- [163] Schwinte P, Voegel JC, Picart C, Haikel Y, Schaaf P, Szalontai B. Stabilizing effects of various polyelectrolyte multilayer films on the structure of adsorbed/embedded fibrinogen molecules: An ATR-FTIR study. *J Phys Chem B*. 2001;105:11906-16.
- [164] Chluba J, Voegel JC, Decher G, Erbacher P, Schaaf P, Ogier J. Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity. *Biomacromolecules*. 2001 Fall;2(3):800-5.
- [165] Benkirane-Jessel N, Lavallo P, Hübsch E, Holl V, Senger B, Haikel Y, et al. Short-Time Tuning of the Biological Activity of Functionalized Polyelectrolyte Multilayers. *Advanced Funct Materials*. 2005;15:648-5.
- [166] Mendelsohn JD, Yang SY, Hiller J, Hochbaum AI, Rubner MF. Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films. *Biomacromolecules*. 2003 Jan-Feb;4(1):96-106.
- [167] Thompson MT, Berg MC, Tobias IS, Rubner MF, Van Vliet KJ. Tuning compliance of nanoscale polyelectrolyte multilayers to modulate cell adhesion. *Biomaterials*. 2005 Dec;26(34):6836-45.
- [168] Yang SY, Mendelsohn JD, Rubner MF. New class of ultrathin, highly cell-adhesion-resistant polyelectrolyte multilayers with micropatterning capabilities. *Biomacromolecules*. 2003 Jul-Aug;4(4):987-94.
- [169] Richert L, Lavallo P, Vautier D, Senger B, Stoltz JF, Schaaf P, et al. Cell interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules*. 2002 Nov-Dec;3(6):1170-8.
- [170] Boura C, Muller S, Vautier D, Dumas D, Schaaf P, Claude Voegel J, et al. Endothelial cell-interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials*. 2005 Aug;26(22):4568-75.
- [171] Houska M, Brynda E, Bohata K. The effect of polyelectrolyte chain length on layer-by-layer protein/polyelectrolyte assembly-an experimental study. *J Colloid Interf Sci*. 2004 May 1;273(1):140-7.
- [172] Etienne O, Schneider A, Taddei C, Richert L, Schaaf P, Voegel JC, et al. Degradability of polysaccharides multilayer films in the oral environment: an in vitro and in vivo study. *Biomacromolecules*. 2005 Mar-Apr;6(2):726-33.

- [173] Picart C, Schneider A, Etienne O, Mutterer J, Schaaf P, Egles C, et al. Controlled degradability of polysaccharide multilayer films in vitro and in vivo. *Advanced Funct Materials*. 2005;15:1771-80.
- [174] Jessel N, Atalar F, Lavalle P, Mutterer J, Decher G, Schaaf P, et al. Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *Advanced Materials*. 2003;15:692-5.
- [175] Caruso F, Niikura K, Furlong DN, Okahata Y. Assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for immunosensing .2. *Langmuir*. 1997 Jun 25;13(13):3427-33.
- [176] Benkirane-Jessel N, Schwinte P, Falvey P, Darcy R, Haikel Y, Schaaf P, et al. Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxicam-cyclodextrin complexes. *Advanced Functional Materials*. 2004 Feb;14(2):174-82.
- [177] Liu W, Sun S, Cao Z, Zhang X, Yao K, Lu WW, et al. An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes. *Biomaterials*. 2005 May;26(15):2705-11.
- [178] Sukhorukov GB, Montrel MM, Petrov AI, Shabarchina LI, Sukhorukov BI. Multilayer films containing immobilized nucleic acids. Their structure and possibilities in biosensor applications. *Biosensors & bioelectronics*. 1996;11(9):913-22.
- [179] Pei R, Cui X, Yang X, Wang E. Assembly of alternating polycation and DNA multilayer films by electrostatic layer-by-layer adsorption. *Biomacromolecules*. 2001 Summer;2(2):463-8.
- [180] Zhang JT, Chua LS, Lynn DM. Multilayered thin films that sustain the release of functional DNA under physiological conditions. *Langmuir*. 2004 Sep 14;20(19):8015-21.
- [181] Yamauchi F, Kato K, Iwata H. Layer-by-layer assembly of poly(ethyleneimine) and plasmid DNA onto transparent indium-tin oxide electrodes for temporally and spatially specific gene transfer. *Langmuir*. 2005 Aug 30;21(18):8360-7.
- [182] Brynda E, Houska M, Jirouskova M, Dyr JE. Albumin and heparin multilayer coatings for blood-contacting medical devices. *Journal of biomedical materials research*. 2000 Aug;51(2):249-57.
- [183] Tan QG, Ji J, Barbosa MA, Fonseca C, Shen JC. Constructing thromboresistant surface on biomedical stainless steel via layer-by-layer deposition anticoagulant. *Biomaterials*. 2003 Nov;24(25):4699-705.
- [184] Serizawa T, Yamaguchi M, Akashi M. Alternating bioactivity of polymeric layer-by-layer assemblies: anticoagulation vs procoagulation of human blood. *Biomacromolecules*. 2002 Jul-Aug;3(4):724-31.
- [185] Liu Y, He T, Gao C. Surface modification of poly(ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2005 Dec 10;46(2):117-26.
- [186] Liu Y, He T, Song H, Gao C. Layer-by-layer assembly of biomacromolecules on poly(ethylene terephthalate) films and fiber fabrics to promote endothelial cell growth. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Jun 1;81(3):692-704.

- [187] Lavallo P, Gergely C, Cuisinier FJ, Decher G, Schaaf P, Voegel JC, et al. Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study. *Macromolecules*. 2002;35:4458-65.
- [188] Thiel BL, Donald AM. The study of water in heterogeneous media using environmental scanning electron microscopy. *J Mol Liq*. 1999;80:207-30.
- [189] Donald AM. The use of environmental scanning electron microscopy for imaging wet and insulating materials. *Nat Mater*. 2003;2:511-6.
- [190] Danilatos GD. Introduction to the ESEM instrument. *Microsc Res Techniq*. 1993;25:354-61.
- [191] Stokes DJ. Recent advances in electron imaging, image interpretation and applications: environmental scanning electron microscopy. *Philos T R Soc B*. 2003;361:2771-87.
- [192] Thiel BL, Toth M. Secondary electron contrast in low-vacuum/environmental scanning electron microscopy of dielectrics. *J Appl Physics*. 2005;97:1-18.
- [193] Boyde A. Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning*. 1988;10:128-38.
- [194] Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*. 1986;56:930-3.
- [195] Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys Rev Lett*. 1982;49:57-61.
- [196] Young RD. Field emission ultramicroscope. *Rev Sci Instr*. 1966;37:275-8.
- [197] Young RD, Ward J, Scire F. The topografiner: an instrument for measuring surface microtopography. *Rev Sci Instr*. 1972;43:999-1011.
- [198] Dieval F, Chakfé N, Cottin-Bizonne S, Le Magnen J-F, Beaufigeau M, Mathieu D, et al. Les tests mécaniques d'évaluation des prothèses vasculaires. *ITBMB-RBM*. 2000;22:70-87.
- [199] Heim F. Développement d'une valve cardiaque en matériau textile. Mulhouse: Université de Haute Alsace; 2004.
- [200] Guidoin R, King M, Marceau D, Cardou A, de la Faye D, Legendre JM, et al. Textile arterial prostheses: is water permeability equivalent to porosity? *Journal of biomedical materials research*. 1987 Jan;21(1):65-87.
- [201] Cardiovascular implants. Tubular vascular prostheses. In: 7198 DisID, ed. 1996:29.
- [202] Cardiovascular implants. Tubular vascular prostheses. In: 7198 DisID, ed. 1996:31.
- [203] Cebe-Suarez S, Zehnder-fjallman A, Ballmer-Hoffer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. Review. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(601-615).
- [204] Jain RK, Au P, Tam J, Duda DG, Fukumura D. The creation in vitro of vascularized skeletal muscle represents a first step to engineering of more complex tissue architectures. *Nat Biotechnol*. 2005;23:821-3.

- [205] Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res.* 2006;312:549-60.
- [206] Thierry B, Winnik FM, Merhi Y, Tabrizian M. Nanocoatings onto arteries via layer-by-layer deposition: toward the in vivo repair of damaged blood vessels. *J Am Chem Soc.* 2003 Jun 25;125(25):7494-5.
- [207] Gao C, Leporatti S, Moya S, Donath E, Möhwald H. Swelling and shrinking of polyelectrolyte microcapsules in response to changes in temperature and ionic strength. *Chem-Eur J.* 2003;9:915-20.
- [208] Hemmerle J, Roucoules V, Fleith G, Nardin M, Ball V, Lavalle P, et al. Mechanically responsive films of variable hydrophobicity made of polyelectrolyte multilayers. *Langmuir.* 2005;21:10328-31.
- [209] Mertz D, Hemmerlé J, Mutterer J, Ollivier S, Voegel JC, Schaaf P, et al. Mechanically responding nanovalves based on polyelectrolyte multilayers. *Nano Lett.* 2007;7:657-62.