

Université de Montréal

**Perméabilité et endothélialisation in vivo d'une prothèse vasculaire de petit
diamètre électrofilée avec membrane bioactive**

Par

William FORTIN

Laboratoire de biomatériaux endovasculaires (LBeV)
Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de
Montréal

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en sciences biomédicales (M.Sc.)

30 novembre 2020

© William Fortin

Université de Montréal

Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé

Perméabilité et endothélialisation in vivo d'une prothèse vasculaire de petit diamètre électrofilée avec membrane bioactive

Présenté par

William Fortin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Alain Rivard, Président-rapporteur
Département de médecine, Université de Montréal

Dr Gilles Soulez, Directeur de recherche
Département de médecine, Université de Montréal

Dre Sophie Lerouge, Co-directrice de recherche
Département d'imagerie et ingénierie, Université de Montréal
Département de génie mécanique, École de technologie supérieure

Dr Robert Guidoin, Membre du jury
Département de chirurgie, Université Laval

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais adresser mes remerciements sincères aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon mémoire de maîtrise.

Je tiens ensuite à remercier tout particulièrement mes directeurs de recherche, Sophie Lerouge et Gilles Soulez. Je vous remercie de m'avoir donné la chance de participer à ce projet de vie qu'est votre œuvre académique, et je vous lève aussi mon chapeau pour votre énergie et votre volonté de toujours pousser plus loin. Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance tout au long de ce projet et de m'avoir aidé à grandir en tant que chercheur. Votre support constant et votre accessibilité ont été déterminants dans ma capacité à mener à bien ce projet. Aussi, sans le support financier que vous avez mis à notre disposition pour ce projet, rien n'aurait été possible.

Je remercie aussi toute l'équipe de chercheurs, étudiants et personnels de recherche du LBeV qui m'ont supporté pendant toute cette aventure, autant au laboratoire qu'au bloc opératoire animal du CRCHUM. À Mélusine Bouchet, qui a été responsable de toute la partie *in vitro* de ce projet et donc de l'élaboration, la construction et la mise à l'épreuve des néo-conduits en laboratoire, merci de ton professionnalisme et de ton complet dévouement à ce projet. Mes travaux n'auraient pas pu voir le jour sans l'existence du néo-conduit que j'ai eu la chance de tester, et je te suis grandement reconnaissant d'avoir eu la patience et l'ouverture d'esprit de m'inclure dans ton projet et d'avoir supporté mon tempérament fonceur et mon éternelle (et fatigante) obsession pour la rapidité. À Marion Maire, merci de ton implication extensive dans les aspects *in vivo* et *in vitro* de ce projet, ton expertise et ta rigueur ont été cruciales tout au long de cette aventure que nous avons vécue ensemble. Hélène Héon, merci de m'avoir partagé ton expertise vétérinaire et ta passion pour les animaux, que tu respectes et dont tu prends soin de manière inspirante. Igor, merci de m'avoir permis d'opérer à tes côtés, j'en suis ressorti un meilleur chirurgien. Aussi, merci à tous ceux qui ont touché de près ou de loin à ce projet qui me tiens à cœur, votre esprit d'entraide a vraiment fait la différence.

J'ai eu l'opportunité de discuter avec plusieurs de mes collègues pendant les mois que j'ai passés au LBeV du CRCHUM, et une observation m'a particulièrement marqué. Tout étudiant(e), à la maîtrise ou au doctorat, s'engage volontairement dans un processus s'apparentant à un marathon pendant lequel il ou elle devra faire face à de multiples embuches, des résultats négatifs, des solutions d'apparence faciles qui s'avèrent difficiles et bien plus encore. Et puis il y a les succès, les résultats qui vont dans le sens des hypothèses, les publications subséquentes. L'ensemble du processus représente un engagement marquant dans la vie des personnes qui osent essayer. J'ai osé essayer, et j'en ressors avec une sentiment de profonde admiration envers toutes ces personnes qui s'embarquent dans cette aventure, qui persévèrent et qui persistent à croire malgré les échecs. Le souvenir de votre dévouement envers la science m'accompagnera tout au long de mon parcours futur.

À ma famille, Marie-José, Marc, Élizabeth et Louis-O, je vous remercie du fond du cœur. Je ne peux pas exprimer la chance que j'ai de vous avoir eu à mes côtés pendant toutes ces années. Vous avez été et êtes toujours l'intarissable support qui me maintient et me pousse à me faire confiance, et je ne pourrais pas m'imaginer être arrivé où j'en suis aujourd'hui sans vous.

À mes amis d'enfance, Vincent, Benoit, Ali, Samuel, je vous remercie de toujours avoir été présents et d'avoir été conciliants envers mes absences et retards continuels. J'aimerais vous promettre que ça changera mais malheureusement nous avons toujours été honnêtes les uns envers les autres, donc je peux vous promettre d'essayer du mieux que je peux dans le futur!

Je me permets de réserver mes derniers remerciements à la personne avec qui je partage ma vie. Merci pour ta confiance, pour ton éternel optimisme, pour ton soutien constant et pour ta capacité à faire ressortir le meilleur en moi. Je nous souhaite que les années à venir soient aussi heureuses que celles passées.

Sincèrement,

William Fortin

Résumé

Les maladies cardiovasculaires continuent à être parmi les principales sources de morbidité et de mortalité dans le monde [1, 2]. Malgré les avancées importantes dans le traitement médical et endovasculaire de ces pathologies, le besoin en revascularisations artérielles par pontage ne cesse de prendre de l'ampleur. Les conduits vasculaires synthétiques actuels performant bien lorsqu'utilisés pour des vaisseaux de calibre moyen, mais ceux de petit diamètre (< 6 mm) démontrent encore à ce jour des taux de perméabilité beaucoup trop bas [3-11]. Deux hypothèses pouvant expliquer ce phénomène sont le manque d'endothélialisation et de compliance des conduits synthétiques actuels [12-18]. Le but de cette étude était de créer et d'évaluer la performance d'un nouveau conduit de petit diamètre avec un potentiel d'endothélialisation supérieur et une compliance similaire aux vaisseaux natifs. Cette étude présente deux aspects distincts : l'élaboration et l'évaluation *in vitro* d'un conduit électrofilé de petit diamètre (5 mm) composé d'une structure de polyuréthane/polycaprolactone (PU/PCL) et d'un revêtement bioactif de sulfate de chondroïtine (CS) par une équipe spécialisée en biomatériaux, puis l'élaboration et l'évaluation d'un essai *in vivo* mettant à l'épreuve la performance du néo-conduit dans un modèle de grand animal par une seconde équipe. Les conduits à l'étude (eVG-CS) ont démontré une compliance 10 fois supérieure à celle des conduits de polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) actuellement utilisés en clinique, ainsi qu'une bonne stabilité au vieillissement *in vitro*. L'évaluation *in vivo*, sous forme de pontages carotidiens bilatéraux chez le mouton, a par contre démontré l'infériorité des conduits à l'étude comparativement aux contrôles en ePTFE en termes de perméabilité et de par l'absence d'endothélialisation significative des greffons à l'étude. L'infériorité *in vivo* de ces nouveaux pontage électrofilés bioactifs par rapport aux résultats favorables *in vitro* fut attribuée principalement à la trop faible porosité des greffons à l'étude ainsi qu'à l'incapacité du revêtement de CS à favoriser un processus d'endothélialisation rapide. L'établissement d'un greffon plus poreux avec un revêtement bioactif différent représente une piste d'amélioration future de cette structure prometteuse de PU/PCL.

Mots-clés : cardiovasculaire, pontage, électrofilage, polyurethane, polycaprolactone, sulfate de chondroïtine, compliance.

Abstract

Cardiovascular diseases present a growing burden of morbidity and mortality worldwide [1, 2]. Despite significant advances in medical and endovascular treatments of these pathologies, the need of revascularization by arterial bypass is increasing. Actual synthetic vascular conduits perform well when used on large-diameter arteries, but small-diameter conduits (<6 mm) still show unacceptably low medium- and long-term permeability rates [3-11]. Two hypotheses can explain this phenomenon – the inability of synthetic bypasses to create a neo-endothelium and compliance mismatch between the graft and the native artery [12-18]. The goal of this study was to create and evaluate the performance of a novel small-diameter vascular conduit with superior endothelialization properties and a compliance similar to native vessels. This study presents two distinct aspects : the *in vitro* elaboration and evaluation of an electrospun, small-diameter (5 mm) vascular conduit made up of a scaffold of polyurethane/polycaprolactone (PU/PCL) combined with a chondroitin sulfate (CS) bioactive coating by a team specialized in biomaterials, and the elaboration and evaluation of an *in vivo* trial testing the performance of the novel vascular graft in a large animal model by a second team. The experimental conduits (eVG-CS) showed an *in vitro* compliance 10-times superior to their commercially-available expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) counterparts, while remaining stable after aging trials. However, *in vivo* evaluation, as bilateral interposition carotid bypasses in sheep, showed the novel bypasses to be inferior to ePTFE controls in terms of permeability and by the absence of significant endothelialization. The *in vivo* inferiority of these novel bioactive electrospun grafts despite favorable *in vitro* results was attributed to the low porosity of the grafts and to the inability of the CS coating to promote the endothelialization process. Establishment of a more porous graft with a different bioactive coating represents the future of the evaluation of this promising PU/PCL structure.

Keywords : cardiovascular, bypass, electrospinning, polyurethane, polycaprolactone, chondroitin.

Table des matières

Remerciements.....	4
Résumé	6
Abstract.....	7
Table des matières.....	8
Liste des tableaux	11
Liste des figures	11
Liste des sigles et abréviations.....	14
CHAPITRE 1 – REVUE DE LITTÉRATURE	16
1.1 Problématique clinique.....	16
1.1.1. Indications de revascularisation par pontage vasculaire	17
1.1.1.1. Chirurgie cardiaque.....	17
1.1.1.2. Chirurgie vasculaire.....	17
1.1.2. Conduits vasculaires disponibles cliniquement	18
1.1.2.1. Conduits autologues	18
1.1.2.2. Conduits synthétiques.....	18
1.1.2.3. Performance des conduits vasculaires.....	20
1.1.2.3.1. Perméabilité.....	20
1.1.2.3.2. Autres paramètres cliniques pertinents.....	21
1.1.2.3.3. Comparaison entre conduits autologues et synthétiques	21
1.1.2.4. Hypothèses relatives à l'échec des conduits vasculaires synthétiques de petit calibre.....	22
1.1.2.4.1. Faible néoendothélialisation.....	22

1.1.2.4.2. Faible compliance	23
1.2 Nouvelles approches pour améliorer la performance des conduits vasculaires synthétiques	23
1.2.1. Prothèses électrofilées.....	23
1.2.2. Conduits vasculaires bioactifs	24
1.2.2.1. Biocompatibilité	24
1.2.2.2. Revêtements bioactifs.....	25
1.2.3. Conduits et stents biorésorbables	26
1.3 Notions biomécaniques et applications chez l'humain.....	27
1.3.1 Notions de compliance	27
1.3.2 Notions de résistance mécanique.....	28
1.3.3 Notions de résistance au vieillissement.....	28
1.4 Conduits vasculaires <i>in vivo</i> et modèles animaux.....	29
1.5 Résultats précédents de l'équipe.....	31
CHAPITRE 2 – OBJECTIFS DU PROJET	35
2.1 Objectifs et hypothèses spécifiques.....	36
CHAPITRE 3 – ARTICLE	37
3.1 Contexte de l'article	37
3.2 Abstract.....	38
3.3 Introduction	39
3.4 Materials and Methods.....	40
3.5 Results.....	47
3.6 Discussion	57
3.7 Conclusion.....	61

3.8	Acknowledgements.....	62
3.9	Conflicts of interest.....	62
3.10	Appendix.....	63
3.10.1	Appendix A – Supplementary data.....	63
3.10.2	Appendix B – Supplemental Details on Materials and Methods.....	64
B.1	Animal preoperative quarantine details.....	64
B.2	Perioperative anesthesia protocol.....	64
B.3	Sedation protocol for echographic follow-up.....	65
CHAPITRE 4 – DISCUSSION.....		66
4.1	Sélection d’un modèle animal pour l’étude de pontages vasculaires.....	67
4.2	Élaboration d’une étude sur greffons vasculaires in vivo.....	69
4.3	Exécution d’un projet in vivo et conclusions.....	73
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....		76
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		78

Liste des tableaux

Table 1.1– Données physiologiques et hématologiques comparatives entre l’humain et les différents modèles de grands animaux.....	31
Table 3.1– <i>In vivo</i> follow-up results. Time <i>in vivo</i> : time from implantation to animal sacrifice.....	52

Liste des figures

Figure 1.1 – Structure du ePTFE sous microscopie électronique (magnification x500). <i>Image provenant de Rutherford’s Vascular Surgery and Endovascular Therapy, 9th edition (2018), chapitre 64 [17].</i>	19
Figure 1.2 – Structure du PET sous microscopie électronique. (A) Dacron tricoté standard (magnification x37). (B) Dacron Vascutek® imprégné de gélatine (magnification x40). (C) Dacron tissé standard (magnification x50). <i>Image provenant de Rutherford’s Vascular Surgery and Endovascular Therapy, 9th edition (2018), chapitre 64 [17].</i>	19
Figure 1.3 – Représentation schématique du procédé d’électrofilage général pour prothèses vasculaires tubulaires.	24
Figure 1.4 – Différentes largeurs de fibres électrofilées de PET représentées au microscope électronique selon la concentration en PET de la solution initiale, soit (A1) 9% (w/v) ou (B1) 12,5% (w/v) (échelle 10 µm). <i>Hadjibadeh A. et al. [20].</i>	32
Figure 1.5 – Représentations au microscope électronique de l’ensemencement en HUVEC de différentes surfaces sans ou avec revêtement de L-PPE:N après 21 jours d’incubation : (a) ePET; (b) ePET + L-PPE:N; (c) PET tissé commercial; (d) PET tissé commercial + L-PPE:N (échelle 100 µm). <i>Savaji H. et al. [22].</i>	33
Figure 3.1 – <i>In vivo</i> implantation of eVG-CS and ePTFE grafts as bilateral carotid bypass.	46

Figure 3.2 – (A) Digital image of the graft. (B) SEM image of the nanofiber mat from eVG nanofiber mat (scale bar: 10 μm). (C) Distributions of fiber diameters for coated grafts. There was no difference between bare and coated materials..... 48

Figure 3.3 – Mechanical properties of eVG and eVG-CS grafts. (A) Representative engineering stress-strain curves from circumferential tensile testing. (B) Mean elastic modulus and tensile strength (n=13). 49

Figure 3.4 – Comparison of (A) the elastic modulus and the tensile strength of the eVG scaffolds as a function of ageing duration in a saline solution at 37°C over 6 months, and (B) ATR-FTIR spectra of pure PU, pure PCL and eVG scaffolds after production and after 6-month ageing. Functional groups of $-\text{CH}_2$ (stretching) and carbonyl keton $-\text{C}=\text{O}$ (stretching) were detected in the ranges of 2850-3000 and 1670-1750 cm^{-1} for all spectra. The hydroxyl $-\text{O}-\text{H}$ (stretching) and $-\text{N}-\text{H}$ (stretching) from PU were identified to the broadened peak in the range 3200-3400 cm^{-1} and were also detected in the PU/PCL spectrum. No difference was observed between fresh and aged PU/PCL samples. 50

Figure 3.5 – Macroscopic analysis. Typical macroscopic appearance of (A, B) eVG-CS grafts after 8 weeks *in vivo*, (C, D) ePTFE prostheses after 5 weeks *in vivo*, showing more tissue adhesion around ePTFE grafts. 53

Figure 3.6 – Ultrasonographic *in vivo* analyses. Longitudinal representations of patent ePTFE (A) and eVG-CS (B) grafts prior to sacrifice. Patent *in vivo* eVG-CS grafts' internal diameters were consistently about 1-mm less than their ePTFE controls, suggesting radial strength discrepancies over time. (C) Axial depiction of adherent mural thrombus formation leading to stenosis in the eVG-CS graft at 4 weeks (sheep #2). (D) Longitudinal image of neointima detachment in an eVG-CS graft at 7 weeks, suggesting weak attachment of the neointima to the luminal side of the graft. (E) Apparent plicature of an eVG-CS graft that led to subsequent thrombosis at 4 weeks (sheep #5). (F) Occlusion of an eVG-CS graft at 4 weeks with dense thrombus formation within the prosthesis (sheep #3). 54

Figure 3.7 – HPS staining and histological analyses of control conduits. ePTFE graft after 8 weeks implantation shows well attached neointima at anastomosis sites but not throughout the length of the implant. (A, B insert) Typical transverse section in the middle of ePTFE implant, showing invasion of the graft by red and white blood cells and a large amount of perigraft tissue around the implant (sheep #2). (C) Longitudinal section showing red blood cells invasion through the ePTFE porosity (black spots are carbon from the prosthesis). (D) Strong neointima attachment close to the anastomosis. 55

Figure 3.8 – Histological analyses of experimental PU/PCL grafts after several weeks of implantation. (A, B insert): Example of patent eVG-CS graft after 8 weeks implantation: distal anastomosis, with thin neointima limited to the perianastomotic area and complete absence of cell invasion within the electrospun VG (sheep #9). (C) Detachment of the neointima from the prosthesis in the anastomosis region led to the formation of a sub-endothelial thrombus, which was visible by duplex ultrasounds (sheep #2). (D) The lower radial force exerted by eVG-CS grafts, confirmed by their deformation during histological sectioning, can lead to kinking and flow disturbance. (E, F) Thrombosed eVG-CS grafts showed major structural deformations, ranging from intra-wall deficits to frank fiber separation (sheep #6 and #3). (HPS staining)..... 56

Figure A.1 – Measurements of (A) weight and (B) fiber diameter of the eVG scaffolds as a function of ageing duration in a saline solution at 37°C over 6 months. 63

Figure A.2 – Doppler ultrasound images for ePTFE (A, B) and eVG-CS (C, D) grafts post-operatively (A, C) and 1 week after the implantation (B, D). All images taken at mid graft, except for (A) taken at proximal anastomosis because of the absence of Doppler signal inside the ePTFE prosthesis just after implantation. 63

Liste des sigles et abréviations

AFS : *amputation-free survival* (Survie sans amputation majeure)

CMD : *carboxymethylated dextran* (Dextran carboxyméthylé)

CS : *chondroitin sulfate* (Sulfate de chondroïtine)

DMF : *N,N-Dimethylformaldéhyde*

EDC : *N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride*

ePET : *electrospun polyethylene terephthalate* (polyéthylène terephthalate électrofilé)

ePTFE : *expanded polytetrafluoroethylene* (polytetrafluoroéthylène expansé)

ÉTS : École de technologie supérieure de Montréal

eVG-CS : *electrospun bioactive vascular graft* (greffon vasculaire bioactif électrofilé)

LBeV : Laboratoire de Biomatériaux endovasculaires

L-PPE:N : Polymérisation plasmatique d'éthylène riche en amines

MACE : *major adverse cardiovascular event* (Événement cardiovasculaire adverse majeur)

MES : *2-morpholinoethane sulfonic acid*

mmHg : millimètres de mercure

NHS : N-hydroxysuccinimide

PCL : Polycaprolactone

PEG : polyéthylène glycol

PEO : polyéthylène oxydé

PET : polyéthylène téréphthalate

Poly : Polytechnique Montréal

PTFE : polytétrafluoroéthylène

PU/PCL : polyuréthane/polycaprolactone

THF : tétrahydrofuran

TLR : *target-lesion revascularization* (Revascularisation de lésion cible)

% w/v : pourcentage en poids/volume (*weight/volume*)

% w/w : pourcentage en poids/poids (*weight/weight*)

CHAPITRE 1 – REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Problématique clinique

Les maladies cardiovasculaires occlusives constituent l'une des principales causes de morbidités et de mortalité dans le monde [1, 2, 50]. L'athérosclérose, élément central à l'origine de ces pathologies, augmente en prévalence secondairement à différents facteurs de risque génétiques et environnementaux, notamment l'âge, le tabagisme, l'hypertension artérielle, le diabète, les dyslipidémies, l'insuffisance rénale chronique et l'obésité [50]. Les avancées médicales des dernières décennies ont prouvé leur efficacité pour la réduction de l'impact des maladies cardiovasculaires en s'attaquant à ces facteurs de risque, mais le vieillissement des populations continue à provoquer l'augmentation inexorable de la prévalence de ces pathologies à l'échelle globale [1, 50]. La maladie vasculaire occlusive, conduisant au rétrécissement d'une artère par l'athérome, à la rupture d'une plaque athérosclérotique ou à l'embolisation distale d'un thrombus cardiaque ou artériel, peut être traitée par approche médicale, endovasculaire ou chirurgicale. L'approche médicale est variable selon la condition vasculaire spécifique traitée, soit par traitements antiplaquettaires et par traitement des comorbidités (hypolipémiants, antihypertenseurs etc.) pour les conditions chroniques et par traitements anticoagulants ou thrombolytiques pour les conditions aiguës. Lorsqu'adoptée seule, l'approche médicale est généralement réservée aux sténoses et thromboses artérielles avec impacts cliniques limités ou chez des patients n'ayant pas d'autre option de par leurs comorbidités [51, 52]. L'approche endovasculaire, en constant développement au cours des dernières décennies et toujours en plein essor, présente une option interventionnelle minimalement invasive pour le traitement des maladies cardiovasculaires occlusives, mais demeure limitée par l'anatomie des lésions et par une perméabilité à long-terme systématiquement moindre que celle des pontages vasculaires [53, 54]. L'approche chirurgicale « ouverte » par pontages vasculaires, malgré sa morbidité plus grande, représente toujours à ce jour l'option la plus durable et définitive pour le traitement de multiples pathologies occlusives artérielles, et les chirurgies de pontages coronariens et périphériques sont pratiquées des centaines de milliers de fois par an à-travers le monde [53-55].

La principale limitation des pontages vasculaires, hormis les comorbidités du patient-même, est l'accessibilité à un conduit vasculaire de qualité. Les pontages vasculaires « autologues », composés d'une artère ou d'une veine du patient, continuent à démontrer leur supériorité par rapport aux conduits synthétiques pour les pontages de petit calibre (<6 mm), autant au-niveau coronarien qu'en périphérie [6-11, 56-57]. Malheureusement, les conduits autologues sont souvent non disponibles ou de qualité inadéquate dans une proportion importante de patients. Il existe un besoin grandissant d'un conduit vasculaire synthétique rapidement accessible avec une performance acceptable chez l'humain.

1.1.1. Indications de revascularisation par pontage vasculaire

1.1.1.1. Chirurgie cardiaque

Depuis l'avènement et les succès de l'angioplastie et du stenting coronariens par approche endovasculaire, les indications de pontages aorto-coronariens et mammo-coronariens se sont restreintes principalement aux maladies coronariennes considérées à « haut-risque ». En général, celles-ci se résument en une maladie atteignant le tronc commun (coronaire gauche proximale), une maladie coronarienne des trois vaisseaux, une maladie coronarienne associée à une dysfonction ventriculaire gauche sévère et certains patients diabétiques atteints d'une maladie coronarienne diffuse [58].

1.1.1.2. Chirurgie vasculaire

De manière parallèle à l'expérience en chirurgie cardiaque, l'essor des technologies et techniques endovasculaires a permis le traitement de plus en plus large de la maladie vasculaire occlusive périphérique. Les technologies endovasculaires sont particulièrement utiles pour les patients multi-comorbides et pour les lésions courtes et uniques. Les indications de pontage vasculaire demeurent variées. Au niveau du membre inférieur spécifiquement, les indications de traitement chirurgical dépendent de l'anatomie des lésions. Les occlusions iliaques de plus de 5 cm, les lésions fémoro-poplitées plus longues que 25 cm, les lésions multi-étagées et les lésions tibiales entraînant une ischémie significative sont majoritairement traitées par pontage de par leur meilleure perméabilité à moyen- et long-termes comparativement à l'approche endovasculaire [59]. L'approche chirurgicale est aussi préconisée pour les fistules artério-veineuses, en cas de

compression extrinsèque (musculo-squelettique, néoplasique ou traumatique) ainsi qu'en cas d'infections vasculaires [60].

1.1.2. Conduits vasculaires disponibles cliniquement

1.1.2.1. Conduits autologues

Tel que décrit précédemment, les conduits vasculaires autologues sont préconisés pour tout pontage vasculaire de petit calibre (<6 mm) en raison de leur supériorité clinique par rapport aux pontages synthétiques. La veine saphène interne est de loin le conduit le plus utilisé en chirurgie vasculaire pour sa facilité de prélèvement et ses succès cliniques éprouvés [63]. Si non disponible, les veines saphènes externes, les veines du bras (basilique et céphalique) ainsi que les veines fémorales « superficielles » peuvent être utilisées [61, 62]. Au niveau artériel, l'artère mammaire interne est primordiale pour les pontages coronariens et sa supériorité est claire dans la littérature par rapport à tout autre conduit autologue [64, 65]. L'artère radiale peut aussi être utilisée comme alternative pour les mêmes indications [71]. Pour la population pédiatrique, l'artère iliaque interne est souvent préconisée chez les jeunes enfants car son risque de dégénérescence anévrysmale est minime par rapport aux conduits veineux [66].

1.1.2.2. Conduits synthétiques

Les conduits synthétiques de petit calibre (< 6mm) sont actuellement très peu utilisés cliniquement à cause de leur piètre performance [7]. Les conduits en ePTFE sont les plus fréquemment utilisés dans ce contexte – leur création date de plus d'un demi-siècle, et consiste en l'expansion et secondairement la fibrillation de fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE), créant des zones ouvertes entre des nœuds de PTFE favorisant l'invasion cellulaire [67] (figure 1.1).

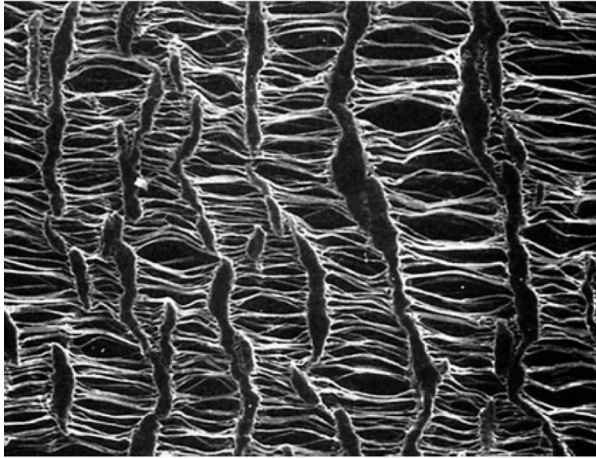


Figure 1.1 – Structure du ePTFE sous microscopie électronique (magnification x500). *Image provenant de Rutherford's Vascular Surgery and Endovascular Therapy, 9th edition (2018), chapitre 64 [17].*

Les conduits en polyéthylène téréphtalate (PET), communément appelé Dacron, sont des structures soit tricotées, soit tissées utilisées depuis près d'un siècle en chirurgie cardiovasculaire. Ils sont de nos jours recouverts d'une couche d'albumine ou de gélatine pour prévenir la transsudation du sang à-travers leurs pores [68] (Figure 1.2).

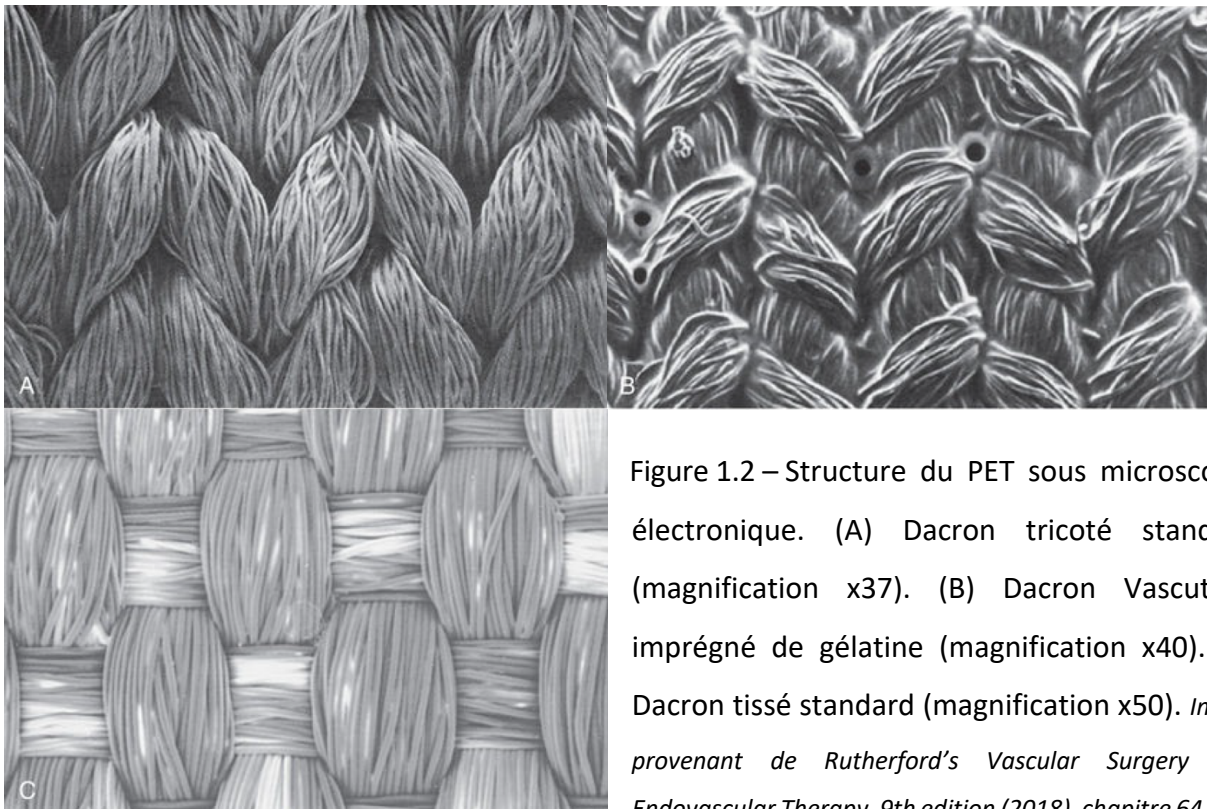


Figure 1.2 – Structure du PET sous microscopie électronique. (A) Dacron tricoté standard (magnification x37). (B) Dacron Vascutek® imprégné de gélatine (magnification x40). (C) Dacron tissé standard (magnification x50). *Image provenant de Rutherford's Vascular Surgery and Endovascular Therapy, 9th edition (2018), chapitre 64 [17].*

D'autres matériaux, tels que le polyuréthane qui est produit par la réaction d'isocyanates avec un groupe alcool, sont utilisés dans certaines situations cliniques limitées. Le polyuréthane seul est

rarement utilisé en tant que pontage vasculaire de par sa biostabilité limitée et sa perte d'élasticité après l'implantation lorsque non-combiné à d'autres matériaux [69].

Différents revêtements bioactifs ont aussi été utilisés pour diminuer la thrombogénicité des différents greffons synthétiques; la section 1.2.3.2 discute de ces modalités plus en détails.

1.1.2.3. Performance des conduits vasculaires

La performance clinique des différents conduits vasculaires est un sujet complexe de par la variabilité des définitions de « performance » utilisées dans la littérature. Les notions de perméabilité et certaines autres issues cliniques pertinentes aident à faire la différence entre une performance purement théorique et une performance ayant un impact clinique significatif.

1.1.2.3.1. Perméabilité

La perméabilité est un concept général relatif à la perméabilité d'un conduit vasculaire jusqu'à sa thrombose finale, exprimée en pourcentage par rapport au temps. Elle se divise en quatre catégories distinctes : La perméabilité primaire, la perméabilité primaire assistée, la perméabilité secondaire et la perméabilité fonctionnelle [70].

La perméabilité primaire est le temps pendant lequel le pontage demeure perméable sans intervention nécessaire pour corriger une sténose menaçant le conduit, exprimée sous forme de pourcentage de pontages ouverts par une unité de temps définie (souvent par an). La perméabilité primaire assistée est le temps pendant lequel le pontage demeure perméable en incluant toute intervention pour corriger une sténose menaçant le conduit. La perméabilité secondaire est le temps pendant lequel le pontage demeure perméable en incluant toute intervention pour corriger une sténose ou toute intervention pour ré-ouvrir un pontage occlus, jusqu'à la thrombose finale. La perméabilité fonctionnelle se réfère aux fistules artério-veineuses d'hémodialyse, et consiste en le temps, après la création de l'accès, pendant lequel la fistule est utilisée jusqu'à sa thrombose finale.

Ces notions de perméabilité décrivent plus en détails la performance clinique d'un conduit vasculaire par rapport au temps d'implantation et aident à guider le clinicien dans la sélection du bon conduit pour la bonne indication.

1.1.2.3.2. *Autres paramètres cliniques pertinents*

Différents paramètres cliniques peuvent contribuer au choix de conduit vasculaire par le clinicien. Les paramètres anatomiques, telle que les réinterventions sur le conduit pour en maintenir la perméabilité (« *target-lesion revascularization* » (TLR)), permettent d'étudier la performance absolue du conduit par l'absence d'intervention supplémentaire au-niveau du pontage initial dans le temps et sont notamment utilisées en recherche clinique pour les revascularisations cardiaques et périphériques. Les issues hémodynamiques, telles que la mesure dans le temps de l'indice tibio-brachial et les pressions digitales, permettent d'évaluer l'impact du pontage sur la perfusion tissulaire. Les issues cliniques subjectives, telles que les questionnaires de qualité de vie pré- et post-pontage, permettent d'évaluer l'impact réel du pontage sur la qualité de vie du patient. Les issues « cliniques objectives », telles que la survie sans amputation (Amputation free survival (AFS)) ou la survie sans événement cardiovasculaire majeur (Major adverse cardiac event (MACE)), sont les issues les plus pertinentes cliniquement puisqu'elles mesurent l'impact réel du pontage sur la survie du patient ou du membre revascularisé [59].

Chacun des critères d'analyse clinique discutés ci-haut ont leur utilité dans certaines situations, à la fois cliniques et en recherche, et peuvent avoir un impact sur le choix du type de pontage et sur la procédure à favoriser pour chaque patient spécifique.

1.1.2.3.3. *Comparaison entre conduits autologues et synthétiques*

Les conduits synthétiques performant bien et sont utilisés en première intention pour les vaisseaux de grand diamètre (> 6 mm) comme l'aorte (1,5-2 cm) et les artères iliaques (1-1,5 cm), fémorales communes (0,5-1 cm), sous-clavières (0,8-1,2 cm) et axillaires (0,6-1 cm). Le clinicien peut, dans ces contextes, s'attendre à des taux de perméabilité de 85 à 97% à plus de 5 ans post-implantation [72, 73]. Par contre, pour les vaisseaux plus distaux et donc plus petits, les taux de perméabilité diminuent rapidement pour atteindre des niveaux inacceptables cliniquement, par exemple au-niveau tibial où la perméabilité tombe sous la barre des 30% à 4-5 ans [3, 4, 7]. Actuellement, l'utilisation contemporaine de conduits vasculaires synthétiques pour pontages coronariens est pratiquement nulle, l'une des dernières séries de cas datant de plus de trente ans démontrant un taux de perméabilité général de 59% à 2 ans [5].

Les conduits autologues performant bien eux-aussi pour des vaisseaux de gros calibre (aorte, iliaques, fémorales communes). De plus, malgré leur moindre performance pour des vaisseaux de petit calibre, ils demeurent supérieurs par rapport aux conduits synthétiques. Les pontages mammo-coronariens sont un exemple notable, avec des taux de perméabilité de plus de 94% à 5 ans, résultat inégalé avec tout autre conduit vasculaire [65]. Les pontages infra-poplités utilisant la veine saphène interne atteignent des taux de perméabilité primaires de 68 à 75% à 4-5 ans, alors que la perméabilité des pontages synthétiques en même position atteint des taux de 12 à 56% à 4-5 ans, ce qui limite grandement leur utilité clinique [3, 4, 7].

1.1.2.4. Hypothèses relatives à l'échec des conduits vasculaires synthétiques de petit calibre

Les pontages synthétiques de petit calibre (<6 mm) sont toujours un sujet d'intenses recherches. Les alternatives synthétiques actuelles aux conduits autologues performent particulièrement mal dans ce contexte et sont conséquemment très peu utilisées. Les hypothèses principales expliquant les échecs des conduits synthétiques actuels se résument d'une part en leur incapacité à favoriser la néo-endothélialisation résultant en une plus grande thrombogénicité et d'autre part en leur faible compliance par rapport aux vaisseaux natifs favorisant l'hyperplasie néo-intimale [6, 18].

1.1.2.4.1. Faible néoendothélialisation

L'endothélium vasculaire possède de puissantes propriétés anti-thrombotiques d'une part par sa production endogène de multiples molécules vasodilatatrices, antiplaquettaires, anticoagulantes et fibrinolytiques, et d'autre part par le tapissage de la paroi vasculaire créant une séparation entre le sang et le collagène (thrombogène) de la paroi sous-jacente [12-14, 74, 75]. Le processus de néo-endothélialisation se réfère à l'habileté d'un vaisseau natif lésé ou d'un pontage à créer une nouvelle couche endothéliale. Ceci permet de réinstaurer les propriétés anti-thrombotiques endogènes normales du conduit de trois façons : par migration trans-anastomotique, par migration trans-murale et par implantation de cellules progénitrices endothéliales circulantes [82]. Les prothèses synthétiques conventionnelles de PET, ePTFE et polyuréthane ont systématiquement démontré une quasi-absence de néo-endothélialisation chez l'humain hormis

pour les quelques millimètres adjacents à l'anastomose par migration trans-anastomotique [6, 15]. Il en résulte un contact constant entre le matériel synthétique et la circulation sanguine, ce qui favorise l'activation de mécanismes pro-thrombotiques endogènes, notamment par la stimulation de la cascade de coagulation et l'activation plaquettaire. Le tout promeut l'occlusion subséquente du conduit par le débalancement de l'équilibre anti-thrombotique normalement créé par les cellules endothéliales.

1.1.2.4.2. Faible compliance

La compliance est définie comme la capacité d'un conduit à changer de volume en réponse à une variation de la pression. Chez l'humain, les artères et veines démontrent des profils de compliance différents selon leur localisation et fonction anatomique, mais demeurent de façon inhérente des conduits compliants [76, 111]. Les conduits de PET et d'ePTFE démontrent une compliance bien moindre que les vaisseaux natifs, et cette différence entre la compliance du conduit et du vaisseau natif crée un stress au-niveau des régions péri-anastomotiques favorisant la formation de d'hyperplasie néo-intimale, l'activation de mécanismes inflammatoires et ultimement l'échec du conduit [16, 18]. Les lits vasculaires périphériques offrant aussi une haute résistance au flot artériel, l'incapacité des greffons synthétiques actuels à modifier leur diamètre en fonction d'un flot résistif de ce type contribue aussi à l'échec de ces conduits dans de multiples situations cliniques [111-112].

1.2 Nouvelles approches pour améliorer la performance des conduits vasculaires synthétiques

1.2.1. Prothèses électrofilées

La construction d'un conduit vasculaire peut se faire de multiples façons. Par exemple, tel que décrit précédemment, les prothèses en Dacron sont construites à partir de fibres de PET qui sont tissées ou tricotées alors que l'ePTFE est construit à partir de l'expansion et la fibrillation de PTFE. Le conduit vasculaire présenté dans ce mémoire est basé sur l'électrofilage. Le procédé d'électrofilage est une méthode novatrice développée dans les dernières décennies pour

fabriquer des structures fibrillaires non tissés à base de nano- et microfibres. Son application dépasse la construction de pontages vasculaires. Le concept général est d'imposer un courant électrique entre une solution de polymère liquide encastrée dans un contenant avec une ouverture de taille variable et une surface de déposition, forçant le polymère à migrer vers la surface de déposition à l'induction du courant [77] (Figure1.3).

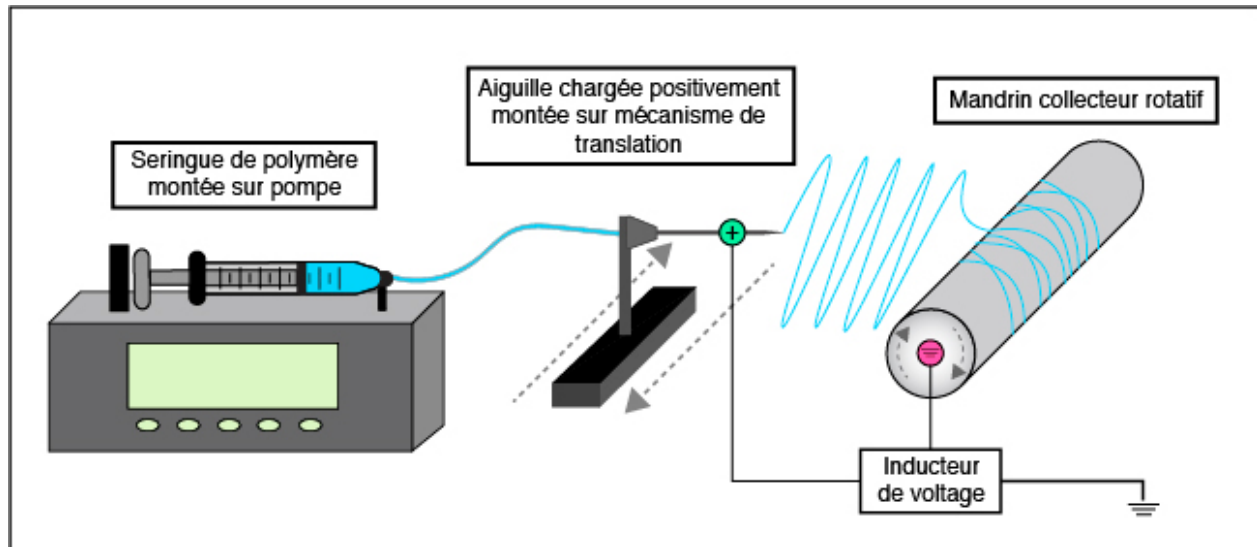


Figure 1.3 – Représentation schématique du procédé d'électrofilage général pour prothèses vasculaires tubulaires.

Plusieurs équipes ont déjà proposé l'électrofilage pour fabriquer des prothèses vasculaires permanentes ou biodégradables [19, 42, 49, 77-79, 91]. Les avantages de cette technique pour les applications vasculaires sont la possibilité de créer des réseaux de fibres aléatoires ou ordonnées ressemblant à la matrice extracellulaire, la capacité de contrôler la porosité de la paroi du conduit et la capacité de contrôler la taille des fibres [78, 79].

1.2.2. Conduits vasculaires bioactifs

1.2.2.1. Biocompatibilité

Le concept de biocompatibilité est utilisé extensivement dans le développement de matériaux biomédicaux, et se réfère globalement à la capacité d'un matériel synthétique à performer dans un individu avec une réponse de l'hôte appropriée [85]. Le concept général peut se traduire en

une multitude de caractéristiques du matériau allant des propriétés de sa surface, de son contenu en eau, de son profil de dégradation, de son interaction avec les cellules de l'hôte, de la toxicité intrinsèque du greffon et à de multiples autres caractéristiques. Un dispositif biocompatible est donc généralement défini comme un matériau qui, lorsqu'implanté chez l'humain, ne cause pas de réaction adverse (toxicité, carcinogénicité, thrombogénicité et autres) et qui permet son incorporation complète à l'hôte à long-terme. Dans le contexte d'un conduit vasculaire, il consiste en particulier à l'absence de formation de thrombose et en la création ou la favorisation de la déposition d'un endothélium tapissant sa paroi interne.

Les conduits vasculaires de PTFE et de PET (Dacron) sont des exemples de matériaux synthétiques résistants à la dégradation chez l'humain et donc parfois considérés à tort comme biocompatibles, malgré leur caractère inerte qui les exclut de la définition générale de biocompatibilité. Après l'implantation, il y a formation de thrombus dans les pores du conduit, puis remodelage avec génération d'une couche principalement composée de collagène et sans réelle néo-endothélialisation [85]. Les conduits de PTFE et de PET s'incorporent donc au milieu sans pour autant reproduire l'environnement cellulaire pour un fonctionnement intravasculaire optimal (i.e. néo-endothélialisation). Tel que mentionné précédemment, les conduits vasculaires actuels composés de polyuréthane seul sont considérés comme peu biocompatibles chez l'humain de par leur dégradation dans le temps par les mécanismes hydrostatiques et hydrolytiques endogènes [84, 85]. Par contre, certains polymères tels que le polycaprolactone ont été utilisés en combinaison à d'autres polymères pour créer des complexes avec une réponse aux atteintes endogènes plus appropriée à long-terme [86].

1.2.2.2. Revêtements bioactifs

Le concept général de revêtement bioactif pour les prothèses vasculaires est la couverture de la surface interne d'un greffon vasculaire par une mince couche moléculaire dans l'intention que cette couche crée une réaction biologique appropriée chez l'hôte. Ce revêtement peut être anti-thrombotique comme pour les revêtements à base d'héparine combinés aux conduits traditionnels de PTFE et de PET. Certaines de ces prothèses bioactives sont déjà commercialisées et les résultats cliniques demeurent mitigés, sans doute à cause de la durabilité limitée de l'effet anti-thrombotique [87-89]. Un revêtement bioactif peut aussi avoir pour but de favoriser la

création d'un néo-endothélium endogène post-implantation. Plusieurs groupes incluant le Laboratoire de Biomatériaux Endovasculaires (LBeV) ont décrit l'utilisation de nouveaux revêtements tels que le polyéthylène glycol (PEG), les dextrans carboxyméthylés (CMD) et le sulfate de chondroïtine (CS) dans les buts particuliers d'inhiber la thrombose endogène ou de favoriser la création d'un néo-endothélium chez l'humain [22, 24, 90, 99, 100].

Plus spécifiquement en lien avec ce travail, le CS, un complexe de la famille des glycosaminoglycans, a été sélectionné comme revêtement bioactif pour ce projet suite à la publication de résultats précédents encourageants par rapport à sa capacité à limiter l'agrégation plaquettaire en plus de favoriser l'adhésion de cellules endothéliales veineuses ombilicales sur la surface du matériau à l'étude [23, 24]. Toutefois, le CS demeure pour le moment de l'ordre de la recherche fondamentale et ne fait pas partie d'une gamme commerciale de conduits vasculaires bioactifs implantables chez l'humain pour le moment.

Les revêtements bioactifs commerciaux actuels ont démontré des résultats soit équivalents aux prothèses conventionnelles, soit pratiquement nuls dans le cas des revêtements « antibactériens » à base d'argent [87-89]. Les revêtements bioactifs ciblant la néo-endothélialisation, tels que le CS, sont encore majoritairement au stade de la recherche fondamentale, et démontrent des résultats prometteurs en termes de promotion de la migration de cellules endothéliales progénitrices et de migration endothéliale directe [22, 24, 90, 99, 100].

1.2.3. Conduits et stents biorésorbables

Un autre segment distinct de la recherche actuelle pour trouver un conduit vasculaire idéal est celui des conduits et des stents biorésorbables. Brièvement, de multiples groupes travaillent sur la conception de conduits à base de matériaux entièrement biorésorbables dans le but de créer une réaction vasculaire régénératrice de l'hôte [91]. L'élaboration de conduits vasculaires biorésorbables est un sujet de recherche dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et demeure de l'ordre de la recherche fondamentale pour le moment, alors que les études précliniques de certains stents biorésorbables ont déjà démontré des résultats encourageants, mais leurs résultats cliniques à moyen-terme ont majoritairement démontré soit l'absence de gain clinique ou une augmentation de la thrombose de ces structures, limitant leur utilisation actuelle [92].

1.3 Notions biomécaniques et applications chez l'humain

Avant toute étude d'un néo-conduit vasculaire chez l'humain, il est nécessaire d'étudier différents paramètres du greffon en laboratoire et chez l'animal pour confirmer sa capacité à se comporter correctement et à résister aux épreuves soumises par les contraintes physiques et biologiques de l'hôte.

1.3.1 Notions de compliance

Tel que brièvement décrit plus haut, la compliance est la capacité d'un conduit à changer de volume en réponse à un changement de pression. Le calcul de la compliance d'un vaisseau peut se faire de différentes façons, notamment par la mise en relation entre le changement de diamètre interne du vaisseau (D_i) par rapport au changement de pression (P) exprimé en

$$\%/mmHg : C = \frac{\Delta D_i}{D_i * \Delta P} * 100$$

La compliance artérielle et veineuse représente donc une mesure de l'élasticité du vaisseau étudié. Chez l'humain, les réseaux veineux sont généralement beaucoup plus compliants que les réseaux artériels et, au niveau artériel, la compliance des artères dépend de leur diamètre et de leur localisation. La paroi de l'aorte, par exemple, est riche en fibres élastiques de collagène, ce qui lui confère une élasticité particulièrement grande - cela permet à l'aorte d'atténuer la différence de pression intravasculaire entre la systole et la diastole cardiaque [80]. Les artères et artérioles plus distales sont progressivement plus musculaires et moins élastiques, leur permettant propager le volume sanguin plus directement et de réagir plus activement aux médiateurs endogènes de la vasodilatation et de la vasoconstriction [81].

Un conduit vasculaire synthétique de petit diamètre (<6 mm) idéal en termes de compliance ne reproduirait donc pas nécessairement l'élasticité d'une artère de gros calibre comme l'aorte, mais aurait une compliance s'approchant de celle d'une artère périphérique comme l'artère fémorale superficielle ou les artères tibiales.

1.3.2 Notions de résistance mécanique

La fabrication d'un conduit vasculaire doit prendre en compte la résistance du conduit à la pression artérielle, mesurée par la pression de rupture ou « burst pressure ». La loi de Laplace stipule que la « tension » (τ) sur les parois d'un conduit est proportionnelle à la pression interne (P) et au rayon (r), et inversement proportionnelle à l'épaisseur des parois (δ) du conduit [83] :

$$\tau = P \frac{r}{\delta}$$

Un conduit idéal pourra donc démontrer, pour une épaisseur donnée, une compliance assez limitée pour lui permettre de réduire la tension sur ses paroi, mais aussi une résistance mécanique intrinsèque lui permettant d'éviter la rupture lors des changements hémodynamiques physiologiques observés chez l'humain à l'atteinte de son diamètre maximal. En appliquant une pression graduellement plus haute à un même conduit, on peut donc mesurer la résistance d'un conduit à l'augmentation du stress sur ses parois peu importe la compliance et l'épaisseur de ces dernières. La pression de rupture est simplement la pression maximale supportée par le conduit avant de subir une rupture, mesurée en mmHg.

1.3.3 Notions de résistance au vieillissement

Un autre point important pour tout nouveau conduit vasculaire synthétique est sa capacité à résister à la dégradation de sa structure dans le temps pour prévenir la dégénérescence anévrysmale et ultimement la rupture du conduit. Les conduits de polyuréthane sont un exemple notable de l'importance de la résistance au vieillissement d'un conduit synthétique. Malgré leur élasticité supérieure permettant la fabrication de conduits possédant une compliance similaire à celle de vaisseaux natifs, les générations antérieures de polyuréthanes purs ont démontré une vulnérabilité particulière aux mécanismes hydrolytiques et oxydatifs endogènes chez l'humain, provoquant leur dégradation dans le temps et limitant leur application clinique [84]. Les tests de vieillissement in vitro peuvent servir d'estimation de la résistance d'un conduit synthétique dans le temps, ou simplement de leur résistance à l'épreuve du temps dans un milieu aqueux, dépendamment de l'élaboration du test.

1.4 Conduits vasculaires *in vivo* et modèles animaux

La sélection du modèle animal pour la recherche appliquée *in vivo* de conduits vasculaires est un sujet controversé. Les modèles sélectionnés par le passé ont souvent mené à plus de questions que de réponses face à leur utilisation plutôt aléatoire et pour différentes indications [6]. L'objectif clinique est crucial dans la sélection de l'animal, en débutant par la décision de sélectionner un petit animal ou un grand animal. Les petits animaux (rats, souris, lapins...) présentent majoritairement des vaisseaux de très petits calibres, idéaux pour la microchirurgie mais non adaptés à l'application de pontages vasculaires de plus de 4 mm vue l'importance d'éviter un stress anastomotique causé par la différence de taille entre le nouveau conduit et le vaisseau natif [93]. Les grands animaux, tels que les chiens, les porcs, les primates et les moutons, présentent des structures macrovasculaires de diamètres variables allant de 2 à 10 mm, permettant l'élaboration et l'implantation de greffons vasculaires de 4 à 6 mm en éliminant les incompatibilités de calibre [93]. C'est pourquoi dans ce projet, un modèle de grand animal a été choisi. Le choix entre les différents modèles de grands animaux doit ensuite s'effectuer selon les besoins de l'étude. Pour le travail actuel concernant un conduit électrofilé avec revêtement bioactif destiné à favoriser l'endothélialisation, les caractéristiques hématologiques de l'animal devaient prioritairement ressembler à celle de l'humain pour permettre une analyse de l'interaction entre le sang et la surface du conduit et surtout pour avoir une meilleure chance d'obtenir des résultats reproductibles chez l'humain (Table 1.1).

Le chien fut le modèle de grand animal le plus utilisé pour les épreuves de conduits vasculaires au 20^e siècle. Au niveau hématologique, le chien démontre toutefois un système plus différent de l'humain que le mouton et le porc. Leur système fibrinolytique est plus actif, l'agrégation plaquettaire est plus lente et le chien a démontré la capacité de créer un néo-endothélium complet sur des greffons inertes de PTFE et de PET, limitant son utilité dans le contexte d'essais sur un pontage vasculaire de petit calibre avec des propriétés pro-endothéliales qui seraient occultées par l'aptitude endogène du chien à établir un néo-endothélium seul [93, 94]. Les limitations éthiques contemporaines à l'utilisation du chien en recherche sont aussi une raison pour laquelle les études de pontages vasculaires utilisant cet animal se font plus rares.

Le porc est aussi un modèle animal fréquemment utilisé pour l'évaluation de nouveaux pontages vasculaires. Le système hématologique du porc est relativement similaire à celui de l'humain, malgré une légère tendance vers l'hypercoagulabilité, ce qui ne représenterait pas une limitation significative pour comparer la perméabilité d'un nouveau greffon avec un greffon standard [93]. Par contre, de manière similaire au chien, le porc a démontré pouvoir générer un néo-endothélium complet sur des pontages vasculaires conventionnels à 3 mois seulement, limitant son utilité dans le contexte spécifique de notre étude [95].

Les modèles de primates, particulièrement les babouins, présentent le système hématologique le plus similaire à l'humain par rapport aux autres modèles animaux de par leur capital génétique semblable à l'humain [93]. Secondairement aux limitations éthiques strictes en recherche chez ces animaux pour des raisons évidentes, leur utilisation comme modèles pour l'essai de pontages vasculaires demeure rare, avec seulement quelques séries décrivant le comportement de pontages synthétiques chez le babouin dans des contextes spécifiques [96].

Le modèle ovin, incluant moutons et chèvres, présente le système hématologique le plus similaire à l'humain après les babouins [29, 97]. Les différences notables du modèle avec l'humain sont relatives à une fibrinolyse moindre et une augmentation totale des taux de plaquettes et de leur adhésion, créant un environnement potentiellement pro-thrombogène [93]. Dans le contexte d'une étude comparative entre un nouveau conduit synthétique et un conduit synthétique conventionnel, cet environnement peut représenter un avantage de par le fait que la différence du taux de thrombose entre les conduits pourrait être plus marquée et nécessiterait donc moins d'animaux. De plus, le modèle ovin a démontré son inaptitude à développer un néo-endothélium complet à moyen-terme sur les prothèses synthétiques conventionnelles, facteur important dans l'étude de la capacité de néo-endothélialisation d'un nouveau conduit [95]. Une précaution additionnelle est toutefois nécessaire quant à l'utilisation des moutons en recherche car ils sont le principal vecteur de la fièvre Q, une infection bactérienne à *Coxiella burnetti* particulièrement dangereuse chez la femme enceinte [98].

Table 1.1 – Données physiologiques et hématologiques comparatives entre l’humain et les différents modèles de grands animaux

	Humain	Babouin	Porc	Mouton	Chien
PAM (mmHg)	95 +/- 11	107 +/- 16	102 +/- 9	114	96 +/- 7
FC (bpm)	70 +/- 14	92 +/- 13	105 +/- 10	95 +/- 24	98 +/- 18
IC (mL/min/kg)	93 +/- 20	103	99 +/- 20	115 +/- 31	88 +/- 19
Hct (%)	44,5 +/- 8	36,2 +/- 2	41	36 +/- 9	45 +/- 10
Plt (x 10 ⁹ /L)	265 +/- 135	370 +/- 105	350 +/- 150	550 +/- 250	350 +/- 150
GB (x 10 ⁹ /L)	7,4 +/- 3,4	7,1 +/- 2,1	14,8	8 +/- 4	11,5 +/- 5,5
Neutro (%GB)	50-70	44	40	30	60
Fib (g/L)	2-4	-	2-4	2-4	1-4

PAM, pression artérielle moyenne ; FC, fréquence cardiaque ; IC, index cardiaque ; Hct, hématocrite ; Plt, plaquettes ; GB, globules blancs ; Neutro, neutrophiles ; Fib, fibrinogène. Table adaptée de la revue de littérature par Byron et al. [93].

Dans le contexte du projet actuel et à la lumière de la littérature sur les modèles animaux, le choix du modèle ovin s’est imposé de par ses similarités hématologiques et son incapacité à créer un néo-endothélium significatif, rendant l’étude de notre conduit dans ce modèle idéale.

1.5 Résultats précédents de l’équipe

L’équipe du Laboratoire de Biomatériaux Endovasculaires (LBeV) localisé au CRCHUM mais affilié à l’école de technologie supérieure (ETS), en collaboration avec l’École Polytechnique de Montréal (Poly), travaille depuis les dernières années à l’élaboration d’un nouveau conduit synthétique avec un revêtement bioactif dans le but final de développer un conduit vasculaire synthétique de petit diamètre (<6 mm) rapide d’accès et avec une performance clinique acceptable, ce qui représenterait une avancée scientifique considérable.

Le premier effort relatif à ce projet fut effectué par une équipe du département de génie chimique de Poly [20] qui a développé un procédé d'électrofilage du PET (ePET) . Ils ont montré qu'il est possible de contrôler la porosité de la paroi et la largeur des fibres électrofilées en modifiant la concentration en PET de la solution liquide, la rapidité du flux et la rapidité de rotation du mandrin utilisé comme plateforme de déposition des fibres de ePET (Figure 1.4). Leur travail a aussi pu démontrer l'importance de la largeur des fibres de ePET sur la force tensile de la surface créée.

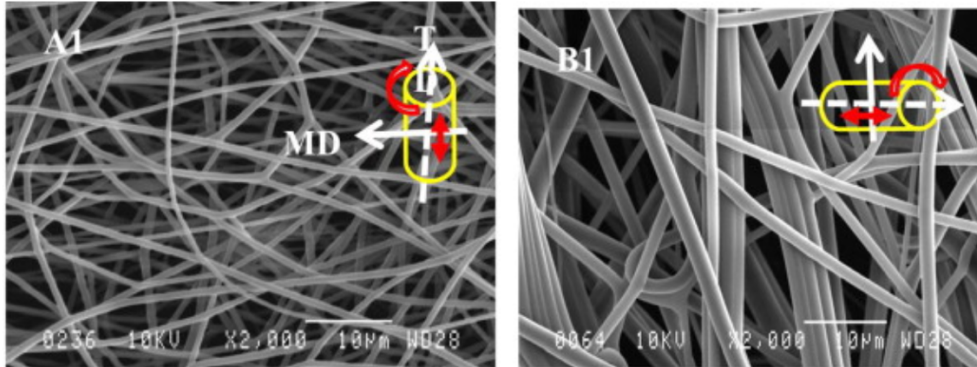


Figure 1.4 – Différentes largeurs de fibres électrofilées de PET représentées au microscope électronique selon la concentration en PET de la solution initiale, soit (A1) 9% (w/v) ou (B1) 12,5% (w/v) (échelle 10 μm). Images provenant de l'article de Hadjibadeh A. et al. [20].

En parallèle, l'équipe des professeurs Wertheimer et Lerouge à Poly a développé des revêtements fins riches en amines primaire par le biais de la polymérisation plasma. Ils ont ensuite démontré que ces couches minces appelées *nitrogen-rich low-pressure plasma polymerized* (L-PPE :N) peuvent être déposées sur des surfaces planes de ePET [22], sans altérer les propriétés mécaniques du matériaux. Elles permettent aussi de mieux retenir les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC) cultivées à leur surface. Leur comparaison par ensemencement d'HUVEC entre des surfaces de PET tissé commercial sans ou avec revêtement de L-PPE:N, de ePET seul et de ePET avec revêtement de L-PPE:N a pu démontrer un greffage des cellules endothéliales plus important pour les greffons avec revêtement et le profil favorable de recouvrement superficiel en cellules endothéliales du ePET par rapport au PET tissé (Figure 1.5). Dernièrement, les auteurs ont pu prouver que les cellules endothéliales greffées sur une surface de ePET/L-PPE:N résistaient mieux à un flot laminaire continu que celles greffées sur une surface

de ePET seul, confirmant l'impact positif du L-PPE:N sur la solidité du lien entre les HUVEC et l'ePET. Cependant le L-PPE :N, avec sa forte concentration en amines primaires, est thrombogène.

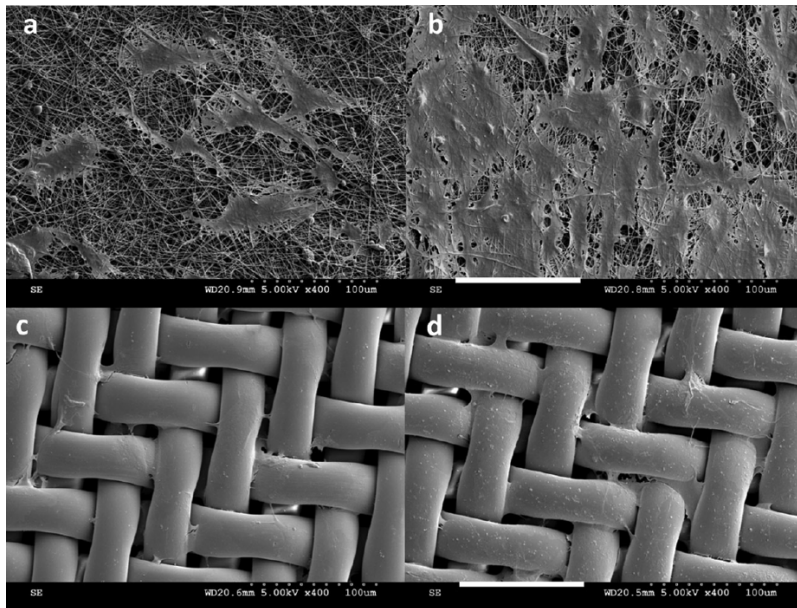


Figure 1.5 – Représentations au microscope électronique de l'ensemencement en HUVEC de différentes surfaces sans ou avec revêtement de L-PPE:N après 21 jours d'incubation : (a) ePET; (b) ePET + L-PPE:N; (c) PET tissé commercial; (d) PET tissé commercial + L-PPE:N (échelle 100 μ m). Images provenant de l'article de Savojsi H. et al. [22].

Le LBEV a donc proposé de greffer du sulfate de chondroïtine (CS) au même revêtement de L-PPE:N précédemment décrit [23] dans le but de générer un revêtement bioactif non thrombogène et favorisant tout de même l'adhésion des cellules endothéliales. Le but de leur étude était de comparer la performance du CS à des revêtements bioactifs pro-endothéliaux utilisés dans la littérature, soit le CMD et le PEG [99, 100]. Ils ont d'abord pu démontrer le greffage covalent adéquat des trois polymères sur la couche de L-PPE:N. Ils ont ensuite confirmé que le revêtement de L-PPE:N-CS réduisait l'absorption de fibrinogène comparativement au revêtement L-PPE:N seul. Cette démonstration sous-tend le potentiel anti-thrombotique du revêtement en L-PPE:N-CS puisque le fibrinogène, une molécule endogène chez l'humain, est crucial dans la cascade d'agrégation plaquettaire et dans la formation organisée du clou plaquettaire [101]. Le revêtement de L-PPE:N-CS a aussi démontré une meilleure adhésion et une croissance supérieure des HUVEC comparativement au PET seul et aux revêtements de PEG et de CMD, tout en étant similaire au revêtement de L-PPE:N seul. La sommation des preuves de ce travail indique donc

que le revêtement L-PPE:N-CS présente une plus grande activité anti-thrombotique en plus de préserver une adhésion et une rétention des cellules endothéliales similaire au revêtement de L-PPE:N seul. Ce revêtement bioactif représente donc les qualités théoriques idéales à l'élaboration d'un conduit de petit diamètre avec le double potentiel de promouvoir la néo-endothélialisation tout en demeurant anti-thrombotique.

Les résultats des trois précédents travaux ciblaient donc la première hypothèse d'échec des conduits synthétiques de petit diamètre (<6 mm), soit l'absence de néo-endothélialisation des conduits actuels. Ils ne répondent cependant pas au deuxième concept lié à l'échec de ces conduits, soit la faible compliance des conduits à base de PET et de PTFE actuellement disponibles (section 1.1.2.3.4). Le dernier effort relatif à ce travail provient d'une quatrième étude par Mélusine Bouchet et le groupe du LBeV et tente de répondre à ce critère crucial dans l'élaboration du conduit synthétique avec des propriétés biomécaniques idéales, notamment en termes de compliance par rapport aux vaisseaux natifs et de résistance à la rupture. Leur travail a consisté en l'élaboration de conduits tubulaires électrofilés tels que décrit ci-haut, mais en utilisant comme polymère primaire une solution de polyuréthane/polycaprolactone (PU/PCL) au lieu du PET [25]. Le PCL seul étant biodégradable, la sélection du PU à l'étude fut cruciale de par la vulnérabilité intrinsèque de certaines générations précédentes de PU aux mécanismes hydrolytiques et oxydatifs endogènes chez l'humain (voir section 1.2.2.3). Il a été démontré qu'un changement de composition du polyuréthane en y ajoutant du 4,4'-diisocyanate de diphenylméthylène (MDI) résultait en une résistance à l'hydrolyse de ces polyuréthanes [102]. C'est donc ce type de polyuréthane qui fut utilisé pour la solution de PU/PCL décrite dans cette étude. Le polymère de PU/PCL électrofilé pour former un conduit tubulaire de petit diamètre (6 mm), comparé à une prothèse de PTFE commerciale de même taille, a pu démontrer une compliance (0,036%/mmHg) s'approchant de celle d'une artère coronaire humaine (0,0725%/mmHg) [110] et environ 10 fois supérieure au PTFE à des pressions physiologiques (80-120mmHg). Le conduit de PU/PCL a aussi démontré une pression de rupture supplantant les résultats cliniques acceptables, confirmant son potentiel en tant que conduit vasculaire idéal en termes de propriétés biomécaniques.

CHAPITRE 2 – OBJECTIFS DU PROJET

La littérature décrite dans le chapitre précédent met en lumière le besoin d'un conduit vasculaire synthétique de petit diamètre (< 6mm) démontrant des résultats cliniques supérieurs aux options actuelles (PET, PTFE) dont l'utilité et l'utilisation dans ce contexte clinique est quasi-nulle étant donné leur piètre performance. Les hypothèses d'échec de ces pontages synthétiques, soit le manque de néo-endothélialisation des conduits disponibles et leur faible compliance par rapport aux vaisseaux natifs, ont guidé l'avancée des recherches effectuées par l'équipe conjointe du LBeV et de Poly. L'élaboration d'un nouveau conduit électrofilé de petit diamètre composé d'un polymère plus compliant (PU/PCL) et doté d'un revêtement bioactif (L-PPE:N-CS) permettant la néo-endothélialisation du greffon après l'implantation est la suite logique des travaux présentés au chapitre précédent. Le travail présenté dans l'article ci-dessous est le fruit d'une collaboration entre Mélusine Bouchet et Marion Maire, chargées de l'élaboration et la caractérisation du néo-conduit, et William Fortin chargé de la conception et de l'exécution d'un essai *in vivo* permettant de tester la performance du greffon dans des situations s'apparentant le plus possible à l'environnement physiologique humain.

L'**objectif général** de ce projet de maîtrise était donc d'élaborer un essai *in vivo* sur grand animal permettant d'étudier le comportement du néo-conduit dans un environnement similaire à l'humain et de le comparer aux conduits synthétiques standards utilisés présentement.

L'**hypothèse générale** de ce projet était d'abord que le conduit bioactif à l'étude surpasserait le conduit de contrôle et, plus spécifiquement pour ce projet de maîtrise, que l'essai élaboré permettrait d'abord d'établir des conclusions reproductibles de la performance du conduit chez l'animal et ensuite que les résultats seraient transposables chez l'humain.

2.1 Objectifs et hypothèses spécifiques

Les objectifs spécifiques relatif à ce projet sont :

- 1- Sélectionner un modèle vasculaire sur grand animal pour l'étude d'un nouveau greffon vasculaire synthétique avec des contraintes physiques et biologiques qui s'apparentent à celles subies par un pontage vasculaire implanté chez l'humain
- 2- Établir un modèle d'étude adéquat pour la comparaison entre un nouveau greffon vasculaire synthétique et le standard actuel
- 3- Compléter un essai *in vivo* sur grand animal permettant d'ériger des hypothèses et conclusions significatives sur la performance du néo-conduit à l'étude par rapport au meilleur conduit actuellement disponible en clinique.

Les hypothèses spécifiques à ces objectifs sont :

- a) Le modèle vasculaire sur grand animal choisi permettra de reproduire adéquatement les contraintes physiques et biologiques qu'un pontage subit lorsqu'implanté chez l'humain
- b) Le modèle d'étude sélectionné permettra la comparaison adéquate du néo-conduit par rapport au standard actuel
- c) L'essai *in vivo* sur grand animal permettra l'élaboration d'hypothèses et de conclusions significatives par rapport à la performance du greffon à l'étude comparativement au meilleur conduit vasculaire synthétique actuellement disponible en pratique clinique.

CHAPITRE 3 – ARTICLE

Design and in vivo testing of a compliant and bioactive electrospun polyurethane vascular prosthesis

Bouchet Mélusine*^{1,2,3}; Fortin William*^{2,5,6} (co-first author); Maire Marion^{1,2}; Héon Hélène²; Ajji Abdellah^{3,4}; Soulez Gilles^{1,6,7}; Therasse Eric^{6,7}; Lerouge Sophie^{&1,2,7}

¹Department of Mechanical Engineering, École de technologie supérieure (ÉTS), Montreal, QC, H3C 1K3, Canada

²Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC, H2X 0A9, Canada

³CREPEC, Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montreal, Montreal, QC, H3C 3A7, Canada

⁴Institute of Biomedical Engineering, École Polytechnique de Montréal, Montreal, QC, H3C 3A7, Canada

⁵Department of surgery, division of vascular surgery, Centre Hospitalier de l'Université de Montreal (CHUM), Montreal, QC, 1051 Sanguinet Montreal, H2X0C1, Canada

⁶Department of Radiology, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), 1051 Sanguinet Montreal, QC, H2X 0C1, Canada

⁷Department of Radiology, Radiation Oncology and Nuclear Medicine, Faculté de Médecine, Université de Montréal, 2900 Bvd Edouard Montpetit, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada,

* : Equivalent contribution to the work

& : Corresponding author

Article soumis pour publication dans «Materials Science and Engineering : C», novembre 2020

3.1 Contexte de l'article

Cet article constitue la réponse aux objectifs spécifiques décrits précédemment (voir section 2.1). L'élaboration des prothèses et leur analyse biomécanique furent réalisées par M. Bouchet, le greffage de CS fut réalisé par M. Maire et l'élaboration et l'exécution de l'essai *in vivo* furent effectués par W. Fortin.

Les résultats de cet article ont été présentés aux conférences Expo Hightex (2017), Canadian Biomaterials Society Annual Meeting (2017), ainsi qu'au Congrès des étudiants, stagiaires et résidents du CHUM (2017) et au congrès des Entretiens Vasculaires (2018).

3.2 Abstract

There is a growing need for small-diameter (< 6 mm) off-the-shelf synthetic vascular conduits for different surgical bypass procedures, with current synthetic conduits showing unacceptable thrombosis rates. Tubular vascular conduits made of a scaffold of polyurethane/polycaprolactone (PU/PCL) combined with a bioactive coating based on chondroitin sulfate (CS) were created using electrospinning and plasma polymerization. The rationale was to build vascular grafts with better compliance compared to standard synthetic conduits and with an inner layer stimulating endothelialization while remaining antithrombogenic. *In vitro*, the novel small-diameter (5 mm) electrospun bioactive vascular grafts (eVG-CS) showed 10-times more compliance compared to commercial expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) conduits while maintaining adequate suturability and burst pressure profiles. The conduits also proved to be stable over 6-month ageing tests in a 37°C saline solution. *In vivo*, eVG-CS grafts were compared to ePTFE grafts in ten sheep in bilateral carotid interposition bypasses. The study was terminated after eVG-CS bypass grafts showed to be inferior compared to their ePTFE counterparts. The inability of the experimental conduits to perform well *in vivo* despite promising *in vitro* results will require further investigation, but may be related to the low porosity of the grafts and the lack of rapid endothelialization despite the presence of the CS coating. . Further research is warranted to explore ways to improve this combination of electrospinning and PU/PCL scaffold in order to promote native endothelialization while being resistant to strenuous conditions such as those seen in real-life situations.

KEYWORDS

Small diameter vascular graft, electrospinning, surface modification, compliance, *in vivo* study, chondroitin sulfate

3.3 Introduction

With ageing of the population and the growing prevalence of coronary and peripheral vascular disease, an increasing number of patients necessitate revascularization procedures [1, 2]. Although many vascular obstructions can be treated by endovascular interventions, surgical bypass grafting remains the only viable option in a large number of cases. In these instances, in the absence of adequate autologous grafts, synthetic conduits are used to bypass the diseased vessel. They reinstate blood flow with acceptable patency rates, as long as the conduit itself possesses an internal diameter greater than 6 mm [3-5]. However, despite significant efforts by several research groups worldwide, there is still no small-diameter (< 6 mm) prosthetic vascular graft showing acceptable patency rates for aorto-coronary and peripheral bypasses [6-11].

Different explanations were given for the failure of synthetic small-diameter bypasses. The lack of significant endothelialization shown by woven polyethylene terephthalate (PET - Dacron) and expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) grafts in humans has been put forward as a crucial point explaining their thrombogenicity [12-15]. Another explanation for bypass graft failure is the low compliance of the synthetic grafts. The compliance mismatch between native and graft material has been shown to promote intimal hyperplasia at the anastomoses and thrombus formation [16-18].

Hence, our hypothesis was that a permanent synthetic bypass conduit promoting endothelialization and with a compliance close to native human vessels could reduce graft failure. Based on these concepts, a novel approach combining electrospinning of polymers and bioactive coatings was developed.

Electrospinning is an alternative process for the fabrication of fiber mats and conduits. It can be used to produce nanofibers structures, either randomly arranged or aligned, and thus create porous scaffolds mimicking the morphology of the extracellular matrix of native vascular structures [19-21]. In this study, it was decided to use nanofibers with a diameter around 500 nm based on a previous *in vitro* study showing that electrospun PET (ePET) mats (mean fiber diameter of 550 nm) promoted the formation of a monolayer of endothelial cells (EC) when compared to

conventional woven PET conduit materials where cell invasion through the graft did not favor the formation of a continuous EC monolayer on their intraluminal surface [22].

More recently, the combination of these mats with a bioactive coating made of a thin plasma-polymerized film covered by chondroitin sulfate (CS), a glycosaminoglycan with anti-platelet and pro-endothelial adhesion properties, was shown to promote the formation of a complete and flow-resistant EC monolayer [22-24]. However, electrospun PET still presents low compliance compared to native vessels. To solve this issue, our team hereby introduced an electrospun and similarly coated tubular structure made of a combination of polyurethane (PU) and polycaprolactone (PCL) (90%/10%). This blend was selected over PET for its better mechanical properties, as it demonstrated a Young's modulus and a compliance closer to that of native arteries compared to other commercial solutions[16, 25-27]. The aim of this study was to produce these bioactive electrospun tubular scaffolds, to characterize their structures and mechanical properties as well as stability *in vitro*, and finally to perform a pilot *in vivo* experiment to assess the suturability, patency and endothelialization of these bioactive vascular grafts in comparison with commercial grafts in a sheep model.

3.4 Materials and Methods

3.4.1. Grafts Production

3.4.1.1. Materials

PU (polyurethane, MDI-polyester/polyether polyurethane, CAS 68084-39-9), PCL (polycaprolactone, Mn = 80,000), PEO (polyethylene oxide, viscosity average molecular weight Mv = 600,000) and chondroitin sulfate (CS) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Co., as well as the chemicals, tetrahydrofuran (THF), N,N-Dimethylformamide (DMF), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS) and 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES). Ethylene (C₂H₄, 99.5 %) and ammonia gas (NH₃, 99.99 %) were obtained from Air Liquide Canada (Montreal, QC, Canada). A conventional

commercially available vascular prosthesis in carbon-coated ePTFE (Impra Carboflo[®], Bard Peripheral Vascular Inc., Tempe, AZ, USA) was selected as a control.

3.4.1.2. Electrospinning

PU/PCL tubular scaffolds were fabricated using an electrospinning setup with a 6-mm diameter rotating mandrel. Briefly, a thin layer of a 3 wt% PEO solution was electrospun on the mandrel, followed by the electrospinning of 3.4 mL of a PU/PCL solution (8 wt% consisting of a mix of 90 % PU/10 % PCL (w/w) dissolved in a 1:1 mix of THF and DMF) at a rate of 0.15 mL.h⁻¹. The power supply provided a constant voltage of 12 kV between the 21G needle in translation and the rotating drum. Detailed electrospinning parameters were described elsewhere [25]. These electrospinning parameters and the thickness of the scaffolds (145 μm) were chosen based on previous work [25] showing that this thickness enables to get adequate impermeability and burst resistance, as well as good handling properties. At the end of the process, the mandrel was immersed in EtOH 50 % in order to dissolve the PEO layer allowing to retrieve the electrospun vascular graft, hereafter called eVG.

3.4.1.3. Bioactive coating (Plasma-polymerization and Chondroitin-Sulfate Coating)

The bioactive coating was created as already described in detail earlier [23, 24]. First, a thin layer of primary amine-rich coating, designated as L-PPE:N, was deposited through plasma deposition on the surface of the grafts in a low-pressure capacitively coupled radio frequency (r.f., 13.56 MHz) glow discharge plasma reactor using ethylene (C₂H₄) and ammonia (NH₃) with flow rates of 20 sccm and 15 sccm respectively. The deposition was performed at 80 Pa pressure under mild conditions (power, P=15W) during 15 minutes to form a coating of about 100 nm thickness.

After inside-out turn of the prosthesis, CS was covalently grafted on amine groups via a carbodiimide chemistry (EDC/NHS), as previously reported [28]. In brief, the tubular scaffolds were immersed in a solution containing 0.01 g.mL⁻¹ CS, 40% v/v EtOH, 50 mM MES, 22.8 mM EDC

and 4.6 mM NHS during 1h at room temperature before rinsing once with PBS and twice with Milli-Q water. The final product is hereafter called eVG-CS.

3.4.1.4 Grafts preparation for in vivo tests

All prostheses were cut to a 7cm-length. The ePTFE prostheses were prepared under sterile conditions under a hood and kept in a closed sterile pouch until use. eVG-CS were wrapped in peel pouches and sterilized by V-PRO maX low temperature system (Steris).

3.4.2. Grafts Characterization

3.4.2.1. Composition, morphology and permeability

Fiber morphology was determined by scanning electron microscopy (SEM; TM3030Plus instrument, Hitachi, Tokyo, Japan) after deposition of a 20 nm-thick layer of chromium conductive coating. Diameters were measured through ImageJ software (NIH, USA) analysis, based on about 200 different fibers. Pore size was calculated for ePTFE and eVG-CS materials.

The CS grafting on eVG was verified through the analysis of surface composition by X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). Surveys (0-1200 eV) were acquired normal to the surface with a VG ESCALAB 3MkII instrument, using nonmonochromatic Mg K α radiation. Charging was corrected by referencing all peaks with respect to the carbon (C 1s) peak at binding energy of 285.0 eV. Quantification of the constituent elements was performed using Avantage v5.979 software (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) after Shirley-type background subtraction. Since CS contains sulfate groups, atomic concentrations of sulfur were determined at the samples surfaces to confirm the grafting, in comparison with uncoated samples.

The chemical composition of electrospun scaffolds was also characterized by attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy (Spectrum GX, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). All spectra were taken in the spectral range by the accumulation of 32 scans

with a resolution of 4 cm^{-1} , and were compared to the spectra of pure PU and PCL pellets. At least three surfaces were analyzed for each condition.

The permeability of eVG-CS was quantified by fitting the grafts in a BioDynamic® chamber of an ElectroForce® 3200 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) and connecting them to a water flow system. Water pressurized at 120 mmHg was circulated to the grafts and the fluid permeating through their walls was collected for 15 minutes. The water permeability was calculated according to the ANSI 7198 standard [29], using the equation: $P_w = Q/A$, where P_w is the water permeability of the tubular scaffold (expressed in $\text{mL}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$), Q is the flowrate of the permeated volume during the test and A is the graft area allowing the permeation in the sample holder.

3.4.2.2. Mechanical Characterization

A uniaxial tensile testing machine (ElectroPuls™ E3000, Instron®, Illinois Tool Works Inc., Norwood, MA, USA) equipped with a 250 N load cell was used for evaluating tensile properties in the circumferential direction, as well as the suture retention strength.

Tensile tests were performed according to the ASTM D882-12 [30], with some modifications. The initial gage length was set to 4.5 mm and the strain rate was of 10 %/min. eVG-CS were cut into rectangular samples in the longitudinal direction and strips with a 5 mm width from at least four different samples were tested. Elastic modulus and tensile strength were calculated through engineering stress-strain curves.

The suture retention strength was determined using strips of eVG-CS with a 15 mm width. The sample was threaded with 7-0 Prolene® Polypropylene suture (Ethicon US, LLC, Cincinnati, OH, USA) at 2 mm from its edge. The suture was pulled at a constant rate of 100 mm/min parallel to the longitudinal axis of the prosthesis. The suture retention strength is defined as the force required to pull a suture from the prosthesis or cause the wall of the prosthesis to fail [29], namely the peak force obtained during this procedure.

At least three different samples were tested for each kind of test.

3.4.2.3. Ageing

To evaluate possible degradation of the constitutive material of the grafts, bare electrospun tubular scaffolds were kept at 37°C in a saline solution during 1, 3 and 6 months. At each time point, the following characteristics were measured: fiber diameters, elastic modulus in the circumferential direction, chemical structure (ATR-FTIR), as well as the graft weight (NewClassic MF Analytical Scale balance with 0.1 mg resolution, Mettler-Toledo Inc., Columbus, OH, USA) after drying.

3.4.3. *In vivo* Implantation

3.4.3.1. Study Design

In this study, experimental electrospun grafts with bioactive coating (eVG-CS) were compared with commercially available ePTFE prostheses. Both grafts were implanted as bilateral end-to-end common carotid bypasses in ten sheep, ePTFE graft serving as a control. Each conduit's (experimental or ePTFE) implantation side (left or right common carotid artery) was randomly selected at the beginning of the study.

3.4.3.2. Animal Selection and Care

The sheep was selected for this study because of its suitable target vessels diameters (common carotid, 5-7 mm) for small-diameter vascular graft implantation and its coagulation system resembling most the human's when compared to other large animals [31]. Animal surgical procedures and follow-up studies were approved by the institutional animal care committee at the Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and the Canadian Council on Animal Care. The study was conceived accordingly to the ARRIVE guidelines [32]. Ten mixed breed (Polled Dorset cross Rideau Arcott, Alpha Ovine, Norwood, ON, Canada) female sheep (26-39 Kg) were used in this study. All animals were kept in acclimation at least one week prior to graft implantation.

3.4.3.3. Surgical Protocol

Each animal was given 80 mg of acetylsalicylic acid (Pharmascience Inc., Montreal, QC, Canada) per day for three days preoperatively. After overnight fasting, the sheep were led to the operating theater. Complete anesthesia protocol is available in the supplemental material section (Appendix B).

Surgical exposition of both common carotid arteries was led via a single longitudinal median neck incision. The left carotid artery was systematically approached first and dissected over a 7-cm segment. Heparin (250 Units/Kg, Heparin USP, Sandoz, Boucherville, QC, Canada) was given intravenously 2 to 5 minutes prior to carotid clamping. Following resection of a 5.5 cm long carotid segment, the randomly selected 5.5-cm long vascular graft (eVG-CS or ePTFE) was anastomosed in an end-to-end fashion, using 7-0 polypropylene running sutures. Flushing of the neo-conduit was done via a 26-gauge needle before definitive reestablishment of blood flow. Implantation of the contralateral graft was done in a similar fashion. After careful hemostasis, closure of the wound was done in a conventional manner. Both implanted grafts are shown on Figure 3.1.

Each sheep received low-molecular-weight heparin (40 mg, Enoxaparin sodium solution, Lovenox®, Sanofi-Aventis Canada Inc., Laval, QC, Canada) every day for three days post-operatively and were then given acetylsalicylic acid (80 mg) every day until the end of the study.

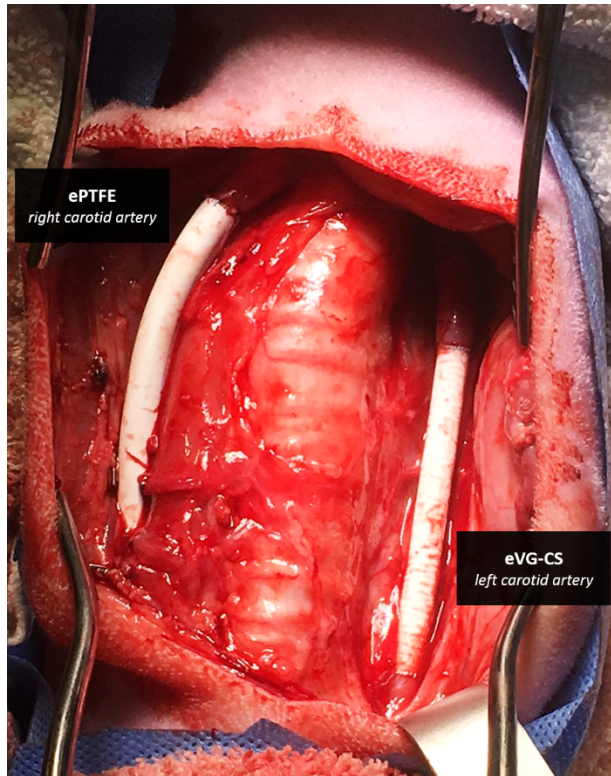


Figure 3.1 – *In vivo* implantation of eVG-CS and ePTFE grafts as bilateral carotid bypass.

3.4.3.4. Ultrasonographic Follow-up

A duplex ultrasonographic study was performed preoperatively on the first sheep for baseline information on velocities, and a standardized echographic follow-up protocol was planned on each graft at different timelines: immediately post-operative, at 1 week, 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks (prior to sacrifice). Peak systolic velocity and ratio measurements were measured systematically on five different sites, including the perianastomotic segments.

3.4.3.5. Animal Sacrifice and Graft Analyses

Sheep were euthanized by IV sodium pentobarbital (108 mg/kg, Euthanyl Forte, Bimeda-MTC Animal Health Inc., Cambridge, ON, Canada). Before harvesting, prostheses were infused with a saline solution for 5 minutes, followed by a formalin solution for 5 minutes. In case of occluded grafts, no irrigation was performed in order not to disrupt the intraluminal content. All explants (20; 10 eVG-CS, 10 ePTFE) were analysed qualitatively for macroscopic appearance, then were

immersed in a formalin solution and stored at 4°C. Each graft was subsequently cut into different axial and longitudinal sections, then embedded in paraffin and stained with hematoxylin phloxine saffron (HPS).

3.4.3.6. Study Termination

The study was terminated nine weeks after its initiation, following several duplex ultrasound follow-up results showing poor patency of the experimental grafts compared to ePTFE controls.

3.4.4. Statistical Analysis

All quantitative *in vitro* results were obtained from at least three independent experiments. Data were expressed as the mean \pm SD. Statistical tests were carried out through GraphPad Prism Software Version 7.0 (San Diego, CA, USA) using Kruskal-Wallis's test or unpaired t tests with Welch's correction when comparing two groups only. A Fisher's test was used to compare the *in vivo* patency of both prostheses. P values of less than 0.05 were considered significant.

3.5 Results

3.5.1. *In vitro* Characterization

Electrospun grafts were observed by SEM and showed nanofibers with a random orientation (Figure 3.2) and a mean diameter of 523 ± 93 nm in the bare state. No significant difference was observed after the addition of the bioactive coating on the grafts (533 ± 57 nm, $p = 0.08$). The mean pore diameter was evaluated at 1.8 ± 0.8 μm with the fitting ellipse method (the average for the major axis and the minor axis are respectively 2.4 ± 0.7 μm and 1.2 ± 0.4 μm). The thickness of eVG-CS mats was 148 ± 23 μm , while ePTFE graft was almost 5-fold thicker with an average of 692 ± 28 μm for its wall. A typical node-fibril microstructure was observed with internodal

distances, described as pore size [33], of 17 ± 6 and 20 ± 7 μm for the inner and outer layers, respectively.

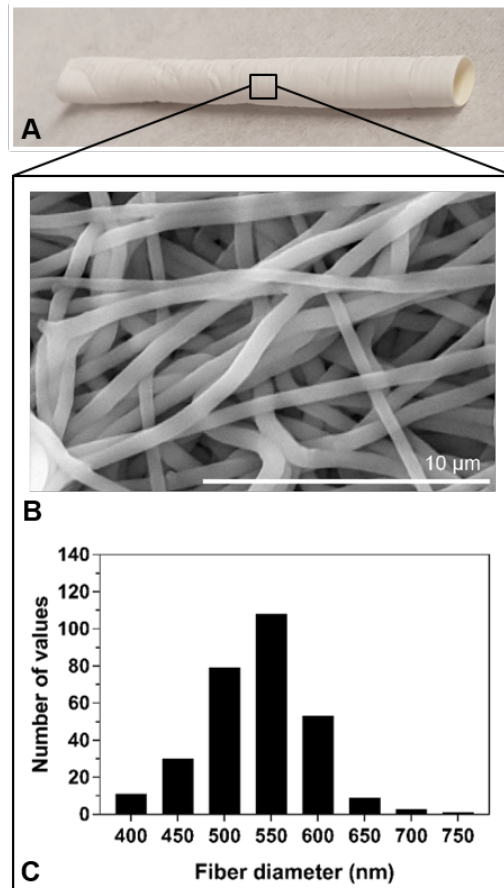


Figure 3.2 – (A) Digital image of the graft. (B) SEM image of the nanofiber mat from eVG nanofiber mat (scale bar: 10 μm). (C) Distributions of fiber diameters for coated grafts. There was no difference between bare and coated materials.

An average sulfur concentration of 1.3 ± 0.2 % was measured at the surface of coated electrospun grafts through XPS technique, while no sulfur was found on bare grafts. This was consistent to previous results on electrospun PET [24, 34] and confirmed the presence of CS at the intraluminal surface of eVG-CS.

Tensile testing of circumferential samples of eVG and eVG-CS demonstrated their quite linear elastic behavior until rupture (Figure 3.3), with a similar Young's modulus (4.6 ± 0.9 MPa and 4.7 ± 1.0 MPa for bare and coated materials, respectively). eVG-CS exhibited a slightly higher tensile strength compared to eVG mats (14.3 ± 2.8 MPa and 10.0 ± 1.7 MPa, respectively, $p = 0.04$).

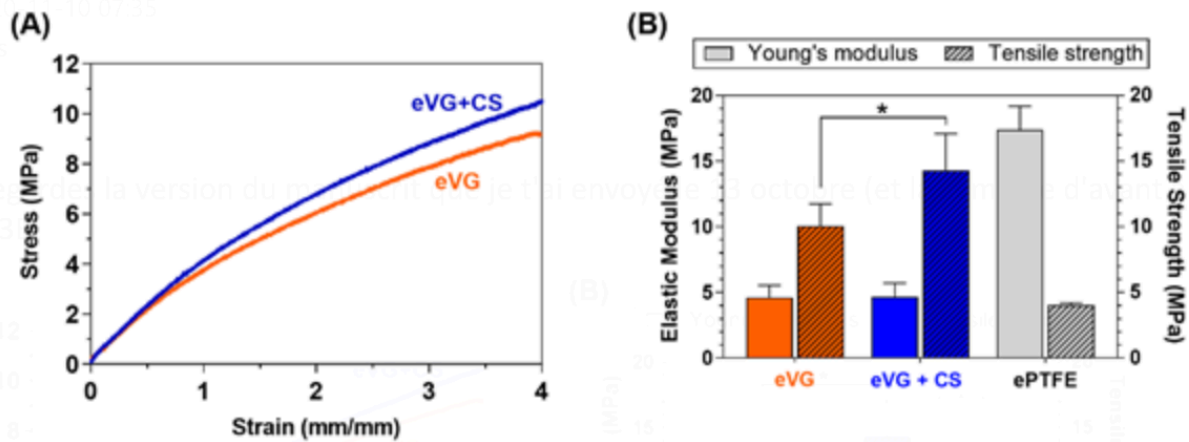


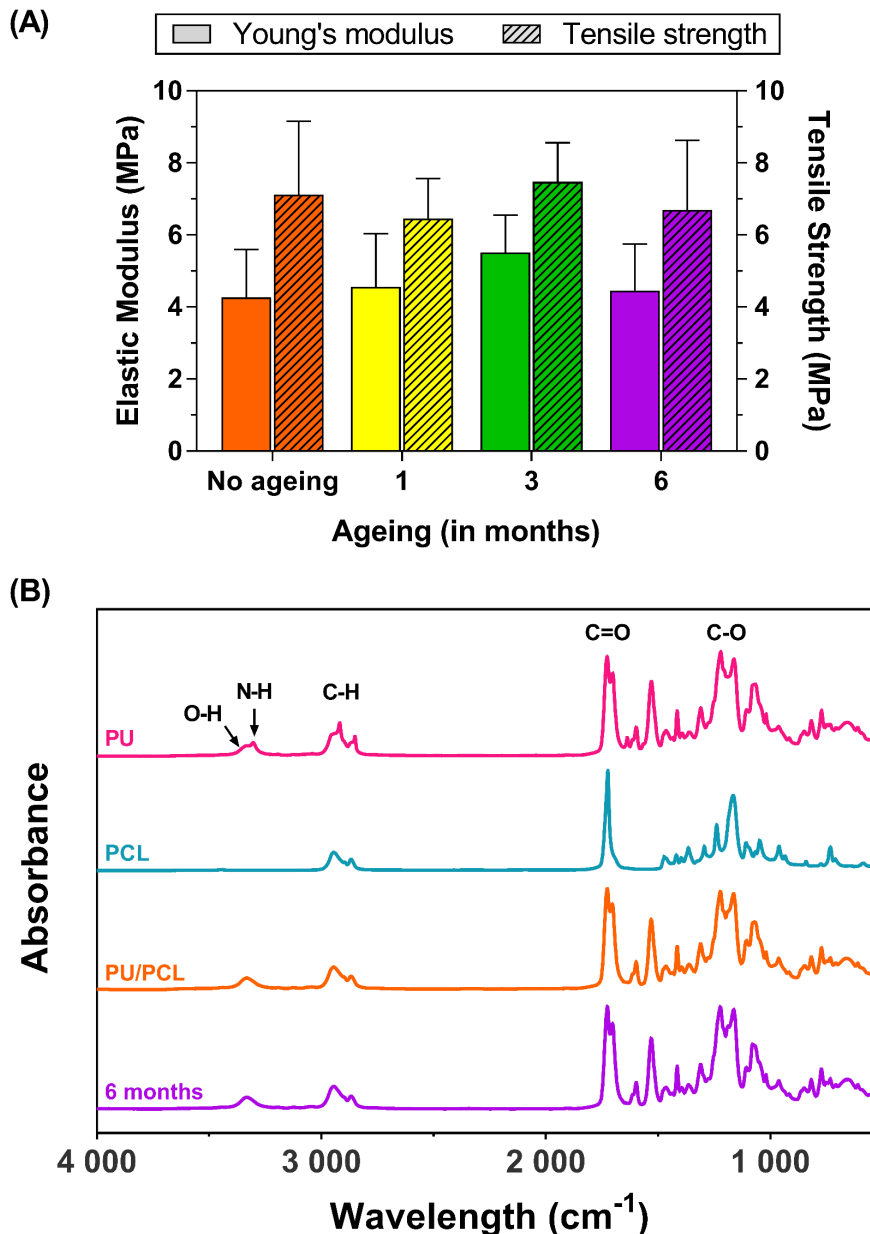
Figure 3.3 – Mechanical properties of eVG and eVG-CS grafts. (A) Representative engineering stress-strain curves from circumferential tensile testing. (B) Mean elastic modulus and tensile strength, in comparison to ePTFE grafts (n=13).

These values are close to those found in our previous study for bare eVG (mean $E = 3.9 \pm 0.4$ MPa) for which the compliance was measured to be of 0.0360 ± 0.0018 %/mmHg at the 80-120 mmHg pressure range [25], which is 10 times higher than commercial ePTFE prostheses (0.0033 ± 0.0005 %/mmHg [25], 0.0026 ± 0.0009 %/mmHg [35]). As the compliance is correlated with the elastic modulus [36], we can expect the compliance of eVG-CS to be in the same order of magnitude.

Besides, as for bare grafts [25], the water permeability of eVG-CS remained with values below $0.002 \text{ mL}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$, meaning that the addition of the CS hydrophilic coating on the lumen surface of prostheses didn't increase their permeability.

Suture retention strength was measured in the longitudinal direction with an average value of 2.72 ± 0.56 N (min-max: 2.03-3.88 N), which is higher than the generally accepted threshold value for implantation, namely 2 N [37].

No discernable weight loss was detected through 6-month ageing of electrospun mats in saline, as well as no changes in their morphology and in the distribution of fiber diameters (See Appendix A). Tensile tests also showed that the elastic modulus and the tensile strength of eVG remained stable during the 6-month ageing period (Figure 3.4A). FTIR analysis confirmed the presence of both PU and PCL in the electrospun PU/PCL scaffolds. No differences were observed between spectra taken over the 6-month ageing period (Figure 3.4B).



3.5.2. *In vivo* Operative Outcomes and Animal Management

A total of 10 sheep were operated as per protocol. Mean carotid cross clamp time was significantly lower for eVG-CS grafts compared to ePTFE grafts (46.6 ± 12.5 minutes vs 60.0 ± 8.0 minutes, $p < 0.001$), probably due to the ease of handling and suturability of the thin electrospun grafts. All grafts were successfully anastomosed to their intended native carotid artery and were free from any visual defect at the time of wound closure.

Three sheep were euthanized or died in the immediate postoperative period - one from perioperative cerebral anoxia attributed to persistent desaturation at the time of carotid cross clamping, and two from respiratory distress attributed to a laryngeal dysfunction secondary to cervical dissection. One sheep was sacrificed at 4 weeks after surgery secondary to persistent respiratory obstruction, and the remaining six sheep were sacrificed at 5-to-8 weeks after surgery (see Table 3.1), at the time of the termination of the *in vivo* study.

3.5.3. Ultrasonographic Baseline and Follow-up Data

All 10 animals underwent immediate post-operative duplex ultrasound as per protocol, and all eVG-CS grafts were patent and free from any apparent thrombus or stenosis. Doppler signal was absent in ePTFE grafts in the immediate postoperative period, because of the attenuation of the ultrasound in the graft wall [38], but graft patency and freedom from significant stenosis was confirmed by antegrade flow and normal distal common carotid artery velocities on the immediate post-operative duplex ultrasound examination. All grafts became echogenic at subsequent examinations and were analyzed as per protocol.

Seven animals underwent subsequent follow-up duplex ultrasounds 4 to 8 weeks postoperatively until study termination. At one week, all ePTFE and eVG-CS grafts were patent and free from stenosis. On final ultrasounds prior to sacrifice of the animals that underwent follow-up studies, five out of the seven (71 %) remaining eVG-CS grafts showed either mural thrombus, significant stenosis or complete vessel occlusion, while none (0 %) of the seven ePTFE grafts showed any sign of stenosis or thrombus adhesion (Table 1, Figure 3.5) ($p = 0.021$).

Table 3.1 – *In vivo* follow-up results. Time *in vivo*: time from implantation to animal sacrifice.

Animal #	Carotid with eVG-CS graft	Time <i>in vivo</i> (weeks)	eVG-CS at sacrifice	ePTFE at sacrifice
1	Right	< 24h	Patent	Patent
2	Left	7	Stenosis	Patent
3	Right	7	Occlusion	Patent
4	Left	7	Stenosis	Patent
5	Left	5	Occlusion	Patent
6	Left	4	Patent	Patent
7	Right	< 24h	Patent	Patent
8	Right	8	Stenosis	Patent
9	Right	8	Patent	Patent
10	Right	< 24h	Patent	Patent

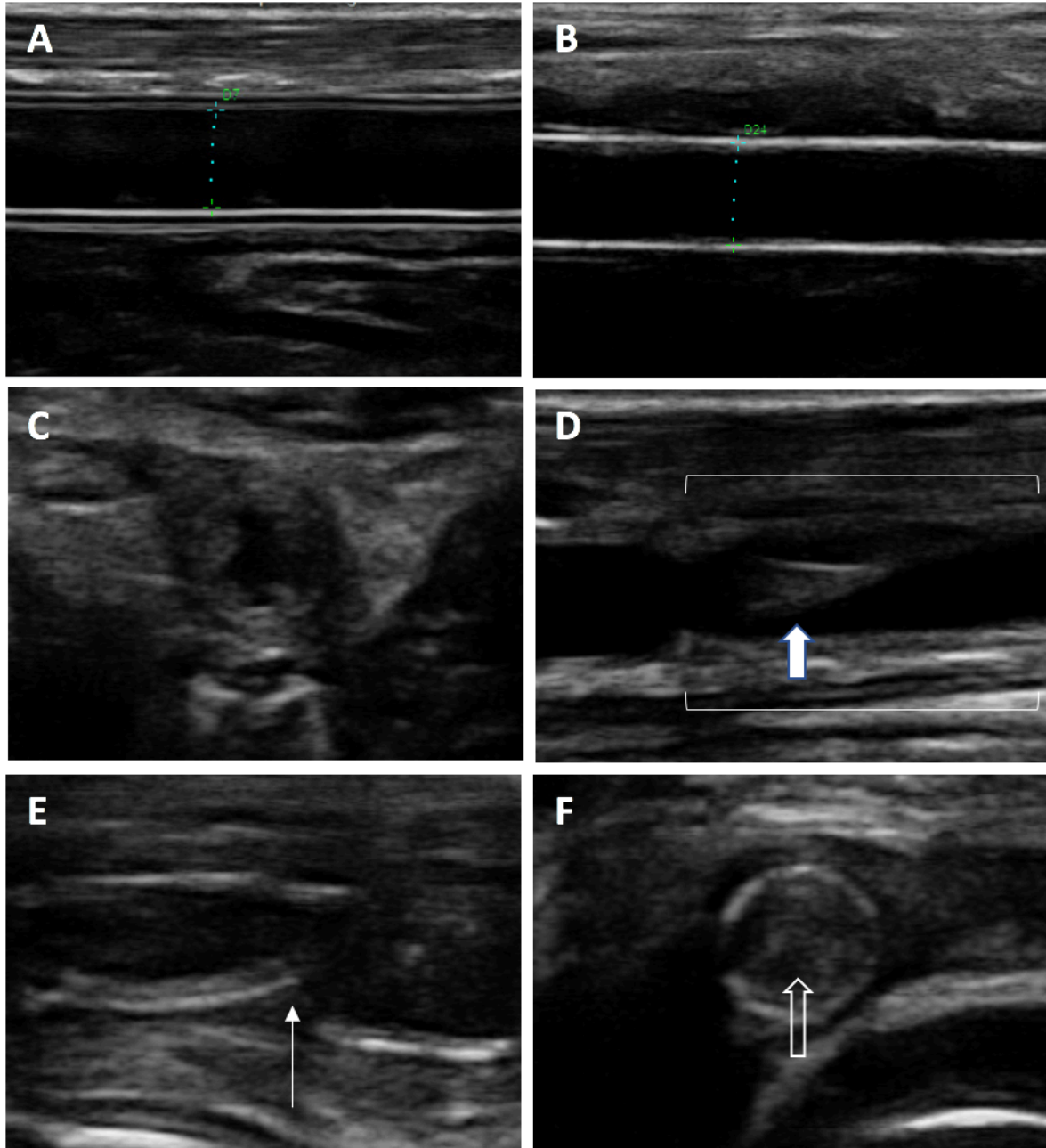


Figure 3.5 – Ultrasonographic in vivo analyses. Longitudinal representations of patent ePTFE (A) and eVG-CS grafts (B) prior to sacrifice (intima-to-intima distance represented by dotted lines). (C) Axial depiction of adherent mural thrombus formation leading to stenosis at 4 weeks in an eVG-CS graft. (D) Longitudinal image of neointima detachment (large arrow) in an eVG-CS graft (delimited with boxes) at 7 weeks, suggesting weak attachment of the neointima to the luminal side of the graft. (E) Apparent plicature (thin arrow) of an eVG-CS graft that led to subsequent thrombosis at 4 weeks (sheep #5). (F) Occlusion of an eVG-CS graft at 4 weeks with dense thrombus formation within the prosthesis (empty arrow).

3.5.4. Ultrasonographic, Macroscopic and Histological Examinations

All twenty prostheses were harvested and analysed as per protocol. Macroscopic analysis of grafts that were explanted a few hours after surgery (6 grafts, 3 eVG-CS and 3 ePTFE) demonstrated the permeability and the absence of any major trauma of all conduits. Macroscopic analysis of conduits that were kept *in vivo* for 4 weeks or more (14 grafts, 7 eVG-CS and 7 ePTFE) showed that ePTFE grafts systematically exhibited higher rigidity and increased adherence to surrounding tissues when compared to eVG-CS grafts (Figure 3.6).

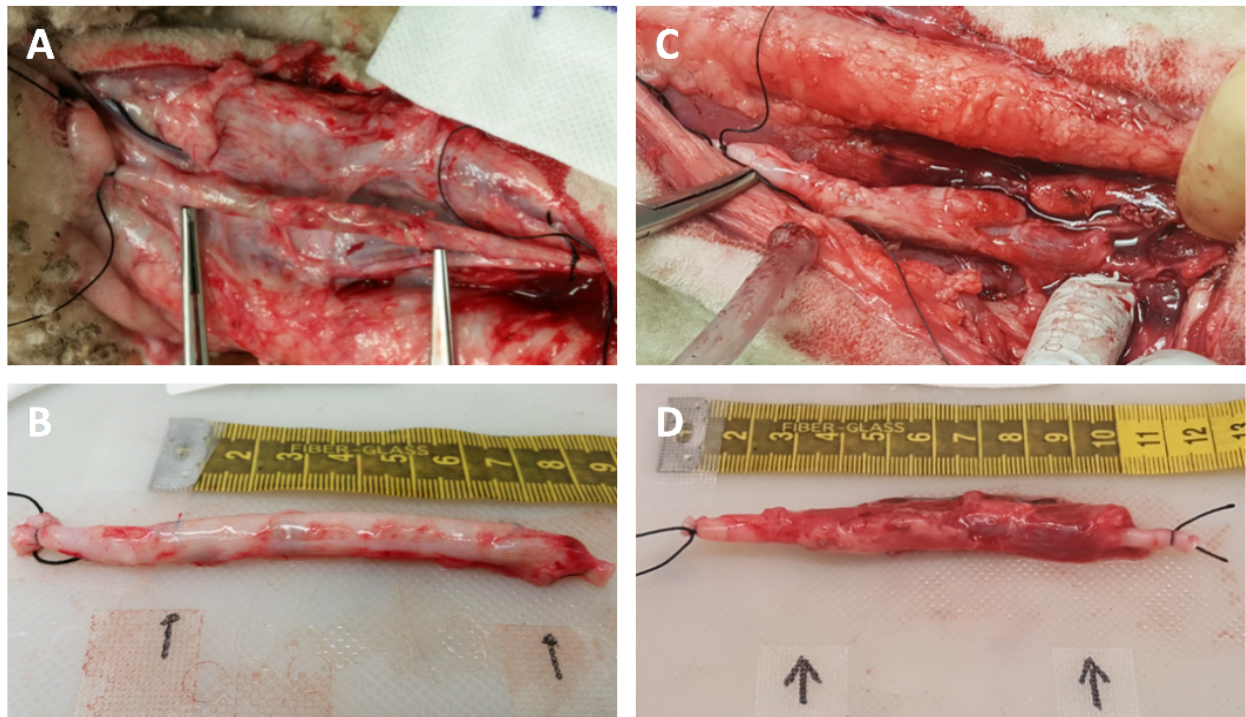


Figure 3.6 – Macroscopic analysis. Typical macroscopic appearance of (A, B) eVG-CS grafts after 8 weeks *in vivo*, (C, D) ePTFE prostheses after 5 weeks *in vivo*, showing more tissue adhesion around ePTFE grafts.

Figures 3.7 and 3.8 summarize the main observations from histological analysis. Histological analyses performed on the 6 grafts that were explanted a few hours after surgery confirmed the patency and absence of any major structural trauma on either eVG-CS or ePTFE conduits. However, analysis of the grafts that were kept *in vivo* for 4 to 8 weeks confirmed the formation

of thrombus that led to stenosis or occlusion in 5/7 eVG-CS grafts (Figure 3.8E,F), while the all ePTFE grafts remained intact. Indeed, most eVG-CS grafts exhibited different degrees of structural degradation on large parts of the conduits' walls. In contrary, ePTFE grafts were no different from the ones observed in the immediate explantation subgroup.

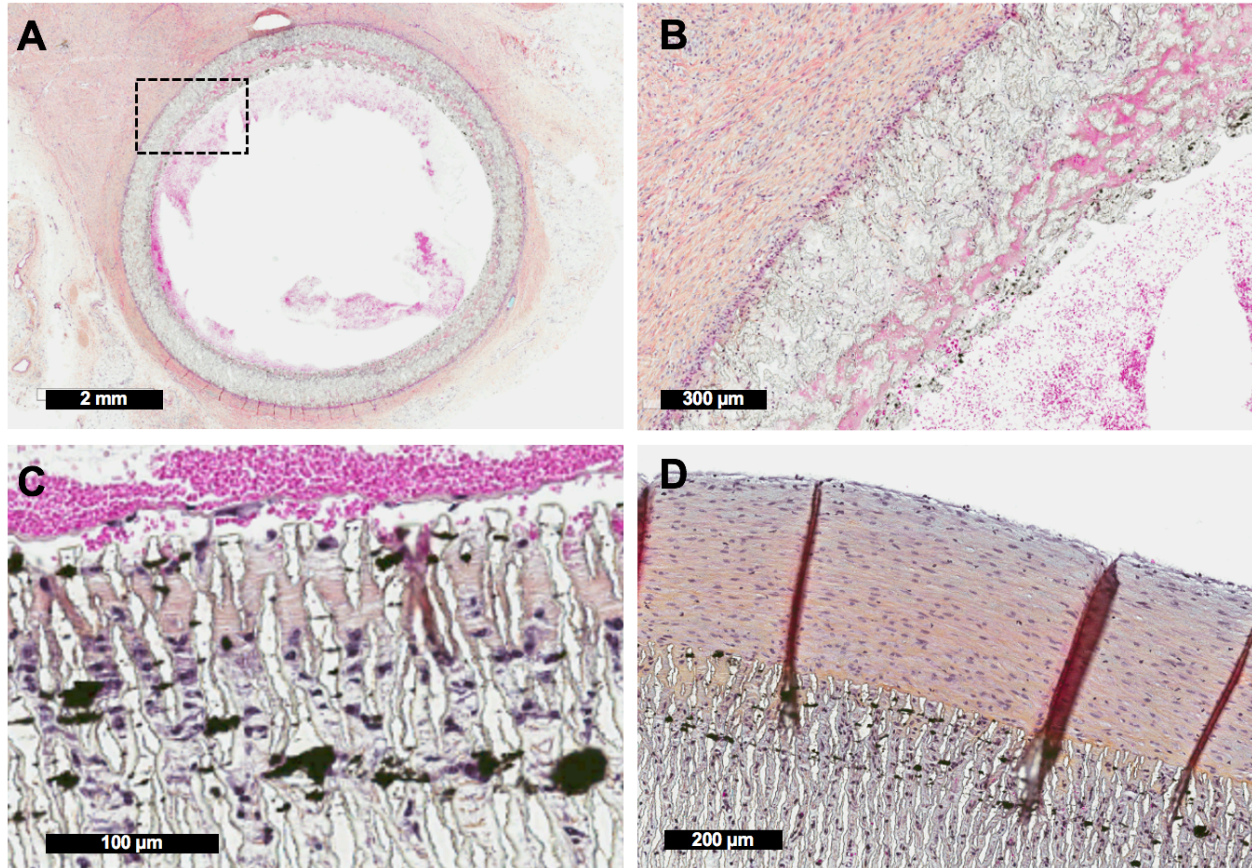


Figure 3.7 – HPS staining and histological analyses of control conduits. ePTFE graft after 8 weeks implantation shows well attached neointima at anastomosis sites but not throughout the length of the implant. (A, B insert) Typical transverse section in the middle of ePTFE implant, showing invasion of the graft by red and white blood cells and a large amount of perigraft tissue around the implant (sheep #2). © Longitudinal section showing red blood cells invasion through the ePTFE porosity (black spots are carbon from the prosthesis). (D) Strong neointima attachment close to the anastomosis.

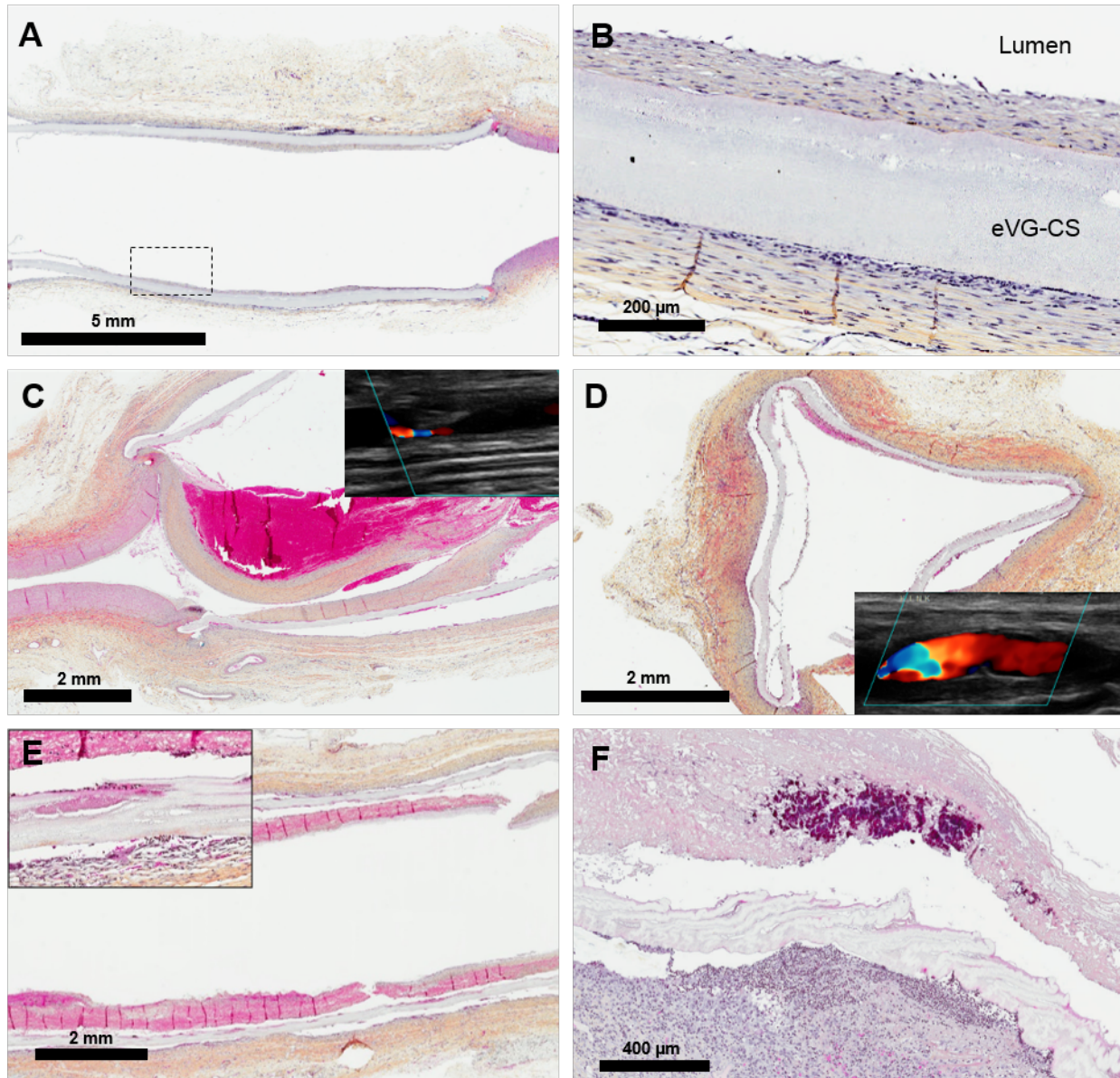


Figure 3.8 – Histological analyses of experimental PU/PCL grafts after several weeks of implantation. (A, B insert): Example of patent eVG-CS graft after 8 weeks implantation: distal anastomosis, with thin neointima limited to the perianastomotic area and complete absence of cell invasion within the electrospun VG (sheep #9). (C) Detachment of the neointima from the prosthesis in the anastomosis region led to the formation of a sub-endothelial thrombus, which was visible by duplex ultrasounds (sheep #2). (D) The lower radial force exerted by eVG-CS grafts, confirmed by their deformation during histological sectioning, can lead to kinking and flow disturbance. (E, F) Thrombosed eVG-CS grafts showed major structural deformations, ranging from intra-wall deficits to frank fiber separation (sheep #6 and #3). (HPS staining).

Two other major differences were noticed between histological slides from eVG-CS or ePTFE conduits. One of them is the presence of cells throughout the wall of ePTFE grafts (Figure 3.7A, B), while no cells were observed within the thickness of the eVG-CS graft (Figure 3.8B). In addition, while the rounded morphology of ePTFE was preserved on transverse sections (Figure 3.7A), it was not the case for some eVG-CS, probably due to lower radial force in the latter (Figure 3.8).

Morphometric analysis was attempted on grafts that were kept *in vivo* for 4 weeks or more, but the occlusion or degradation of the eVG-CS conduits was too important for a definitive comparison of the extent of graft covered by neointima. Some eVG-CS grafts showed neointimal proliferation on the perianastomotic area of their intraluminal aspect (Figure 3.8A), but only over a few millimeters or centimeters, which was similar to the degree of endothelialization observed in ePTFE grafts. Besides, there was no strong cohesion between the neointima and the electrospun materials. Figure 3.8C shows an example of neointima detachment from the graft surface at the distal side of eVG-CS that led to the formation of a sub-endothelial blood clot and subsequently to the graft occlusion. In contrast, cell invasion inside the porosities of ePTFE was obvious, leading to a more adherent peri-anastomotic neointima (Figure 3.7D).

3.6 Discussion

In this study, we created a novel small-diameter bioactive vascular conduit, which was characterized *in vitro* then implanted *in vivo* in 10 sheep. *In vitro* tests confirmed the integrity of the electrospun conduits and the adequate grafting of the bioactive coating to their internal scaffold. Experimental conduits displayed a compliance about 10-times higher than commercially available ePTFE vascular conduits and an adequate suturability profile. Six (6)-months ageing tests in a 37°C saline solution also suggested that, as expected, the experimental conduits do not undergo significant degradation with time, at least in short term.

In the *in vivo* portion of our study, the electrospun conduits were compared to commercially available ePTFE vascular grafts as bilateral interposition carotid bypasses in a sheep model. Successful application of an electrospun PCL/PU mix as a vascular carotid bypass graft in sheep

has been previously described by Jirofti et al. [104]. The authors used co-electrospinning to combine fibers of 15% PCL with fibers of 10% PU with a mean diameters ranging between 411 and 440 nm, similarly to the present study. They could ultimately show patency of 5-mm diameter, 3-cm long PCL/PU graft in 9 sheep up to 32 weeks after implantation, which confirms the adequacy of the present model. ePTFE was chosen as a reference here since it presents good patency rate but poor endothelialization due to the inertness of the material. Although surgical implantation was mostly uneventful, four sheep out of ten suffered from respiratory complications related to the surgical approach and had to be sacrificed immediately (3 sheep) or earlier than expected (1 sheep at 4 weeks). These complications could be explained by the use of a ventral sagittal surgical approach, with a single midline incision over the trachea. To expose each carotid artery, the trachea had to be moved laterally. This may have induced tension on surrounding tissues resulting in swelling and inflammation. It appears that sheep are prone to inflammation and swelling when tissue of the cervical region are manipulated. A bilateral approach, by creating two incisions on each side of the trachea, should be preferred to reduce tissue trauma. These complications, although unexpected, allowed us to gather invaluable information on the experimental conduits' behavior in the animals over time.

The study on the remaining sheep was terminated at nine weeks, after duplex ultrasound follow-up showed inferiority of the experimental conduits. Different hypotheses could explain the inferiority of the experimental conduits compared to ePTFE grafts *in vivo* even though they had shown promising results in the *in vitro* phase. Five out of the seven eVG-CS grafts that remained *in vivo* for 4 to 8 weeks had significant thrombus formation on their intra-luminal surface. Those grafts were also the ones that showed thrombus adhesion or complete thrombosis, while the two physically intact grafts were free from any clot formation. This observation could suggest that the grafts themselves were not inherently thrombogenic in their intact form but may have gained this characteristic as they underwent physical degradation. Also, since the underlying L-PPE:N layer has been shown to be inherently thrombogenic, incomplete coverage by CS could also lead to thrombus formation and ultimately the graft's failure observed in this study. Another important detail to discuss is that to obtain the bioactive coating on the luminal side of the grafts, the manufacturing of eVG-CS required a manual processing step of inside-out turn for each prosthesis

after plasma deposition. This might have inflicted surface defect and micrometric damages through prosthesis wall that could have had an impact on the grafts' performance *in vivo* thereafter. A solution to that would be to create the amine-rich layer coating directly inside the eVG, either by using plasma reactors with cylindrical configuration [39, 40], or by the use of other wet chemical techniques such as the introduction of amine groups by an aminolysis reaction [41, 42].

The smaller radial force exerted by the eVG-CS could also increase the propensity of the eVG to collapse or kink during flexions and hyperextensions seen in large animals and in many human anatomical positions (knee, neck etc.). While its importance in the present study cannot be asserted, mechanical tests reproducing these conditions should be performed. The design of eVG could be modified to provide higher radial force by playing on the orientation of fibers.

Another important point to discuss is the fact that the two intact experimental grafts that remained *in vivo* for 4 and 8 weeks respectively showed adequate incorporation and neointimal formation on the peri-anastomotic area but did not display improved endothelialization further in the middle of the graft compared to the ePTFE controls. This is likely due to the small pore size of the eVG grafts. We chose such a low porosity based on some previous research that showed this could lead to the formation of a complete endothelial monolayer with cell-cell contact [22, 46, 47] in contrast to structures with large pores where cells penetrate into the structure and are less likely to form a complete endothelial barrier [22, 46, 48]. However, the absence of cell invasion within the graft also has two drawbacks. First, on the luminal surface, it limits the anchorage of neointimal tissue, as it could be observed here with cases of neointima detachment from the grafts. Second, it limits the formation of perigraft tissue and capillary ingrowth through the graft which is believed to play an important role in transmural endothelialization. Indeed, neo-endothelialization develops via three mechanisms: transanastomotic ingrowth, transmural migration and seeding from circulating endothelial cells progenitors [6, 15, 33, 49, 51]. By building a graft with low porosity, transmural migration cannot contribute to neo-endothelialization of the conduit, which could have a significant impact on its ability to perform better than conventional highly porous grafts in that regard. Building a more porous vascular PU/PCL scaffold could be a

way to encourage endothelial migration through this mechanism [49, 52, 54]. While probably necessary, high porosity is however not sufficient, as shown by several studies on ePTFE including this one

Three mechanisms have been proposed as sources of synthetic graft lumen endothelialization *in vivo*. First is the transanastomotic ingrowth which was identified as the more probable endothelialization mechanism in most animal studies [15]. However in animals, transanastomotic ingrowth is generally restricted to the first 1-2 cm around the anastomoses [6, 15, 49], as it is observed in the case of our study, and is even more limited in humans [50]. The two other processes include a fallout source from circulating cells [33, 51] and transmural endothelialization arising from the capillary ingrowth of perivascular tissue through the pores of the graft wall [15, 33, 51]. Transmural growth has been described to occur significantly faster on high-porosity grafts [49, 52-54]. Zhang et al. thus compared PU prostheses of two porosities and concluded that the rapid ingrowth of perigraft collagenous tissue in the most porous prostheses may have accelerated the lining of endothelial-like cells [49]. Thus, the pore size and the porosity significantly affect neoendothelialization and are critical parameters for the performance of vascular grafts. Future work will be performed on grafts with increased pore size. In contrast to PU/PCL grafts, ePTFE grafts are much more porous and showed pronounced cellular invasion throughout the graft thickness, with obvious communication between the perigraft tissue and the graft lumen and better adhesion of the neointima when present. However, the neointima was still incomplete at 8 weeks, apart from the anastomotic regions. This is why the use of bioactive coatings promoting endothelial adhesion remains a potential strategy to improve neoendothelialization and patency rate of small diameter vascular grafts. It is however impossible to conclude here about the potential benefit of the chondroitin-rich bioactive coating tested in this study. Regarding the third hypothesis for neo-endothelialization – seeding from circulating endothelial cells – the CS coating of intact experimental grafts in this study provides evidence of its possible inability to enhance endothelial cells deposition through this process.

3.7 Conclusion

This study portrays the building and pilot *in vivo* testing of small-caliber nanofibrous electrospun PU/PCL vascular grafts coated with a chondroitin bioactive coating. The grafts showed promising behaviors in terms of compliance and suturability and did not show deterioration over a 6-month period in *in vitro* settings. However, the grafts did not perform as expected in strenuous *in vivo* settings, and further research is warranted to explore possible improvements to the scaffold's porosity and coating to increase their potential to induce a stable, homogenous neo-endothelium.

3.8 Acknowledgements

This study was jointly supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Canada Research Council in Natural Sciences and Engineering (NSERC) (Collaborative Health Research Projects CPG 127764) and Lerouge's Canada Research Chair in biomaterials and endovascular implants (CRC, 950-229036). M. Bouchet gratefully acknowledges scholarships from École de technologie supérieure. The authors also thank the team of Pr. M. Wertheimer and G. De Crescenzo, as well as M. Gauthier (École Polytechnique), M. Gouin, B. Chayer and I. Salazkin (CRCHUM) and the personnel of the CRCHUM Animal core facility for their collaboration in the project and their skilled technical support.

3.9 Conflicts of interest

None to declare.

3.10 Appendix

3.10.1 Appendix A – Supplementary data

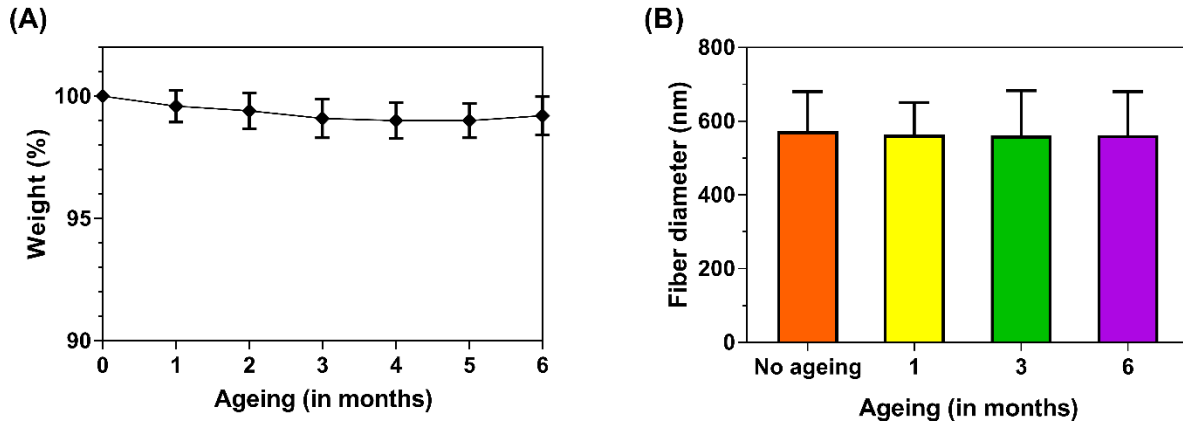


Figure A.1 – Measurements of (A) weight and (B) fiber diameter of the eVG scaffolds as a function of ageing duration in a saline solution at 37°C over 6 months.

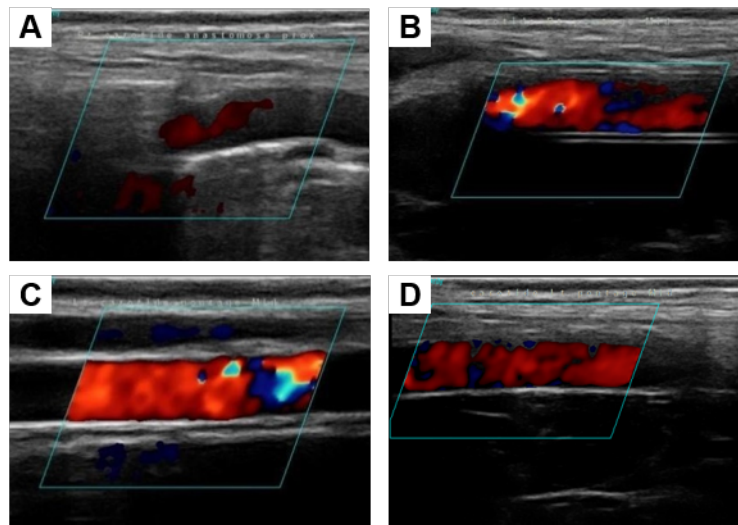


Figure A.2 – Doppler ultrasound images for ePTFE (A, B) and eVG-CS (C, D) grafts post-operatively (A, C) and 1 week after the implantation (B, D). All images taken at mid graft, except for (A) taken at proximal anastomosis because of the absence of Doppler signal inside the ePTFE prosthesis just after implantation.

3.10.2 Appendix B – Supplemental Details on Materials and Methods

B.1 Animal preoperative quarantine details

Animals were group housed in a room ventilated with filtered 100 % outside air (room temperature 19 +/- 1° C, relative humidity 50 +/-10 %). A 12-h: 12-h light: dark cycle was used. The animals had free access to good quality hay (Norfoin Inc., Saint-Césaire, QC, Canada) and water. The quantity of pelleted diet (Teklad Ruminant Diet 7060, Envigo, Madison, WI, USA) was limited to 250 ml/day. The animals were treated 5 days with fenbendazole per os (5 mg/kg, Safe-Guard Suspension, Merck Animal Health, Kirkland, QC, Canada) to control parasites.

B.2 Perioperative anesthesia protocol

On the day of the procedure the sheep received a premedication of butorphanol subcutaneously (SC) (0.05mg/kg Torbugesic® Zoetis Canada Inc., Kirkland, QC, Canada). A 20 G catheter (Jelco, Smiths Medical ASD, Inc., Southington, CT, USA) was introduced in the cephalic vein and general anesthesia was induced with an intravenous (IV) injection of diazepam (0.2mg/kg, Diazepam injection USP, Sandoz, Boucherville, QC, Canada) and ketamine (2mg/kg Ketalean Bimed-MTC Animal Health Inc., Cambridge, ON, Canada). Endotracheal intubation was performed with a 8.5 mm (ID) cuffed endotracheal tube (Teleflex, Research Triangle Park, NC, USA) and anesthesia was maintained with isoflurane (2-3 %, Forane, Baxter, Mississauga, ON, Canada) and a FiO₂ of 1. Intermittent positive pressure ventilation (Ohio 7000, Omeda, Rexdale, ON, Canada) was use and ventilation parameters were adjusted to maintain the end-tidal carbon dioxide concentration (EtPCO₂) between 35 and 45 mmHg. A positive end-expiratory pressure (PEEP) was maintained with a 5 cm H₂O PEEP valve (Hallowell EMC, Pittsfield, MA, USA) installed on the expiratory limb of the circle system. An orogastric tube (Stomach Tube, JorVet, McCarthy & Sons Service, Calgary, AB, Canada) was used to prevent free gas bloat.

To ensure preemptive analgesia the animal received an IV bolus of ketamine (0.2 mg/kg), fentanyl (0.005 mg/kg, Sandoz, Boucherville, QC, Canada) and lidocaine hydrochloride (1 mg/kg, Hospira, Montreal, QC, Canada) followed by constant rate infusion (CRI) of ketamine (0.3 mg/kg/h), fentanyl (0.005 mg/kg/h) and lidocaine (1.5 mg/kg/h). The surgical site was infiltrated with bupivacaine hydrochloride (2 mg/kg, Marcaine, Hospira, Montreal, QC, Canada). The animal also received IV Meloxicam (0.5 mg/kg, Metacam, Boehringer Ingelheim Ltd., Burlington, ON, Canada) and SC buprenorphine (0.005 mg/kg, Vetergesic[®], Sogeval UK Limited, Sheriff Hutton York, UK) 1 hour prior to the surgical procedure. Cefazolin was administered IV (22 mg/k, Hospira, Montreal, QC, Canada), at the beginning of the surgical procedure to prevent microbiological infection.

To ensure postoperative analgesia a fentanyl transdermal patch (1.5 µg/kg, Mylan Pharmaceutical ULC, Etobicoke, ON, Canada) was placed at the beginning of the anesthesia and removed 72 hours later. Post-operative analgesia was also provided for 3 days with daily meloxicam per os (1 mg/kg, Meloxicam oral suspension Solvet Alberta Veterinary Laboratories, Calgary, AB, Canada).

B.3 Sedation protocol for echographic follow-up

The echography was performed under butrophanol sedation (0.05mg/kg Torbugesic, Zoetis Canada Inc., Kirkland, QC, Canada).

CHAPITRE 4 – DISCUSSION

Avant toute discussion sur les objectifs spécifiques de ce mémoire, il est nécessaire de comprendre le contexte qui a mené aux recherches présentées. Tel que discuté dans l'introduction de ce mémoire, la maladie artérielle occlusive, autant au niveau coronarien que périphérique, constitue l'un des plus grands enjeux de santé dans le monde, suivant le vieillissement des populations et l'accroissement des maladies chroniques secondaire aux succès de la médecine moderne. Parallèlement, les différentes avancées médicales et chirurgicales contemporaines au niveau de la santé cardiovasculaire tentent de répondre aux besoins des populations mais demeurent ultimement limitées par l'avancée inexorable du fardeau athérosclérotique avec l'âge et les comorbidités des patients. Les pontages vasculaires, visant le rétablissement d'une perfusion tissulaire adéquate, demeurent la dernière et ultime ligne thérapeutique disponible pour les cliniciens et chirurgiens visant à améliorer la qualité ou l'espérance de vie de leurs patients en situation d'ischémie organique. La révolution médico-chirurgicale créée par l'avènement des pontages vasculaires au 20^e siècle demeure toutefois incomplète lorsqu'il y a épuisement des options de conduits vasculaires provenant du patient lui-même, forçant le clinicien à opter pour un conduit synthétique ou même au traitement médical palliatif faute de meilleure option. Les conduits synthétiques actuels, malgré leur performance adéquate pour les vaisseaux de moyen- et gros calibre (>6 mm), démontrent systématiquement une mauvaise performance pour les vaisseaux de petit calibre (<6 mm). La recherche d'une option de pontage vasculaire synthétique de petit diamètre demeure donc un sujet de recherche intense, autant en ingénierie tissulaire (pontages résorbables) qu'en recherche sur biomatériaux (pontages synthétiques et pontages bioactifs).

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, j'ai été appelé à faire partie d'une équipe multidisciplinaire visant à créer et tester un pontage synthétique bioactif de petit calibre (5 mm) ayant pour but final d'offrir une option plus performante aux médecins et chirurgiens cardiovasculaires qui font face à des pathologies artérielles occlusives de plus en plus complexes. Mon projet dans cette équipe étant imbriqué dans l'entité globale, il est inévitable de discuter ici brièvement des résultats généraux qui y ont été démontrés. L'élaboration du conduit lui-même, menée à bien par

une collaboration entre les équipes du LBeV et de Poly, nécessitait une expertise en biomécanique, en biomatériaux et en leur application en clinique. Le résultat final de ce travail est un conduit synthétique construit en utilisant la technique d'électrofilage avec un mélange de polyuréthane et de polycaprolactone combiné à couche bioactive de sulfate de chondroïtine au niveau du versant endoluminal de la prothèse. Ce néo-conduit a démontré des résultats *in vitro* encourageants, notamment par sa compliance supérieure aux conduits synthétiques actuels et par une résistance à la rupture satisfaisant les standards actuels. Malheureusement, la partie *in vivo* de ce travail, dont je discuterai plus bas puisque cette partie du travail consistait en mon projet de maîtrise, a démontré que le nouveau conduit à l'étude (eVG-CS) n'a non seulement pas pu supplanter le conduit de contrôle (ePTFE), mais s'est même démontré inférieur en termes de perméabilité à moyen-terme sans pour autant démontrer l'augmentation désirée en termes de favorisation du processus de néo-endothélialisation.

Le travail associé à ce mémoire était divisé en trois étapes distinctes :

- 1- Sélectionner un modèle de grand animal adéquat permettant une étude de l'interaction entre le conduit et le sang dans des conditions s'apparentant à celles vues chez l'humain.
- 2- Planifier un modèle d'essai *in vivo* permettant l'analyse du greffon et sa comparaison à un conduit synthétique actuellement utilisé en clinique.
- 3- Compléter l'essai *in vivo* et permettre l'élaboration d'hypothèses et de conclusions pertinentes et transposables à l'humain par rapport au néo-conduit à l'étude.

4.1 Sélection d'un modèle animal pour l'étude de pontages vasculaires

L'élaboration d'un essai *in vivo* de bonne méthodologie représente un point clé permettant la translation de la recherche fondamentale à la recherche clinique. Le sujet actuel nécessitait l'implantation du nouveau conduit à l'étude dans la circulation artérielle d'un animal pour étudier son évolution dans le temps et la comparer à celle d'un conduit synthétique utilisé cliniquement. La littérature au sujet des essais sur animaux pour l'étude de pontages vasculaires est vaste et hétérogène, ce qui a rendu complexe la sélection de l'animal adéquat pour notre étude.

Tel que décrit dans la section 1.4 de ce mémoire, notre délibération a d'abord pris en compte la taille des vaisseaux pour éviter le stress anastomotique et donc l'insertion induite de facteurs pouvant avoir un impact sur la perméabilité des pontages à l'étude [92, 103]. Le modèle de grand animal fut sélectionné sur cette base, en prenant compte que les pontages à l'étude (5 mm de diamètre interne) devaient se retrouver en interposition sur des artères natives de même calibre. Le chien et le porc ayant démontré par le passé pouvoir rapidement créer un néo-endothélium complet sur des greffons synthétiques contrairement à l'humain, le choix final résidait entre le babouin et le mouton [93-95]. Pour considérations éthiques et aussi par relative équivalence du point de vue de la similarité des caractéristiques hématologiques entre le mouton, le babouin et l'humain, nous avons finalement sélectionné le mouton comme modèle pour cette étude [29, 93, 96, 97].

L'élaboration de cet essai *in vivo* nécessitait donc une revue complète de la littérature avant même de sélectionner le modèle animal à employer. Zilla et al. [6] ont démontré dans leur revue à quel point ce concept était crucial par rapport à la recherche translationnelle entre le laboratoire et l'humain. Tel que noté par ces auteurs, la littérature actuelle sur le sujet présente beaucoup de questions de recherche inappropriées et beaucoup d'exemples d'utilisation du mauvais modèle animal pour l'application clinique finale. Avant l'élaboration de ce travail, notre revue de la littérature, en concordance avec celle des auteurs susmentionnés, a mis en évidence la prééminence des études sur le porc malgré l'inadéquation que nous venons de mettre en évidence. Depuis 2016 toutefois, la recherche *in vivo* en chirurgie vasculaire sur le mouton continue de progresser, notamment avec la publication d'essais similaires au nôtre et de nouveaux protocoles de prise en charge de l'animal dans ce contexte particulier [104, 105-108]. Ces éléments de littérature, en combinaison à notre travail, ajoutent à nos connaissances sur l'utilisation de ce modèle pour l'étude de pontages vasculaires.

4.2 Élaboration d'une étude sur greffons vasculaires in vivo

Suite à la sélection de l'animal, l'élaboration d'un essai in vivo permettant la comparaison entre le néo-conduit et un contrôle nécessitait plusieurs paramètres. Premièrement, nous nous devions de sélectionner un « pontage contrôle » approprié. Deuxièmement, l'essai devait permettre de comparer les deux conduits dans un environnement quasi-identique. Troisièmement, l'essai devait permettre l'observation in vivo de la performance des conduits à différents temps du processus de guérison. Quatrièmement, les pontages à l'étude devaient être assez longs pour permettre l'analyse et la comparaison de la distance de néo-endothélialisation. Finalement, la durée de l'étude devait être assez longue pour permettre la comparaison des taux de perméabilité des pontages.

Le premier aspect de l'élaboration de l'étude était de déterminer quel serait le conduit vasculaire synthétique de contrôle. En effet, ce projet représentait un bond important entre nos connaissances *in vitro* et la clinique, donc le choix résidait principalement entre un contrôle « parfait », c'est-à-dire représentant le meilleur standard clinique, et un contrôle « de transition », soit un conduit électrofilé de même composition, mais sans le revêtement bioactif (CS). Pour un contrôle « parfait », suite à une revue de la littérature et des standards cliniques, les conduits de petit diamètre en ePTFE en sont ressortis comme étant le comparatif adéquat, puisqu'ils sont encore utilisés dans des cas exceptionnels de dernière ligne comme pour les fistules artério-veineuses synthétiques de patients hémodialysés. Le principal avantage de ce choix était que l'étude, si positive, pourrait avoir un meilleur potentiel de transposabilité par rapport à la clinique et donc représenter un plus grand pas vers l'avant. L'inconvénient principal, qui représentait aussi l'avantage de l'alternative (contrôle de transition), était que ce contrôle était déjà bien éprouvé en clinique et qu'il représentait des décennies d'amélioration de son architecture pour améliorer sa performance. L'utilisation de ce contrôle parfait représentait donc un risque de ne pas pouvoir tirer de conclusions précises sur certaines raisons spécifiques d'échec de nos greffons expérimentaux dans le cas où ils ne performaient pas tel qu'anticipé, comme il s'est avéré être le cas dans notre étude. Si nous avions sélectionné un contrôle de transition (donc de PCL/PU électrofilé sans revêtement), nous aurions pu déterminer spécifiquement le rôle du revêtement de CS pour l'endothélialisation et la perméabilité des greffons. Par contre, cela aurait

limité le potentiel de transposabilité des résultats à la clinique, puisqu'il n'y aurait pas eu de comparaison avec le standard actuel. Nous avons donc opté pour un contrôle en ePTFE pour notre étude. Ce choix s'est avéré trop risqué en rétrospective et, malgré la quantité significative d'informations que nous avons pu obtenir à l'aide de ce modèle, l'addition d'un sous-groupe de contrôle sans revêtement bioactif nous aurait permis de déterminer plus précisément le rôle du revêtement de CS sur l'endothélialisation des greffons.

Le deuxième point mentionné consistait en la détermination de la cible artérielle sur laquelle implanter les pontages et aussi sur le devis de l'étude. L'environnement devant être quasi-identique, deux choix s'offraient à nous. D'abord, nous pouvions utiliser une artère par mouton et pratiquer la même chirurgie sur tous, avec la moitié des pontages expérimentaux (eVG-CS) et l'autre moitié des pontages contrôles (ePTFE). Autrement, nous pouvions décider de pratiquer une intervention symétrique sur le même animal, avec d'un côté le pontage expérimental (eVG-CS) et de l'autre le contrôle (ePTFE) et procéder ensuite à un devis comparatif sur la totalité des pontages. Deux avantages logiques se présentaient avec la deuxième option – d'un côté cela nécessitait la moitié du nombre d'animaux nécessaires pour le même nombre de données, et de l'autre les variations hématologiques et physiologiques propres à chaque animal seraient neutralisées par le fait que chaque animal présenterait les données d'un pontage expérimental et d'un pontage contrôle. Le choix du devis de l'étude ne s'est donc pas fait en regard de la littérature existante sur le sujet spécifique des interventions vasculaires chez le mouton, mais bien par rapport à un accord de notre équipe pour en arriver au devis qui présenterait le meilleur potentiel d'arriver à comparer adéquatement les pontages à l'essai. Les artères carotides et iliaques du mouton étaient les seules candidates présentant une distribution symétrique et un diamètre adéquat (5 mm)[93]. Le choix des artères carotides s'est ensuite fait par leur facilité d'accès chirurgical. De façon surprenante, ce nouveau modèle vasculaire bi-carotidien pour l'étude de nouveaux conduits vasculaires semble gagner en popularité dans la littérature depuis 2016, en parallèle au projet présenté dans cette étude [104, 106-108]. En rétrospective, l'idée de ce devis était originale et pourrait représenter un standard comme modèle d'étude *in vivo* préliminaire de nouveaux conduits vasculaires.

En troisième lieu, le protocole de suivi in vivo a dû être élaboré et le suivi au duplex artériel s'est présenté comme la modalité de choix par son coût faible, la facilité de complétion de l'examen au-niveau du cou de l'animal et la reproductibilité élevée du duplex au-niveau carotidien prouvée chez l'humain [109]. Les fréquences choisies de suivi, soit en post-opératoire immédiat, puis à 1, 4, 8 et 12 semaines, se sont montrées d'une importance capitale dans le projet actuel. En effet, tous les pontages implantés étaient perméables au duplex postopératoire immédiat et au suivi à 1 semaine, mais des sténoses et thromboses du côté expérimental se sont manifestées au duplex à 1 mois et ont ultimement mené à l'arrêt précoce de l'étude. Les données ultrasonographiques accumulées au cours de l'étude ont aussi contribué à l'émission des hypothèses importantes par rapport à la performance et l'échec des greffons à l'étude.

Le quatrième critère d'élaboration de l'essai in vivo était relatif à la longueur-même des greffons à l'étude. L'hypothèse initiale étant que le revêtement bioactif de sulfate de chondroïtine favoriserait une néo-endothélialisation des conduits à l'étude. En prenant en compte que tant chez l'humain que le mouton la néo-endothélialisation des conduits synthétiques actuels ne dépassait pas les 1-2 cm périnastomotiques, nous avons opté pour une longueur de greffons de 5,5 cm bilatéralement pour nous permettre de mieux analyser la potentielle différence entre les conduits expérimentaux et les contrôles. En prenant compte de la littérature sur les conduits vasculaires synthétiques, qui remonte jusqu'au milieu du 19^e siècle, cette longueur demeure par contre à la limite inférieure de ce qui est accordé comme acceptable par les experts dans le domaine. La longueur de pontages cardiovasculaires peut fréquemment atteindre de 40 à 60 cm et une fréquente critique de l'évidence disponible actuellement dans ce contexte est que la majorité des pontages implantés chez l'animal sont de moins de 7 cm, limitant la validité externe des conclusions de ces travaux [6]. L'étude présentée ici se voulait être un tremplin vers l'accumulation d'évidences supplémentaires avant l'application finale chez l'humain et il demeurait crucial lors de son élaboration que si la prothèse démontrait une supériorité par rapport au contrôle de ePTFE, une seconde phase devrait évaluer sa performance en tant que long pontage et à plus long terme. Pour le travail que nous avons présenté ici, la longueur choisie a semblé suffisante dans ce contexte de suivi à court-moyen terme puisque les greffons expérimentaux qui sont demeurés perméables jusqu'à la fin de l'étude ont démontré une néo-

endothélialisation incomplète et similaire à leurs contrôles en ePTFE, un des deux points principaux rendant l'étude négative. Par contre, le nombre de greffons en ePTFE à l'étude (dix) est grandement insuffisant pour élaborer une conclusion claire sur l'aspect adéquat de la longueur des greffons de cette étude. Un modèle de pontages aorto-iliaques ou aorto-fémoraux aurait pu nous permettre de créer des conduits significativement plus longs et ainsi réduire le risque d'observer une néoendothélialisation complète des greffons par migration transanastomotique à plus long terme, ce qui n'a pas pu être évalué au cours de cette étude. La littérature sur les longs pontages vasculaires (≥ 10 cm) de petit diamètre chez le mouton est rare et beaucoup moins élaborée que celles pour le chien ou le porc, consistant de quelques études seulement [116-118]. Si le modèle ovin s'impose comme modèle animal idéal dans ce contexte, l'élaboration d'essais systématiques comparant des pontages plus longs s'avèrera cruciale.

Dernièrement, le suivi longitudinal des greffons implantés chez l'animal se devait d'être assez long pour permettre le développement d'une possible néo-intima au-niveau de la surface des greffons et pour étudier la différence de perméabilité entre les greffons expérimentaux et les contrôles. Tel que mentionné précédemment, la littérature actuelle sur le sujet demeure hétérogène. Souvent, les études de suivi longitudinal sur des greffons expérimentaux ne durent pas assez longtemps pour déceler de réelles différences [6]. L'infériorité des greffons expérimentaux de notre étude ne s'est manifestée qu'à 4 semaines, sur une étude longitudinale au suivi prévu jusqu'à 12 semaines. Il n'existe pas de standard par rapport au temps de suivi idéal dans ce contexte singulier. Considérant qu'aucun pontage en ePTFE n'était occlus aux suivis allant jusqu'à 8 semaines, il est logique que, pour une future étude similaire sur la perméabilité de nouveaux pontages, le suivi *in vivo* s'étende au moins jusqu'à 12 semaines ou plus pour avoir l'opportunité de déceler des cas d'échecs attendus pour les pontages de contrôle.

4.3 Exécution d'un projet in vivo et conclusions

L'exécution d'une étude in vivo sur pontages vasculaires représente un parcours ardu et parsemé d'embûches. Éthiquement, deux points cruciaux devraient se retrouver au centre de l'élaboration de ces projets : l'élaboration d'un essai permettant la réponse à une question clinique pertinente en utilisant le moins d'animaux possible et la sécurité des animaux participant à l'étude.

En premier, le projet décrit dans ce mémoire a démontré au moins partiellement la capacité à atteindre l'objectif final qui était de permettre l'élaboration d'hypothèses et de conclusions pertinentes et transposables par rapport à la performance d'un néo-conduit synthétique comparé à un contrôle déjà utilisé chez l'humain. En effet, de multiples explications plausibles concernant l'échec du conduit à l'étude ont permis à notre équipe d'orienter les futures recherches sur ce néo-conduit prometteur. Pour l'infériorité en termes de perméabilité du pontage en eVG-VS par rapport à celui en ePTFE, la dégradation *in vivo* du conduit d'eVG-CS avec le temps, le processus de fabrication incluant le retournement de la prothèse pouvant causer des micro-traumas dans sa structure, la faible force radiale du greffon le rendant vulnérable à la plicature et la dénudation de la couche pro-thrombotique de L-PPE :N ont été mis de l'avant pour expliquer les résultats. Pour l'absence de bénéfices en termes de néo-endothélialisation, la faible porosité causant l'absence d'invasion cellulaire dans le greffon explique au moins partiellement le résultat obtenu. La littérature sur le sujet est contradictoire, mais la construction de pontages expérimentaux avec une perméabilité plus grande dans le futur pourrait représenter une piste de solution pour favoriser l'invasion des cellules endothéliales et donc la néoendothélialisation des greffons expérimentaux. Il est aussi à noter que certaines colorations histologiques auraient pu nous permettre d'obtenir plus d'informations sur des mécanismes supplémentaires expliquant l'échec des conduits à l'étude, ce qui constitue une limitation à l'interprétation des résultats. En effet, l'invasion transmurale et péri-prothétique par différents types de collagènes constitue une partie intégrante du processus de guérison suivant l'implantation de pontages synthétiques et leur apport est reconnu pour avoir un effet significatif sur la compliance des artères natives et donc aussi des greffons synthétiques [113]. Diverses colorations immunohistochimiques, telles que le Trichrome de Masson et le rouge de Picrosirius, auraient pu mettre en lumière la présence et l'organisation structurelle des fibres de collagène au-niveau de l'espace péri-prothétique des

greffons expérimentaux et ainsi nous donner différentes pistes de solution potentielles pour améliorer la structure des greffons et leur capacité à produire un réseau de fibres de collagènes *in vivo* susceptible de maintenir leur compliance mesurée initialement [114-115]. Il aurait aussi été pertinent de mesurer la compliance des greffons expérimentaux avant le greffage du revêtement de CS pour les comparer à la compliance moyenne obtenue après ce dernier, puis de mesurer la compliance des pontages à l'étude toujours perméables au moment du sacrifice des animaux. Ces informations auraient pu nous permettre d'avoir une meilleure idée de l'évolution de ce paramètre crucial tout au long de la production et de l'expérimentation des conduits. D'autres mesures telles que la mesure de l'angle de contact nous auraient aussi permis de mesurer plus précisément le degré d'imperméabilité des prothèses à l'étude avant l'implantation et auraient pu donner plus de pistes de solution pour des projets futurs.

Aussi, la transposabilité à l'humain des résultats de cet essai demeure à démontrer puisque l'étude a dû être arrêtée précocement et qu'aucune thrombose ou sténose significative de greffons contrôles (ePTFE) n'a pu être observée. En effet, chez l'humain, les conduits de petit diamètre en ePTFE sont reconnus pour leur piètre perméabilité même à moyen terme en raison de l'apparition fréquente de sténoses et d'occlusions des greffons secondaires au développement de thrombus et d'hyperplasie intimale, surtout au-niveau des régions péri-anastomotiques. Le fait que nous aurions pu démontrer des anomalies sténotiques ou thrombotiques de pontages contrôles à 12 semaines dans notre étude demeure du domaine de la spéculation. La décision initiale de choisir les artères carotides pour l'étude de pontages avec une application future largement axée sur la revascularisation périphérique venait aussi avec un risque pour la transposabilité des résultats. En effet, le flot sanguin dans les artères carotides du mouton est à moins haute résistance comparativement aux artères périphériques humaines. Tel que discuté dans la section 1.1.2.4.2, la haute résistance du lit vasculaire distal au pontage a un effet négatif sur la perméabilité des conduits faiblement ou non-compliants. Il est donc possible que la performance parfaite des conduits en ePTFE dans cette étude soient aussi partiellement due au fait que le lit vasculaire distal de l'artère choisie était plus favorable à la perméabilité de ces conduits. Il serait donc nécessaire dans le futur d'obtenir plus de résultats sur la perméabilité à long terme des conduits standards avec ce modèle pour évaluer s'il est adéquat pour démontrer

un avantage d'un potentiel nouveau conduit synthétique puisque l'étude se doit de prouver une opportunité de démontrer une différence entre le standard actuel (inadéquat en clinique) et le futur pontage expérimental.

Un dernier point à aborder concernant la conception d'un projet *in vivo* de la sorte est la sécurité des animaux participant à l'étude. La sélection du modèle d'essai *in vivo* utilisé pour notre travail nous a imposé d'opter pour un animal qui n'avait pas été utilisé précédemment par notre institution et la mise en place de protocoles systématiques pour leurs soins continue d'évoluer dans la littérature. Le décès ou le sacrifice de quatre des dix moutons utilisés (40%) suite à des complications anesthésiques et chirurgicales au cours de ce travail nécessitant des approches carotidiennes bilatérales met bien en lumière l'importance de l'approche et du protocole anesthésique utilisés chez l'animal. Jirofti et al [104] ont pu démontrer un taux de mortalité peropératoire de 4,1% (1/24) pour un même modèle d'étude. La seule différence claire entre notre protocole et le leur était leurs approches carotidiennes bilatérales en optant pour deux incisions médiales aux muscles sterno-cléido-mastoïdiens au lieu d'une incision supra-trachéale unique. Ces incisions sont exactement les mêmes que celles utilisées pour la chirurgie carotidienne chez l'humain. L'unique mortalité démontrée dans leur étude fut prouvée secondaire à une pluie embolique cérébrale et non à des problèmes respiratoires récurrents comme pour les nôtres. Une recommandation claire à la suite de ce projet sur l'approche bi-carotidienne chez le mouton est donc de procéder à une incision distincte pour l'approche de chacune des artères carotides et de procéder à une dissection minimale des structures adjacentes, avec pour but de diminuer tout traumatisme nerveux cervical pouvant engendrer les problèmes auxquels nous avons fait face. Une deuxième recommandation claire est de ne pas procéder à une incision supra-trachéale unique, qui est liée à une dissection para-trachéale plus étendue et à une augmentation apparente du risque de dénervation cervicale et de problèmes respiratoires récurrents par la suite.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce projet de maîtrise était d'élaborer un essai *in vivo* permettant de tester la performance d'un néo-conduit synthétique électrofilé avec revêtement bioactif comparativement au meilleur standard disponible en clinique actuellement. Au final, l'essai se devait de permettre l'élaboration d'hypothèses et de conclusions par rapport à la performance des néo-conduits et aussi d'arriver à assurer un degré de transposabilité de ces résultats chez l'humain. D'abord, l'occurrence lors de cette étude d'une mortalité plus élevée des animaux participants a permis la modification des recommandations sur la technique chirurgicale dans le futur. Ensuite, l'essai ainsi construit a permis d'étudier adéquatement la performance *in vivo* des néo-conduits et d'élaborer de futurs essais pré-cliniques pour améliorer la structure des greffons, sans toutefois prouver son potentiel de transposabilité chez l'humain pour le moment.

En commençant par le point important de la sécurité des animaux participant à l'étude, notre taux de mortalité et de sacrifice précoce d'animaux s'est démontré trop élevé par rapport à d'autres auteurs dans la littérature. L'incision supra-trachéale unique pour l'accès aux deux artères carotides de chaque animal a été ciblée comme étant la cause des problèmes respiratoires récurrents à l'origine de ces mortalités, et une recommandation par rapport à l'utilisation de deux incisions médiales aux muscles sterno-cléido-mastoïdiens a pu être émise en conséquence. La littérature sur ce type d'approche bilatérale chez le mouton demeure constituée de quelques publications seulement, et il est clair que vu son potentiel, de futurs essais similaires doivent et seront créés, nous permettant d'ajouter à nos connaissances et ainsi d'affiner nos techniques.

Ensuite, nous avons pu mettre en évidence les différentes causes d'échec du néo-conduit *in vivo* malgré des résultats *in vitro* prometteurs. La présence d'anomalies au niveau de la structure des greffons et la thrombogénicité potentielle de la paroi endoluminale secondaire à ces anomalies présentent des hypothèses pertinentes expliquant la perméabilité moindre de ces conduits par rapport à leurs contrôles, alors que la faible porosité des greffons d'eVG-CS explique adéquatement l'absence d'un néo-endothélium plus étendu par rapport à ceux d'ePTFE. Ces hypothèses ont mené à des perspectives d'études appropriées visant l'amélioration du néo-

conduit avant d'autres essais *in vivo*. Les points principaux à élucider dans le futur seront donc d'explorer l'effet de différents degrés de porosité des greffons sur l'invasion cellulaire, les méthodes permettant une construction atraumatique des conduits (notamment lors du greffage de CS) et l'amélioration de la résistance structurelle des greffons face aux conditions subies par ces derniers après leur implantation (modification du mélange PU/PCL, modification du diamètre moyen des fibres électrofilées, prothèses ondulées). Ce modèle d'étude, de façon fortuite, a parallèlement été utilisé dans la littérature des dernières années, ce qui ajoute du poids à son caractère approprié dans le contexte des études *in vivo* pour de nouveaux pontages vasculaires.

Dernièrement, le point de la transposabilité des résultats chez l'humain n'a pas pu être élucidé lors de cet essai. La raison principale expliquant ce phénomène, sans toutefois invalider le modèle, est que l'étude a dû être arrêtée précocement suite à la performance inférieure claire des néo-conduits par rapport à leurs contrôles, ce qui n'a pas alloué le suivi prévu à 12 semaines des conduits en ePTFE. La résultante est qu'aucun pontage en ePTFE n'a démontré de défaut significatif. Or, chez l'humain, ces pontages de petit calibre sont reconnus comme présentant des échecs significatifs à moyen-terme, donc tout essai *in vivo* sur le sujet devrait pouvoir démontrer des cas de sténose ou de thrombose de ces greffons utilisés en contrôle pour pouvoir arriver à des conclusions pour les greffons expérimentaux. Une recommandation pour de futures études similaires serait donc d'obtenir un suivi d'au moins 12 semaines pour tenter de prouver ce point.

Ce projet a permis de faire progresser les connaissances sur un nouveau type d'essai *in vivo* pour tester les nouveaux conduits vasculaires de petite taille au stade préclinique. Il a aussi permis de donner des indications pertinentes à notre équipe d'ingénieurs notamment par rapport à l'amélioration de la porosité de prothèses électrofilées et à différentes stratégies de modifications de surfaces bioactives ayant pour but d'améliorer la durabilité *in vivo* des conduits. Notre équipe possède donc maintenant des pistes de solutions dans la construction et les essais *in vitro* de ces néo-conduits pour en améliorer leur performance. De plus, ce projet nous a permis de développer une approche chirurgicale *in vivo* modifiée nous permettant de réduire les pertes de vies animales et donc de réduire l'impact des limitations chirurgicales sur l'étude de néo-conduits dans le futur. Au final, ce projet présente donc une épreuve *in vivo* prometteuse et reproductible pour l'étude de nouveaux pontages vasculaires

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] D. Lloyd-Jones, R.J. Adams, T.M. Brown et al., Heart disease and stroke statistics - 2010 update: A report from the American heart association. 2010, *Circulation* 121(7); 948-954.
- [2] L. Norgren, W.R. Hiatt, J.A. Dormandy et al., Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). 2007, *J. Vasc. Surg.* 45(1 Suppl.); S5-S67.
- [3] G.L. Londrey, D.E. Ramsey, K.J. Hodgson et al., Infrapopliteal bypass for severe ischemia: Comparison of autogenous vein, composite, and prosthetic grafts. 1991, *J. Vasc. Surg.* 13(5); 631-636.
- [4] F.J. Veith, S.K. Gupta, E. Ascer et al., Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions. 1986, *J. Vasc. Surg.* 3(1); 104-114.
- [5] F.W. Hehrlein, M. Schlepper, F. Loskot et al., The use of expanded polytetrafluoroethylene (PTFE) grafts for myocardial revascularization. 1984, *J. Cardiovasc. Surg.* 25(6); 549-553.
- [6] P. Zilla, D. Bezuidenhout, P. Human, Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing. 2007, *Biomaterials* 28; 5009-5027.
- [7] M. Albers, V.M. Battistella, M. Romiti et al., Meta-analysis of polytetrafluoroethylene bypass grafts to infrapopliteal arteries. 2003, *J. Vasc. Surg.* 37(6); 1263-1269.
- [8] O.E. Teebken, A. Haverich, Tissue engineering of small diameter vascular grafts. 2002, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 23(6); 475-485.
- [9] M.S. Baguneid, A.M. Seifalian, H.J. Salacinski et al., Tissue engineering of blood vessels. 2006, *Br. J. Surg.* 93(3); 282-290.
- [10] S. Pashneh-Tala, S. MacNeil, F. Claeysens, The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future. 2016, *Tissue Eng. Part B Rev.* 22(1); 68-100.
- [11] D.G. Seifu, A. Purnama, K. Mequanint, D. Mantovani, Small-diameter vascular tissue engineering. 2013, *Nat. Rev. Cardiol.* 10; 410-421.
- [12] R. Botting, J.R. Vane, Mediators and the anti-thrombotic properties of the vascular endothelium. 1989, *Ann. Med.* 21(1); 31-38.
- [13] M.W. Radomski, R.M.J. Palmer, S. Moncada, The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. 1987, *Br. J. Pharmacol.* 92(3); 639-646.
- [14] A. Sandoo, J.J.C.S.V. van Zanten, G.S. Metsios et al., The endothelium and its role in regulating vascular tone. 2010, *Open Cardiovasc. Med. J.* 4; 302-312.

- [15] A.W. Clowes, T.R. Kirkman, M.A. Reidy, Mechanisms of arterial graft healing. Rapid transmural capillary ingrowth provides a source of intimal endothelium and smooth muscle in porous PTFE prostheses. 1986, *Am. J. Pathol.* 123(2); 220-230.
- [16] N.R. Tai, H.J. Salacinski, A. Edwards et al., Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. 2000, *Br. J. Surg.* 87(11); 1516-1524.
- [17] W.M. Abbott, A. Callow, W. Moore et al., Evaluation and performance standards for arterial prostheses. 1993, *J. Vasc. Surg.* 17(4); 746-756.
- [18] M.J. Collins, X. Li, W. Lv et al., Therapeutic strategies to combat neointimal hyperplasia in vascular grafts. 2012, *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 10(5); 635-647.
- [19] K.A. Rocco, M.W. Maxfield, C.A. Best et al., In vivo applications of electrospun tissue-engineered vascular grafts: A review. 2014, *Tissue Eng. Part B Rev.* 20(6); 628-640.
- [20] A. Hadjizadeh, A. Aji, M.N. Bureau, Nano/micro electro-spun polyethylene terephthalate fibrous mat preparation and characterization. 2011, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 4(3); 340-351.
- [21] A. Hadjizadeh, A. Aji, M. Jolicoeur et al., Effects of Electrospun Nanostructure versus Microstructure on Human Aortic Endothelial Cell Behavior. 2013, *J. Biomed. Nanotech.* 9; 1159-1209.
- [22] H. Savoji, A. Hadjizadeh, M. Maire et al., Electrospun nanofiber scaffolds and plasma polymerization: a promising combination towards complete, stable endothelial lining for vascular grafts. 2014, *Macromol. Biosci.* 14(8); 1084-1095.
- [23] P.K. Thalla, H. Fadlallah, B. Liberelle et al., Chondroitin sulfate coatings display low platelet but high endothelial cell adhesive properties favorable for vascular implants. 2014, *Biomacromolecules* 15(7); 2512-2520.
- [24] H. Savoji, M. Maire, P. Lequoy et al., Combining Electrospun Fiber Mats and Bioactive Coatings for Vascular Graft Prostheses. 2017, *Biomacromolecules* 18(1); 303-310.
- [25] M. Bouchet, M. Gauthier, M. Maire et al., Towards Compliant Small-Diameter Vascular Grafts: Predictive Analytical Model and Experiments. 2019, *Mater. Sci. Eng. C* 100; 715-723.
- [26] C. Charbonneau, B. Liberelle, M.-J. Hébert et al., Stimulation of cell growth and resistance to apoptosis in vascular smooth muscle cells on a chondroitin sulfate/epidermal growth factor coating. 2011, *Biomaterials* 32(6); 1591-1600.
- [27] American National Standards Institute, Cardiovascular implants - Tubular vascular prostheses. 2010, Association for the Advancement of Medical Instrumentation, 56.
- [28] ASTM International, Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. 2012, ASTM D882.
- [29] A. Kónya, K.C. Wright, M. Gounis, K. Kandarpa, Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular aneurysm repair. 2008, *S. of Mod. for Biomed. Res.*, 369-384.

- [30] C. Kilkenny, W.J. Browne, I.C. Cuthill et al., Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. 2010, PLoS Biol. 8(6), e1000412.
- [31] P.F. Sánchez, E.M. Brey, J.C. Briceño, Endothelialization mechanisms in vascular grafts. 2018, J. Tissue Eng. Regen. Med. 12(11); 2164-2178.
- [32] P. Lequoy, H. Savoji, B. Saoudi et al., In Vitro and Pilot in Vivo Evaluation of a Bioactive Coating for Stent Grafts Based on Chondroitin Sulfate and Epidermal Growth Factor. 2016, J. Vasc. Intervent. Radiol. 27(5); 753-760.
- [33] M.J. Moreno, A. Ajji, D. Mohebbi-Kalhari et al., Development of a compliant and cytocompatible micro-fibrous polyethylene terephthalate vascular scaffold. 2011, J. Biomed. Mater. Res. B 97(2); 201-214.
- [34] Y. Chen, X. Ding, Y.L. Li et al., Experimental Models of Compliance and Young's Modulus of Woven Vascular Prosthesis. 2011, Adv. Mater. Res. 332-334; 609-612.
- [35] K. Billiar, J. Murray, D. Laude et al., Effects of carbodiimide crosslinking conditions on the physical properties of laminated intestinal submucosa. 2001, J. Biomed. Mater. Res. 56(1); 101-108.
- [36] H. Rostad, A. Grip, C. Hall, Blood flow measurement in PTFE grafts. 1987, J. Cardiovasc. Surg. 28(3); 262-265.
- [37] D. Mantovani, M. Castonguay, J.F. Pageau et al., Ammonia RF-Plasma Treatment of Tubular ePTFE Vascular Prostheses. 1999, Plasmas Polym. 4(2); 207-228.
- [38] M. Laurent, Utilisation d'une décharge à barrière diélectrique pour développer une matrice polymère plasma dégradable pour des applications vasculaires. 2017, LAPLACE Université Laval, 226.
- [39] Y. Zhu, C. Gao, T. He, J. Shen, Endothelium regeneration on luminal surface of polyurethane vascular scaffold modified with diamine and covalently grafted with gelatin. 2004, Biomaterials 25(3); 423-430.
- [40] Y. Zhu, C. Gao, X. Liu, J. Shen, Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Biomacromolecule Immobilization for Promoting Cytocompatibility of Human Endothelial Cells. 2002, Biomacromolecules 3(6); 1312-1319.
- [41] Y.M. Ju, J.S. Choi, A. Atala et al., Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels. 2010, Biomaterials 31(15); 4313-4321.
- [42] B.M. Whited, M.N. Rylander, The influence of electrospun scaffold topography on endothelial cell morphology, alignment, and adhesion in response to fluid flow. 2014, Biotechnol. Bioeng. 111(1); 184-195.
- [43] S. Soliman, S. Sant, J.W. Nichol et al., Controlling the porosity of fibrous scaffolds by modulating the fiber diameter and packing density. 2011, J. Biomed. Mater. Res. A 96(3); 566-574.
- [44] Z. Zhang, Z. Wang, S. Liu, M. Kodama, Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small-diameter microporous polyurethane vascular prostheses. 2004, Biomaterials 25(1); 177-187.

- [45] T. Pennel, D. Bezuidenhout, J. Koehne et al., Transmural capillary ingrowth is essential for confluent vascular graft healing. 2018, *Acta Biomaterialia* 65; 237-247.
- [46] Z.J. Hu, Z.L. Li, L.Y. Hu, W. He, R.M. Liu, Y.S. Qin, S.M. Wang, The in vivo performance of small-caliber nanofibrous polyurethane vascular grafts. 2012, *BMC Cardiovasc. Disord.* 12; 115.
- [47] T. Pennel, P. Zilla, D. Bezuidenhout, Differentiating transmural from transanastomotic prosthetic graft endothelialization through an isolation loop-graft model. 2013, *J. Vasc. Surg.* 58(4); 1053-1061.
- [48] R.A. White, The effect of porosity and biomaterial on the healing and long-term mechanical properties of vascular prostheses. 1988, *ASAIO Transactions* 34(2); 95-100.
- [49] J. Pu, F. Yuan, S. Li, K. Komvopoulos, Electrospun bilayer fibrous scaffolds for enhanced cell infiltration and vascularization in vivo. 2014, *Acta Biomater.* 13; 131-141.
- [50] Q. Herrington, B. Lacey, P. Sherliker et al., Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce Global Burden of Atherothrombotic Disease. 2016, *Circulation Research* 118; 535-546.
- [51] S.P. Jackson, Arterial thrombosis – insidious, unpredictable and deadly. 2011, *Nature Medicine* 17; 1423-1436.
- [52] N Mackman, Triggers, targets and treatment for thrombosis. 2008, *Nature* 451; 914-918.
- [53] J.A. Laukkanen, S.K. Kunutsor, M. Niemelä et al., All-cause mortality and major cardiovascular outcomes comparing percutaneous coronary angioplasty versus coronary artery bypass grafting in the treatment of unprotected left main stenosis: a meta-analysis of short-term and long-term randomised trials. 2017, *BMJ Open Heart* 4; e000638 1-10.
- [54] Q.-H. Tang, J. Chen, C.-F. Hu, X.-L. Zhang, Comparison Between Endovascular and Open Surgery for the Treatment of Peripheral Artery Diseases: A Meta Analysis. 2020, *Ann Vasc Surg.* 62; 484-495.
- [55] J.J. Siracuse, A. Farber, In Patients with Critical Limb Ischemia Does Bypass Improve Limb Salvage and Quality of Life When Compared to Endovascular Revascularisation? 2017, *Diff. Dec. in Surg.* 3; 163-170.
- [56] T. Bisdas, G. Torsello, R.T. Grungmann et al., Results of peripheral bypass surgery in patients with critical limb ischemia (CRITISCH registry). 2016, *Gefässchirurgie* 21; 71-79.
- [57] M. Desai, A.M. Seifalian, G. Hamilton, Role of prosthetic conduits in coronary artery bypass grafting. 2011, *Eur J of Cardio-Thoracic Surg* 40(2); 394-398.
- [58] C.S. Rihal, D.L. Raco, B.J. Gersh, S. Yusuf, Indications for Coronary Artery Bypass Surgery and Percutaneous Coronary Intervention in Chronic Stable Angina. 2003, *Circulation* 108(20); 2439-2445.

- [59] M.S. Conte, A.W. Bradbury, P. Kolh et al., Global vascular guidelines on the management of chronic limb-threatening ischemia. 2019, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 58(1); S1-S109.e33.
- [60] W.R. Wilson, T.C. Bower, M.A. Creager et al., Vascular Graft Infections, Mycotic Aneurysms, and Endovascular Infections: A Scientific Statement From the American Heart Association. 2016, *Circulation* 134(20), e412-e460.
- [61] P. Nierlich, P. Metzger, F.K. Enzmann et al., The small saphenous vein: an underestimated source for autologous distal vein bypass. 2019, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 58(4); 556-563.
- [62] F. Javairih, V.P. Federico, S. Scali et al., Management of patch infections after carotid endarterectomy and utility of femoral vein interposition bypass graft. 2019, *J. Vasc. Surg.* 69(6); 1815-1823.
- [63] O. Humbarger, J.J. Siracuse, D. Rybin et al., Broad variation in prosthetic conduit use for femoral-popliteal bypass is not justified on the basis of contemporary outcomes favoring autologous great saphenous vein. 2019, *J. Vasc. Surg.* 70(5); 1514-1523.
- [64] S.N. Buttar, T.D. Yan, D.P. Taggart, D.H. Tian, Long-term and short-term outcomes using bilateral internal mammary artery grafting versus left internal mammary artery grafting: a meta-analysis. 2017, *Heart* 103(18); 1419-1426.
- [65] G.M. Fitzgibbon, H.P. Kafka, A.J. Leach et al., Coronary Bypass Graft Fate and Patient Outcome: Angiographic Follow-up of 5,065 Grafts Related to Survival and Reoperation in 1,388 Patients During 25 Years. 1996, *JACC* 28(3); 616-626.
- [66] J.C. Stanley, E. Criado, G.R. Upchurch Jr et al., Pediatric renovascular hypertension: 132 primary and 30 secondary operations in 97 children. 2006, *J. Vasc. Surg.* 44(6); 1219-1228.
- [67] A. Florian, L.H. Cohn, G.J. Dammin, J.J. Collins, Small Vessel Replacement With Gore-tex (Expanded Polytetrafluoroethylene). 1976, *Arch. Surg.* 111(3); 267-270.
- [68] A. Branchereau, P. Rudondy, J.P. Gournier, H. Espinoza, The albumin-coated knitted dacron aortic prosthesis: a clinical study. 1990, *Ann. Vasc. Surg.* 4(2); 138-142.
- [69] M.R. Kapadia, D.A. Popowich, M.R. Kibbe, Modified prosthetic vascular conduits. 2008, *Circulation* 117(14); 1873-1882.
- [70] A.N. Sidawy, R. Gray, A. Besarab et al., Recommended standards for reports dealing with arteriovenous hemodialysis accesses. 2002, *J. Vasc. Surg.* 35(3), 603-610.
- [71] S. Deb, E.A. Cohen, S.K. Singh et al., Radial Artery and Saphenous Vein Patency More Than 5 Years After Coronary Artery Bypass Surgery. 2012, *JACC* 60(1); 28-35.
- [72] K.W.H. Chiu, R.S.M. Davies, P.G. Nightingale et al., Review of Direct Anatomical Open Surgical Management of Atherosclerotic Aorto-Iliac Occlusive Disease. 2010, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 39(4); 460-471.

- [73] A. Mingoli, R.J. Feldhaus, C. Fabrina et al., Comparative results of carotid-subclavian bypass and acilloacillary bypass in patients with symptomatic subclavian disease. 1992, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 6(1); 26-30.
- [74] Y. Yang, J. Loscalzo, Regulation of Tissue Factor Expression in Human Microvascular Endothelial Cells by Nitric Oxide. 2000, *Circulation* 101(18), 2144-2148.
- [75] W.C. Aird, Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. 2007, *Circulation Research* 100(2); 158-173.
- [76] A. Avolio, D. Jones, M. Tafazzoli-Shadpour, Quantification of Alterations in Structure and Function of Elastin in the Arterial Media. 1998, *Hypertension* 32(1); 170-175.
- [77] M.M. Demir, I. Yilgor, E. Yilgor, B. Erman, Electrospinning of polyurethane fibers. 2002, *Polymer* 43(11); 3303-3309.
- [78] I.Yalcin Enis, T.G. Sadikoglu, Design parameters for electrospun biodegradable vascular grafts. 2016, *J. Ind, Text.* 47(8); 2205-2227.
- [79] D. Li, R. Xia, Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel? 2004, *Advanced materials* 16(14); 1151-1170.
- [80] H. Wolinsky, S. Glagov, A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. 1967, *Circulation Research* 20(1); 99-111.
- [81] B.I. Lévy, A. Tedgui, *Biology of the Arterial Wall.* 2007, Springer Sc. & Bus. Med. 1(2); 25-44.
- [82] A.F. Sanchez, E.M. Brey, J.C. Briceno, Endothelialization mechanisms in vascular grafts. 2018, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 12(11); 2164-2178.
- [83] A.N. Sidawy, B.A. Perler, *Rutherford's Vascular Surgery and Endovascular Therapy.* 2018, Elsevier Health Sciences 1(8); 87-96.
- [84] H.J. Griesser, Degradation of Polyurethanes in Biomedical Applications - A Review. 1991, *Polym. Degrad. Stabil.* 12(11); 329-354.
- [85] D.F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility. 2008, *Biomaterials* 29(20); 2941-2953.
- [86] C.S. Ong, T. Fukunishi, R.H. Liu et al., Bilateral arteriovenous shunts as a method for evaluating tissue-engineered vascular grafts in large animal models. 2017, *Tissue Engineering Part. C* 23(11); 728-735.
- [87] C. Devine, C. McCollum et al., Heparin-Bonded Dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass: five-year results of a prospective randomized multicenter trial. 2004, *J. Vasc. Surg.* 40(5); 924-931.
- [88] T. Nakatani, Y. Fujii, T. Goyama, S. Ozama, Novel DLC Coating Technique on an Inner-wall of Extended Polyfluoroethylene Vascular Grafts Using Methane Plasma Produced by AC HV Discharge. 2018, *J. P. Sc. and Tech.* 31(3); 373-377.
- [89] M. Batt, E. Jean-Baptiste, S. O'Connor et al., In-situ Revascularisation for Patients with Aortic Graft Infection: A Single Centre Experience with Silver Coated Polyester Grafts. 2008, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 36(2); 182-188.

- [90] A. de Mel, G. Jell, M.M. Stevens, A.M. Seifalian, Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review. 2008, *Biomacromolecules* 9(11); 2969-2979.
- [91] J. Johnson, D. Ohst, T. Groehl et al., Development of novel, bioresorbable, small-diameter electrospun vascular grafts. *J. Tissue. Sci. Eng.* 6(2); 1-7.
- [92] H. Jinnouchi, S. Torii, A. Sakamoto et al., Fully bioresorbable vascular scaffolds: lessons learned and future directions. 2019, *Nat. Rev. Cardiol.* 16(5); 286-304.
- [93] M.J. Byrom, P.G. Bannon, G.H. White, M.K.C. Ng, Animal models for the assessment of novel vascular conduits. 2010, *J. Vasc. Surg.* 52(1); 176-195.
- [94] M.H. Wu, Q. Shi, Y. Kouchi et al., Implant site influence on arterial prosthesis healing : A comparative study with a triple implantation model in the same dog. 1997, *J. Vasc. Surg.* 25(3); 528-536.
- [95] T. Ueberrueck, J. Tautenhahn, L. Meyer et al., Comparison of the Ovine and Porcine Animal Models for Biocompatibility Testing of Vascular Prostheses. 2005, *J. Surg. Res.* 124(2); 305-311.
- [96] S.W. Jordan, C.A. Haller, R.E. Sallach et al., The effect of a recombinant elastin-mimetic coating of an ePTFE prosthesis on acute thrombogenicity in a baboon arteriovenous shunt. 2007, *Biomaterials* 28(6); 1191-1197.
- [97] P. Tillman, S.N. Carson, L. Talken, Platelet function and coagulation parameters in sheep during experimental vascular surgery. 1981, *Lab. Animal Science* 31(3); 263-267.
- [98] A.E. Simor, J.L. Brunton, I.E. Salit et al., Q fever : hazard from sheep used in research. 1984, *Can. Med. Ass. J.* 130(8); 1013-1016.
- [99] S. Tugulu, P. Silacci, N. Stregiopulos, H.A. Klok, RGD-Functionalized polymer brushes as substrates for the integrin specific adhesion of human umbilical vein endothelial cells. 2007, *Biomaterials* 28(16); 2536-2546.
- [100] G. Sabra, P. Vermette, Endothelial cell responses towards low-fouling surfaces bearing RDG in a three-dimensional environment. 2011, *Exp. Cell. Res.* 317(14); 1994-2006.
- [101] L.V. Parise, S.S. Smyth, B.S. Coller, Platelet morphology, biochemistry and function. 2001, *Williams hematology* 7; 1597-1645.
- [102] R.S. Labow, Y. Tang, C.B. McCloskey, J.P. Santerre, The effect of oxidation on the enzyme-catalyzed hydrolytic biodegradation of poly(urethane)s. 2002, *J. Biomat. Sc.* 13(6); 651-665.
- [103] M.J. Byrom, P.G. Bannon, G.H. White, M.K. Ng, Optimal graft diameter: effect of wall shear stress on vascular healing. 2009, *J. Vasc. Surg.* 10(3); 176-195.
- [104] N. Jirofti, D. Mohebbi-Kalhari, A. Samimi et al., Small-diameter vascular graft using co-electrospun composite PCL/PU nanofibers. 2018, *Biomedical Materials* 13(5); e1-e15.

- [105] K. Schleimer, H. Jalaie, M. Afify et al., Sheep models for evaluation of novel patch and prosthesis material in vascular surgery: tips and tricks to avoid possible pitfalls. 2018, *Acta Vet. Scand.* 60(1); e1-e12.
- [106] K. Madhavan, W. Elliot, Y. Tan et al., Performance of marrow stromal cell-seeded small-caliber multilayered vascular graft in a senescent sheep model. 2018, *Biomedical Materials* 13(5); e1-e13.
- [107] B. Wulff, S. Stahlhoff, R. Vonthein et al., Biomimetic Heparan Sulfate-Like Coated ePTFE Grafts Reduce In-graft Neointimal Hyperplasia in Ovine Carotids. 2017, *Ann. Vasc. Surg.* 40; 274-284.
- [108] A. Basir, M. L. de Jong, A. Vink et al., A Novel Cardiovascular Prosthesis Made from Woven Ultrahigh-Molecular-Weight Polyethylene Fibers, Proof of Concept in a Sheep Model. 2018, *Ann. Vasc. Surg* 52; 244-254.
- [109] A.F. AbuRahma, M. Srivastava, P.A. Stone et al., Critical appraisal of the Carotid Duplex Consensus criteria in the diagnosis of carotid artery stenosis. 2011, *J. Vasc. Surg.* 53(1); 53-60.
- [110] J.A. Shaw, B.A. Kingwell, A.S. Walton et al., Determinants of coronary artery compliance in subjects with and without angiographic coronary artery disease. 2002, *JACC*, 39 (10); 1637-1643.
- [111] M.F. O'Rourke, M.G. Taylor, Vascular impedance of the femoral bed. 1966, *Circulation Research* 18(2); 126-139.
- [112] E. Ascer, F.J. Veith, S.A. White-Flores et al., Intraoperative outflow resistance as a predictor of late patency of femoropopliteal and infrapopliteal arterial bypasses. 1987, *J. Vasc. Surg.* 5(6); 820-827.
- [113] S.A. Sell, M.J. McClure, C.P. Barnes et al., Electrospun polydioxanone–elastin blends: potential for bioresorbable vascular grafts. 2006, *Biomedical materials* 1(2); 72-80.
- [114] W.N. O'connor, S. Valle, A combination Verhoeffs elastic and Masson's trichrome stain for routine histology. 1982, *Stain technology* 57(4); 207-210.
- [115] R. Lattouf, R. Younes, D. Lutomski et al., Picosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. 2014, *J. Hist. & Cyto.* 62(10); 751-758.
- [116] M. Grabenwöger, F. Fitzal, J. Sider et al., Endothelialization of biosynthetic vascular prostheses after laser perforation. 1998, *Ann. Thor. Surg.* 66(6); S110-S114.
- [117] S.E. Matthiasson, D. Bergqvist, A. Lundell, B. Lindblad, Effect of dextran and enoxaparin on early ePTFE graft thrombogenicity in sheep. 1995, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 9(3); 284-292.
- [118] P.F. Dunn, K.D. Newman, M. Jones et al., Seeding of vascular grafts with genetically modified endothelial cells: secretion of recombinant TPA results in decreased seeded cell retention in vitro and in vivo. 1996, *Circulation*, 93(7); 1439-1446.