

Université de Montréal

**Revêtement anti-apoptotique à base de chondroïtine
sulfate : Vers un stent-graft bioactif**

par

Cindy Charbonneau

Département de Génie Biomédical

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)
en Génie Biomédical

Septembre, 2011

© Cindy Charbonneau, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Revêtement anti-apoptotique à base de chondroïtine sulfate : Vers un stent-graft bioactif!

Présentée par :
Cindy Charbonneau

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

L'Hocine Yahia, président-rapporteur
Sophie Lerouge, directeur de recherche
Julian Zhu, co-directeur
Nicolas Noiseux, membre du jury
Nathalie Fauchoux, examinateur externe
Jocelyn Dupuis, représentant du doyen de la FES

Résumé

La réparation endovasculaire (EVAR) est une technique minimalement invasive permettant de traiter l'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) par l'entremise d'un stent-graft (SG). L'utilisation d'EVAR est actuellement limitée par de fréquentes complications liées à une guérison inadéquate autour de l'implant. Ce manque de guérison est principalement dû au type de recouvrement polymérique des SG, au milieu pro-apoptotique des AAA et à l'accès réduit aux nutriments et à l'oxygène après EVAR. L'objectif de cette thèse consistait à concevoir un revêtement bioactif permettant d'inhiber l'apoptose et stimuler la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), pour ainsi favoriser la guérison des tissus vasculaires autour des SG.

La chondroïtine-4-sulfate (CS) a d'abord été choisie, car elle a été identifiée comme un médiateur important de la réparation vasculaire. Il a été démontré que la CS en solution influence directement la résistance à l'apoptose des CMLV, en plus de favoriser la différenciation myofibroblastique chez les fibroblastes. Dans le cadre de ce projet, un premier revêtement à base de CS et de collagène a été créé. Bien que le revêtement permettait d'induire une résistance à l'apoptose chez les CMLV, il se désintérait trop rapidement dans des conditions aqueuses. Une nouvelle méthodologie a donc été adaptée afin de greffer la CS directement sur des surfaces aminées, à l'aide d'un système utilisant un carbodiimide.

Dans le but d'accroître la croissance des CMLV à la surface des revêtements, le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) a ensuite été sélectionné. En plus de ses propriétés mitogéniques et chimiotactiques, l'EGF stimule la production d'éléments de la matrice extracellulaire, comme le collagène et la fibronectine. De plus, l'activation du récepteur de l'EGF inhibe également l'apoptose des CMLV. L'EGF a donc été greffé sur la CS. Le revêtement de CS+EGF a démontré une bonne uniformité et bioactivité sur des surfaces de verre aminé.

Dans une 3^{ème} étape, afin de permettre de transposer ce revêtement bioactif sur des implants, plusieurs méthodes permettant de créer des groupements d'amines primaires sur les biomatériaux polymériques comme le PET ou le ePTFE ont été étudiées. La polymérisation par plasma a été choisie pour créer le revêtement CS+EGF à la surface de PET. Une fois de plus, celui-ci a permis d'inhiber l'apoptose des CMLV, dans des conditions pro-apoptotiques, et de favoriser la croissance des cellules. Le revêtement de CS et d'EGF, déposé sur des surfaces aminées, possède des caractéristiques biologiques intéressantes et semble donc prometteur pour favoriser une meilleure guérison autour des SG.

Mots-clés : Anévrisme de l'aorte abdominale, stent-graft, revêtement bioactif, chondroïtine sulfate, facteur de croissance de l'épiderme, apoptose.

Abstract

Endovascular aneurysm repair (EVAR) is a minimally invasive technique performed to treat abdominal aortic aneurysm (AAA) through the use of a stent-graft (SG). The usage of EVAR is presently limited by postoperative complications related to an incomplete healing of the surrounding tissues. The materials currently used in SG, the proapoptotic pathophysiology of AAA and the limited access to nutrients and oxygen, all limit the wound healing process and proper tissue ingrowth around the implant. The main objective of this thesis was to create of a bioactive coating inhibiting cell apoptosis and increasing vascular smooth muscle cells (VSMC) growth, to promote healing of the vascular tissues surrounding SG.

Chondroitin sulfate (CS) was chosen since recent findings have shown that this polysaccharide triggers key mechanisms involved in vascular repair. CS in solution was shown to inhibit apoptosis of VSMC, as well as stimulate myofibroblast differentiation. A coating of CS and collagen was first created for the purpose of this work. Although the coating was shown to increase cell resistance to apoptosis with VSMC, it was not stable enough, since it rapidly disintegrated in aqueous solutions. A new methodology was thus proposed, where CS was grafted right on aminated surfaces, through carbodiimide chemistry.

Epidermal growth factor (EGF) was then chosen to increase VSMC growth on the coatings. EGF is a known mitogenic and chemotactic growth factor for VSMC. It also stimulates the production of extracellular matrix elements, such as collagen and fibronectin. The activation of EGF receptor (EGFR) also triggers various cell signalling pathways modulating VSMC resistance to apoptosis. EGF was thus grafted on CS. CS+EGF coating on aminated glassed slides was shown to be uniform and bioactive.

Finally, several methodologies to produce primary amines on polymeric biomaterials, such as PET and ePTFE, were studied in order to eventually transfer the

coating on implants. Plasma polymerization was chosen to create the CS+EGF coating. Once again the coating was shown to decrease VSMC apoptosis, in apoptotic conditions, and favour cell growth. Overall, the CS and EGF coating on aminated surfaces possesses interesting biological features and is a promising avenue to stimulate vascular healing around SG.

Keywords : Abdominal aortic aneurysm, stent-graft, bioactive coating, chondroitin sulfate, epidermal growth factor, apoptosis.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xvi
Remerciements	xx
Introduction	1
Chapitre 1: Revue de littérature	4
1.1 L'aorte	4
1.1.1 Morphologie et structure de l'aorte	4
1.1.2 Matrice extracellulaire dans les tissus vasculaires	7
1.2 L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA)	11
1.2.1 Étiologie, prévalence et facteurs de risque	11
1.2.2 Pathophysiologie	13
1.3 Apoptose	15
1.3.1 Voies de l'apoptose	15
1.3.2 Caractéristiques morphologiques de l'apoptose	17
1.3.3 Apoptose et anévrismes	18
1.4 Traitements de l'anévrisme de l'aorte abdominale	20
1.4.1 Chirurgie conventionnelle	20
1.4.2 Réparation endovasculaire	21
1.4.3 Complications de la réparation endovasculaire	22
1.4.4 Manque de guérison après la réparation endovasculaire	24
1.4.5 Biomatériaux polymériques utilisés dans les SG	26
1.4.6 Stratégies étudiées pour améliorer la guérison des AAA	27
1.5 Modifications de surfaces	29
1.5.1 Modification par plasma	30
1.5.2 Techniques d'immobilisation de molécules	32

1.6 Biomolécules pour favoriser la guérison des tissus vasculaires	36
1.6.1 Médiateurs pro-adhésifs et pro-prolifératifs	36
1.6.2 Médiateurs anti-apoptotiques	38
1.6.3 Chondroïtine sulfate	41
1.6.4 Facteur de croissance de l'épiderme	46
Chapitre 2: Objectifs du projet	54
Chapitre 3: Revêtement de chondroïtine sulfate et collagène (Article 1)	55
3.1 Présentation de l'article	55
3.2 Chondroitin-4-Sulfate: A Bioactive Macromolecule to Foster Vascular Healing around Stent-Grafts after Endovascular Aneurysm Repair	56
3.2.1 Abstract	57
3.2.2 Keywords	57
3.2.3 Introduction	58
3.2.4 Experimental Part	61
3.2.5 Results and Discussion	67
3.2.6 Conclusion	74
3.2.7 Acknowledgements	74
Chapitre 4: Optimisation d'un revêtement de CS et d'EGF (Article 2)	75
4.1 Présentation de l'article	75
4.2 Stimulation of cell growth and resistance to apoptosis in vascular smooth muscle cells on a chondroitin sulfate / epidermal growth factor coating	76
4.2.1 Abstract	77
4.2.2 Keywords	77
4.2.3 Introduction	78
4.2.4 Materials and methods	81
4.2.5 Results	89
4.2.6 Discussion	99
4.2.7 Conclusions	104
4.2.8 Acknowledgements	104

Chapitre 5: Transfert du revêtement bioactif sur des biomatériaux polymériques (Article 3)	105
5.1 Présentation de l'article	105
5.2 Chondroïtine sulfate and epidermal growth factor immobilization after plasma polymerization : a versatile anti-apoptotic coating to promote healing around stent-grafts	106
5.2.1 Abstract	107
5.2.2 Keywords	107
5.2.3 Introduction	108
5.2.4 Materials and methods	111
5.2.5 Results	120
5.2.6 Discussion	131
5.2.7 Conclusions	135
5.2.8 Acknowledgements	135
Chapitre 6: Discussion et recommandations	136
Bioactivité de la CS greffée	138
Activité anti-apoptotique du revêtement CS+EGF	140
Bioactivité de EGF greffé	142
Effet du revêtement sur le phénotype cellulaire	144
Autres travaux futurs	147
Comparaison du revêtement par rapport à la littérature	148
Chapitre 7 : Conclusion	152
Bibliographie	154

Liste des tableaux

Tableau 1 : Sections de l'aorte	5
Tableau 2: Structure et source des différents glycosaminoglycanes (À partir de [13, 14])..	10
Tableau 3: Étapes de l'AAA (Adapté de [11, 15, 17, 18])	12
Tableau 4 : ToF-SIMS analysis of amino-coated glass slides with/o CS (40 µm x 40 µm). ^a Total positive ion count ^b Total negative ion count.	92
Tableau 5: Solutions used for assessing the stability of the different coatings.....	116
Tableau 6 : Hydrophilicity and chemical compositions of pristine and modified PET surfaces, obtained by WCA and XPS measurements respectively (n = 3)	121

Liste des figures

Figure 1: Sections de l'aorte	4
Figure 2: Structure de la paroi des artères.....	6
Figure 3: Voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose [31].....	16
Figure 4 : A) Chirurgie conventionnelle et B) réparation endovasculaire [39]	20
Figure 5: Types de fuites sanguines [51]	23
Figure 6: Réacteurs a) L-PPE:N b) H-PPE:N et c) UV-PE:N [80].....	32
Figure 7: Adsorption des protéines selon la charge et l'hydrophilicité de la surface [72]...	33
Figure 8: Libération de médiateurs anti-apoptotiques pour les CMLV par les cellules endothéliales apoptotiques [121].....	41
Figure 9: Apoptose des CMLV en présence de CS en solution dans un milieu normal (N) ou sans sérum (SS) (* et ** $p < 0.05$ par rapport au milieu sans sérum à 8h et 24h respectivement)	44
Figure 10: Structure de l'EGF humain	47
Figure 11: Activation et dimérisation du EGFR [142].....	48
Figure 12: Phénomène d'excitation croisée entre l'activation et l'inhibition de l'apoptose après l'activation du EGFR [144].....	49
Figure 13: Apoptose des CMLV en présence d'EGF en solution dans un milieu normal (N) ou sans sérum (SS) (* $p < 0.05$ par rapport au milieu sans sérum).....	50
Figure 14: Apoptose des CMLV en présence de CS et d'EGF en solution dans un milieu normal (N) ou sans sérum (SS) (* $p < 0.05$ par rapport au milieu sans sérum).....	51
Figure 15: Déplétion des CMLV en présence de CS et d'EGF en solution dans un milieu normal (N) ou sans sérum (SS) (* $p < 0.05$ par rapport au milieu sans sérum).....	52
Figure 16: Structure of CS, a polysaccharide containing two alternating units D-GlcA and D-GalNac	60
Figure 17: Crosslinking of collagen and CS with EDC/NHS. EDC covalently attaches CS to collagen via amide bonds and NHS stabilizes the <i>o</i> -acylisourea amine-reactive intermediates	63

Figure 18: FT-IR of collagen (CC) and collagen-CS (CSC) coatings. Spectrum of CC and CSC showed typical peaks of collagen. Specific peaks of CS were masked by collagen peaks in CSC.	68
Figure 19: SEM of CC and CSC coatings. CC and CSC coatings are relatively smooth, uniform and nonporous surfaces.	68
Figure 20: VSMC adhesion on virgin (PET) and coated (CC and CSC) PET surfaces. After 4h of incubation in DMEM/F12; $n \geq 7$ (* $p < 0.05$ with PET) determined by MTT assay. Results are expressed as the percentage of absorbance obtained with PCP controls. CC and CSC coatings significantly increased cell adhesion compared to PET.	69
Figure 21: VSMC viability on CC and CSC coatings, compared to a control biocompatible surface (PCP), determined as the ratio of absorbance in MTT assay after 48 h of incubation in DMEM/F12 compared to t_0 ($n \geq 3$).	70
Figure 22: VSMC viability in serum-free medium, when adhered on virgin PET, coated PET (CC and CSC) and cell culture plates (PCP). Data are expressed as the ratio of absorbance after 24 h of incubation in serum-free medium (SS) vs. after 24 h in normal medium (N); $n \geq 4$ (* $p < 0.05$ with PET).	72
Figure 23 : Silanization procedure used for the self-assembly of APTES-monolayer on silicon wafers	83
Figure 24: Chemical structure of chondroitin-4-sulfate ($n \frac{1}{4} 10$ to 100)	83
Figure 25: EDC/NHS coupling reaction	83
Figure 26 : Dry thickness of CS coating assessed by ellipsometry as a function of CS concentration ($n \geq 5$).	89
Figure 27 : Dry thickness (left axis) and water contact angle measurement (right axis) of APTES-coated (APTES), CS-coated (CS), CS+EGF-coated (CS+EGF) silicon wafers assessed by ellipsometry and static water contact angle respectively. CS incubated on APTES-coated silicon wafers without EDC/NHS in the coupling reaction solution (CS*) was evaluated as a reference ($n \geq 5$). The error bars represent the cumulative errors after each layer (APTES, CS and CS+EGF).	90

- Figure 28 : ToF-SIMS images of C_3H_8N (A and D), SO (B and E) and SO_3 (C and F) fragments on CS-coated glass slides (A-C) and amino-coated glass slides (D-F). Each pixel corresponds to C_3H_8N , SO or SO_3 fragments that are specific to CS. The total counts (tc) of each fragment are also given in Figure inserts. In each case, the scale bar corresponds to 2 μm 91
- Figure 29 : Dry thickness of CS+EGF coating assessed by ellipsometry as a function of EGF concentration ($n \geq 5$). 93
- Figure 30 : VSMC crystal violet staining after 4- hours of adhesion (A-C) and 7- days of cell growth (D-F) on amino-coated (A and D), CS-coated (B and E) and EGF+CS-coated glass slides (C and F). Scale bars correspond to 100 μm 94
- Figure 31 : VSMC growth on TCPS (\square) and amino-coated (\bullet), CS-coated (\circ) and EGF+CS-coated glass slides (\blacksquare). The graph presents the ratios of cell counts on each surface, after 24 hours, 4 days and 7 days, compared to their respective initial cell count after 4h of cell adhesion ($n \geq 10$). Results after 7 days of cell growth on EGF+CS-coated glass slides (\ddagger) were underestimated as VSMC formed multilayers as illustrated in Figure 30. 96
- Figure 32 : Actin and nucleus staining of VSMC on amino-coated (A), CS-coated (B) and EGF+CS-coated glass slides (C) (Scale bars: 100 μm). Actin was stained with phalloidin-Alexa 488 (green) and nucleus with HT (blue) after 7 days of cell culture. 97
- Figure 33 : Proportion of apoptotic cells on PCP with normal medium (Ctrl+), PCP with serum-free (SS) medium (Ctrl-), CS-coated glass slides with SS medium (CS), EGF+CS-coated glass slides with SS medium (EGF+CS) and CS-coated glass slides + 10 ng/ml EGF in solution with SS medium (EGF*+CS). Cell apoptosis was significantly lower on all surfaces after 6 and 24 hours when compared to the negative control (\square and * $p < 0.05$ compared to Ctrl- at 6h and 24h respectively, $n \geq 9$). 98
- Figure 34 : Field-emission scanning electron microscopy images of A) LP B) LP/CS C) HP C) HP/CS (Scale bars: 1 μm). 122

- Figure 35 : Cell apoptosis on PET, LP, LP/CS, HP, HP/CS, PETf and PETf/CS in serum-free medium after 24 h. Proportions of apoptotic cells were significantly lower on all surfaces compared with PET (* $p < 0.001$). CS grafting also decreased cell apoptosis on LP (** $p < 1 \times 10^{-6}$). Cell apoptosis was significantly lower on LP/CS compared with PETf/CS ($p < 1 \times 10^{-5}$) ($n \geq 6$).124
- Figure 36 : Residual thickness of LP coating after immersion in MES+EDC+NHS+CS (Sol 1), MES+EDC+NHS (Sol 2), Milli-Q water (Sol 3), and PBS 1x (Sol 4) for 60 min. Residual thicknesses were calculated from initial thickness measurement of LP (100%) and final measurements after immersion.125
- Figure 37 : VSMC growth on TCPS, PET, LP, LP/CS and LP/CS+EGF. The graph presents cell counts on each surface, after 24, 96 and 168 h, after normalization to their respective initial cell count, i.e., after 4 h of cell adhesion ($n = 8$). Cell growth was significantly more important on surfaces where CS and EGF were both grafted (* $p < 0.005$ compared to LP at 24 h, ** $p < 0.005$ compared to all surfaces at 96 h and *** $p < 0.005$ compared to all surfaces at 168 h).126
- Figure 38 : Actin, vinculin and nucleus staining of VSMC on PET, LP, LP/CS and LP/CS+EGF (Scale bars: 100 μm). Nucleus (blue / row A) was stained with HT, actin (green / row A) with phalloidin-Alexa 488 and vinculin (red / row B) with mouse anti-vinculin (primary antibody) + anti-mouse Alexa 555 (secondary antibody) and after 4 h of cell culture. Rows D and E represent a merge of actin, vinculin and nucleus staining after 4 h and 7 days of cell culture.128
- Figure 39 : Cell apoptosis on TCPS, PET, LP, LP/CS and LP/CS+EGF in SS medium after 6 and 24 h. Proportion of apoptotic cells was significantly higher on PET compared to all the surfaces ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$ after 6 and 24 h respectively). Cell apoptosis on LP/CS and LP/CS+EGF was significantly lower compared to LP after at 6 h (* $p < 0.002$) and 24 h (** $p < 1 \times 10^{-16}$) ($n \geq 8$).129
- Figure 40 : HT/PI staining of VSMC after 24 h in SS medium on A) PET B) LP/CS+EGF and C) LP/CS (Scale bars: 100 μm). The experiment was also conducted on D) LP/CS+EGF with VSMC exposed to PD153035 a chemical inhibitor of EGFR.....130

Figure 41: Variation du pourcentage de cellules apoptotiques en présence du revêtement de CS après 4 heures d'hypoxie (*p < 0.001 par rapport à CS/H:PPEN).....	139
Figure 42: Phosphorylation de ERK 1/2 du revêtement greffé sur verre aminolysé	141
Figure 43: Facteurs pouvant influencer le phénotype des CMLV [213]	146

Liste des abréviations

AAA	Anévrisme de l'aorte abdominale
AIF	Facteur inducteur d'apoptose
APTES	3-aminopropyltriéthoxysilane
bFGF	Facteur de croissance des fibroblastes basique
CC	Revêtement de collagène
CMLV	Cellules musculaires lisses vasculaires
CS	Chondroïtine-4-sulfate
CSC	Revêtement de collagène et de CS
CE	Cellules endothéliales
DISC	Complexe oligomérique induisant la mort cellulaire
DMEM/F12	Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient mixture F-12 Ham's
DMMB	Diméthylmethylene blue
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride
EGF	Facteur de croissance de l'épiderme
EGFR	Récepteur du facteur de croissance de l'épiderme
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
EtOH	Éthanol
EVAR	Réparation endovasculaire de l'anévrisme
FADD	Domaine de mort associé à Fas (<i>Fas associated death domain</i>)
FBS	Sérum fœtal bovin
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FT-IR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GAG	Glycosaminoglycane
HB-EGF	Facteur de croissance de l'épiderme lié à l'héparine
H-PPE:N	Polymère plasma riche en azote déposé à pression atmosphérique à partir d'éthylène
HOPI	Coloration au Hoechst 33342 (2'-(4-éthoxyphényl)-5-(4-méthyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1H-benzimidazole) et à l'iodure de propidium

IAP	Inhibiteur de l'apoptose
IL	Interleukine
INF	Interféron
LC-SPDP	Succinimidyl 6-[30-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate
LEE	Limitante élastique externe
LEI	Limitante élastique interne
L-PPE:N	Polymère plasma riche en azote déposé à basse pression à partir d'éthylène
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEC	Matrice extracellulaire
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid
Milieu N	Milieu normal
Milieu SS	Milieu sans sérum
MMP	Métalloprotéase matricielle
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide
N	Milieu normal (DMEM/F12)
NF κ B	Nuclear factor-kappa B
NHS	<i>n</i> -hydroxysuccinimide
β NMA	Actine non musculaire
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthétase
PBS	Solution physiologique tamponnée par les phosphates
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEG	Polyéthylène glycol
PET	Poly(éthylène) téréphtalate
PET _f	Poly(éthylène) téréphtalate fonctionnalisé par plasma
PS	Phosphatidyl sérine
ePTFE	Polytétrafluoroéthylène expansé
QCM-D	Microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation
RFGD	Décharge lumineuse de radiofréquence

ROS	Dérivés réactifs d'oxygène (<i>Reactive oxygen species</i>)
α SMA	Alpha smooth muscle actin
SCF	Facteur des cellules souches (<i>Stem cell factor</i>)
SEM	Microscopie électronique à balayage
SG	Stent-graft
SIS	Sous-muqueuse du petit intestin
SS	Milieu sans-sérum
TCPS	Plaque de culture en polystyrène (<i>Tissue culture polystyrene plates</i>)
TGF	Facteur de croissance transformant
TEM	Microscopie électronique en transmission
TIMP	Inhibiteurs tissulaire
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TPA	2-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate
VEGF	Facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires
XPS	Spectrométrie photoélectronique par rayons X

*À tout ceux qui ont cru en moi et tout
spécialement à mon amour de tous les jours!*

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice, Sophie Lerouge, qui m'a supporté tout au long de ce projet. Sa curiosité scientifique et ses connaissances multidisciplinaires ont fait en sorte qu'elle a su me donner des conseils judicieux, me permettant d'arriver à mes fins par des chemins alternatifs et efficaces, lors des impasses. De plus, elle a été d'un grand support au plan personnel et encore une fois ses conseils m'ont permis de passer au travers en y sortant plus forte!

J'aimerais ensuite remercier mon co-directeur, Julian Zhu, qui m'a assisté au démarrage du projet. Ses connaissances en chimie fondamentale m'ont permis de bien comprendre les différentes options de greffage et ont facilité mes démarches expérimentales.

J'aimerais dédier une attention particulière à Gregory DeCrescenzo, ainsi qu'à Marie-Josée Hébert, qui ont été bien plus que des collaborateurs pour ce projet. Tous deux étaient toujours disponibles pour répondre aux questions et discuter des différentes avenues pour le projet. Leur expertise et points de vue ont été d'une grande aide à la réalisation de ce projet. Et leurs encouragements étaient grandement appréciés!

J'aimerais remercier les nombreux collaborateurs, ainsi que toutes les personnes qui ont contribué au projet et plus particulièrement à Juan-Carlos Ruiz, Benoît Liberelle, Cyril Boucher, Julien Gautrot, Pierre-Luc Girard-Lauriault, Houman Savoji, Michael R. Wertheimer, Nicolas Hegerle, July Dorion Thibaudeau, Émilie Dubeau, Émilie Tétrault et Audrey Jousse.

J'aimerais remercier tous mes collègues du LBeV (Marion Maire, Pauline Lequoy, Saoussen Berrhamoune, Jean-Michel Coutu, Jérémie Barrette, Ahmed Fatimi, Bruno Lacolla, Pradeep Thalla, Hicham Fadlallah, Marie-Christine Bonneviot et Annie Major) pour votre bonne humeur et votre soutien. Je suis bien contente d'avoir fait la connaissance

de chacun d'entre vous et je suis notamment contente d'avoir découvert des amis chers parmi vous. J'ai apprécié les nombreux échanges en votre compagnie et nos petites activités improvisées! Je remercie également mes collègues du 9ie (Mathilde Soulez, Nathalie Brassard, Marc-André Raymond et Patrick Laplante) pour votre apport scientifique et nos petites discussions lors de mes passages! Un merci spécial à Marc-André qui m'a initié au monde de la culture cellulaire.

J'aimerais également remercier tous mes amis, ainsi que mes confrères et consoeurs de l'univers du cheerleading (Carabins et Spirix) pour m'avoir encouragée et supportée. Un merci particulier à Geneviève et Martin (et Adam) pour votre soutien et votre amitié qui m'est très chère.

Un merci spécial à toute ma famille et ma belle-famille. Plus spécifiquement à mes parents qui m'ont tout d'abord transmis des valeurs essentielles à la réussite d'un tel projet, soit la persévérance, la passion et le courage, mais également puisqu'ils ont toujours cru en moi et mes moyens. Sans leur soutien, je n'aurais pas accompli tout ce que j'ai fait à ce jour! Finalement, je tiens à remercier Pascal, mon âme sœur, mon yang, mon équilibre et mon homme! Son support, son amour inconditionnel et ses encouragements m'ont permis de foncer droit devant et d'atteindre des buts/rêves plus grands que souhaités!

Merci à tous ☺

Introduction

Dans les pays industrialisés, l'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) est responsable de 1-3% de tous les décès chez les hommes âgés entre 65 et 85 ans [1]. L'AAA se caractérise par une dilatation localisée permanente de la paroi aortique, liée à une dégénérescence des tissus vasculaires, par une déplétion importante des cellules vasculaires et une protéolyse des protéines structurales, comme le collagène et l'élastine. À terme, tout anévrisme est menacé de rupture. La rupture d'un AAA est fatale dans 80 à 90% des cas, en incluant la mortalité préhospitalière [2] et constitue la 15^{ie} cause de mortalité en Amérique du Nord [3].

À l'heure actuelle, deux types de traitements peuvent être utilisés dans le but de prévenir la rupture de l'anévrisme, soit la chirurgie conventionnelle et la réparation endovasculaire (EVAR). EVAR est une technique minimalement invasive permettant, entre autre, de diminuer le temps de convalescence, la mortalité à court terme et de traiter les patients inopérables [4] par l'entremise d'une endoprothèse couverte, dénommée stent-graft (SG), qui est insérée par cathéter via l'artère fémorale. EVAR est une alternative prometteuse à la chirurgie ouverte, mais son utilisation est associée à une incidence relativement élevée de complications qui sont reliées à une guérison inadéquate autour de l'implant. Ce manque de guérison est notamment influencé par le milieu pro-apoptotique des AAA (i.e. déplétion cellulaire et accumulation de protéines pro-apoptotiques telles p53 et Bax), les propriétés de surface des recouvrements polymériques utilisés et l'ajout de la prothèse qui limite l'apport en nutriment et oxygène à la paroi vasculaire.

La modification de surface des SG constitue un moyen d'optimiser les interactions biologiques autour des implants, afin de favoriser la fixation biologique au vaisseau sanguin, en stimulant la croissance d'un tissu fibreux organisé constitué principalement de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), de fibroblastes et de collagène. En considérant le fait que les SG sont déployés dans un environnement pro-apoptotique, nous cherchons à créer un revêtement permettant de développer un état de résistance à l'apoptose

des cellules vasculaires adhérentes. Ce projet de doctorat, à valeur multidisciplinaire, s'inscrit dans un domaine en pleine expansion, à savoir la modification de surface des biomatériaux. La problématique principale consiste à trouver un moyen pour contrer les caractéristiques pro-apoptotiques des AAA, qui semblent jouer un rôle important dans le manque de guérison autour des implants, et ainsi freiner la progression de l'anévrisme au cours du temps. Nous avons donc choisi de concevoir un revêtement de SG bioactif, qui pourrait éventuellement stimuler la régénération de tissu organisé, et favoriser l'incorporation de la prothèse au vaisseau sanguin.

Le chapitre 1 de cette thèse comporte une revue de littérature, détaillant les problématiques de la réparation endovasculaire et la démarche scientifique menant à la conception du revêtement bioactif. Plus spécifiquement, cette section décrit : la structure et la fonction de l'aorte saine, la pathophysiologie des AAA, l'apoptose dans le contexte des anévrismes, les types de traitements offerts pour prévenir la rupture de l'aorte, les complications reliées à EVAR, la nature des biomatériaux vasculaires, les types de modifications de surface des matériaux bio-inertes et les médiateurs anti-apoptotiques. Nous verrons, plus particulièrement, le portrait de deux molécules d'intérêts, la chondroïtine sulfate (CS) et le facteur de croissance de l'épiderme (EGF), dans le rôle de la réparation vasculaire. Il a été démontré, dans les laboratoires du D^r MJ Hébert, que la CS possède des propriétés spécifiques à la reconstruction d'une paroi vasculaire, telles l'induction de la résistance à l'apoptose, ainsi que la stimulation de la différenciation myofibroblastique. Pour ce qui est de l'EGF, il a été illustré dans la littérature, que ce facteur de croissance possède une double-fonctionnalité, tout d'abord en favorisant la prolifération des CMLV, tout en stimulant la production d'éléments de la matrice extracellulaire (MEC), mais également en induisant la survie cellulaire via des signaux anti-apoptotiques.

Le chapitre 2 couvre les objectifs généraux et spécifiques de ce projet. Le chapitre 3 dévoile le premier article, ayant été publié en 2007 dans le périodique *Macromolecular Bioscience*. Dans cet article, un revêtement à base de CS et de collagène a été créé. Nous

avons démontré que le revêtement de CS et collagène augmentait la viabilité, dans un milieu sans sérum, et l'adhésion, dans un milieu normal, des CMLV. Par contre, le revêtement se dégradait peu à peu dans le milieu de culture. Nous avons donc opté pour une méthode de greffage directe de la CS par la création de liaisons amides stables avec une surface aminée. Le chapitre 4 présente un article récemment publié, au début de l'année 2011, dans le périodique *Biomaterials*. Les travaux de cette publication illustrent la bioactivité de la CS et de l'EGF greffés sur du verre aminolysé, par l'augmentation de l'adhésion et la croissance cellulaire en présence de l'EGF et par la résistance à l'apoptose des CMLV exposées au revêtement en présence de conditions pro-apoptotiques. Suite à cette preuve de principe, il restait à pouvoir transposer ce revêtement sur des surfaces polymériques. Le chapitre 5 expose un article récemment soumis au périodique *Acta Biomaterialia* qui consiste essentiellement en la suite de l'article présenté au chapitre 4. Dans cet article, il est démontré que le revêtement peut être transposé sur des surfaces de même nature que les matériaux utilisés pour les SG. L'objectif principal de ce troisième article consistait à comparer trois différentes méthodes de fonctionnalisation de la surface par plasma, dans le but d'introduire des amines primaires pour y greffer la CS et l'EGF. Une fois de plus, la bioactivité du revêtement a été illustrée par l'augmentation de la croissance et la résistance à l'apoptose chez les CMLV. La discussion générale de cette thèse et les recommandations qui en découlent, ainsi que la conclusion sont présentées respectivement aux chapitres 6 et 7.

Chapitre 1: Revue de littérature

1.1 L'aorte

Afin de comprendre correctement les mécanismes impliqués dans la pathophysiologie de l'anévrisme de l'aorte abdominale, il est important de bien connaître la structure, ainsi que le fonctionnement normal de l'aorte.

1.1.1 Morphologie et structure de l'aorte

L'aorte (Figure 1) est la plus grosse artère du réseau de vaisseaux sanguins. Elle constitue la principale artère de la circulation systémique et son rôle fondamental consiste à transporter le sang oxygéné, en provenance du ventricule gauche du cœur, vers l'ensemble des tissus et organes du corps humain. Le grand diamètre de l'aorte (2-3 cm) offre une faible résistance au flux sanguin, faisant en sorte que la vitesse d'écoulement du sang peut atteindre jusqu'à 50 cm/s [5]!

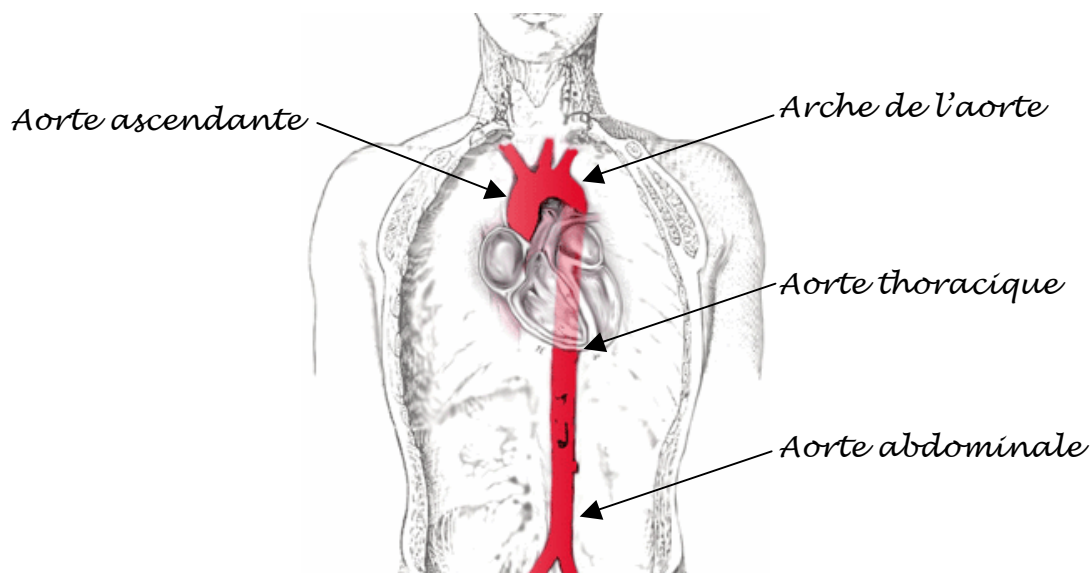


Figure 1: Sections de l'aorte¹

¹ <http://www.iradonline.org/about.html>

L'aorte se divise essentiellement en trois sections, soit l'aorte ascendante, l'arche de l'aorte et finalement l'aorte descendante qui elle se divise en l'aorte thoracique (au-dessus du diaphragme) et l'aorte abdominale (sous le diaphragme). L'aorte abdominale se termine à l'embranchement des deux artères iliaques [6]. Le tableau ci-dessous révèle les longueurs et diamètres moyens de chacune des sections de l'aorte.

Tableau 1 : Sections de l'aorte

Section de l'aorte	Longueur	Diamètre
<i>Aorte ascendante</i>	5 – 5,5 cm	3 cm
<i>Arche de l'aorte</i>	4,5 cm	2,5 – 3 cm
<i>Aorte thoracique</i>	20 cm	2 – 2,3 cm
<i>Aorte abdominale</i>	15 cm	1,7 – 2 cm

L'aorte est une artère dite élastique. Les artères élastiques sont des vaisseaux de gros calibre, ayant une paroi épaisse et qui détiennent une plus grande concentration d'élastine par rapport aux autres types vaisseaux, comme les artères musculaires ou les artérioles. Les artères élastiques peuvent donc se dilater, afin d'amortir la pression sanguine et rapidement reprendre leur position initiale, pour maintenir une pression diastolique positive. La paroi de l'aorte est principalement constituée de trois couches distinctes soient la tunique interne (l'intima), la tunique moyenne (la média) et la tunique externe (l'adventice). Ce qui différencie la structure de l'aorte de celle des autres artères, est l'épaisseur et la constitution de ces trois couches, ainsi que le diamètre de la lumière du vaisseau. Les différentes couches de la paroi des artères sont illustrées à la Figure 2.

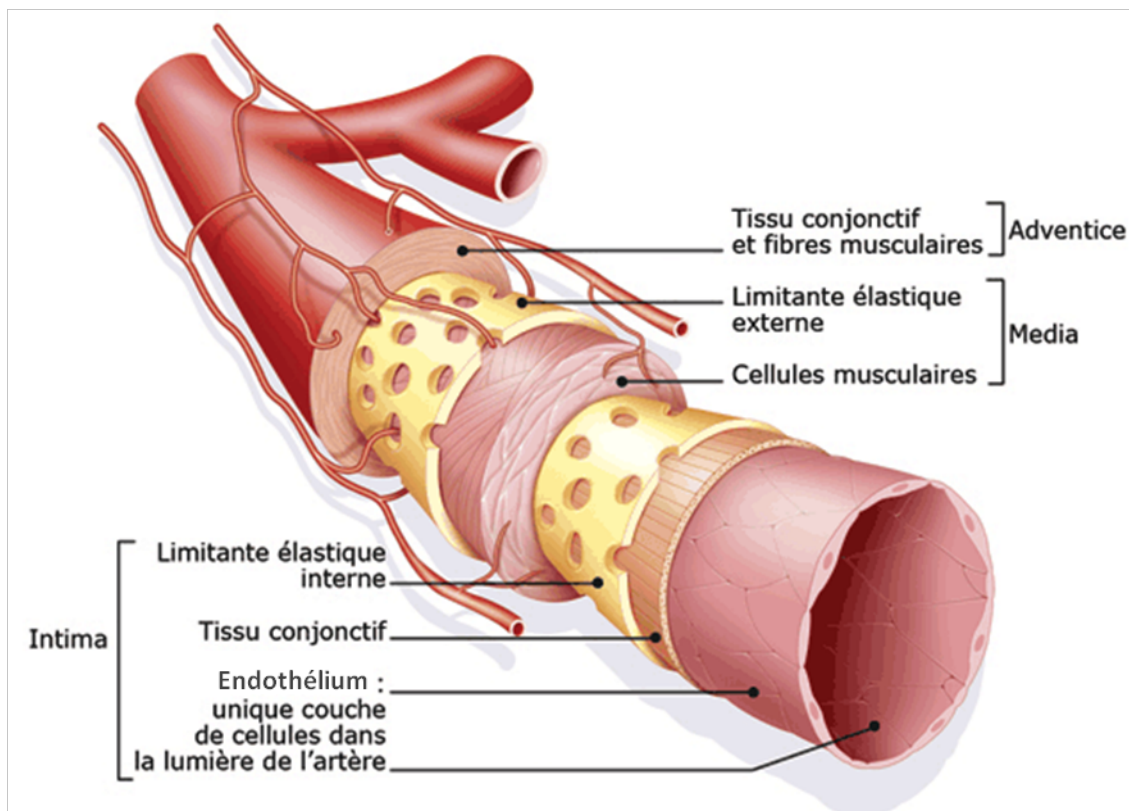


Figure 2: Structure de la paroi des artères²

L'intima est délimitée par l'endothélium et la limitante élastique interne (LEI). L'endothélium est un épithélium simple squameux typique et il est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) qui tapisse la lumière de l'aorte. Les CE permettent de minimiser la friction entre la paroi et le sang, en formant une monocouche lisse. De plus, les CE sécrètent plusieurs substances actives impliquées dans la croissance des tissus vasculaires et la rigidité des vaisseaux. L'endothélium repose sur une membrane basale constituée essentiellement de tissu conjonctif lâche. La LEI est la première membrane élastique de la paroi aortique. Cette couche contient plusieurs fenestrations laissant circuler les cellules et les substances régulatrices. Dans l'intima, on retrouve du

²

http://www.santea.com/media/images/planches_anatomiques/cardiovasculaire_et_metabolisme/artere_de_moyen_calibre_et_ses_trois_tuniques_intima_media_adventice_legende

collagène, de l'élastine et de la substance fondamentale composée de mucopolysaccharides acides, tels l'acide hyaluronique et la chondroïtine sulfate.

La média est majoritairement composée de CMLV et de feuillets d'élastine disposés en couche. Cette tunique, d'un peu plus de 1 mm d'épaisseur, est constituée de feuillets continus d'élastine entrecoupés d'anneaux de CMLV, de fibres de collagène, de fibres d'élastine et de substance fondamentale longitudinalement orientées. Les CMLV synthétisent plusieurs protéines, comme les protéoglycanes, le collagène, la gélatine, la laminine et l'élastine, qui contribuent au maintien de l'intégrité et de la fonctionnalité de la paroi aortique [7, 8]. La média est la couche la plus épaisse parmi les tuniques de l'aorte. Elle est séparée de l'adventice par la dernière membrane élastique, la limitante élastique externe (LEE).

L'adventice est composée surtout de tissus conjonctifs lâches, majoritairement caractérisée par des fibres de collagènes, permettant de consolider l'aorte aux structures avoisinantes. On y retrouve également des fibroblastes, des mucopolysaccharides, des neurofibres et quelques CMLV. Dans les gros vaisseaux comme l'aorte, l'adventice est traversée par un ensemble de petits vaisseaux appelés *vasa vasorum*. Ce réseau est responsable d'alimenter les tissus de la paroi externe, ainsi que d'assurer l'évacuation des produits de résidus, puisque l'importante épaisseur de la paroi de l'aorte limite la diffusion à partir de la lumière [5, 6].

1.1.2 Matrice extracellulaire dans les tissus vasculaires

La matrice extracellulaire (MEC) est un complexe moléculaire composée de protéines structurales, protéines adhésives, protéoglycanes, glycosaminoglycanes, facteurs de croissance et finalement d'enzymes de dégradation contrôlant la quantité de chacun de ces éléments pour assurer l'homéostasie des tissus. Dans les tissus vasculaires, la MEC détient plusieurs rôles tels; servir de substrat pour les cellules et de réservoir pour les facteurs de croissance, produire des signaux anti-apoptotiques, favoriser l'adhérence des lipoprotéines artérielles et influencer les propriétés mécaniques des tissus [9]. La MEC

offre un support structural, assure la cohésion entre les composés et permet l'adhérence/circulation des cellules dans la paroi vasculaire.

La MEC est un milieu dynamique conçu pour établir l'équilibre entre les cellules dans les tissus en faisant parvenir une panoplie de signaux influençant la croissance, la survie et la mort cellulaire [9]. Au cours du vieillissement et du développement de certaines pathologies, comme pour les anévrismes, la proportion d'enzymes et d'inhibiteurs est inversée, résultant en une diminution significative des protéines de la MEC [10].

1.1.2.1 Protéines structurales

Le collagène et l'élastine constituent les deux principales protéines structurales des vaisseaux sanguins et chacune offre une fonction spécifique, soit la résistance à la traction et l'élasticité respectivement [10]. Il existe une grande variété de fibres de collagène, mais les types I et III constituent environ 90% des collagènes présents dans les vaisseaux et de façon similaire, l'élastine compose environ 90% des tissus élastiques.

1.1.2.2 Métalloprotéases matricielles (MMP)

Les MMP sont des enzymes de dégradation de la MEC et sont soit sécrétées par les cellules endothéliales ou liées de façon transmembranaire aux cellules, sous la forme d'un précurseur inactif. Le clivage d'un complexe intramoléculaire est nécessaire à l'activation des MMP et cette catalyse fait appel à d'autres MMP, la thrombine ou des dérivés réactifs d'oxygène (ROS pour *Reactive oxygen species*) [9]. Le niveau d'activité des MMP est contrôlé par la présence d'inhibiteurs tissulaires (TIMP) qui se lient de façon non covalente aux MMP et inhibent leur activité. À l'heure actuelle, il existe plus d'une vingtaine de variétés de MMP et seulement quatre TIMP (TIMP-1, -2, -3 et -4). L'équilibre entre les MMP et les TIMP est essentiel au développement normal des tissus, ainsi que d'autres fonctions comme l'angiogenèse, la cicatrisation, l'inflammation et l'induction de l'apoptose [11].

1.1.2.3 Glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont des polysaccharides non-ramifiés composés d'unités disaccharidiques répétitives. Généralement, chaque unité disaccharidique comporte un hexosamine (*N*-acetylgalactosamine ou *N*-acetylglucosamine) et un hexose (acide glucuronique ou acide iduronique ou galactosamine). En comparant la structure chimique du motif répétitif, le type de liaison entre les résidus (α ou β) et le nombre/localisation des groupements sulfatés, les GAG peuvent être divisés en quatre classes différentes : 1) hyaluronane 2) chondroïtine sulfate (CS) et dermatane sulfate 3) héparane sulfate et héparine et 4) kératane sulfate (Tableau 2).

Les GAG se situent principalement à la surface des cellules dans la matrice extracellulaire. Ce sont des composés très hydrophiles puisqu'ils contiennent plusieurs groupements polaires et ioniques, comme des hydroxyles et des sulfates. Ceci permet aux GAG d'occuper un grand volume et d'offrir une grande élasticité, ainsi qu'une grande résistance à la compression [12].

Tableau 2: Structure et source des différents glycosaminoglycanes (À partir de [13, 14])

Glycosaminoglycane	Structure	Liaison	Source
<i>Dermatane sulfate</i>		$\beta(1-3)$	<ul style="list-style-type: none"> • Peau • Vaisseaux sanguins • Valve cardiaque • Tendon
<i>Chondroïtine-4-sulfate</i>		$\beta(1-3)$	<ul style="list-style-type: none"> • Cartilage • Cornée • Peau • Artère • Os
<i>Chondroïtine-6-sulfate</i>		$\beta(1-3)$	<ul style="list-style-type: none"> • Cartilage • Cornée • Peau • Artère • Os
<i>Hyaluronane</i>		$\beta(1-3)$	<ul style="list-style-type: none"> • Corps vitreux • Cartilage • Liquide synovial
<i>Kératane sulfate</i>		$\alpha(1-4)$	<ul style="list-style-type: none"> • Cartilage • Cornée • Disque vertébral • Os
<i>Héparine</i>		$\alpha(1-4)$	<ul style="list-style-type: none"> • Mastocytes (poumon, foie, peau et muqueuse intestinale)
<i>Héparane sulfate</i>			<ul style="list-style-type: none"> • Membrane basale • Poumon • Artère

1.2 L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA)


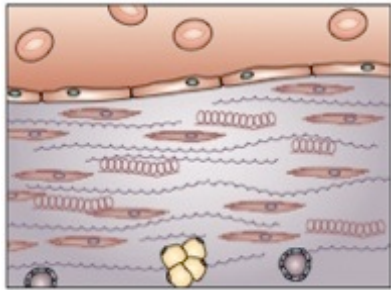

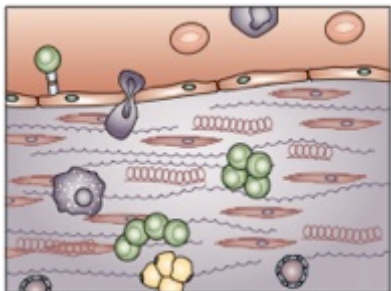

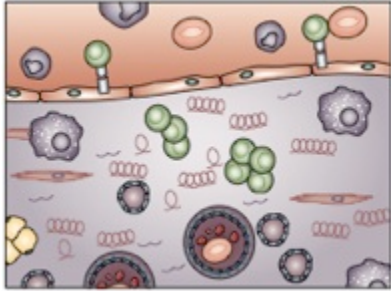









Le terme anévrisme provient du grec *aneurusma* et se définit comme étant une dilatation localisée, permanente et irréversible d'un vaisseau sanguin, liée à une dégénérescence des tissus vasculaires, plus particulièrement de la média [1]. L'AAA est dépisté, lorsque le diamètre de l'aorte atteint plus de 3 cm ou plus de 50% du diamètre normal [15].

1.2.1 Étiologie, prévalence et facteurs de risque

Selon Santé Canada, l'anévrisme de l'aorte coûterait 103.2 M\$ en frais directs (soins hospitaliers) et 236.9 M\$ en frais indirects (coûts de la mortalité prématurée) [16]. Avec le vieillissement de la population actuelle, le nombre de patients devant être traités pourrait augmenter considérablement au cours des prochaines années. Les principaux facteurs de risques liés à cette pathologie sont l'hypertension, l'obésité, la sédentarité, l'âge, les antécédents familiaux, le tabagisme (le risque est quatre fois plus élevé chez les fumeurs) et le sexe du patient (le risque de développer un AAA est plus élevé chez les hommes) [17].

À terme tout anévrisme est menacé de rupture, ce qui provoque une hémorragie massive. Généralement, le risque de rupture augmente en fonction du diamètre de l'anévrisme, du taux d'expansion et du sexe du patient (le risque de rupture est trois fois plus élevé chez les femmes) [18]. Le Tableau 3 résume les étapes du développement d'un AAA et illustre les modifications à l'intérieur de la paroi vasculaire, de l'initiation à la rupture de l'aorte.

Tableau 3: Étapes de l'AAA (Adapté de [11, 15, 17, 18])

Étape	Aorte	Paroi vasculaire
<i>Normal</i>		
<i>Initiation</i>		
<i>Progression</i>		
<i>Rupture</i>		 <ul style="list-style-type: none">  Smooth muscle cell  Elastin  Collagen  Vasa vasorum  Adipocyte  T lymphocyte  Macrophage

1.2.2 Pathophysiologie

Le développement et la progression de l'AAA sont gouvernés par trois principaux mécanismes pathophysiologiques, soient l'apoptose cellulaire, la protéolyse des protéines structurales et la présence de cellules inflammatoires [19]. Anatomiquement, le développement d'un AAA se définit par un remodelage destructif de la paroi aortique [18], ainsi qu'une déplétion cellulaire des CMLV [7, 20] menant à une perte d'intégrité de la paroi vasculaire pouvant ultimement entraîner la rupture de l'aorte. Plus spécifiquement, une altération importante du tissu conjonctif est observée [1]. Cette dernière se caractérise par une fragmentation des tissus élastiques et une dégradation protéolytique des protéines structurales telles l'élastine et le collagène, ainsi qu'une infiltration inflammatoire excessive des lymphocytes (T et B) et des macrophages [18, 20]. Plusieurs études ont démontré la présence d'une néovascularisation dans la média des AAA, ce qui peut influencer la venue de ces cellules inflammatoires au site de l'anévrisme par les nouveaux vaisseaux [21, 22]. La présence de cellules inflammatoires dans la paroi vasculaire semble initier le processus de destruction des composés de la MEC. De plus, les macrophages et lymphocytes, T et B, qui se sont infiltrés dans la paroi libèrent certains médiateurs cytotoxiques tels les cytokines, la perforine et le ligand Fas (FasL) qui sont des protéines pouvant participer à l'apoptose des CMLV [7].

Dans les parois vasculaires des AAA, des modifications structurales ainsi qu'une perte substantielle de certains GAG, tels l'héparane sulfate, la chondroïtine sulfate et l'hyaluronane peuvent être observées. Ainsi, un déficit allant jusqu'à 90% de la quantité totale des GAG de la paroi vasculaire des aortes saines peut être perçue [23]. La destruction du tissu conjonctif peut s'expliquer par l'augmentation de la concentration et de l'activité des MMP responsables de la dégradation de l'élastine et du collagène. De nombreuses études ont démontré l'augmentation de certaines élastases (MMP-2, MMP-7, MMP-9 et MMP-12) ainsi que certaines collagénases (MMP-1, MMP-8 et MMP-13) dans les AAA [1, 18, 20].

La déplétion cellulaire des CMLV peut s'expliquer par une augmentation significative du taux d'apoptose dans les tissus vasculaires des anévrismes [7, 8, 24-27]. De plus, la présence accrue de protéines pro-apoptotiques, comme la perforine et FasL, à l'intérieur des cellules provoque l'augmentation du taux d'apoptose des CMLV dans les AAA. Afin de promouvoir la formation néointimale et ainsi favoriser la guérison de la paroi vasculaire, la diminution de la concentration des protéines pro-apoptotiques est donc essentielle [28]. La section suivante détaille davantage le phénomène de l'apoptose, par les voies de l'apoptose, les caractéristiques morphologiques et son importance dans les anévrismes.

1.3 Apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui est présent lors du développement et du vieillissement normaux de certains organes (ex : formation des doigts et du cerveau et différenciation intestinale) et qui participe à l'homéostasie des cellules et des tissus. L'apoptose peut également être provoquée par une multitude de facteurs physiologiques et pathologiques. La présence d'agents nocifs, certaines maladies, le manque de facteurs de croissance, l'irradiation et la perte d'interaction entre les cellules et la MEC (anoïkis) sont quelques exemples d'éléments déclencheurs de l'apoptose.

1.3.1 Voies de l'apoptose

La présence d'un stimulus pro-apoptotique déclenche une cascade protéolytique complexe menant à la mort des cellules [29]. Il existe deux grandes voies de signalisation de l'apoptose; le chemin intrinsèque et extrinsèque (Figure 3). Dans les deux cas, il y a une activation en série de plusieurs protéases à cystéines, appelées caspases, menant à l'apoptose cellulaire.

1.3.1.1 Voie extrinsèque

La voie extrinsèque de l'apoptose est activée lorsqu'un récepteur de surface de mort cellulaire (ex : Fas, TNFR1, Apo-3) est attaché à son ligand respectif (ex : FasL, TNF- α , TRAIL). Cette liaison provoque le recrutement de molécules adaptatrices (ex : FADD, pour *Fas associated death domain*) et la formation d'un complexe oligomérique induisant la mort cellulaire (DISC). La formation du DISC active la caspase-8, qui elle peut directement activer la caspase-3 [30].

1.3.1.2 Voie intrinsèque

La voie intrinsèque s'effectue via la mitochondrie et peut être activée par différentes conditions environnementales, telles le manque d'oxygène ou de facteurs de croissance,

l'endommagement de l'ADN ou encore la présence d'un stress oxydatif. L'arrivée de signaux pro-apoptotiques déclenche une série d'évènements. Tout d'abord, la présence de signaux apoptotiques augmente la disponibilité de gènes pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bax. Ceci augmente la perméabilisation de la membrane mitochondriale, par une polarisation de celle-ci, et provoque la libération de plusieurs protéines dans le cytoplasme dont le cytochrome C. Le cytochrome C se fixe à la protéine APAF1 et active cette dernière. En présence d'ATP, l'activation de la protéine APAF1 provoque la formation d'apoptosomes et de ce fait l'activation d'une caspase initiatrice, la caspase-9. L'activation de cette dernière provoque l'activation des caspases effectrices, les caspases 3, 6 et 7 [30].

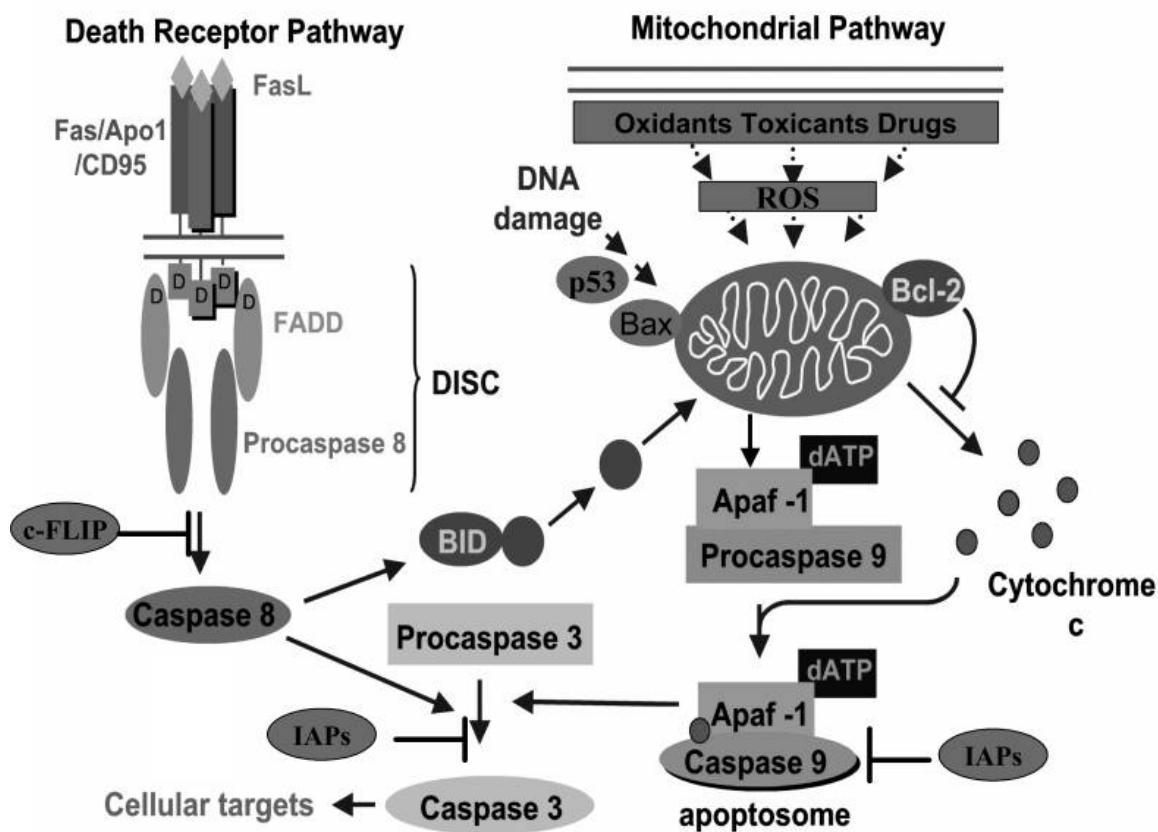


Figure 3: Voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose [31]

1.3.1.3 Inhibition de l'apoptose

Il existe plusieurs protéines pouvant inhiber le cycle intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. Les plus communes font parties de la famille des inhibiteurs de l'apoptose (IAP) et certaines études ont démontré qu'elles pouvaient inhiber les caspases 3, 7 et 9 [30]. Une seconde classe de protéines très bien connue inclus les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et Bcl-xL qui inhibent le relâchement du cytochrome c par les mitochondries [32], en inhibant le relâchement de calcium (Ca^{2+}) par le réticulum endoplasmique.

1.3.2 Caractéristiques morphologiques de l'apoptose

Le processus de l'apoptose peut se diviser en 3 étapes principales: 1) la phase d'initiation 2) la phase de décision et 3) la phase de dégradation. L'initiation de l'apoptose peut être activée soit par la présence de signaux inducteurs de la mort cellulaire ou un stress particulier, menant respectivement à la voie extrinsèque et intrinsèque et à l'activation des caspases initiatrices. La phase de décision se caractérise par la libération du cytochrome c et des procaspases 2, 3 et 9. Les deux premières phases de l'apoptose sont réversibles contrairement à la phase de dégradation. Lors de cette dernière étape, l'activation des caspases effectrices est suivie par la perte de jonctions cellulaires, la condensation du cytoplasme et de la chromatine, le bourgeonnement de la membrane plasmique et la fragmentation en corps apoptotiques qui seront éventuellement phagocytés [33]. Les changements morphologiques d'une cellule apoptotique sont déclenchés par l'activation des caspases effectrices qui elles activent les endonucléases cytoplasmiques et d'autres protéases qui dégradent les protéines du noyau et du cytosquelette [29].

La perméabilité de la membrane plasmique demeure intacte tout au long du processus de l'apoptose. L'exposition des phosphatidylserines sur le feuillet externe de la membrane permet aux macrophages et aux cellules environnantes de reconnaître les corps apoptotiques et de les éliminer par phagocytose [33]. Ce mécanisme d'élimination permet

d'éviter les réactions inflammatoires, contrairement à d'autres types de mort cellulaire comme la nécrose où le contenu des cellules est relâché dans les tissus environnants. De plus, la phagocytose des cellules apoptotiques diminue les risques de nécrose secondaire et empêche le largage de cytokines anti-inflammatoires [29], comme les interleukines (IL).

1.3.3 Apoptose et anévrismes

L'augmentation du taux d'apoptose dans les tissus des AAA, entraînant une importante déplétion chez la population de CMLV, est un phénomène très bien établi. Plusieurs études ont démontré l'augmentation de l'expression de p53, un facteur de transcription, et l'accroissement de Bax, une protéine pro-apoptotique X associée à la famille des Bcl-2, dans les tissus des AAA [26, 34, 35].

La dégradation matricielle, influencée par la présence de MMP et d'autres protéases comme les cytokines, ainsi que la réponse inflammatoire contribuent tous à l'apoptose des CMLV. Les cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes, neutrophiles) libèrent plusieurs médiateurs pro-apoptotiques comme le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , interféron (INF)- γ , IL et les ROS [36, 37].

Dans le contexte des AAA, les deux voies de l'apoptose, intrinsèque et extrinsèque, semblent être impliquées. Tout d'abord, la présence de cytokines tels TNF, INF- γ et IL-1 activent la cascade de Fas/FasL, stimulant ainsi le chemin extrinsèque. Le prélèvement de tissus aortiques chez des patients ayant subi une opération chirurgicale de l'aorte a confirmé l'activation du FasL [7]. D'autre part, il a été démontré que la voie intrinsèque de l'apoptose pouvait être activée suite à une perfusion à l'élastase dans un modèle de rats d'AAA [38]. Dans cette étude, une augmentation du taux d'apoptose, ainsi que du diamètre aortique, et plus particulièrement, la présence d'une caspase initiateur propre au chemin intrinsèque, la caspase-9 ont été observés. En bref, une multitude de facteurs sont responsables de l'apoptose cellulaire dans les AAA, la présence de cytokines, les ROS, la perte d'interaction des cellules avec la MEC par la présence de protéases (anoïkis), etc.

1.4 Traitements de l'anévrisme de l'aorte abdominale

À l'heure actuelle, il existe deux types de traitements permettant de prévenir la rupture de l'anévrisme (Figure 4), soit la chirurgie conventionnelle ou la réparation endovasculaire (EVAR). Dans les deux cas, la réparation d'un AAA a généralement lieu lorsque le diamètre et la vitesse d'expansion de l'aorte atteignent respectivement 5,5 cm et 0,6 à 0,8 cm / année [11, 15].

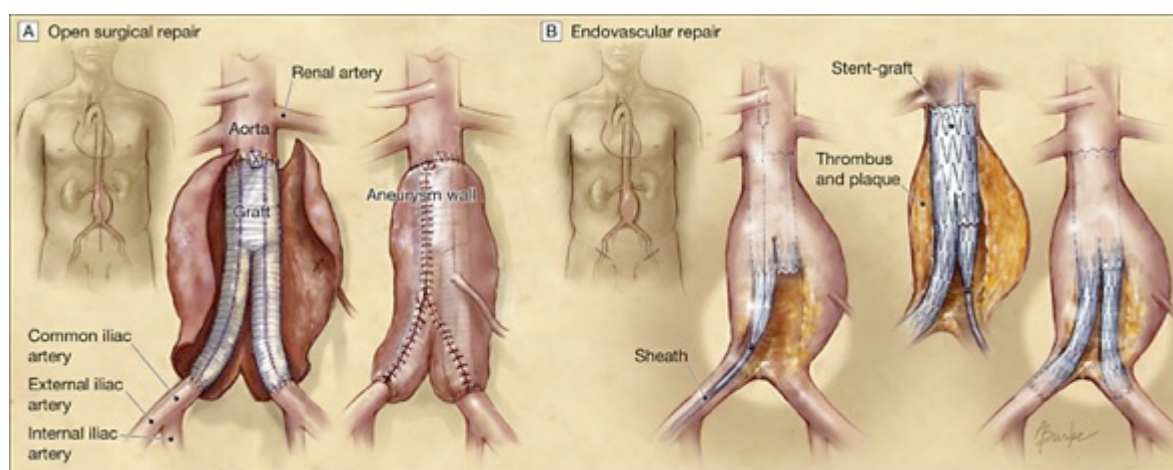


Figure 4 : A) Chirurgie conventionnelle et B) réparation endovasculaire [39]

1.4.1 Chirurgie conventionnelle

La chirurgie conventionnelle nécessite une anesthésie générale du patient, afin d'accéder à l'aorte via une laparotomie. Avant de procéder à la réparation de l'AAA, la partie supérieure de l'aorte ainsi que les artères iliaques doivent être clampées pour bloquer le flux sanguin. Le sac anévrismal est incisé et les plaques et les thrombus sont ensuite retirés. Une prothèse est fixée par suture à la place de l'anévrisme et les tissus de l'aorte sont refermés autour de la prothèse. La chirurgie conventionnelle est une technique établie depuis plus de 50 ans et est considérée comme la référence pour le traitement des AAA. Bien que ce type de traitement nécessite moins d'interventions secondaires [40], il

comporte des risques plus importants de mortalité périopératoire, de complications majeures et un temps de convalescence plus long [41].

1.4.2 Réparation endovasculaire

Lors de la réparation endovasculaire, une prothèse endovasculaire connue sous le nom d'endoprothèse couverte ou « stent-graft » (SG) est insérée via l'artère fémorale par l'entremise d'un cathéter et de fils guides, elle est conduite jusqu'à l'anévrisme par fluoroscopie par rayons X pour finalement y être déployée. Le SG est un dispositif muni d'une structure métallique, qui est généralement composé de Nitinol[®] (ou d'acier inoxydable), et recouvert d'un matériel synthétique comme le polyéthylène téréphtalate (PET ou Dacron[®]) ou le poly(tétrafluoroéthylène) expansé (ePTFE). À l'heure actuelle, il existe cinq SG circulant sur le marché américain approuvées par la FDA³, en excluant les prothèses sous essai clinique, soient 1) AneuRx AAAdvantage Stent Graft System (Medtronic, Inc.) (Depuis 1999) 2) Excluder[™] Bifurcated Endoprosthesis (W.L. Gore & Associates, Inc.) (Depuis 2002) 3) Zenith[®] AAA Endovascular Graft (Cook, Inc.) (Depuis 2003) 4) Talent[™] Abdominal Stent Graft System (Medtronic, Inc.) (Depuis 2008) et 5) Endurant Stent Graft System (Medtronic, Inc.) (Depuis 2010). Ces dispositifs présentent des caractéristiques physiques différentes. Par exemple, l'Excluder n'a pas de trous de soudure, tandis que le Zenith a des crochets pour maintenir la prothèse en place [42].

EVAR est un traitement minimalement invasif qui permet de soigner les AAA et constitue une technique relativement nouvelle par rapport à la chirurgie conventionnelle. Le premier SG de type tubulaire a été utilisé pour la première fois chez l'humain, en 1991, par Parodi et al. [43]. Idéalement, le SG devrait avoir une bonne flexibilité et force longitudinale, pouvoir résister au repliement, être facile à déployer, peu perméable et modulaire [4]. Le SG devrait également offrir un support mécanique aux parois aortiques,

³<http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/default.htm>

tout en orientant la circulation du sang à l'intérieur de la prothèse, plutôt que dans le sac anévrisimal.

Il avait été établi auparavant que EVAR était économiquement plus avantageuse par rapport à la chirurgie conventionnelle, puisqu'elle permettait de diminuer les complications systémiques (*i.e.* cardiaque et pulmonaire), le temps d'hospitalisation et le coût des ressources générales. Aujourd'hui, cet avantage est contrebalancé par le coût du dispositif ($\approx 10,400$ US\$) et les coûts du diagnostique et du suivi (coûts provenant de différentes techniques d'imagerie avant et après l'intervention). Il a été estimé que EVAR coûte environ 20,000 US\$, comparativement à $\approx 12,500$ US\$ pour la chirurgie conventionnelle [44].

L'avantage principal de la réparation endovasculaire est sa nature minimalement invasive, qui permet de diminuer le temps de convalescence, de réduire la morbidité périopératoire, de traiter les patients inopérables par chirurgie ouverte, de modérer les pertes sanguines et de diminuer les coûts liés à la chirurgie [4, 19, 45, 46]. Plusieurs études ont démontré une diminution significative du taux de mortalité/morbidité et du nombre de complications sévères à court et à moyen termes [45, 47, 48]. EVAR est une alternative prometteuse à la chirurgie ouverte, mais son utilisation est associée à une incidence relativement élevée de complications.

1.4.3 Complications de la réparation endovasculaire

Les complications prédominantes qui freinent actuellement l'exploitation d'EVAR sont 1) la persistance d'une circulation sanguine (*i.e. fuites sanguines, ou endofuites*), 2) la migration du SG et 3) l'existence de défaillances tardives de la prothèse pouvant tous mener à une rupture éventuelle de l'anévrisme [42].

1.4.3.1 Endofuites

Les fuites sanguines ou « endoleaks » se définissent par la persistance d'un écoulement sanguin autour de la prothèse et à l'intérieur du sac anévrismal [49]. Il en existe 5 types (Figure 5). Le type I se rapporte à un flux sanguin provenant des extrémités de l'implant (collet proximal ou distal) et le type II à un écoulement rétrograde en provenance de vaisseaux collatéraux donnant dans l'anévrisme. Les fuites de type III sont dues à une perte d'intégrité structurale du SG, tandis que le type IV proviennent d'un écoulement au travers du tissu (perméabilité). Enfin, on appelle les fuites de type V (ou endotension) les cas correspondant à un grossissement du sac anévrismal et de sa pression interne en absence de fuites détectables [50].

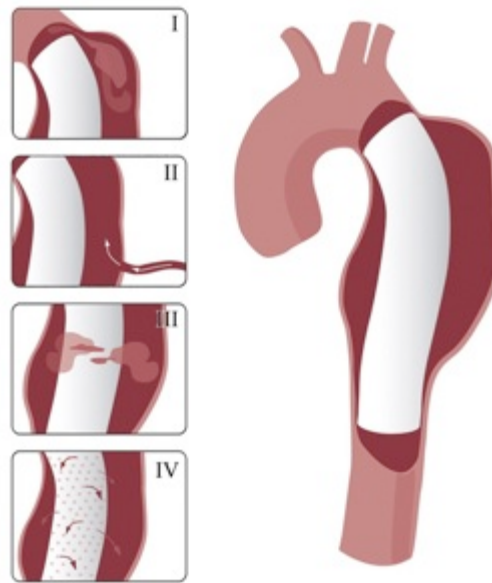


Figure 5: Types de fuites sanguines [51]

Les fuites de type I et II sont les plus fréquentes et problématiques. Une méta-analyse menée par Franks et al. a démontré qu'environ 10,5% des patients développent des fuites de type I, tandis qu'environ 13,7% développent des fuites de type II, III ou IV, après EVAR [52]. Pour éviter les risques de rupture, les fuites de type I sont généralement

traitées par réintervention endovasculaire, voire par conversion chirurgicale, si la réintervention est inefficace[4]. Ceci génère des coûts humains et financiers importants. Les travaux récents de l'équipe sur modèles animaux ont montré le rôle des cellules endothéliales dans la persistance des fuites, ce qui laisse penser qu'il est important de ne pas favoriser leur croissance autour de l'implant [53].

1.4.3.2 Migration

La durabilité d'une réparation endovasculaire est garantie par le maintien de la position du SG dans l'aorte et par l'étanchéité entre la paroi aortique et le dispositif [54]. La migration du SG, par rapport à sa position initiale, peut engendrer des effets indésirables comme la création de fuites sanguines tardives de type I aux collets et une revascularisation, expansion et/ou rupture du sac anévrisimal. Certaines études ont démontré que le taux de migration pouvait atteindre jusqu'à 7% des patients après 1 an, 20% après 2 ans et 42% après 4 ans [44]. La migration d'un SG est associée à différentes causes. L'accroissement du diamètre du collet de l'anévrisme peut faire en sorte qu'il y ait moins de friction entre le dispositif et la paroi aortique. La nature de la fixation proximale peut également influencer la facilité du SG à migrer [55].

1.4.4 Manque de guérison après la réparation endovasculaire

Plusieurs études ont démontré que les fuites sanguines et la migration des SG semblaient être liées à une mauvaise incorporation des endoprothèses dans la paroi vasculaire. Même après plusieurs mois, voire années, après l'implantation, le SG demeure entouré d'un caillot sanguin fibrineux non organisé, caractérisé par un déficit en fibroblastes, CMLV et collagène [56, 57]. La présence d'un caillot fibrineux, tout au long de l'implant et même aux points de contacts entre le SG et la paroi qui sont situés aux extrémités, empêche la fixation biologique de l'implant et compromet l'étanchéité entre la paroi et le sac anévrisimal.

Pour favoriser l'incorporation de l'endoprothèse dans la paroi vasculaire, un mécanisme de guérison devrait avoir lieu. Il devrait y avoir la présence des cellules, comme les fibroblastes, les myofibroblastes et les CMLV, ainsi qu'une matrice fibreuse riche en éléments de la MEC, comme le collagène et les glycosaminoglycanes, et des facteurs de croissance. Les fibroblastes migrant de l'adventice de la paroi aortique devraient se différencier en myofibroblastes, afin de produire les composés de la MEC nécessaires à la reconstruction des tissus et promouvoir l'effet contractile favorisant la guérison [58]. La durabilité d'EVAR peut donc être compromise par le manque de guérison des tissus vasculaires entourant le SG [54].

Le manque de guérison des tissus vasculaires entourant les SG peut se justifier par quelques facteurs environnementaux. Tout d'abord, dans le contexte des AAA, le phénotype pro-apoptotique et la déplétion cellulaire des CMLV limitent leur survie et prolifération, autour de l'implant ainsi que dans le sac anévrisimal, ainsi que la production des protéines synthétisées par les CMLV, telles le collagène, la gélatine, la laminine et l'élastine qui contribuent au maintien de l'intégrité et/ou fonctionnalité de la paroi aortique [7, 8]. En second lieu, l'ajout d'un SG restreint l'approvisionnement en oxygène ainsi qu'en nutriments et/ou facteurs de croissance vers les tissus par l'absence de circulation sanguine. L'ajout d'un SG amplifie donc la présence des facteurs pro-apoptotiques dans le contexte anévrisimal. Finalement, tel que décrit dans la section suivante, malgré leurs bonnes propriétés mécaniques, les matériaux utilisés dans les SG (ePTFE et PET) ne promeuvent pas les interactions cellule/surface nécessaires à l'adhésion, la migration et la survie cellulaire.

Hypothèse #1 : La guérison inadéquate autour des SG s'avérant être l'un des principaux facteurs d'échec associé à EVAR, le développement de biomatériaux et d'implants bioactifs est une stratégie prometteuse pour diminuer l'incidence des complications qui y sont rattachées.

1.4.5 Biomatériaux polymériques utilisés dans les SG

Les matériaux polymériques les plus couramment utilisés sont le PET, le ePTFE et les polyuréthanes. Les polymères sont utilisés depuis plus de 50 ans dans le cadre des prothèses vasculaires en général et leurs propriétés sont très bien connues.

1.4.5.1 Poly(éthylène téréphtalate)

Le PET est un polymère semi-cristallin provenant de la famille des polyesters qui a été breveté par DuPont (Dacron®) en 1950 [59]. Ses longues chaînes sont obtenues par la polycondensation d'acide téréphtalique et d'éthylène glycol. L'extrusion du PET permet de créer des microfilaments qui peuvent ensuite être tissés ou tricotés dans des motifs particuliers (ex : motif superposé et maillage). Le PET tissé a une meilleure stabilité et une perméabilité plus basse, tandis que le PET tricoté a une plus grande porosité et une capacité d'expansion radiale sous la pression (distensibilité) [59]. Ce polymère est en général très rigide (résistance à la traction : 172 MPa et Module d'Young : 14.1 GPa) et beaucoup moins souple (compliance, $C = 1.9\% \text{ } 100\text{mmHg}^{-1}$) que les artères naturelles ($C = 5.9\% \text{ } 100\text{mmHg}^{-1}$) [60].

1.4.5.2 Polytétrafluoroéthylène expansé

Le ePTFE est un polymère semi-cristallin composé de chaînes carbonées saturées de fluor ($-\text{CF}_2-\text{CF}_2-$) qui a été breveté par Gore (Gore-Tex) en 1969 [59]. Le ePTFE est obtenu suite à un procédé d'extrusion tubulaire, suivi d'une période de chauffage et d'expansion longitudinale et finalement d'un frittage. La couleur blanche du ePTFE résulte de l'accumulation d'air au cours du procédé [61]. Le ePTFE est considéré chimiquement très inerte, par la présence des atomes de fluor, et hydrophobe. Il possède un coefficient de friction très bas, une rigidité moyenne (résistance à la traction : 21 MPa et Module d'Young : 413 MPa) et est encore moins souple que le PET ($C = 1.6\% \text{ } 100\text{mmHg}^{-1}$) [60].

Ces deux matériaux ont été choisis pour leurs propriétés mécaniques et leur relativement bonne hémocompatibilité, permettant d'éviter la formation de thrombose lorsqu'ils sont utilisés dans les petits vaisseaux sanguins. Cependant, leurs propriétés de surfaces sont peu propices à la croissance cellulaire. Ceci est particulièrement le cas du ePTFE qui est très hydrophobe et suscite la dénaturation des protéines qui s'adsorbent à sa surface et font le lien entre la surface et les cellules. Les interactions entre les molécules de la membrane plasmique des cellules [62] et les protéines adsorbées sont alors non-spécifiques et faibles (i.e. ioniques, polaires, hydrogènes ou électrostatiques). Les cellules peuvent facilement se détacher et mourir par apoptose comme lors de la perte d'interaction entre cellules et MEC dans les tissus (anoïkis) [63]. Il a également été démontré que les greffons de PET ne procurent pas une incorporation adéquate des tissus vasculaires [64]. Les travaux antérieurs de l'équipe du Pr. Sophie Lerouge ont démontré de haut taux d'apoptose des CMLV lorsqu'elles sont adhérentes sur ces matériaux *in vitro*, surtout en présence de milieu sans sérum [65].

1.4.6 Stratégies étudiées pour améliorer la guérison des AAA

Il existe deux stratégies principales pour améliorer la guérison des AAA, soit 1) la thérapie pharmaceutique et 2) la modification de surface des SG. La thérapie pharmaceutique se veut principalement une approche préventive, cherchant à stopper l'évolution des AAA. Essentiellement, la thérapie pharmaceutique cherche soit à diminuer la réponse inflammatoire, minimiser le stress oxydatif, inhiber l'activité des protéases ou augmenter la synthèse des composants de la MEC, des phénomènes tous présents dans les AAA [66]. Cette stratégie, par contre, nécessite beaucoup de recherches supplémentaires pour en arriver à un traitement définitif. Il ne faut pas négliger le fait que la plupart des anévrismes sont décelés très tardivement, puisqu'ils sont généralement asymptomatiques. La thérapie pharmaceutique nécessiterait donc un dépistage des AAA beaucoup plus précoce, afin d'être utilisée comme traitement. Le traitement pharmaceutique pourrait donc être considéré, plus réalistement, comme une stratégie complémentaire aux modifications de surface des SG.

Peu d'efforts ont été fait à ce jour pour améliorer l'incorporation des prothèses dans la paroi vasculaire. Pourtant, ceci permettrait d'éliminer les complications, comme la migration et la présence d'endofuites. Malgré les études montrant le manque de guérison autour des stent-grafts, les efforts des industriels sont dirigés vers l'amélioration de la durabilité des implants et de leur fixation mécanique à l'aide de crochets et surtout vers la diminution du profil (diamètre et flexibilité du système inséré) pour permettre de traiter un nombre plus important de patients (CX Today's News, 10 avril 2011).

À ce jour, il existe très peu de travaux de recherche portant directement sur la modification de surface des SG. À titre d'exemple, Van der Bas et al. ont démontré *in vitro* [67] et *in vivo*, chez des modèles porcins, [68] qu'il était possible de stimuler la réparation vasculaire par l'entremise d'un SG imprégné de collagène de type I, d'héparine et du facteur de croissance de fibroblastes basique (bFGF). Kajimoto et al. ont démontré *in vivo*, chez des modèles canins, qu'il était possible d'accélérer la formation d'un thrombus organisé, en présence d'un SG couvert d'un revêtement de collagène de type I, d'élastine, d'héparine et de bFGF contenant des myoblastes et fibroblastes [69]. Mais ces stratégies comportent quelques limites dont l'utilisation d'un facteur de croissance angiogénique (bFGF), d'un anti-coagulant (héparine) et de modèles animaux ne reproduisant pas la réalité clinique.

Il est à noter également qu'aucune stratégie, pharmaceutique ou modification de SG, ne vise à inhiber spécifiquement le phénotype pro-apoptotique des cellules vasculaires dans le contexte des AAA.

Hypothèse 2 : Le phénotype pro-apoptotique des CMLV dans les AAA et le type de recouvrement polymérique des SG peuvent expliquer le manque de guérison autour du SG après EVAR. Un revêtement bioactif pourrait permettre aux cellules vasculaires de la paroi aortique de déclencher des mécanismes de reconnaissances biomoléculaires [70], favorisant ainsi certaines activités biologiques telles l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation, la viabilité et le fonctionnement cellulaire [62], malgré un environnement peu favorable.

1.5 Modifications de surfaces

La plupart des polymères, tels PET et ePTFE, ne contiennent pas de groupements réactifs fonctionnels et sont considérés chimiquement inertes. Dans un contexte où les polymères sont de plus en plus utilisés pour des applications médicales, les propriétés de surface peuvent limiter la durabilité de certains implants et même le succès des traitements médicaux qui s'y rattachent. Une alternative fréquemment étudiée, dans le but d'augmenter la biocompatibilité des biomatériaux, est la modification de surface, par des techniques physico-chimiques et/ou le couplage de biomolécules. La technique de modification choisie doit permettre de créer une nouvelle surface stable, uniforme, reproductible et fonctionnelle.

Les techniques physico-chimiques peuvent être utilisées, par exemple, pour modifier la mouillabilité, la rugosité et la stabilité de la surface. Dans la plupart des cas, ces techniques sont utilisées pour créer des groupements fonctionnels à la surface, permettant ainsi d'immobiliser des molécules bioactives, pour générer des interactions spécifiques entre les cellules et la surface. Pour ce type d'utilisation, il est nécessaire de maintenir un contrôle rigoureux des groupements fonctionnels générés à la surface, pour éviter la création de groupements non désirés [71].

Il existe quatre catégories principales de modification physico-chimique des surfaces, soit la modification par voie humide, la silanisation, les traitements par gaz ionisé (*i.e.* plasma, traitement corona et traitement à la flamme) et la radiation UV [72]. L'avantage principal des techniques de modification par voie humide est qu'elles ne nécessitent pas l'utilisation d'appareils spéciaux et sont donc généralement plus économiques. Par contre, l'utilisation de produits corrosifs et chimiques génère des déchets toxiques qui doivent être traités. La silanisation a comme avantage de produire une monocouche uniforme, mais il a également été démontré qu'il pouvait y avoir une hydrolyse à des températures et des pH plus élevés [72]. La radiation UV peut polymériser une grande variété de monomères, comme l'acide acrylique et l'acrylamide, en présence

d'une lampe UV et d'un photosensibilisateur, par contre la répétabilité du traitement peut être compromise par la présence de particules qui bloquent les rayons UV. Les traitements corona et à la flamme sont des traitements simples et peu coûteux, mais qui génèrent plusieurs groupements oxygénés non spécifiques. Le traitement corona est également instable dans le temps. La modification par plasma présente plusieurs avantages par rapport aux autres techniques, tels la versatilité, le maintien des propriétés intégrales des matériaux, la création de fonctions spécifiques, une bonne reproductibilité et sa nature peu polluante [73]. Le désavantage principal des plasmas est l'optimisation des nombreux paramètres expérimentaux, comme le débit des gaz, la pression et la puissance, pour permettre la reproductibilité [72]. Dans la littérature, plusieurs travaux de recherche font appel au plasma pour modifier des matériaux comme le PET ou ePTFE, dans le but de rendre les surfaces bioactives [74-76].

1.5.1 Modification par plasma

Le plasma est considéré comme le 4^{ème} état de la matière. Le plasma se définit comme étant un gaz partiellement ionisé composé d'atomes, de molécules, d'ions et de radicaux libres excités, suite à une stimulation par radio-fréquences, micro-ondes ou une décharge d'électrons [77]. La grande variété de plasmas permet de réaliser plusieurs techniques différentes de modification de surface, comme la gravure et l'amincissement par arrachement ionique, l'implantation ionique, la pulvérisation et la déposition (*i.e.* déposition conjuguée, polymérisation, greffage par co-polymérisation et ablation au laser) [77]. Il est également possible d'implanter une multitude de groupements fonctionnels, tout dépendant des sources gazeuses utilisées.

L'utilisation des plasmas pour immobiliser des molécules est de plus en plus fréquente dans le domaine des biomatériaux. En particulier, des plasmas à base d'azote, d'ammoniaque ou d'oxygène sont couramment utilisés pour générer des groupements fonctionnels comme les hydroxyles, carboxyles, amines et aldéhydes sur les biomatériaux [73]. Des revêtements fins et riches en groupements fonctionnels peuvent également être

polymérisés par plasma. Citons notamment l'heptylamine, l'allylamine, le propylamine et l'éthylènediamine utilisés pour créer des surfaces comportant des groupements amines, l'acide acrylique pour les carboxyles, ainsi que le méthanol, l'éthanol et l'alcool isopropylique pour les hydroxyles [73].

Plus récemment, l'équipe du Professeur Wertheimer de l'École Polytechnique a mis au point une nouvelle gamme de revêtements organiques polymérisés par plasma riches en amines primaires, soit via la polymérisation d'éthylène par plasma à pression atmosphérique (H-PPE:N) et à basse pression (L-PPE:N), ou encore la photopolymérisation par ultraviolet (UV-PE:N). Les principaux avantages de ces revêtements, par rapport à d'autres techniques de modification sont; 1) l'augmentation de la concentration en azote et en amines primaires, 2) un vieillissement relativement faible, 3) une très bonne uniformité de surface et 4) le fait que le revêtement hautement réticulé empêche sa restructuration en un matériel hydrophobe pour être thermodynamiquement plus stable, et ce malgré son énergie de surface élevée [65].

Un réacteur de décharge à barrière diélectrique (DBD) est utilisé, lors de la polymérisation H-PPE:N, (Figure 6a). Un mélange gazeux d'azote (N_2) et d'éthylène (C_2H_4) est introduit à l'aide d'un diffuseur à gaz dans la zone de décharge diélectrique, entre une électrode sous haute tension et le polymère préalablement fixé sur une plaque de verre. Lors de la polymérisation L-PPE:N, un réacteur de décharge luminescente de radiofréquence (RFGD pour *radio frequency glow discharge*) est employé (Figure 6b). Un mélange gazeux de C_2H_4 et d'ammoniaque (NH_3) est introduit dans la chambre, préalablement réglée à basse pression ($< 10^{-4}$ Pa), par l'entremise d'un distributeur et de contrôleurs de débits. Finalement, tout comme pour le L-PPE:N, un mélange gazeux de C_2H_4 et NH_3 est utilisé pour le UV-PE:N, et ce à basse pression ($\sim 7 \times 10^{-4}$ Pa), mais en présence de lampes UV (Figure 6c). En faisant varier les conditions expérimentales, notamment le ratio des gaz, ces techniques de polymérisation permettent de créer des films possédants différentes compositions et teneurs en amines primaires [78-80].

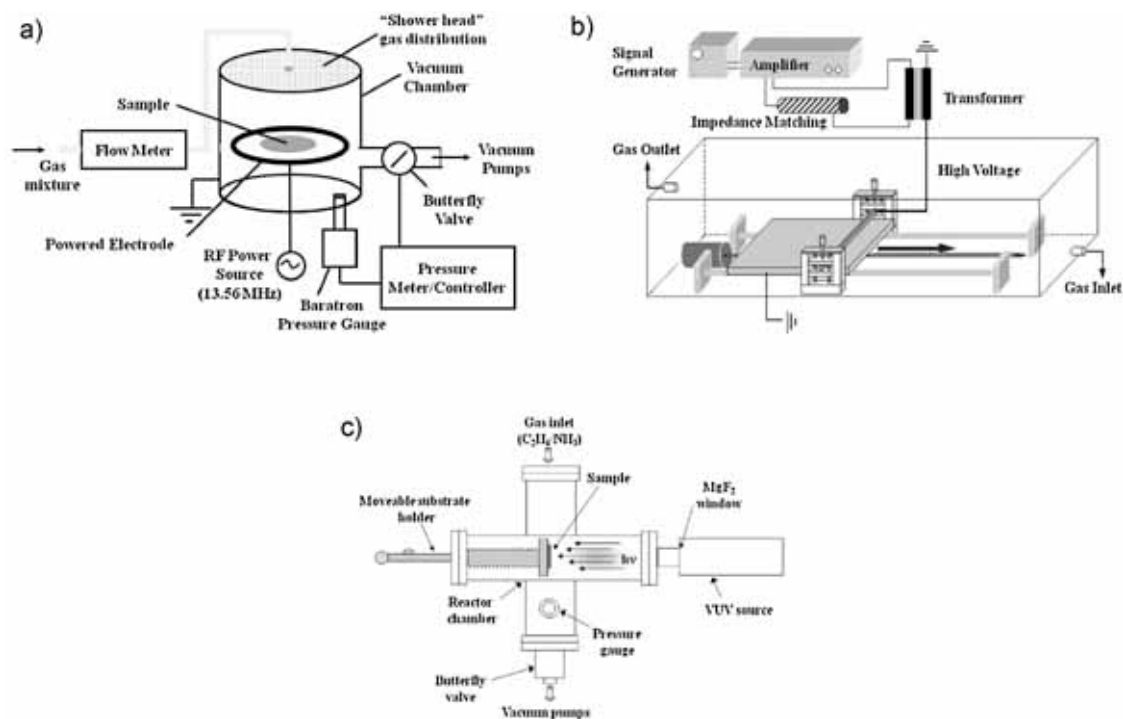


Figure 6: Réacteurs a) L-PPE:N b) H-PPE:N et c) UV-PE:N [80]

1.5.2 Techniques d'immobilisation de molécules

La modification physico-chimique des polymères inertes peut parfois suffire pour stimuler des interactions biologiques entre un biomatériau et les cellules. Par contre, tel que mentionné précédemment, ces interactions sont généralement non-spécifiques, puisque les matériaux modifiés contiennent plusieurs groupements fonctionnels réactifs et favorisent ainsi l'adsorption non-spécifique des protéines. Lorsqu'un biomatériau entre en contact avec les tissus, une adsorption quasi-immédiate des protéines peut être observée. Le type, la concentration et l'orientation des protéines adsorbées varient entre autre en fonction de la charge et l'hydrophilicité de la surface (Figure 7), et les protéines peuvent même se dénaturer tout dépendant de la nature de la surface [81]. L'adsorption des protéines dicte en quelque sorte la réponse cellulaire.

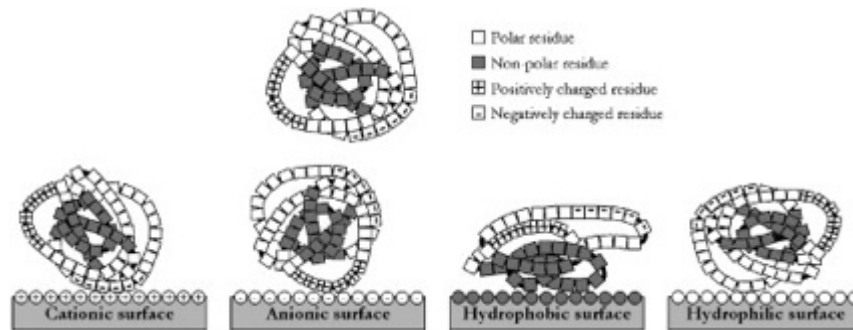


Figure 7: Adsorption des protéines selon la charge et l'hydrophilicité de la surface [72]

Afin d'initier des interactions spécifiques, des molécules bioactives sont souvent liées aux surfaces modifiées, un processus appelé la biofonctionnalisation. Les molécules bioactives peuvent être de sources naturelles ou synthétiques et peuvent catalyser ou favoriser une réaction spécifique avec un système biologique particulier [72]. L'attachement d'un ou plusieurs ligands à la surface d'un biomatériau polymérique bioinerte permet de privilégier des réponses cellulaires spécifiques, prédictives et contrôlées [82]. Ces biomolécules peuvent être immobilisées à la surface via plusieurs méthodes différentes dont l'adsorption directe, le greffage par des liens covalents, l'incorporation physique dans un revêtement ou encore la création d'un revêtement/hydrogel principalement composé d'une biomolécule [83]. Le type d'immobilisation choisi pour une application est important dans la perspective où les nouvelles propriétés des molécules immobilisées doivent être préservées afin d'empêcher le réarrangement moléculaire à la surface.

L'adsorption est une méthode d'immobilisation très simple, nécessitant seulement une période d'incubation entre la surface et les biomolécules [84], pour générer des interactions intermoléculaires du type ionique ou hydrophobique, donc non covalente [83]. Les interactions électrostatiques font appel à la loi de Coulomb où des molécules de charges électriques opposées interagissent et où la solidité des interactions est dictée par la force entre les molécules. L'assemblage couche par couche est un exemple de ce type

d'interaction, tel qu'il a été démontré dans une étude menée par Yunxiao et al. où le collagène (charge positive) a été lié à la chondroïtine sulfate (charge négative) en multicouches, dans le but d'augmenter l'attachement, la croissance et la viabilité des cellules endothéliales humaines [85]. Malgré la simplicité de cette technique, l'adsorption des molécules peut générer une surface hétérogène et instable, possédant des molécules avec une orientation aléatoire [83].

Les interactions d'affinités permettant d'effectuer une immobilisation orientée et homogène de molécules [83]. De plus, puisque les interactions ne sont pas covalentes, les molécules peuvent être dissociées. Les systèmes les plus courants sont la biotine/avidine et les étiquettes avec l'hystidine. Malgré le fait que les interactions d'affinités favorisent l'orientation des molécules, cette technique nécessite plusieurs étapes de préparation. De plus, le greffage des protéines/étiquettes à la surface ou sur les biomolécules peut être à la base non-orienté et ainsi limiter le rendement de l'immobilisation recherchée.

Les liaisons covalentes permettent de créer des liaisons plus stables, prévenir la métabolisation et prolonger la bioactivité des molécules [72]. Hors, ce type d'immobilisation génère une orientation dite statistique, où les molécules sont couplées via des groupements fonctionnels réactifs disponibles, par la présence d'un réticulant. Il existe une très grande variété d'agents de réticulations permettant de lier des groupements fonctionnels comme les thiols, aldéhydes, acides carboxyliques, hydroxyles et les amines primaires [72]. Les liaisons covalentes les plus souvent rencontrées sont; 1) acide carboxylique – amine primaire, 2) thiol – thiol, 3) amine primaire – amine primaire, 4) thiol – amine primaire, 5) carbonyle – carbonyle, 6) phénol – amine primaire, 7) hydroxyle – amine primaire, 8) aldéhyde – amine primaire, 9) hydrogène réactif – amine primaire, 10) hydrogène réactif – thiol et 11) thiol – carbonyle [72].

Dans le cas des biomatériaux, l'adsorption non spécifique de protéines et/ou peptides devrait être évitée, car les molécules solubles non immobilisés peuvent mener à des réponses antagonistes entre les ligands et la MEC, provoquant la perte d'interaction entre les cellules et la surface, le détachement cellulaire et finalement la mort cellulaire par

anoïkis [86]. L'immobilisation d'une biomolécule à la surface d'un biomatériau via une liaison covalente stable permet ainsi de limiter la dégradation enzymatique du ligand [87] et d'assurer une meilleure adhésion cellulaire [88]. Par contre, il importe de mentionner que la bioactivité d'une biomolécule immobilisée varie selon plusieurs facteurs, comme par exemple; la densité en surface, la distribution, l'orientation et la conformation [86, 88].

1.6 Biomolécules pour favoriser la guérison des tissus vasculaires

Tel que mentionné plus haut, afin de favoriser une réponse biologique adéquate autour des stent-grafts, il est essentiel d'y fixer des biomolécules qui interagissent spécifiquement avec les cellules, par exemple les protéines de la MEC, les facteurs de croissance, les protéoglycanes et les peptides. La section suivante vise à présenter les biomolécules ayant un effet reconnu sur les CMLV et fibroblastes qui nous intéressent ici.

1.6.1 Médiateurs pro-adhésifs et pro-prolifératifs

Les protéines les plus souvent utilisées dans le but de stimuler l'adhésion et la prolifération des cellules vasculaires sont 1) les protéines adhésives, telles la fibronectine [89], la laminine, la vitronectine et le collagène [90] qui interagissent avec les intégrines des cellules via des motifs d'adhésion peptidiques [62] 2) les peptides, notamment ceux de la famille des RGD et 3) les facteurs de croissance. Ces biomolécules peuvent être immobilisées à la surface via plusieurs méthodes différentes dont l'adsorption directe, le greffage par des liens covalents, l'incorporation physique dans un revêtement ou encore la création d'un revêtement/hydrogel principalement composé d'une biomolécule. L'attachement d'un ou plusieurs ligands à la surface d'un biomatériau polymérique bioinerte permet de privilégier des réponses cellulaires spécifiques, prédictives et contrôlées [82].

L'ajout d'un facteur de croissance à une surface bioactive peut s'avérer être un choix judicieux pour favoriser des interactions cellules/surface essentielles menant au déclenchement du processus de guérison. Dans le cadre d'un revêtement de SG pour le traitement des AAA, le facteur de croissance choisi devrait favoriser la croissance cellulaire des CMLV et des fibroblastes, inhiber l'apoptose et stimuler la production d'éléments de la MEC. Les facteurs de croissance peuvent être imprégnés et relargués par une matrice (comme le collagène ou autre gel) ou peuvent être au contraire immobilisés à la surface du

matériau. Cette 2nde option est particulièrement intéressante puisqu'il a été démontré que l'immobilisation des facteurs de croissance, empêche leur internalisation menant à une activation cellulaire soutenue et un temps d'exposition plus long, tel que démontré avec l'EGF auprès de cellules A431 [91].

Les principaux facteurs de croissance reconnus pour jouer un rôle dans la réparation vasculaire sont le facteur de croissance de transformation (TGF- β), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VEGF), le bFGF et l'EGF. Il a été démontré par Mii et al que le TGF- β inhibait la prolifération et la migration des CMLV, et ce même en présence d'autres facteurs de croissance mitogéniques, tels que le PDGF, le bFGF et l'EGF [92]. Par contre, il a été démontré que TGF- β augmentait la production d'éléments de la MEC par les CMLV, comme par exemple la production de la fibronectine [93, 94]. Le VEGF n'est pas approprié non plus car c'est un facteur de croissance ayant un rôle primordial dans le développement de l'angiogenèse et de la vasculogenèse, ce qui d'après notre hypothèse, pourrait favoriser les fuites. D'autre part, tout comme le TGF- β , il a été démontré que le VEGF inhibait la prolifération des CMLV [95]. Tel que mentionné précédemment, le bFGF est un facteur de croissance couramment utilisé pour favoriser la croissance des cellules vasculaires, par contre son caractère angiogénique [96] pourrait gêner le développement d'une néointima stable, par la présence de fuites sanguines via la formation de nouveaux vaisseaux et le recrutement des cellules inflammatoires. De façon analogue au VEGF et bFGF, le PDGF est connu pour favoriser l'angiogénèse, en solution [97] et immobilisé [98]. De plus, ce facteur de croissance contient sept résidus de lysines [99], ce qui peut influencer grandement le rendement de son immobilisation, en utilisant des techniques faisant intervenir les amines primaires. L'EGF est un facteur de croissance chimiotactique pour les CMLV favorisant la prolifération cellulaire et stimulant la production d'éléments de la MEC, dont le collagène et la fibronectine [93]. Il a un effet mitogène sur les CMLV [100] mais aussi sur les fibroblastes [101]. Reynolds et al ont démontré que l'activation du récepteur EGFR par l'EGF activait la cascade des protéines kinases extracellulaires stimulées par des agents mitogènes (ERK) ainsi que la prolifération des CMLV [102].

L'EGF semble donc un facteur de croissance convenable pour favoriser la croissance et la migration des CMLV et des fibroblastes, en plus de ses propriétés anti-apoptotiques qui sont présentées plus loin dans cette revue de littérature.

1.6.2 Médiateurs anti-apoptotiques

L'importance des mécanismes d'apoptose dans le manque de guérison autour des stent-grafts nous a poussé à investiguer plus particulièrement les biomolécules favorisant un état de résistance à l'apoptose chez les CMLV et les fibroblastes. Actuellement, aucune recherche ne propose d'utiliser des revêtements visant à inhiber spécifiquement le phénotype pro-apoptotique des CMLV et fibroblastes dans le contexte des AAA. Bien qu'il existe de nombreux travaux faisant appel à la modification de surface des biomatériaux pour augmenter l'adhésion et la prolifération cellulaire, il n'existe que quelques études cherchant spécifiquement à réduire l'apoptose des cellules vasculaires. Voici quelques exemples traitant de ce sujet en particulier.

Rask et al. ont développé un hydrogel composé de chitosane et d'un peptide dérivé de l'angiopoïétine-1, le QHREDGS, pour augmenter la survie des cardiomyocytes après un infarctus du myocarde [103]. Harrison et al. ont créé des films d'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) contenant un composé riche en oxygène, le sodium percarbonate, dans le but de libérer de l'oxygène *in situ* et promouvoir la guérison des tissus [104]. Fan et al. ont démontré que l'immobilisation de l'EGF sur un polymère peigne de poly(méthyle méthacrylate) et poly(éthylène oxyde) promouvait la survie des cellules mésenchymateuses humaines [105], tandis que Prasad et al. ont démontré qu'une matrice composée de fibrine, fibronectine, gélatine et de VEGF promouvait la survie des cellules endothéliales humaines [106]. Malgré le nombre limité d'études portant sur la création de surfaces favorisant la survie cellulaire, la conception de revêtements anti-apoptotiques semble une avenue encourageante pour stimuler la guérison des tissus et diminuer les taux d'échecs.

Dans la littérature, une multitude de médiateurs anti-apoptotiques impliqués dans la formation des plaques athérosclérotiques et la resténose ont été identifiés. Une revue de

tous les médiateurs anti-apoptotiques, ayant été découverts à ce jour, pourrait à elle seule faire l'objet d'une étude complète. Pour limiter l'étendue de ce recueil et ainsi se concentrer sur les facteurs les plus significatifs, une revue des médiateurs anti-apoptotiques pour les cellules vasculaires et plus particulièrement les CMLV est présentée dans cette section.

Plusieurs facteurs de croissance arborent des propriétés anti-apoptotiques envers les cellules vasculaires. Le VEGF-B inhibe l'apoptose des cellules endothéliales, péricytes et CMLV [107]. Le PDGF et le facteur de croissance insulino-mimétique (IGF-1) inhibent également l'apoptose chez les CMLV [108], et ce via la voie de signalisation de la kinase PI3K pour le IGF-1 [109]. La cytokine TGF- β 1 détient un double-rôle en induisant l'apoptose chez les cellules endothéliales, tout en inhibant l'apoptose des CMLV [110]. Le facteur de cellule souche (SCF pour *Stem Cell Factor*) peut diminuer l'apoptose des CMLV, préalablement soumis à un milieu sans sérum contenant du peroxyde d'hydrogène, en activant la voie Akt et augmentant la concentration de Bcl-2, inhibant ainsi le largage du cytochrome-*c* via les mitochondries [111]. De plus, il a été démontré que l'activation du récepteur cellulaire EGFR par l'EGF chez les CMLV provoque des modifications post-traductionnelles de la protéine Bax (famille des protéines Bcl-2), après une induction de l'apoptose par l'inhibition des protéasomes, engendrant ainsi des signaux anti-apoptotiques [112].

L'apoptose des CMLV, soumis à un milieu sans sérum, peut également être inhibée par l'apelin, un peptide, et l'acide 15-hydroxyicosatétraénoïque, un dérivé métabolique de l'acide arachidonique, par les voies de ERK/Akt [113] et PI3K/Akt respectivement [114]. Pour les cellules endothéliales plusieurs composés dont des dérivés cholestérols [115], l'humanine [116], ainsi que la combinaison des vitamines C et E, et la *N*-acétylcystéine, un antioxydant, [117] ont démontré des propriétés anti-apoptotiques. Le PR39, un peptide présent dans le processus de guérison, inhibe l'apoptose des cellules endothéliales soumis à un environnement hypoxique, par une augmentation de l'expression de l'inhibiteur de l'apoptose IAP-2 [118]

Puisque nous cherchons à favoriser la croissance d'un tissu autour du SG, pour promouvoir un joint hémostatique avec la paroi de l'anévrisme. Il est intéressant de s'inspirer des mécanismes de réparation vasculaire et de formation de néointima. La formation d'une néointima a été documentée dans plusieurs cas de remodelages vasculaires pathologiques, comme l'athérosclérose. Il est présumé qu'une altération de l'endothélium est un élément précurseur du développement des plaques athérosclérotiques et de l'accumulation des CMLV [119], en raison de la présence de médiateurs anti-apoptotiques. L'altération de l'endothélium peut être initiée par plusieurs facteurs dont la présence de radicaux libres ou d'infections et provoque l'apoptose des cellules endothéliales. Dans ce cadre, le groupe du Dr MJ Hébert a démontré que les cellules endothéliales apoptotiques libéraient des médiateurs paracrines inhibant l'apoptose des CMLV humaines et de rats (voir Figure 8), fibroblastes et cellules mésenchymateuses. Parmi ces médiateurs, un fragment *c*-terminal du domaine V du perlecan, contenant des motifs de la laminine G (LG3), ainsi qu'un site d'ancrage de la CS ont été identifiés [120-122]. Plus spécifiquement, ils ont démontré que la CS en solution développait un état de résistance à l'apoptose chez les CMLV (voir détails plus loin). Des travaux récents de Soulez et al. ont également permis d'identifier l'EGF parmi les médiateurs paracrines libérés par les cellules endothéliales apoptotiques [122]. Ils ont aussi démontré que l'ajout de LG3 au EGF augmentait la résistance à l'apoptose des cellules mésenchymateuses humaines, en amplifiant la phosphorylation ERK 1/2. Ces travaux ont permis d'identifier le potentiel de la CS et de l'EGF, comme médiateur de la réparation vasculaire, et sont à la base des travaux de recherche présentés dans cet ouvrage. Leur structure et fonction respectives sont donc décrites dans les prochains paragraphes.

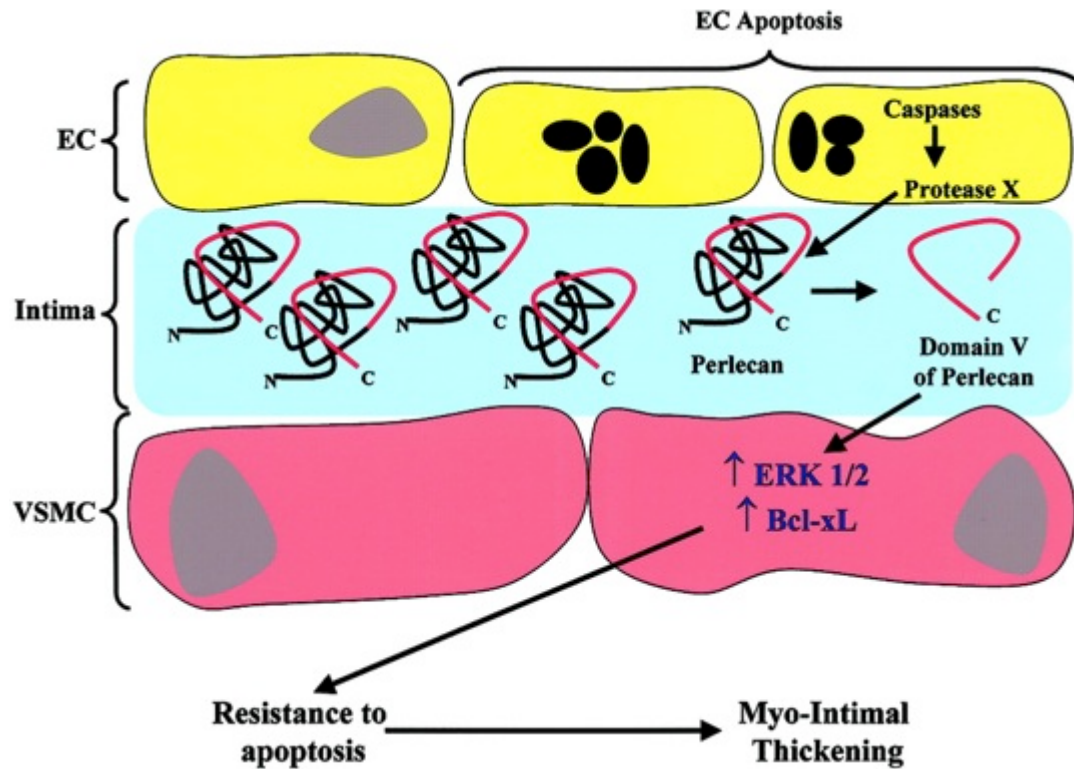


Figure 8: Libération de médiateurs anti-apoptotiques pour les CMLV par les cellules endothéliales apoptotiques [121]

1.6.3 Chondroïtine sulfate

La chondroïtine-4-sulfate (CS) est l'un des glycosaminoglycanes (GAG) du tissu conjonctif le plus abondant du corps humain. Ceci lui confère donc une particularité de biocompatibilité très importante. Son coût de production relativement faible lui donne un avantage supplémentaire. La CS est un mucopolysaccharide linéaire qui est constitué d'unités disaccharidiques répétitives reliées par un lien β 1-3; l'acide D-glucoronique et le D-galactosamine (voir structure au Tableau 2). La CS est sulfatée à la position C-4 de la galactosamine [123, 124] et elle chargée négativement, malgré la présence de contre-ions positifs [125].

1.6.3.1 Protéoglycanes composés de CS

À l'état naturel, la CS est ancrée aux protéoglycanes. Les protéoglycanes sont des glycoprotéines composés d'une ou plusieurs chaînes de GAG sulfatés, telle que la CS, et d'une variété d'oligosaccharides liés de façon covalente à une protéine. Les protéoglycanes ont plusieurs rôles dans les tissus, dont l'organisation et le fonctionnement de la MEC, les interactions cellules / MEC et la régulation des mécanismes cellulaires, comme la différenciation, la migration et la division cellulaire. La synthèse des chaînes de GAG, comme la CS, est contrôlée par l'activité d'un groupe de glycotransférases et sulfotransférases, qui sont des enzymes produits par l'appareil de Golgi [126].

Essentiellement, la CS dans est localisée les hyalectines (*e.g.* aggrécane, versicane, neurocane et brevicane) et dans les petits protéoglycanes riches en leucines (« Small leucine-rich proteoglycans », *e.g.* décorine et biglycane). Le rôle de l'aggrécane est de maintenir l'hydratation des tissus, en attirant et liant des molécules d'eau par la densité élevée de ses groupements négatifs. La versicane contient moins de CS que l'aggrécane, mais possède un rôle similaire. La versicane interagit avec plusieurs macromolécules extracellulaires, ainsi que des récepteurs surfaciques cellulaires, et serait donc impliquée dans l'organisation de la MEC, la régulation de la prolifération et la migration cellulaires. La décorine joue également un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire en interagissant directement avec les cellules et les facteurs de croissance, comme le TGF- β . La décorine peut également se lier au récepteur de l'EGF, modulant ainsi les mécanismes cellulaires reliés à l'activation du EGFR [126]. La CS peut également se retrouver dans les protéoglycanes de la membrane basale (*i.e.* perlecan et bamacan), ainsi que dans des protéoglycanes cellulaires, comme le syndecan et le NG2-melanoma et le CD44 [127].

1.6.3.2 Rôle de la CS dans le développement de l'athérosclérose

La versicane, le biglycan et la décorine sont des protéoglycanes présents dans la paroi normale aortique, qui s'accumulent lors du développement des plaques athérosclérotiques. La versicane, particulièrement, joue un rôle important dans la rétention

et l'accumulation lipidique. L'accumulation des protéoglycanes comme la versicane, le biglycan et la décorine dans les plaques athérosclérotiques est déclenchée par une multitude de facteurs de croissance et de cytokines, tels le TGF- β , le PDGF, l'EGF, le bFGF et l'IL-1 β , qui sont relâchés par les cellules inflammatoires et qui ont, pour la plupart, un effet mitogénique sur les cellules musculaires lisses artérielles.

La présence de versicane et d'une accumulation d'agrégats d'hyaluronane permet de créer un « manteau » viscoélastique autour des cellules. Dans les AAA, une diminution marquée de la versicane a été observée, ce qui influencerait les propriétés viscoélastiques et la compressibilité de la paroi aortique et provoquerait la déformation et la dilatation de la paroi lors de l'évolution de la pathophysiologie. Les protéoglycanes contenant de la CS sont en quelque sorte des régulateurs de la distribution des éléments de la MEC, mais aussi des propriétés mécaniques de la paroi aortique [127].

1.6.3.3 Effet de la CS en solution

Plus tôt dans ce texte, il a été établi que les AAA étaient caractérisées par un environnement pro-apoptotique appauvri d'éléments de la MEC, dont les glycosaminoglycanes comme la CS. Cette dernière comporte plusieurs propriétés pouvant être bénéfiques dans la guérison des tissus vasculaires après une réparation endovasculaire. Les recherches effectuées par le groupe du Dr MJ Hébert ont démontré que la CS en solution était un médiateur efficace pour la résistance à l'apoptose des CMLV de rat et humaines, ainsi que des fibroblastes [120, 121]. L'ajout de la CS dans un milieu sans sérum amplifiait la phosphorylation ERK 1/2, engendrant ainsi l'augmentation de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL et le développement d'un état de résistance à l'apoptose chez les CMLV [121]. Pour les fibroblastes, l'ajout de la CS activait la voie de signalisation PI3K, empêchant ainsi la régulation à la hausse de Bim-EL, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2, et générant l'augmentation de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL [120]. Chez les CMLV de rat, les CMLV humaines et les fibroblastes, la présence de la CS, à une

concentration de 125 $\mu\text{g/ml}$, diminuait significativement le taux d'apoptose après 24 heures en milieu sans sérum.

En plus d'induire la résistance à l'apoptose des CMLV et des fibroblastes, le groupe du D^r MJ Hébert a démontré que la CS influençait la capacité de différencier les fibroblastes en myofibroblastes (i.e. différenciation myofibroblastique), tel que caractérisé par l'apparition de myofilaments d'actine, par immunofluorescence et analyse Western (α -SMA pour *alpha smooth muscle actin*) [120].

Lors d'expériences réalisées dans nos laboratoires, nous avons également effectué quelques tests *in vitro* chez les CMLV en présence de CS en solution, pour évaluer la résistance à l'apoptose après 8 et 24 heures en milieu sans sérum (Figure 9). Ce test démontre bel et bien que la CS permet de diminuer le taux d'apoptose, à partir d'une concentration de 125 $\mu\text{g/ml}$, et ce dès 8 heures d'incubation.

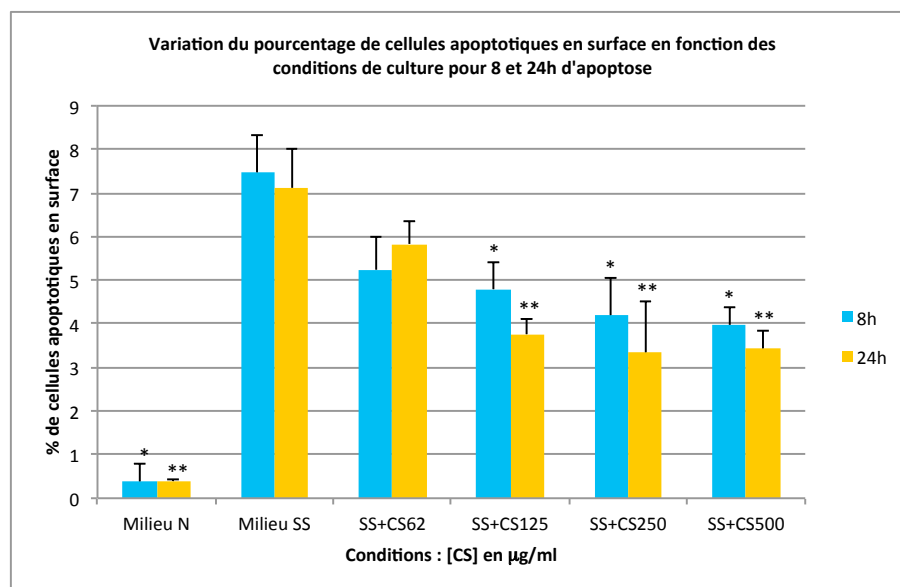


Figure 9: Apoptose des CMLV en présence de CS en solution dans un milieu normal (N) ou sans sérum (SS) (* et ** $p < 0.05$ par rapport au milieu sans sérum à 8h et 24h respectivement)

1.6.3.4 Biomatériaux à base de CS

La CS étant une molécule très hydrosoluble, sa réticulation est donc indispensable afin de limiter ou empêcher sa libération en solution aqueuse. De plus, ce glycosaminoglycane contient peu de groupements fonctionnels réactifs limitant ainsi sa réticulation par des techniques traditionnelles, tels le glutaraldéhyde ou encore l'épichlorhydrine, qui interagissent plutôt avec des groupements amines, un groupement peu réactif chez la CS. Ceci peut expliquer pourquoi plusieurs études ont démontré que la CS peut être fonctionnalisée, notamment par une substitution méthacrylate [128], aldéhyde [129] ou diamine [130] avant d'être utilisée comme hydrogels, adhésifs, films, etc. Par contre, la fonctionnalisation d'une molécule bioactive, comme la CS, peut influencer sa capacité d'interactions avec les cellules, et ainsi modifier le comportement cellulaire qui était préalablement recherché.

Dans la littérature, plusieurs applications de la CS ont été réalisées dans le domaine des biomatériaux, et surtout dans l'axe des cartilages. Pour nommer quelques applications, Rammelt et al. ont observé qu'un revêtement de CS et de collagène de type I déposé sur des prothèses de titane favorisait le remodelage osseux autour des implants orthopédiques [131]. Li et al. ont démontré qu'un hydrogel de CS créé après photopolymérisation de la CS pré-fonctionnalisée par des groupements méthacrylates maintenait la viabilité des chondrocytes [132]. Il a également été constaté par van Susante et al. qu'une matrice de CS et collagène de type I réticulée par un carbodiimide soluble favorisait la prolifération des chondrocytes ainsi que la rétention de protéoglycanes [133]. Reyes et al. ont révélé que la CS fonctionnalisée par des groupements aldéhydes pouvait être utilisée comme adhésif favorisant le scellement d'incisions de la cornée [134]. Gilbert et al. ont démontré qu'un hydrogel de CS et de poly(éthylène glycol) pouvait accélérer la guérison des tissus lésés dans la muqueuse du sinus maxillaire [135]. Il a également été observé par Mi et al. que la CS, dans une matrice de chitosane, pouvait être utilisée pour adsorber le bFGF et ainsi favoriser la prolifération des fibroblastes humaines et de ce fait même influencer la réparation des tissus [136]. Dans le domaine vasculaire, Liu et al. ont démontré qu'un

système couche par couche de CS et collagène pouvait augmenter l'adhésion, la croissance et la viabilité des cellules endothéliales humaines [137]. En revanche, dans un article portant sur les réponses cellulaires des cellules vasculaires par rapport aux polysaccharides, Chupa et al. ont démontré que la CS complexée au chitosane inhibait la prolifération cellulaire dû à une mauvaise adhésion [138].

Hypothèse #3 : Sachant que la CS est impliquée dans le processus de guérison des tissus [139, 140], la présence de CS pourrait favoriser l'incorporation du SG à la suite d'un traitement endovasculaire, en stimulant la réparation vasculaire. Ainsi, la création d'un revêtement à base de CS pourrait induire un état de résistance à l'apoptose des CMLV et favoriser, avec l'ajout d'autres biomolécules, comme l'EGF, la croissance des CMLV à la surface du PET et ePTFE.

1.6.4 Facteur de croissance de l'épiderme

L'EGF est un polypeptide de 6.4 kDa composé de 53 acides aminés (voir Figure 10). Le précurseur de l'EGF contient environ 1200 acides aminés [141], dont 9 sous-unités analogue à l'EGF situées dans le domaine extracellulaire. Il contient également un domaine trans-membranaire hydrophobe et un domaine cytoplasmique [142]. L'EGF est composé de trois ponts disulfures (Cys6-Cys20, Cys14-Cys31 et Cys33-Cys42), ce qui augmente sa stabilité, de feuilletts β et plusieurs liaisons hydrogènes (Val19-Asn32, Met21-Ala30, Ile23-Lys28, Val34-Tyr37 et Ile38-Tyr44). Il fait partie de la famille de l'EGF comprenant en outre; 1) le TGF α , 2) le facteur de croissance analogue au facteur de croissance de l'épiderme lié à l'héparine (HB-EGF), 3) l'amphiréguline, 4) l'épiréguline et 5) l'épigène [142].

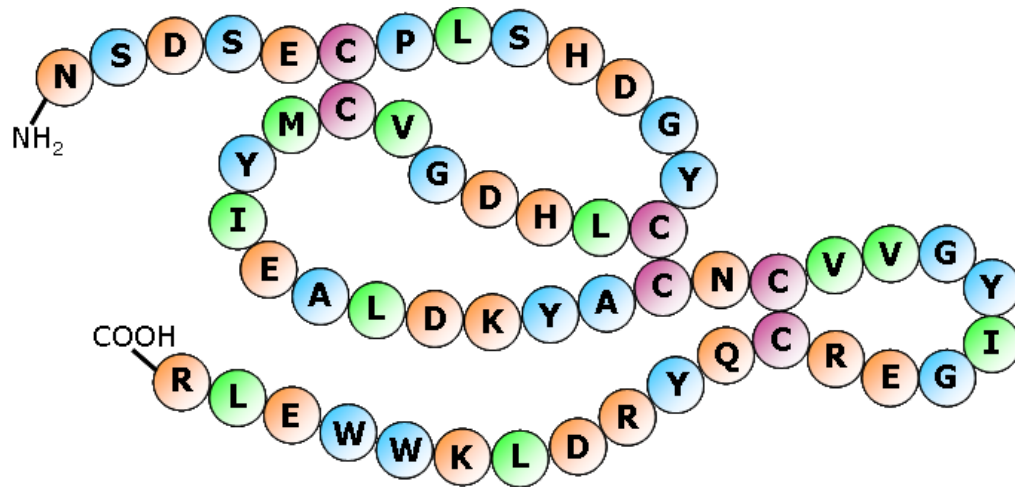


Figure 10: Structure de l'EGF humain

1.6.4.1 Récepteur de l'EGF

La nature hydrophile de l'EGF empêche son internalisation par la membrane plasmique qui est hydrophobe. La communication entre l'EGF et la cellule est donc assurée par l'activation du récepteur de l'EGF (EGFR). Les acides aminés impliqués dans l'interaction ligand-récepteur sont les suivants : Arg41, Ile-23, les résidus hydrophobes du feuillet β (acides aminés 19 à 31) [143]. Le EGFR est un récepteur de la famille des tyrosines kinases et comporte donc une portion intracellulaire et extracellulaire. Il est composé d'une chaîne polypeptidique de 1186 acides aminés (621 acides aminés extracellulaires, 23 acides aminés trans-membranaires et 542 acides aminés situés dans le domaine cytoplasmique) [142]. Il existe quatre récepteurs de l'EGF [142] : 1) ErbB1 (aussi appelé EGFR, HER1), 2) ErbB2 (aussi appelé HER2, p185 ou neu), 3) ErbB3 (aussi appelé HER3 ou p160) et 4) ErbB4 (aussi appelé HER4).

L'EGF active seulement ErbB1 et non les trois autres récepteurs. Pour permettre l'activation du EGFR, une dimérisation de deux EGFR, ainsi que la liaison du ligand (l'EGF) aux deux EGFR doivent avoir lieu (Figure 11). Dans la littérature, plusieurs types

de liaisons récepteur-ligand ont été identifiés entre EGF et EGFR faisant intervenir soit une homodimérisation ou hétérodimérisation du EGFR et des ordres de liaisons récepteur-ligand différentes. Dans une revue de littérature, Dreux et al. ont identifié plusieurs types de liaisons entre EGF-EGFR précédemment publiés, les plus courantes sont 1) la liaison d'un premier complexe EGF-EGFR à un deuxième complexe EGF-EGFR, 2) la liaison d'un complexe EGF-EGFR à un second récepteur EGFR et ensuite un EGF et 3) la création d'un dimère inactif composé de deux EGFR et activation par la liaison des ligands en modifiant la conformation du domaine transmembranaire [142]. La liaison EGF-EGFR permet de stabiliser le domaine cytoplasmique du dimère EGFR pour ensuite activer le domaine kinase et finalement permettre l'autophosphorylation du récepteur.

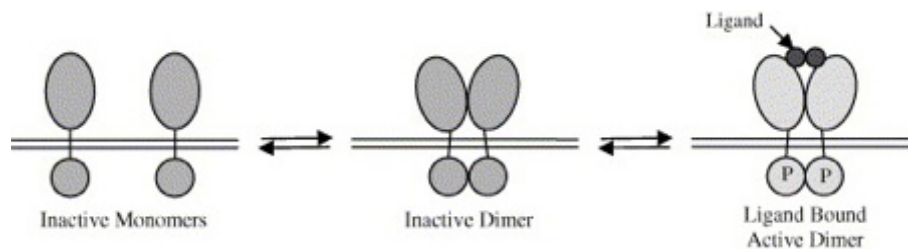


Figure 11: Activation et dimérisation du EGFR [142]

1.6.4.2 Fonctions de l'EGF

Tel que discuté ci-dessus, l'EGF est un facteur de croissance chimiotactique et mitogène pour les CMLV [100] mais aussi pour les fibroblastes [101]. De plus, l'EGF semble stimuler les voies de signalisation menant à un état de résistance à l'apoptose. Dans un article de synthèse, Henson et al. ont révélé que l'activation des récepteurs de l'EGF mène à l'activation de trois voies de signalisation différentes (PI3K/AKT, RAS/ERK et JAK/STAT) qui elles provoquent la stimulation de protéines anti-apoptotiques (Famille Bcl-2, IAP, CREB, mTOR, NFκB et HIF-1α) et l'inhibition de protéines pro-apoptotiques (BAD, Caspase 9 et FOXO) [144]. La Figure 12 illustre la double-signalisation inhibant les

protéines pro-apoptotiques (noires) et activent les protéines anti-apoptotiques (blanches), après l'activation de EGFR des deux voies de l'apoptose, extrinsèque et intrinsèque [144].

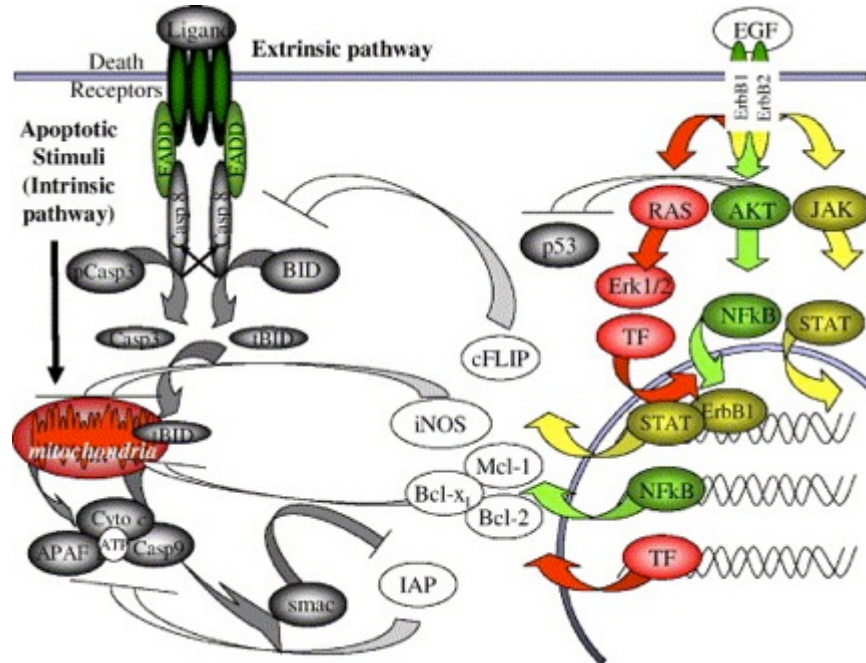


Figure 12: Phénomène d'excitation croisée entre l'activation et l'inhibition de l'apoptose après l'activation du EGFR [144]

Avant de choisir l'EGF pour un revêtement bioactif, nous avons effectué quelques tests *in vitro*, pour vérifier le potentiel anti-apoptotique de l'EGF humain en solution sur les CMLV et un potentiel effet additif ou synergique avec la CS.

L'apoptose de CMLV a été induite lors d'incubation de 24 heures dans un milieu sans sérum (Figure 13). Selon ces résultats, l'EGF semble inhiber l'apoptose, et ce pour des concentrations aussi minimales que 0,1 ng/ml. À partir de ce graphique, on observe que la résistance à l'apoptose chez les CMLV s'intensifie avec la concentration d'EGF, jusqu'à l'obtention d'un plateau aux alentours de 10 ng/ml. Suite à ces résultats, nous avons évalué l'effet combiné de l'EGF et de la CS en solution sur la résistance à l'apoptose des CMLV

(Figure 14), ainsi que la déplétion cellulaire (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), en présence de milieu sans sérum. Tout comme pour les résultats présentés à la Figure 9 et la Figure 13, le taux d'apoptose a significativement diminué, en présence de CS et d'EGF individuellement, par rapport au contrôle négatif, le milieu sans sérum seul. L'ajout des deux molécules à la fois ne présente pas des résultats significativement différents de la CS ou l'EGF seuls en solution. Il ne semble donc pas avoir d'effet synergique ou additif de l'EGF et la CS sur la résistance à l'apoptose.

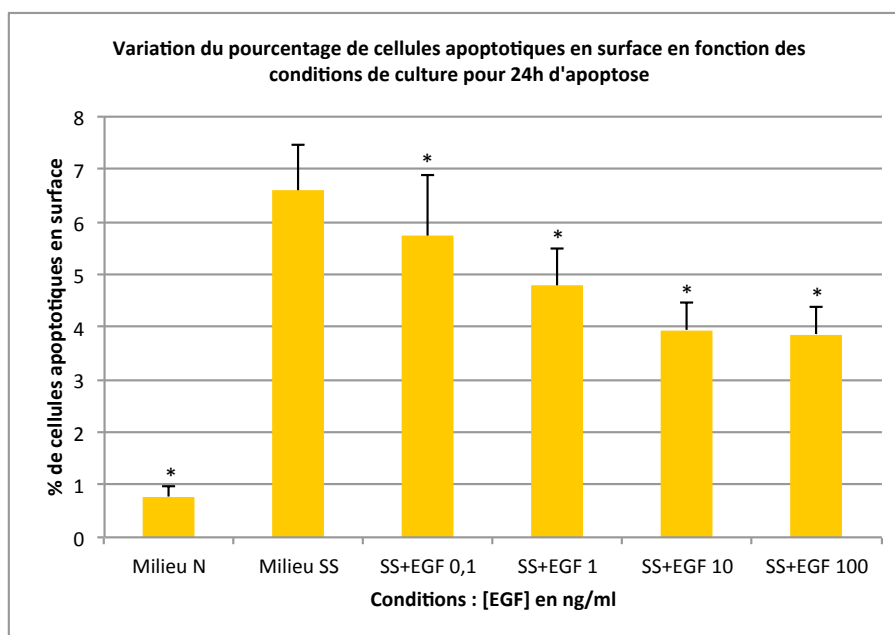


Figure 13: Apoptose des CMLV en présence d'EGF en solution dans un milieu normal (N) ou sans sérum (SS) (* $p < 0.05$ par rapport au milieu sans sérum)

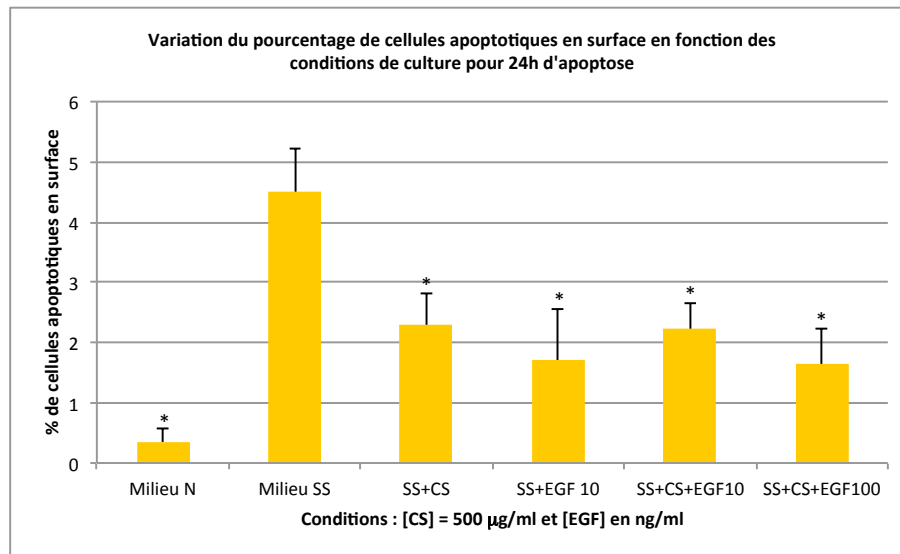


Figure 14: Apoptose des CMLV en présence de CS et d'EGF en solution dans un milieu normal (N) ou sans sérum (SS) (* $p < 0.05$ par rapport au milieu sans sérum)

Pour ce qui est de la déplétion cellulaire, le nombre de cellules résiduelles après une période d'incubation en milieu sans sérum (SS) a été comparé au nombre de cellules présentes en milieu normal avec sérum (N), et ce pour chaque condition. Tel qu'illustré à la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, l'ajout de la CS a diminué significativement la déplétion cellulaire par rapport au milieu sans sérum seul. L'EGF en solution permet de réduire davantage la déplétion cellulaire, par rapport au milieu sans sérum ($p = 0.002$). La combinaison de la CS et l'EGF en solution semble diminuer davantage la déplétion cellulaire, par rapport au milieu sans sérum ($p < 0.005$ pour 10 et 100 ng/ml d'EGF) et par rapport au milieu sans sérum avec la CS ($p = 0.057$ et $p = 0.009$ pour 10 et 100 ng/ml d'EGF respectivement). Donc, malgré le fait que le taux d'apoptose en surface ne varie pas significativement entre la CS, l'EGF et la CS+EGF en solution, la déplétion cellulaire en présence des deux molécules tend à diminuer comparativement aux molécules individuellement. Le milieu sans sérum est connu pour arrêter le cycle de croissance des cellules dans la phase G0/G1. De ce fait, les travaux de recherche effectués dans les laboratoires du D^r MJ Hébert avaient démontré que les CMLV exposées au mélange de

médiateurs relâchés par les cellules endothéliales apoptotiques, dans un milieu sans sérum, semblaient maintenir un état pro-prolifératif, par l'absence d'arrêt en phase sous-G0 et G0/G1, prévenant ainsi l'apoptose et l'arrêt de cycle de croissance en phase G1 [121]. Ces résultats, combinés aux résultats présentés à la Figure 15, nous laissent croire que l'EGF en solution inhiberait l'arrêt du cycle de croissance, engendré par le milieu sans sérum, et pourrait par le fait même maintenir une certaine prolifération cellulaire.

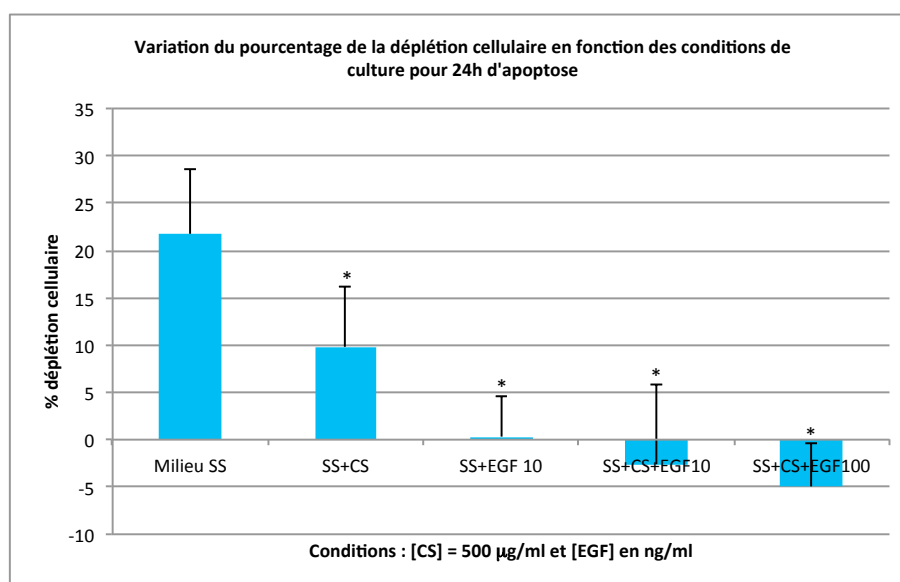


Figure 15: Déplétion des CMLV en présence de CS et d'EGF en solution dans un milieu normal (N) ou sans sérum (SS) (* $p < 0.05$ par rapport au milieu sans sérum)

1.6.4.3 Immobilisation d'EGF sur les biomatériaux

Plusieurs études de natures différentes ont démontré qu'il était possible d'immobiliser l'EGF à un biomatériau tout en maintenant sa bioactivité. L'EGF peut être greffé de façon covalente, notamment via les amines de l'EGF [91], par l'intermédiaire d'une étiquette histidine [145] ou de façon orientée avec l'utilisation d'un système coiled-coil [146]. Le désavantage principal de l'immobilisation des facteurs de croissance par une conjugaison au groupement amine de la lysine est la création de surfaces hétérogènes provoquant des conformations et des activités fonctionnelles variables [147], malgré le fait que son efficacité ait été démontré dans plusieurs études [91, 148, 149].

Hypothèse #4 : L'ajout de l'EGF au revêtement pourrait permettre une croissance des CMLV. En plus des propriétés pro-prolifératives de l'EGF, sa capacité d'influencer la migration et d'inhiber l'apoptose des cellules vasculaires pourraient être bénéfique dans le contexte d'une guérison des tissus vasculaires. La création d'un revêtement combinant la CS et l'EGF, sur des surfaces polymériques comme le PET ou le ePTFE, pourrait donc favoriser la croissance cellulaire tout en inhibant l'apoptose autour des SG, assurant ainsi la fixation de la prothèse et la durabilité d'EVAR à long-terme.

Chapitre 2: Objectifs du projet

Essentiellement, ce projet repose sur l'hypothèse que les complications suivant EVAR sont liées à un manque d'incorporation des endoprothèses dans la paroi vasculaire causée notamment par un déficit de la formation néointimale. L'objectif à long terme de ce projet consiste à développer un SG bioactif intégrant des polymères synthétiques ou naturels et des médiateurs connus, qui influencent la résistance à l'apoptose, ainsi que la migration, la prolifération et la différenciation des CMLV et/ou des fibroblastes dans le but d'améliorer la guérison des tissus vasculaires autour des SG.

La CS possède un rôle central dans le processus de la réparation vasculaire. Il a été démontré que la CS en solution avait un effet direct sur la résistance à l'apoptose des CMLV et des fibroblastes, par l'activation de la voie de phosphorylation ERK 1/2. Il a également été révélé que la CS influençait la différenciation myofibroblastique. Ces propriétés spécifiques confèrent à la CS un potentiel fort intéressant dans le cadre de la réparation des anévrismes par le biais des SG, car elle pourrait favoriser la guérison des tissus aortiques en contrecarrant les caractéristiques pathophysiologiques des anévrismes pour ainsi diminuer les complications, comme les fuites sanguines et la migration des SG. Nous voulons donc stimuler la croissance des cellules vasculaires autour de l'implant et déclencher le processus de guérison des tissus.

L'objectif général de ce projet consiste donc à créer un revêtement bioactif intégrant la CS pour combattre l'environnement pro-apoptotique des AAA. Plus spécifiquement, nous cherchons à 1) créer un revêtement à base de CS permettant une bonne adhésion des CMLV 2) démontrer le potentiel anti-apoptotique de la CS immobilisée en surface par sa capacité d'induire *in vitro* un état de résistance à l'apoptose des CMLV, en optimisant, si nécessaire, les propriétés biologiques du revêtement, telles la migration et la croissance cellulaire, par l'ajout de facteurs de croissance pro-prolifératifs ou d'autres molécules bioactives, comme l'EGF et 3) transférer le revêtement sur des surfaces représentatives des SG, comme le PET.

Chapitre 3: Revêtement de chondroïtine sulfate et collagène (Article 1)

3.1 Présentation de l'article

Ce chapitre présente l'article intitulé « **Chondroitin-4-Sulfate: A Bioactive Macromolecule to Foster Vascular Healing around Stent-Grafts after Endovascular Aneurysm Repair** » qui a été publié dans *Macromolecular Bioscience* (Volume 7, numéro 5, pp. 746-752) [150].



De récents développements dans le domaine de la biologie moléculaire, plus particulièrement sur le remodelage vasculaire, ont démontré que la CS en solution déclenchait des mécanismes cellulaires impliqués dans la réparation vasculaire. Suite à ces résultats très encourageants, nous nous sommes penchés sur la création d'un revêtement à base de CS dans le but de vérifier si les propriétés de la CS pouvaient être maintenues après son immobilisation. Afin d'exploiter les propriétés de la CS, tout en inhibant son caractère anti-adhésif, un premier revêtement à base de CS et de collagène de type I a été conçu. Le collagène a été ajouté à la CS pour améliorer à la fois les propriétés mécaniques du revêtement, ainsi que l'adhésion cellulaire. Le revêtement de CS et collagène a été créé par l'entremise d'une réticulation à l'aide de deux réactifs, soit le 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) et *n*-hydroxysuccinimide (NHS), fixant le collagène et la CS par des liaisons covalentes de type amide [133].

Les tests de viabilité cellulaire ont permis de conclure que le revêtement de collagène et CS semblait augmenter la viabilité des CMLV de rat, même après l'immobilisation de la CS. De plus, une augmentation de l'adhésion des CMLV sur le revêtement a été observée, en comparant aux films de PET vierge. Par contre, l'ajout de la CS dans le revêtement semblait tout de même diminuer l'adhésion des CMLV par rapport au revêtement de collagène seul.

3.2 Chondroitin-4-Sulfate: A Bioactive Macromolecule to Foster Vascular Healing around Stent-Grafts after Endovascular Aneurysm Repair

Cindy Charbonneau^{1,2}, Julien E. Gautrot², Marie-Josée Hébert¹, X. X. Zhu², Sophie Lerouge^{1*}

¹ Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 1560 Sherbrooke Est, Montréal, QC, Canada H2L 4M1

² Département de Chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville Montréal, QC, Canada H3C 3J7

* Corresponding author:

Sophie Lerouge, PhD

Laboratoire de biomatériaux endovasculaires (LBeV))

CHUM Research Center, Notre-Dame Hospital, JA de Sève Building, Y-1603

1560 Sherbrooke St. East, Montreal, QC, Canada H2L 4M1

Fax: + 1 514 412 7785

3.2.1 Abstract

Deficient healing after endovascular aneurysm repair with a stent-graft is thought to be related to pro-apoptotic environment in abdominal aortic aneurysms and inertness of graft materials. We developed a bioactive coating containing chondroitin-4-sulfate and assessed its potential to improve cell adhesion, viability and resistance to apoptosis on PET surfaces. Coatings of collagen type I and CS were prepared and characterized by DMMB, FT-IR, DSC, SEM and contact angle goniometry. Preliminary cell culture experiments with vascular smooth muscle cells showed increased adhesion and viability in serum-free medium on CS-coated surfaces compared to control PET films.

3.2.2 Keywords

Biomaterials; chondroitin-4-sulfate; coatings; stent-graft; vascular repair

3.2.3 Introduction

Poly(ethylene terephthalate) (PET, Dacron) and expanded poly(tetrafluoroethylene) (ePTFE) grafts have been used extensively over the years in vascular repair. These materials have good mechanical properties, are quite inert and exhibit low thrombogenicity [151-153]. This might be favorable to avoid thrombotic occlusion or stenosis in small-diameter artificial vessels. However, when tissue healing is critical to the success of the treatment, such as endovascular aneurysm repair (EVAR), the relative inertness of PET and ePTFE might be problematical. Abdominal aortic aneurysms (AAA) are characterized by a permanent dilatation of the aortic wall which can eventually lead to rupture of the aorta and cause death. EVAR is a minimally invasive treatment in which a stent-graft (SG) is inserted via femoral artery access under fluoroscopic guidance and deployed at the site of the aneurysm to exclude it from blood flow and prevent further enlargement or aneurysm rupture. A SG is a tubular device composed of a polymeric graft (PET or ePTFE) supported by a metallic structure or stent. Treatment of AAA with EVAR is a promising alternative to open surgery but is compromised by complications such as device migration and endoleakage. Migration is related to insufficient fixation of the implant to the vessel wall and affects 3–8% of patients [154-156]. Persistence of blood flow into the aneurysm after stent grafting, or endoleak, affects 20% of patients [157, 158]. Previous work has shown that these complications might be related to deficient healing around the SG, which compromises its biological incorporation and fixation. Analysis of SGs retrieved from patients at surgical conversion or autopsy showed poor or no organization of the blood clot formed between the SG and the aneurysmal wall and on SG lumen, even several years after implantation [56, 57, 159]. Activation of repair pathways after vascular injury usually induces thrombus organization with fibroblasts, myofibroblasts and vascular smooth muscle cells (VSMC) invasion as well as extracellular matrix (ECM) deposition. In coronary stents, these mechanisms can lead to excessive fibrous tissue formation restricting the vessel lumen (neointimal hyperplasia). In contrast, thrombus organization is insufficient after EVAR, even at the neck of the aneurysm where the SG and vessel wall are in direct

contact. Despite the fact that this problem is well known, very few efforts have been made to date to increase healing around SGs [64, 68].

AAA are associated with an important VSMC depletion within the vessel wall which leads to the weakening and progressive dilatation of the aortic wall [160-162]. A large body of evidence shows that a sustained increase in apoptosis, a programmed form of cell death, plays a central role in this depletion [25, 27]. Moreover, cell apoptosis is likely to increase after EVAR since the implant excludes the aneurysm from blood flow, therefore limiting cell access to nutrients and oxygen. To promote tissue growth on the surface of the SG and thus improve SG incorporation, the biomaterial should promote not only the adhesion and proliferation of VSMC and fibroblasts but also the development of a state of resistance to apoptosis [163-166]. Conventional graft materials such as ePTFE and PET either favor anoikis (programmed cell death induced by loss of cell-matrix interactions) or fail to activate integrin-dependent survival signals [63]. They may thus prevent the accumulation of VSMC and fibroblasts/myofibroblasts in this pro-apoptotic environment and contribute further to an insufficient healing process around the SG. We recently showed that VSMC are significantly less resistant to apoptosis once adhered on PET compared to other biomaterials such as polystyrene culture plates (PCP) [65]. Our general aim consists in creating bioactive coatings activating specific cell-surface interactions with vascular cells implicated in the healing process, and thus enhancing their adhesion, proliferation, migration and resistance to apoptosis around SGs.

Recent work done by our group demonstrated that chondroitin sulfate (CS) (Figure 16), a major component of the ECM, triggers several key mechanisms implicated in vascular repair. This polysaccharide was identified amongst mediators released by apoptotic endothelial cells [121]. CS was shown to trigger myofibroblast differentiation²⁶ and resistance to apoptosis in fibroblasts and VSMC [120, 121]. CS in solution activates a molecular pattern of apoptosis inhibition characterized by increased gene and protein levels of the anti-apoptotic mediator Bcl-xL [121]. This newly identified mediator offers a new opportunity to counterbalance the pro-apoptotic environment present after EVAR and

generate a fibroproliferative reaction at the abluminal surface of the SG. Here we report the development of a coating incorporating CS, as well as preliminary data concerning its bioactivity *in vitro*. Due to its high water solubility, CS crosslinking is required to create a stable coating. Since crosslinked pure CS gels exhibit high hydrophilicity, important swelling and poor mechanical properties, CS was combined to collagen type I which is more mechanically resistant and displays better cell adhesion and proliferation properties [167].

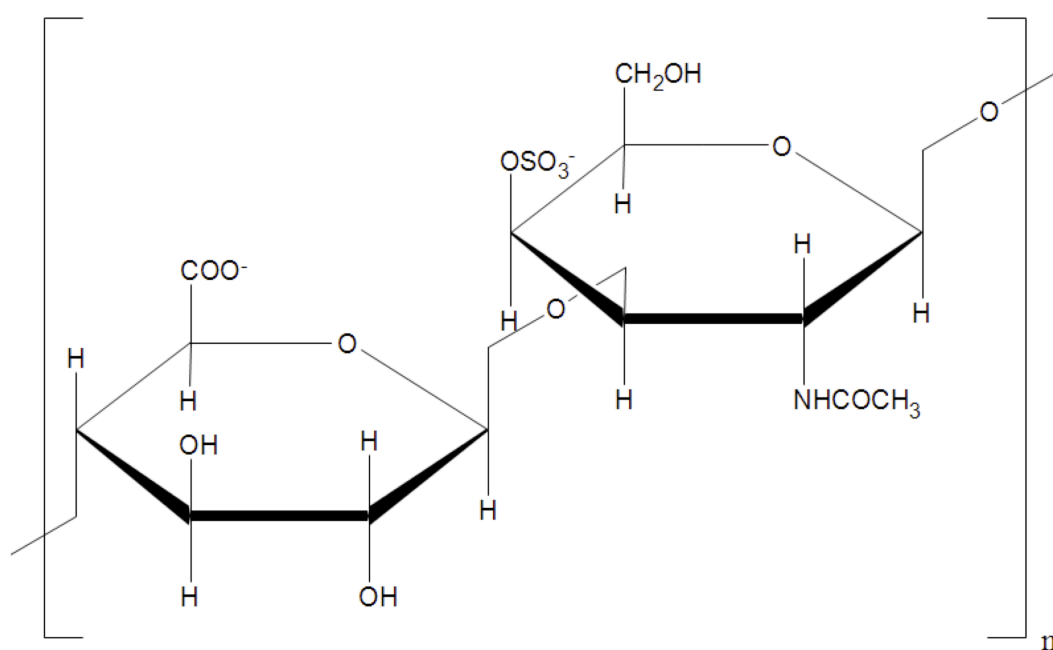


Figure 16: Structure of CS, a polysaccharide containing two alternating units D-GlcA and D-GalNac

3.2.4 Experimental Part

3.2.4.1 Materials

PET films were obtained from DuPont Teijin Films (Hopewell, VA, USA). Insoluble type I collagen from bovine Achilles tendon, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES), and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2.5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada) and CS was obtained from Calbiochem (San Diego, CA, USA).

For cell culture experiments, A7R5 cells, a clonal smooth muscle cell line from rat embryonic thoracic aorta (ATCC, Manassas, VA), were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient mixture F-12 Ham's medium (DMEM/F12; Gibco BRL, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; Medicorp, Montréal, QC, Canada) and 0.1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL). RPMI medium (Gibco BRL) was used for cell culture experiments in serum-free conditions (serum starvation, SS). PCPs were purchased from Costar® (Corning Life Sciences, Acton, MA, USA)

3.2.4.2 Preparation of Coatings

Coating preparation was done on PET films to reproduce the expected interaction between the coating and the material of the SG. CS was combined with collagen type I which plays an essential role in adhesion as well as proliferation and migration of VSMC [167]. CS can be covalently attached to collagen via amide bonds (Figure 17). CS and insoluble type I collagen were crosslinked with EDC and NHS according to the protocol of Pieper et al [168]. Briefly, 400 mg of insoluble type I collagen was swollen overnight at 4 °C in 25 mL of 0.5 M acetic acid solution at a pH of 2.5. After the addition of 25 mL of ice-cold water, the slurry was homogenized at 4 °C using a PowerMax* AHS 200

homogenizer (VWR International), then filtered through a 70 μm gauge nylon filter and spread on PET films. The dried collagen was incubated for 30 min in 40 vol.-% ethanol containing $50 \times 10^{-3}\text{m}$ MES at room temperature. The collagen was then crosslinked for 4 h in 40 vol.-% ethanol containing $50 \times 10^{-3}\text{m}$ MES, $33 \times 10^{-3}\text{m}$ EDC and $6 \times 10^{-3}\text{m}$ NHS with or without 2.75% w/v CS to create collagen-CS (CSC) and collagen (CC) coatings, respectively. The crosslinking reaction was stopped by washing the coatings twice for 1 h with 0.1 m Na_2HPO_4 , which leads to hydrolysis of residual EDC intermediates and carboxylic groups. To eliminate any residual product the coatings were successively rinsed with 1 m NaCl for 2 h, 2 m NaCl for 24 h and distilled water. EDC enables the covalent coupling of CS to collagen via amide bonds, whilst NHS increases EDC-mediated reaction efficiency by stabilizing the o-acylisourea amine-reactive intermediate [169]. The use of EDC is advantageous giving that it does not remain in the coating. It also creates water soluble intermediates that can be easily washed away [170]. EDC-crosslinked collagen has already been shown to be biocompatible.

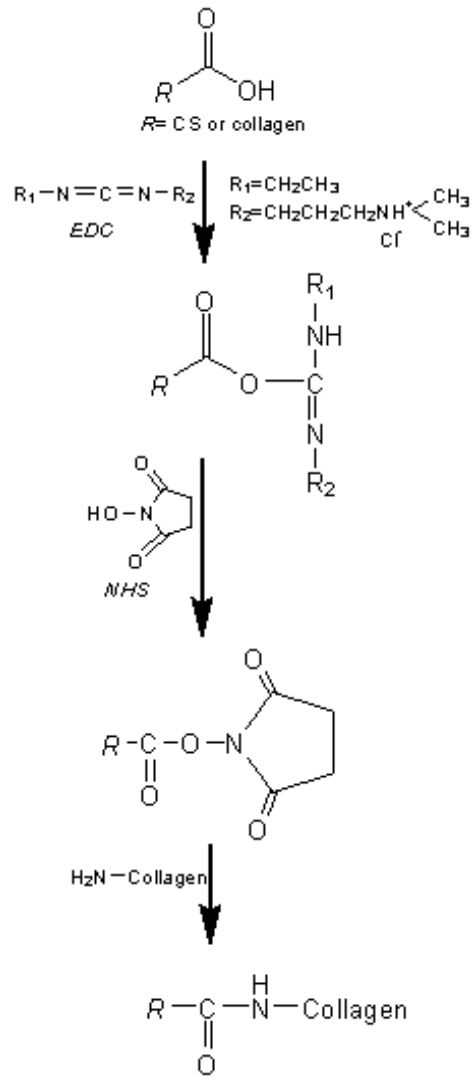


Figure 17: Crosslinking of collagen and CS with EDC/NHS. EDC covalently attaches CS to collagen via amide bonds and NHS stabilizes the *o*-acylisourea amine-reactive intermediates

3.2.4.3 Characterization of Coatings

CS quantification of CSC coatings was done by dimethylmethylene blue (DMMB) assay [171]. It is based on the metachromatic shift in absorption which occurs when the dye is complexed with sulfated glycosaminoglycans. Briefly, each sample was mixed with 20×10^{-3} M sodium phosphate buffer (pH = 6.8) containing 300 μ g papain, 1×10^{-3} M EDTA and 2×10^{-3} M dithiothreitol, and incubated for 60 min in an oil-bath regulated at 60 °C. Papain was used to digest the interfering proteins. The volume of the sample was completed to 5 mL with 50×10^{-3} M Tris/HCl (pH = 8.0) containing 12.5×10^{-3} M iodoacetic acid. 100 μ L of each sample was mixed with 2.5 mL of DMMB color reagent containing 38.5×10^{-3} M 1,9-dimethylmethylene blue, 40.5×10^{-3} M glycine, 40.5×10^{-3} M sodium chloride and 9.5×10^{-3} M HCl. The absorbencies were immediately read at 525 nm with a Varian Cary 300 Bio UV-vis spectrophotometer. To maintain the linearity of the response each sample contained not more than 5 μ g of CS [171]. CS quantification of each sample was compared to a calibration curve obtained using standard solutions containing up to 5 μ g of CS. Each measurement was performed in triplicates.

Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy of coatings was carried out with a Digilab FTS-3100 Excalibur Series spectrometer by transmission through NaCl tablets as the sum of 64 accumulations with 4 cm^{-1} resolution. Spectra of CC and CSC coatings were calculated after subtraction of a background spectrum made with the uncoated NaCl tablet. The sampling depth was considered similar in both coatings.

Thermal properties of coatings were determined by calorimetric measurements performed using DSC (Q-1000 TA Instrument). The samples were heated in a nitrogen atmosphere at a rate of $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ from 40 to 140 °C. The denaturation temperature (TD) was determined as the onset point of the endothermic peak of the DSC profiles.

Surface wettability of coatings was evaluated by static contact angle using an FTA200 goniometer (First Ten Ångstroms, Portsmouth, VA, USA) and compared to virgin PET. Contact angle of each surface with water was measured in triplicates. The morphology of the coatings was observed by scanning electron microscopy (SEM) (Hitachi S-3500, Rexdale, Ontario) at a 10 kV accelerating voltage after gold-palladium sputtering. Film thickness was determined using a Digimatic Indicator (Mitutoyo, Japan).

3.2.4.4 Cell Culture Experiments

3.2.4.4.1 Cell Adhesion

Cell adhesion on control and modified surfaces was tested on films deposited in 24-well PCP. To limit cell adhesion onto the specific surfaces and avoid film floating, cloning cylinders (Fisher) were used [65]. The surfaces were exposed to 50 000 VSMC/200 μ L normal medium (DMEM/F12) for 4 h at 37 °C/5% CO₂. Cell adhesion on each surface was compared by MTT colorimetric assay, which is based on the reduction of MTT by the mitochondrial dehydrogenase of viable cells to purple formazan. After 4 h of incubation the medium and cloning cylinders were removed, 500 μ L of 0.5 mg MTT/mL in DMEM/F12 were put into the wells and the samples were incubated for 3 h at 37 °C/5% CO₂. Subsequently, the formazan was solubilized with isopropyl alcohol + 0.04 m HCl. Absorbances at 570 and 650 nm were taken with a multiwell scanning spectrophotometer (VersaMax™) and subtracted. Cell adhesion on control PET, CS and CSC coatings was expressed as the percentage of PCP controls. Experiments were performed in triplicate.

3.2.4.4.2 Biocompatibility of Coatings

In order to confirm the absence of cytotoxicity of the coatings, VSMC viability in normal medium was assessed on coated (CC and CSC) surfaces and compared to a biocompatible surface (PCP). Cells were left to adhere for 4 h in DMEM/F12 (t0). The

medium was then changed to remove floating cells. For each surface, the MTT colorimetric assay was used to compare the amount of viable cells after 48 h compared to t_0 .

3.2.4.4.3 Cell Viability in Serum-Free Medium

To evaluate the capacity of VSMC to survive in a pro-apoptotic environment once adhered on control and coated PET surfaces, cells were subjected to serum starvation as a pro-apoptotic stimuli which reproduces limited access to growth factors [121, 172]. Cells were left to adhere and grow to confluence in DMEM/F12 medium supplemented with 5% FBS on CC and CSC surfaces, as well as on control PET and on PCP for comparison. The medium was removed and cells were then exposed to normal (N) or serum-free medium (SS) for 24 h. On each surface, the amount of viable cells in SS determined by MTT colorimetric assay as described above was compared to the amount of viable cells after exposition to normal medium (N). Cell viability after 24 h in SS was calculated with the equation below, where A_N and A_{SS} are the absorbencies of VSMC exposed to N and SS medium, respectively:

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{(A_N - A_{SS})}{A_N} \times 100$$

3.2.4.5 Statistical Analysis

Results were expressed as mean values \pm standard deviation (SD). Data were analyzed using nonpaired Student's t-tests or one-way ANOVA when appropriate. Tuckey's post hoc test was used when variances were equal. A p value of 0.05 or less was considered significant.

3.2.5 Results and Discussion

3.2.5.1 Characterization of Coatings

The CS amount in CSC coatings, as estimated by the DMMB assay, was 162 ± 108 mg of CS per gram of coating while, as expected, no trace of CS was found in CC coatings. The amount of CS found in CSC coatings is comparable to concentrations of solubilized CS reported by Hebert and coworkers [121] that generated *in vitro* pivotal events leading to neointima formation. The variability in CS amount could be diminished with further optimization of the coating preparation process.

FT-IR analysis showed typical spectra of collagen characterized among others by amide bonds stretching and bending but did not allow to clearly identify specific peaks of CS in CSC, because they were masked by collagen peaks (Figure 18). The carboxylate absorbance bands of CS (1610 and 1411 cm^{-1}) were overlapped by the amide I (1649 cm^{-1}) and amide II (1545 cm^{-1}) vibrational modes, methyl (1375 cm^{-1}) and methylene (1480 cm^{-1}) absorbance bands, as well as the aliphatic side groups (1450 and 1402 cm^{-1}) from amino acid residues of the collagen [173]. CS detection in the coatings is also limited by the depth of FT-IR analysis giving that CS is most likely located at the surface of the coating. Indeed, during coating preparation, CS is added over the collagen layer and due to the low swelling of collagen CS diffusion within the film is limited during crosslinking.

In DSC, a visible transition was observed at about $103\text{ }^{\circ}\text{C}$ in CSC compared to $93\text{ }^{\circ}\text{C}$ for crosslinked collagen. This suggests that the TD was slightly shifted by the addition of CS in the collagen. SEM of CC and CSC showed that both coatings had relatively smooth, uniform and nonporous surfaces (Figure 19). The thickness of the coating was about $20\text{ }\mu\text{m}$. Contact angle goniometry showed that both collagen coatings (CC and CSC) were slightly more hydrophilic than PET. Contact angles with water were approximately 60° (64 ± 5 and $58 \pm 6^{\circ}$ for CC and CSC, respectively) compared to $81 \pm 7^{\circ}$ for control PET. No statistical difference was observed between CS and CSC.

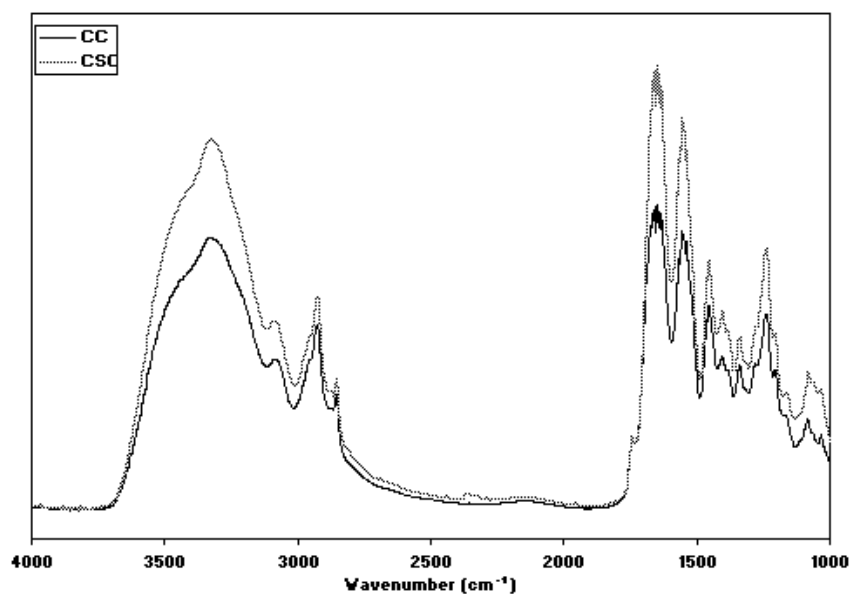


Figure 18: FT-IR of collagen (CC) and collagen-CS (CSC) coatings. Spectrum of CC and CSC showed typical peaks of collagen. Specific peaks of CS were masked by collagen peaks in CSC.

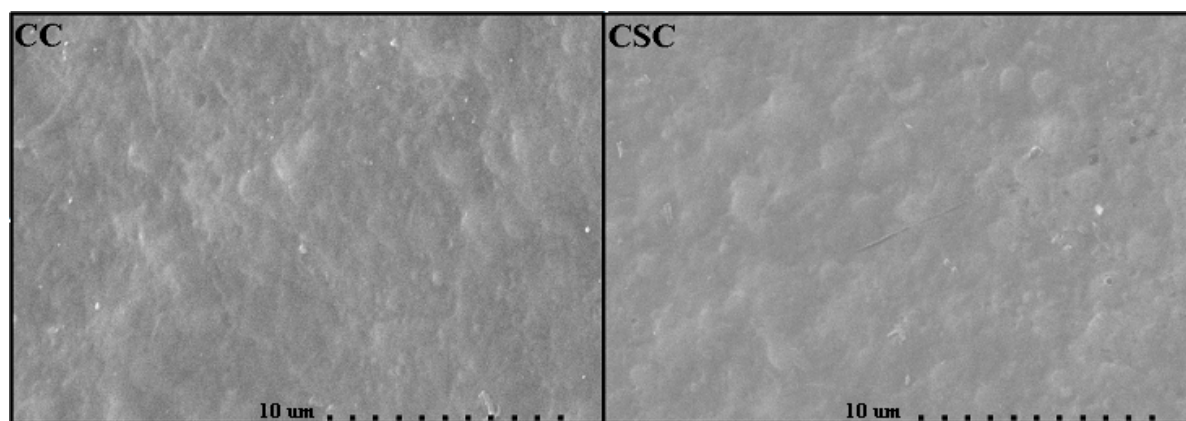


Figure 19: SEM of CC and CSC coatings. CC and CSC coatings are relatively smooth, uniform and nonporous surfaces.

3.2.5.2 Cell Culture Experiments

Cell adhesion is necessary to promote cell and tissue growth on the biomaterial. As expected MTT colorimetric assay showed that cell adhesion after 4 h of incubation was significantly poorer on PET than on PCP surfaces (Figure 20). CC and CSC coatings significantly increased the number of adherent cells on PET films ($p < 0.01$) as much as the PCP level. This is in agreement with the fact that collagen type I is known to favor $\beta 1$ integrin-dependant adhesion of VSMCs [167, 174]. Absorbance of CSC coating was slightly although not significantly lower than CC coating. Crosslinking of CS may limit the adhesion properties of collagen by decreasing the number of its functional groups involved in VSMC adhesion.

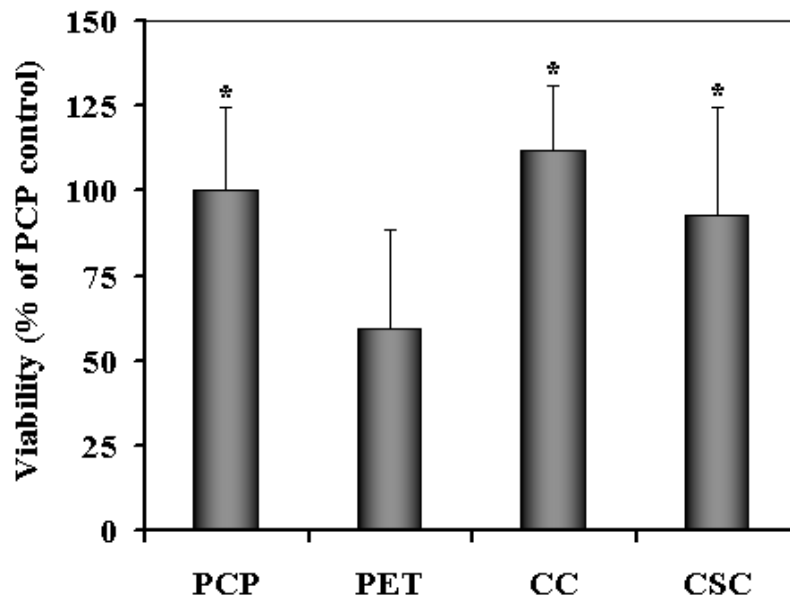


Figure 20: VSMC adhesion on virgin (PET) and coated (CC and CSC) PET surfaces. After 4h of incubation in DMEM/F12; $n \geq 7$ (* $p < 0.05$ with PET) determined by MTT assay. Results are expressed as the percentage of absorbance obtained with PCP controls. CC and CSC coatings significantly increased cell adhesion compared to PET.

Cells grown on the coatings for 48 h in normal medium (Figure 21) showed no cytotoxic effect related to the coatings. Percentages of viable cells (expressed as a percentage of cells present at t_0) were close or even above 100% indicating that cell growth had occurred. Although no significant difference was observed by ANOVA analysis, a trend between the different surfaces was noted. As the MTT method represents a composite index of the number of viable cells that have proliferated onto the surface and resisted to cell death (including apoptosis), we plan to further delineate the impact of each surface on both pathways in future studies.

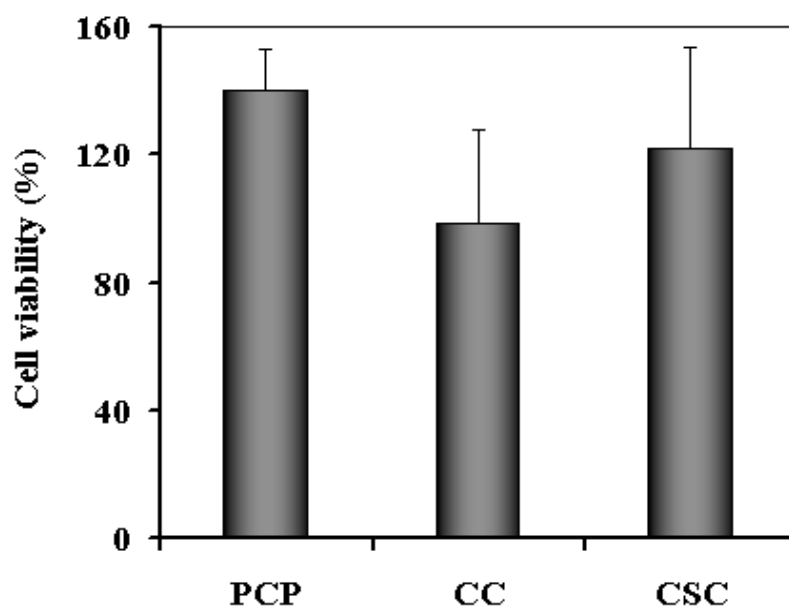


Figure 21: VSMC viability on CC and CSC coatings, compared to a control biocompatible surface (PCP), determined as the ratio of absorbance in MTT assay after 48 h of incubation in DMEM/F12 compared to t_0 ($n \geq 3$)

As mentioned above, the SG is to be inserted in a pro-apoptotic environment characterized by VSMC depletion secondary to a pro-apoptotic phenotype. The availability of growth factors on the abluminal side of the SG may be limited since it will not be in direct contact with flowing blood. To favor cell growth on the SG surface, the development of a state of resistance to apoptosis is therefore essential. We have previously stated that cells adhered to PET films show little resistance to apoptosis induced by SS [65]. It was also demonstrated that CS in solution can increase resistance to apoptosis of VSMC grown on PET surfaces [65]. We evaluated whether a coating incorporating CS could induce a state of resistance to apoptosis in VSMC grown onto the surface. The percentage of viable cells after 24 h of incubation in serum free medium compared to 24 h in normal medium was evaluated by MTT assay and compared to control PET, collagen coating alone and PCP. CC and CSC coatings were shown to both significantly increase the viability index of adherent VSMC in serum free medium compared to PET films (Figure 22). The viability index is an indicator of resistance to apoptosis, since SS is a well-known pro-apoptotic stimuli. The ratio of apoptotic cells will be determined by future investigation with fluorescent microscopy after Hoechst 33342 and propidium iodide [121]. The viability index on CSC was found to be increased compared to CC alone. This trend, although not statistically significant, suggests that the addition of CS to collagen may increase the resistance to apoptosis of adhered VSMC, and that CS bioactivity is preserved to some extent after crosslinking with collagen.

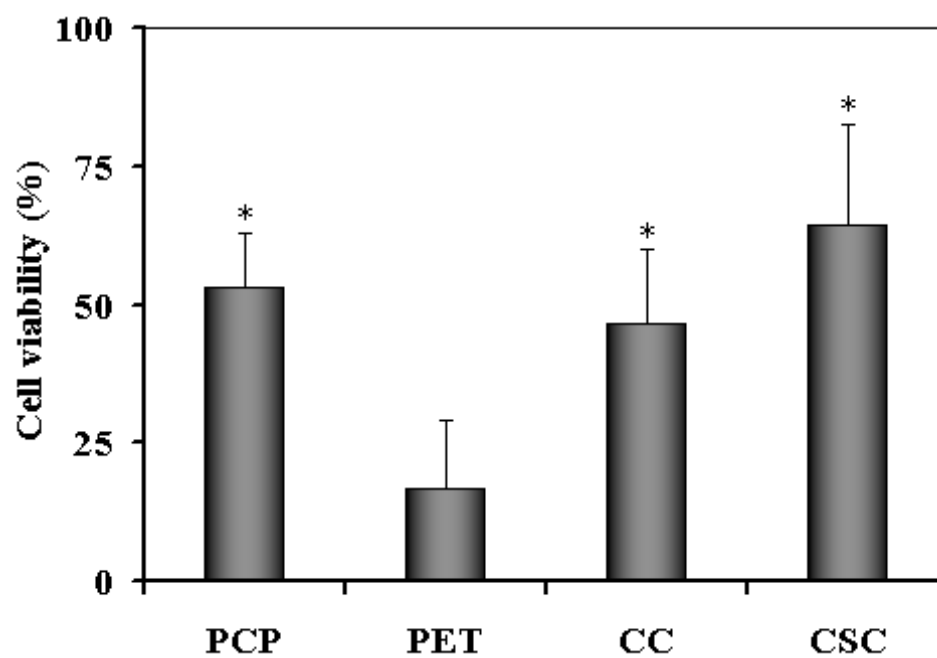


Figure 22: VSMC viability in serum-free medium, when adhered on virgin PET, coated PET (CC and CSC) and cell culture plates (PCP). Data are expressed as the ratio of absorbance after 24 h of incubation in serum-free medium (SS) vs. after 24 h in normal medium (N); $n \geq 4$ (* $p < 0.05$ with PET).

CS is a member of one of the four structurally distinct GAG families. It is a linear polysaccharide comprised of repeating disaccharide units of an amino sugar, *N*-acetyl-d-galactosamine (d-GalNAc), and a uronic acid, d-glucuronic (d-GlcA). Recent advances in glycobiology have made apparent that GAGs participate in a variety of biological processes such as cell–matrix interactions and activation of chemokines, enzymes and growth factors [175]. CS in solution has been shown to induce the development of a state of resistance to apoptosis in VSMC by increasing phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1/2 and increasing level of expression of Bcl-xL [121], which is a member of the anti-apoptotic Bcl2 family [30]. Sulfation was shown to play a particularly important role in CS activity [175]. It may interact with several receptors such as L- and P-selectin [175], but those implicated in the development of resistance to apoptosis in VSMC have not yet been identified. It was also reported that CS in solution induces myofibroblast differentiation mediated by phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) activation [120]. Cell migration on material surfaces was also shown to be increased by solubilized CS [65].

Therefore, CS is an interesting bioactive factor to be immobilized on SG surfaces to favor fibrous tissue growth. CS is a cheap, readily available, stable, biocompatible polysaccharide which can be easily fixed on biomaterials and sterilized without impairing its bioactivity. Advantages upon coating with growth factors such as TGF- β or FGF [68] include possible sterilization, economical benefit and long-term bioactivity. Nonetheless, an important question is to know whether crosslinked CS retains some bioactivity, especially regarding its anti-apoptotic effect. These preliminary cell culture experiments suggest increased cell adhesion and viability in serum-free media on both coatings compared to PET. CSC coatings tend to further increase cell viability compared to CC coatings. Further investigation is required to confirm these results and confirm that CSC coatings induce similar cellular signaling pathways observed in the development of a state of resistance to apoptosis with CS in solution (i.e. increase in ERK 1/2 and Bcl-xL expression).

CC and CSC coatings were found to be loosely attached to the PET films. Surface pretreatment of PET by plasma is presently under investigation at our laboratory to increase

coating adhesion. Surface functionalization of PET with NH₃ plasma [176] or deposition of a plasma polymerized nitrogen-rich thin coating [65] will be studied in order to add primary amine groups able to create covalent bonding with collagen or CS.

3.2.6 Conclusion

We have developed a thin coating incorporating CS by crosslinking with EDC/NHS. Preliminary data suggest that bioactive sites responsible for increased cell resistance to apoptosis in CS are still available after crosslinking with collagen. Further work is needed to achieve optimization of the coating, estimate the extent of the grafting and investigate further its potential to promote cell adhesion, proliferation, migration and resistance to apoptosis on PET graft surfaces, as well as to confirm the mechanisms implicated in increased resistance to apoptosis. Bioactive coatings open the way to a new generation of SGs improving the success of EVAR. The newly described mediators used here may not only initiate vascular repair around implants, but also tackle the molecular and cellular abnormalities that favor aneurysm formation and progression.

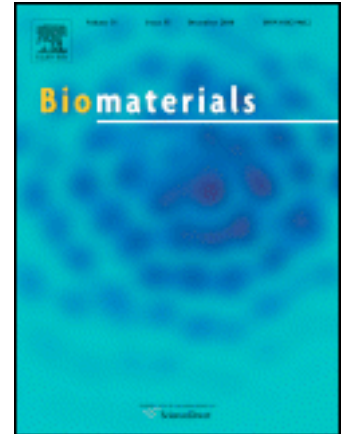
3.2.7 Acknowledgements

The authors thank Marc-André Raymond and Patrick Laplante for their help in cell culture experiments and Marc Gauthier for FT-IR experiments. This project has been funded by the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; grant number RMP-72548), and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ research award to S. L.). We also acknowledge a scholarship (C. C.) grant from the Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB).

Chapitre 4: Optimisation d'un revêtement de CS et d'EGF (Article 2)

4.1 Présentation de l'article

Ce chapitre présente le deuxième article de cette thèse intitulé « **Stimulation of cell growth and resistance to apoptosis in vascular smooth muscle cells on a chondroitin sulfate / epidermal growth factor coating** » et publié dans *Biomaterials* (Volume 32, numéro 6, pp. 1591-1600) [177].



L'article précédent a démontré le potentiel de la CS immobilisée en favorisant la survie des CMLV dans un milieu pro-apoptotique. Par contre, la présence du collagène ne semblait pas suffisante pour maintenir l'adhésivité des CMLV à la surface du revêtement en milieu sans sérum. L'objectif des travaux illustrés dans ce présent article a donc été d'identifier une méthodologie permettant de greffer la CS directement sur une surface pré-fonctionnalisée, en compagnie d'un facteur de croissance pro-prolifératif, l'EGF. Le but ultime étant de créer une surface anti-apoptotique, favorisant le croissance des CMLV et transposable sur plusieurs types de biomatériaux.

Le revêtement a été réalisé en deux étapes; la première étant le greffage de la CS sur des surfaces de verres aminolysés, via le système carbodiimide EDC/NHS, et suite à l'activation des groupements carboxyliques de la CS, le greffage de l'EGF sur la CS. L'ajout de l'EGF a bel et bien favorisé l'adhésion et la croissance des cellules. Et le revêtement a permis d'inhiber l'apoptose des cellules en présence de milieu pro-apoptotique. Somme toute, le revêtement a démontré un potentiel fort intéressant, malgré le fait qu'il ait été déposé sur des lames de verres.

4.2 Stimulation of cell growth and resistance to apoptosis in vascular smooth muscle cells on a chondroitin sulfate / epidermal growth factor coating

Cindy Charbonneau^{1,4}, Benoît Liberelle³, Marie-Josée Hébert¹, Gregory De Crescenzo³ and Sophie Lerouge^{1,2*}

¹ Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 1560 rue Sherbrooke Est, Montréal (Qc), Canada, H2L 4M1

² Department of Mechanical Engineering, École de Technologie Supérieure (ÉTS), 1100 boul. Notre- Dame Ouest, Montréal (Qc), Canada, H3C 1K3

³ Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre- Ville, Montréal (Qc), Canada, H3C 37A

⁴ Biomedical Engineering Institute, Université de Montréal, P.O. Box 6128, succ. Centre- Ville, Montréal (Qc), Canada, H3C 3J7

*Corresponding author:

Sophie Lerouge, PhD

Laboratoire de biomatériaux endovasculaires (LBeV)

CRCHUM, Notre-Dame Hospital

2099 rue Alexandre-de-Sève, Montréal, QC, Canada, H2L 2W5.

Tel: + 1 514 890 8000 x 28821

Fax: +1 514 412 7785

4.2.1 Abstract

Deficient healing after endovascular aneurysm repair is thought to be related to the pro-apoptotic environment in abdominal aortic aneurysms and inertness of the graft materials. A bioactive coating containing both chondroitin sulfate (CS) and epidermal growth factor (EGF) was developed in order to increase the growth and resistance to apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMC) on biomaterials surfaces. CS and EGF were covalently grafted using carbodiimide chemistry and the coating was characterized and optimized using ellipsometry, static contact angle and ToF-SIMS. Its potential to improve cell adhesion, growth and resistance to apoptosis was assessed in vitro with rat aortic VSMC. Results showed that CS and EGF immobilization allowed for the creation of a uniform coating that increased cell adhesion, growth and resistance to apoptosis in serum-free medium. Overall, CS and EGF possess great potential as bioactive anti-apoptotic mediators for vascular repair.

4.2.2 Keywords

Apoptosis, bioactive coating, chondroitin sulphate, endovascular aneurysm repair, epidermal growth factor, vascular smooth muscle cells.

4.2.3 Introduction

The constant rise in vascular diseases (atherosclerosis, aneurysms and other coronary diseases) constitutes an important incentive in the field of biomedical engineering for developing new implants, procedures and tissue engineering strategies designed to boost the overall effectiveness of respective treatments. There is increasing evidence that biomaterials that are currently used for the treatment of vascular diseases, such as polyethylene terephthalate (PET, Dacron) or expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE), offer good mechanical properties but fail to stimulate proper cell mechanisms involved in vascular repair. In this context, the creation of biomimetic surfaces is an interesting strategy whereby proteins, growth factors and other biomolecules can be immobilized to stimulate cell adhesion, growth and survival.

Resistance to apoptosis is a key issue for several vascular implants, in particular for stent-grafts used to treat abdominal aortic aneurysms (AAA). AAA are characterized by a permanent dilation of the aortic wall, which can lead to rupture of the aorta and cause the patient's death. To prevent rupture, a stent-graft, consisting of a PET or ePTFE polymeric graft supported by metallic struts can be deployed transfemorally under fluoroscopic guidance within the aneurysm in order to exclude it from blood flow. This minimally invasive treatment, called endovascular aneurysm repair (EVAR), is an interesting alternative to open surgery, but the lack of healing around the implants gives rise to complications and raises concerns regarding its long-term clinical success [57].

The depletion of medial vascular smooth muscle cells (VSMC) through apoptosis is central to medial thinning and AAA development. Many studies have shown an increase in cell apoptosis leading to a substantial VSMC depletion in the vascular wall of aneurysms [7, 24-26]. VSMC synthesize many proteins, such as proteoglycans, collagen, gelatin, laminin and elastin, which contribute to preserving the integrity and functionality of the aortic wall [7]. Their death can lead to aneurysm progression over time. Hence, vascular cells at the site of AAA present a pro-apoptotic phenotype that is potentially troublesome

for repair post EVAR. Additionally, the deployment of a stent-graft limits the access of O₂, nutrients and growth factors to the vascular wall and thus creates a pro-apoptotic environment for the vascular cells. Finally, the inertness of the biomaterials currently used for stent-grafts prevents the stimulation of proper cell mechanisms inhibiting cell apoptosis in such an environment.

Hydrophobic materials such as ePTFE give rise to non-specific cell/surface interactions [62] and provoke cell apoptosis through the loss of interactions between cells and extracellular matrix in a phenomenon called anoikis [63]. PET generally produces relatively better cell adhesion than PTFE, but our previous work has shown that vascular cells adhered on PET exhibit high rates of apoptosis in serum-free media [65], which, to a certain extent, mimics the environment inflicted on vascular cells after treatment. To promote tissue growth, the biomaterial should not only increase cell adhesion and proliferation but also trigger a state of resistance to apoptosis [165]. Thus, the main objective of this study was to develop an anti-apoptotic and pro-proliferative coating to counteract cell depletion caused by apoptosis and promote the healing of tissues surrounding vascular implants such as stent-grafts.

A promising mediator for vascular repair is chondroitin sulphate (CS). Previous work has demonstrated that this polysaccharide triggers key mechanisms involved in vascular repair, such as cell migration and resistance to apoptosis of VSMC and fibroblasts [120, 121]. Of interest, CS has been shown to improve healing in a wide variety of applications. CS/collagen coating were demonstrated to improve bone healing in orthopaedic titanium bone implants [178], CS adhesive to seal corneal incisions [134] and CS/poly(ethylene glycol) hydrogel to increase sinonasal wound healing [135]. Another potential mediator of vascular repair is epidermal growth factor (EGF), a 6-kDa mitogenic polypeptide known to enhance VSCM growth [100]. The activation of EGF receptors (EGFR) also triggers various cell signalling pathways leading to the release of anti-apoptotic proteins while inhibiting the release of pro-apoptotic proteins [144]. We hypothesized that CS in combination with EGF should offer a new opportunity to

counterbalance the pro-apoptotic environment present after EVAR and generate a fibroproliferative reaction at the abluminal surface of the stent-graft.

In this study, CS and EGF were grafted on two types of aminated surfaces, namely amino-coated glass slides and native silicon wafers that were previously modified with a layer of anhydrous 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). First, CS was covalently grafted on the aminated surfaces, through coupling chemistry based on 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS). Carboxylic groups of CS were then used to covalently immobilize human EGF. The optimization of the coating was evaluated with ellipsometry measurements. The wettability and uniformity of the coating was assessed by static contact angle and ToF-SIMS measurements respectively. *In vitro* cell culture assays were carried out with rat aortic VSMC. The bioactivity of the CS/EGF coating was determined by assessing its potential to improve cell adhesion, growth and resistance to apoptosis

4.2.4 Materials and methods

4.2.4.1 Chemicals and Reagents

Amino-coated glass slides (10 x 10 mm²) were purchased from Erie Scientific Co. (Portsmouth, NH, USA) and native silicon wafers (Prime Si P/Boron) were obtained from University Wafer (South Boston, MA, USA). The amino-coated glass slides supplied by Erie Scientific Co. were shown in another study to contain high binding capacity and low variability when used for antibody microarrays [179]. Silicon wafers, on the other hand, were employed given that the interface of native oxide overlayer provides a high optical contrast that improves ellipsometric and contact angle measurements [146]. APTES (99% purity), EDC, NHS, 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES), chondroitin-4-sulfate and Triton X-100 were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada). Recombinant human EGF was obtained from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA).

4.2.4.2 Cell Culture

For cell culture experiments, A7R5 cells (under 20 passages), a clonal smooth muscle cell line from rat embryonic thoracic aorta (ATCC, Manassas, VA), were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F-12 Ham's Media (DMEM/F12; Gibco BRL, Invitrogen, Grand Island, NY, US) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; MEDICORP, Montreal, QC, Canada) and 1% penicillin-streptomycin (PS, Gibco BRL, Invitrogen, Grand Island, NY, US). RPMI medium (Gibco BRL, Invitrogen, Grand Island, NY, US) was used for serum-free (SS) cell culture experiments. Propidium Iodide (PI, Molecular Probes, Invitrogen, Grand Island, NY, US) and Hoechst 33342 (HT, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) were used for apoptosis assays. Costar[®] (Corning Life Sciences, Acton, MA, US) tissue culture polystyrene (TCPS) 24-well plates were used as a control in cell experiments.

4.2.4.3 Coating Preparation

4.2.4.3.1 Cleaning Procedures

Glassware was cleaned overnight with KOH-saturated isopropyl alcohol, then rigorously rinsed with Milli-Q water and dried in a clean oven at 120 °C (under atmospheric pressure). The amino-coated glass slides were cleaned for 2 min with chloroform (99% purity, Fisher Scientific) and 2 times for 2 min with Milli-Q water in an ultrasonic bath, then dried with nitrogen gas. The silicon wafers were cleaned with a Piranha solution (3 parts of sulfuric acid to 1 part of hydrogen peroxide) for 10 min at 100 °C, rinsed with Milli-Q water and air-dried at room temperature. For cell experiments, all surfaces were immersed in a solution of 70% v/v ethanol and dried with nitrogen gas prior testing.

4.2.4.3.2 APTES Grafting

A silanization procedure was used to generate APTES layers on silicon wafers (Figure 23) as previously described [180]. Briefly, a 10 mM APTES solution was first prepared in freshly distilled toluene (99.5% purity, VWR International Inc.). The solution was filtered through a 0.2 µm PTFE filter and then put in contact with the silicon wafers for 3 h at room temperature in dry Schlenk tubes. The surfaces were air-dried for 1 min at room temperature and then for 90 min at 120°C in a clean oven. The surfaces were rinsed with distilled toluene for 5 min to remove any remaining residues and air-dried at room temperature.

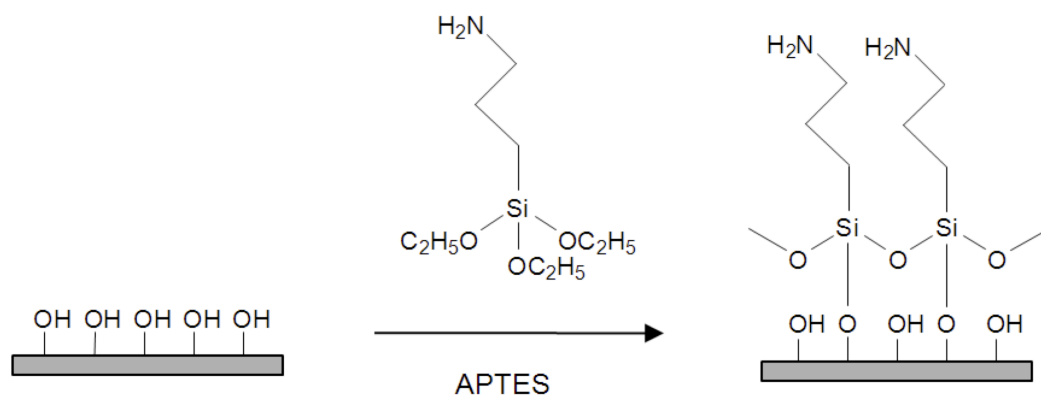


Figure 23 : Silanization procedure used for the self-assembly of APTES-monolayer on silicon wafers

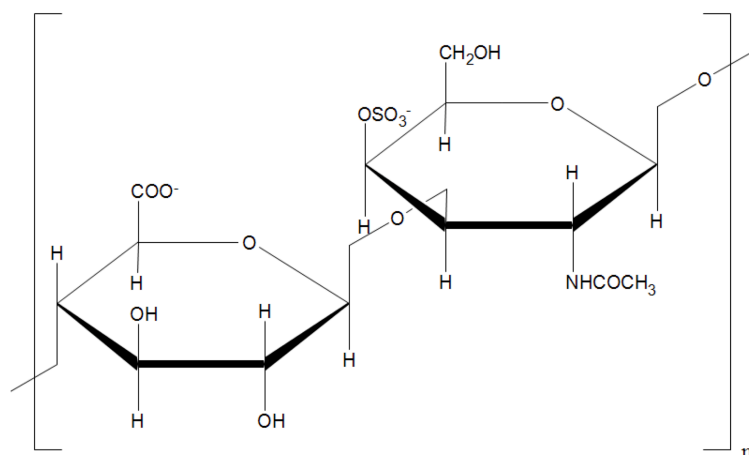


Figure 24: Chemical structure of chondroitin-4-sulfate ($n \approx 10$ to 100)

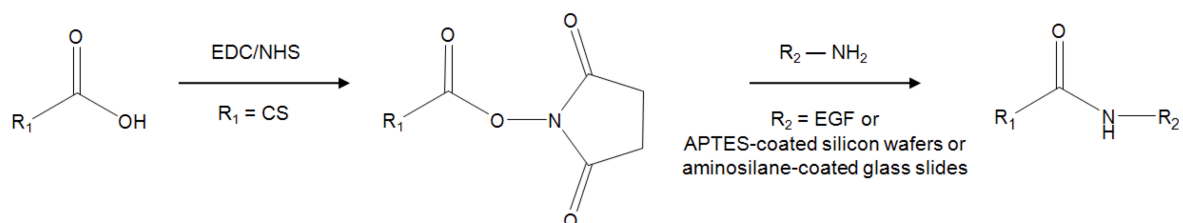


Figure 25: EDC/NHS coupling reaction

4.2.4.3.3 CS and EGF Immobilization

Preparation of the coating was done either on amino-coated glass slides or APTES-coated silicon wafers to allow further characterization. Both surfaces contain accessible primary amines, thus allowing CS (Figure 24) grafting by standard EDC/NHS chemistry (Figure 25). EDC covalently attaches accessible carboxylic acids of CS to primary amines by amide bonding, while NHS boosts EDC-mediated reaction efficiency by stabilizing the *o*-acylisourea amine-reactive intermediate [181]. A CS concentration of 0.1% w/v was used for the optimization of [EDC]/[COOH] ratio (ranging from 0 to 20) in the coupling reaction solution. The surfaces were exposed to 100 μ l of the CS solution, containing 40% v/v ethanol, 50 mM MES, EDC and NHS (NHS/EDC: 0.2) for 60 min at room temperature. All surfaces were thoroughly rinsed with PBS (2 min) and Milli-Q water (2 x 2 min) in an ultrasonic bath and dried with nitrogen gas, to remove any unbound CS. The same procedure was used to optimize CS concentration (0.01 to 2 % w/v) in the coupling reaction solution using the optimal [EDC]/[COOH] ratio. EGF was then tethered to grafted CS (optimal condition) using the same coupling reagents. The CS-modified surfaces were exposed to 100 μ l of an aqueous solution containing 40% v/v ethanol, 22.8 mM EDC and 4.6 mM NHS, for 15 min at room temperature to activate the carboxylic acids of CS. The surfaces were rinsed with Milli-Q water to remove residual EDC/NHS and avoid possible intramolecular bonding of EGF. Optimization of EGF grafting was performed by exposing 100 μ l of an EGF aqueous solution (concentration ranging from 0 to 600 nM) for 60 min at room temperature. The surfaces were rinsed once with PBS 1x and twice with Milli-Q water and then dried with nitrogen gas.

4.2.4.4 Physical and Chemical Characterization of the Surfaces

4.2.4.4.1 Ellipsometry

Dry thickness of grafted layers on APTES-coated silicon wafers was measured with an automatic M2000 ellipsometer (J.A. Woollam Co., Inc., Lincoln, NE, USA) equipped with data acquisition software (Complete EASE). The measurements were performed at room temperature with a 75° angle of incidence and data were acquired within a wavelength range of 245-1650 nm. A refractive index of $n = 1.465$ [182] was used for the measurements of CS and EGF layers. The dry thickness was obtained using the WVase 32 analysis software package as the difference between the APTES-coated silicon wafers and the CS and/or EGF coated wafers. Three measurements were taken on each surface and the experiment was repeated at least twice. Ellipsometric measurements were used to optimize CS and EGF grafting.

4.2.4.4.2 Static Water Contact Angle

Wettability of the coating on APTES-coated silicon wafers was measured through static contact angle with a FTA200 goniometer (First Ten Ångstroms, Portsmouth, VA, USA) equipped with a data analysis software package (FTA32 Video). Three measurements were taken on each surface using Milli-Q water as probe liquid and the experiment was repeated at least twice.

4.2.4.4.3 Static Time of Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy (ToF-SIMS)

The presence and uniformity of the CS coating on amino-coated glass slides was assessed by means of a ToF-SIMS IV instrument (ION-TOF GmbH, Munster, Germany). For this study, a pulsed primary ion source of $^{69}\text{Ga}^+$ was operated at 15 keV with a pressure of 5×10^{-9} Torr. The width of the source was controlled at 27.5 ns, the ionic current at 1.8 pA and the primary ion dose density under 5×10^{11} ions/cm² in order to remain in a static mode. Neutralization of surface charges was accomplished with a low energy electron

source. The scanning area of secondary ions was $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$ for spectroscopy and $10 \times 10\ \mu\text{m}$ for imaging. Positive and negative secondary ions were detached from the outmost layer of the coating and their respective masses were measured. The experiment was repeated at least twice.

4.2.4.5 Biological Characterization

4.2.4.5.1 Cell Adhesion

VSMC were incubated on each surface for 4 h at 37°C and 5% CO_2 with a cell density of 2×10^5 cells/ml, in 200 μl of normal medium (N, DMEM/F12 medium supplemented with 10% FBS and 1% PS). Cloning cylinders were used to limit the area. After 4 h, the surfaces were washed with phosphate buffered saline (PBS 1x) to remove non-adherent cells. Adherent cells were then coloured with a 0.075% w/v crystal violet solution for 15 min, rinsed 3 times with Milli-Q water and dried at room temperature. Images were captured through microscopy and cells were counted. Cell adhesion was carried out on amino-coated glass slides, CS-coated glass slides, EGF+CS-coated glass slides as well as TCPS (control). Three images were taken per surface with a minimum of 4 samples per condition and each experiment was performed in triplicate.

4.2.4.5.2 Cell Growth

A starting cell density of 2×10^5 cells/ml in 200 μl of N medium was used for cell growth experiments. After 4 h of adhesion, cloning cylinders were removed, the surfaces were washed with PBS 1x to remove non-adherent cells and cells were left to grow for 1, 4 and 7 days at 37°C and 5% CO_2 in 500 μl of N medium. The medium was changed every 2 days. Cell colouration (crystal violet), surfaces and replicates were as described in the cell adhesion section.

4.2.4.5.3 Cell Apoptosis

Cells were left to adhere and grow until 80% of confluence. The cells were then washed with PBS to remove any trace of growth factor from the medium. Half of the surfaces were exposed to normal medium and the other half to serum free medium (SS, RPMI without serum nor growth factors) for 6 or 24 h to provoke apoptosis. To assess apoptosis, VSMC were stained with HT/PI. 1 $\mu\text{g/ml}$ of HT was incorporated in the medium of each condition and incubated for 10 min at 37°C. Cells were washed with PBS to prevent further intake of HT. A 5 $\mu\text{g/ml}$ solution of PI in PBS was added to each condition. Images were captured through fluorescence microscopy with an excitation filter of 360-425 nm. HT/PI staining made it possible to distinguish between viable (normal cytoplasmic and nuclear morphology, blue color), primary necrotic (larger nucleus, no chromatin condensation and alteration of cell membrane integrity), early apoptotic (nuclear condensation, cell shrinkage and no alteration of cell membrane integrity, bright blue colour) and late apoptotic cells (typical apoptosis nuclear transformations and disruption of cell membrane integrity, red colour) [65, 120, 121]. The proportion of apoptotic cells was calculated for each condition. Three images were taken per surface with a minimum of 3 samples per condition and each experiment was performed in duplicate (24-h time point) or triplicate (6-h time point).

4.2.4.5.4 Actin and Nucleus Staining

After 7 days of cell growth, VSMC were fixed with a 4% w/v solution of paraformaldehyde for 10 min at room temperature and rinsed with PBS. The cells were permeabilized with 0.4% v/v Triton X100 for 10 min and rinsed with PBS. A 10% goat serum solution in 0.1% v/v Triton X-100 / PBS was used to block the cells. Actin staining was achieved by incubating phalloidin-Alexa 488 (1/40 dilution, A12379, Molecular Probes) in PBS for 50 min. Nucleus staining was achieved by adding 10 μl of Hoechst solution (5 $\mu\text{g/ml}$) and incubating another 10 min. Surfaces were washed with PBS and transferred to microscopic slides. Fluoromount was used as a mounting medium. Once dried, the samples were observed through fluorescence microscopy.

4.2.4.5 Statistical Analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analysis was carried out using independent two-sample *t*-test with equal variances following ANOVA analysis. A *p* value < 0.05 was considered significant for all tests.

4.2.5 Results

4.2.5.1 Coating Optimization and Physicochemical Characterization

Ellipsometric measurements were used to identify the optimal experimental conditions for CS and EGF grafting as well as to evaluate whether non-specific binding of CS occurred on APTES-coated silicon wafers. To define the optimal EDC concentration, the dry CS layer thickness was measured for various EDC concentrations while a fixed CS concentration of 0.1 % w/v was maintained in the coupling reaction solution. An optimum was observed for equimolar EDC/CS mixtures (data not shown). [EDC]/[COOH] ratio of 1 was thus used to further optimize CS concentration in the coupling reaction solution. As shown in (Figure 26), dry thickness increased with CS concentration and plateaued at 0.81 ± 0.10 nm (after ultrasonication) for CS concentrations higher than 1% w/v. The hydrophilic polymer grafting was also confirmed by wettability measurements showing a large decrease of contact angle values from $65.9 \pm 1.6^\circ$ to $43.5 \pm 1.8^\circ$ for APTES and CS layers, respectively.

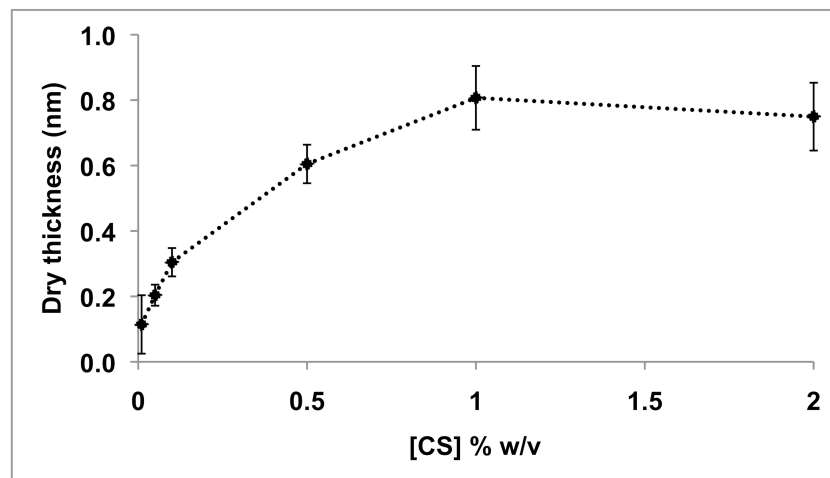


Figure 26 : Dry thickness of CS coating assessed by ellipsometry as a function of CS concentration ($n \geq 5$).

To evaluate whether CS had been covalently grafted to the surface, the CS layer thicknesses in the presence or absence of EDC/NHS in the coupling mixture were compared before and after ultrasonication. For both conditions (i.e. with and without EDC/NHS), a difference of 0.5 nm was detected before and after ultrasonication (data not shown), suggesting that non-specific adsorption of CS occurred. Such a phenomenon was expected since negatively charged CS macromolecule can electrostatically interact with positively charged amine groups of APTES-coated surfaces. Of interest, ultrasonication was proven to be effective in removing non-covalently bound CS. Indeed, no CS accumulation could be detected for treatments performed in the absence of EDC/NHS after ultrasonication, as indicated by dry thickness and water contact angle measurements (Figure 27). Overall, these results confirmed that EDC/NHS was required to covalently graft CS to the surface and that ultrasonication was effective in removing non-specifically adsorbed CS.

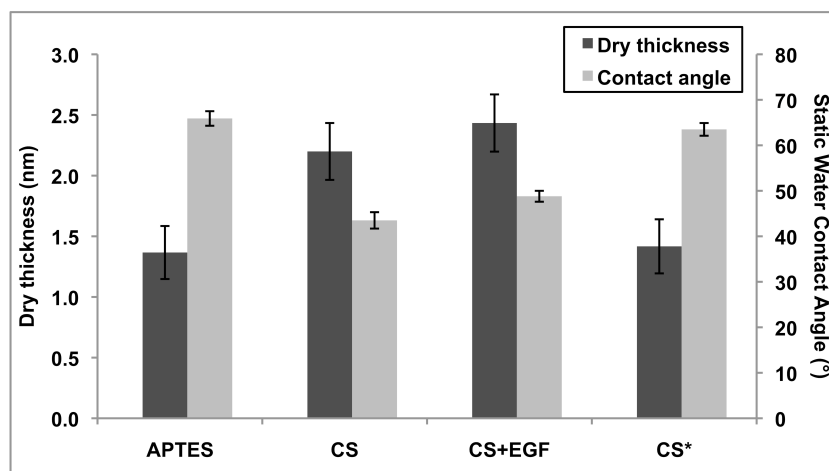


Figure 27 : Dry thickness (left axis) and water contact angle measurement (right axis) of APTES-coated (APTES), CS-coated (CS), CS+EGF-coated (CS+EGF) silicon wafers assessed by ellipsometry and static water contact angle respectively. CS incubated on APTES-coated silicon wafers without EDC/NHS in the coupling reaction solution (CS*) was evaluated as a reference ($n \geq 5$). The error bars represent the cumulative errors after each layer (APTES, CS and CS+EGF).

ToF-SIMS analysis was then performed to confirm the presence of CS on amino-coated glass slides as well as to evaluate CS coating homogeneity. Figure 28 shows images and pixel counts of C_3H_8N , SO and SO_3 fragments on amino-coated glass slides in the presence or absence of CS pretreatment, while Tableau 4 presents the average proportion of fragments weighed against total count. A net decrease of Si on the CS-coated surface compared to the control surface was detected. Of interest, a large rise in fragments specific to CS was observed on CS-coated surfaces after ultrasonication, thus unambiguously confirming CS grafting. From Figure 28 (and data not shown), it can also be seen that all fragments were uniformly distributed on the surface, which was indicative of a homogeneous CS layer.

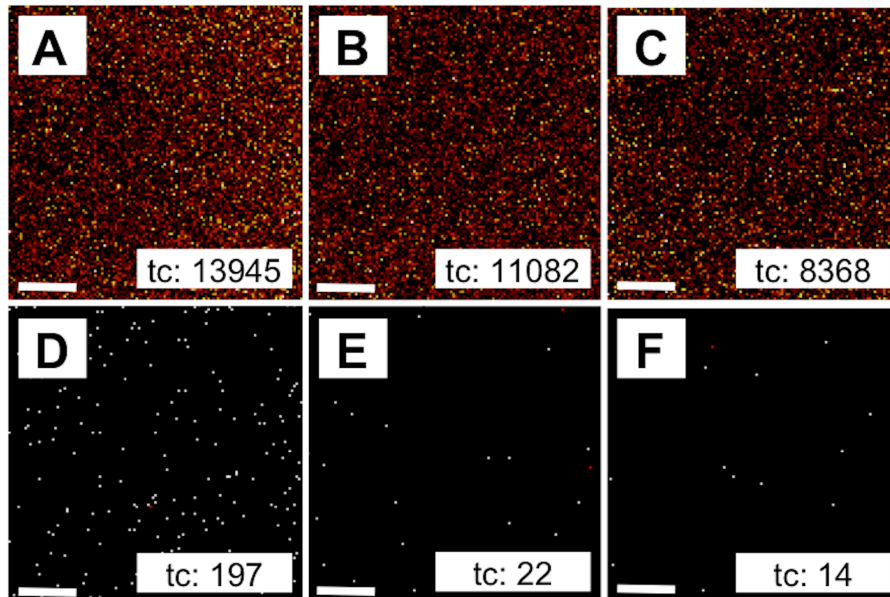


Figure 28 : ToF-SIMS images of C_3H_8N (A and D), SO (B and E) and SO_3 (C and F) fragments on CS-coated glass slides (A-C) and amino-coated glass slides (D-F). Each pixel corresponds to C_3H_8N , SO or SO_3 fragments that are specific to CS. The total counts (tc) of each fragment are also given in Figure inserts. In each case, the scale bar corresponds to 2 μm .

Tableau 4 : ToF-SIMS analysis of amino-coated glass slides with/o CS (40 μm x 40 μm).

^a Total positive ion count ^b Total negative ion count.

Ions	Without CS	With CS
Si (+)	10.10 \pm 0.30%	4.09 \pm 1.93%
C ₃ H ₈ N (+)	0.09 \pm 0.01%	2.71 \pm 1.14%
S (-)	0.16 \pm 0.01%	0.24 \pm 0.08%
SO (-)	0.01 \pm 0.00%	0.14 \pm 0.08%
SO ₂ (-)	---	0.17 \pm 0.10%
SO ₃ (-)	---	0.56 \pm 0.38%
SO ₃ H (-)	---	0.10 \pm 0.06%
SO ₄ (-)	---	0.15 \pm 0.10%
SO ₄ H (-)	---	0.32 \pm 0.15%
C ₂ H ₃ SO (-)	---	0.10 \pm 0.04%
Total + Ion Count ^a	2.5 x 10 ⁶	4.4 x 10 ⁶
Total - Ion Count ^b	3.3 x 10 ⁶	10.2 x 10 ⁶

The optimized CS coating ([EDC]/[COOH]: 1 and 1% CS w/v) was then used for subsequent experiments designed to covalently graft EGF through the formation of an amide bond between free amine and carboxylic groups present on EGF and CS, respectively. The thickness of the EGF layer increased with increasing EGF concentrations (Figure 29) and saturation was observed for EGF concentration being equal to 200 nM (net thickness increase of 0.24 \pm 0.04 nm). For subsequent surface preparation, however, we used EGF solutions at 100 nM, due to the prohibitive cost of EGF.

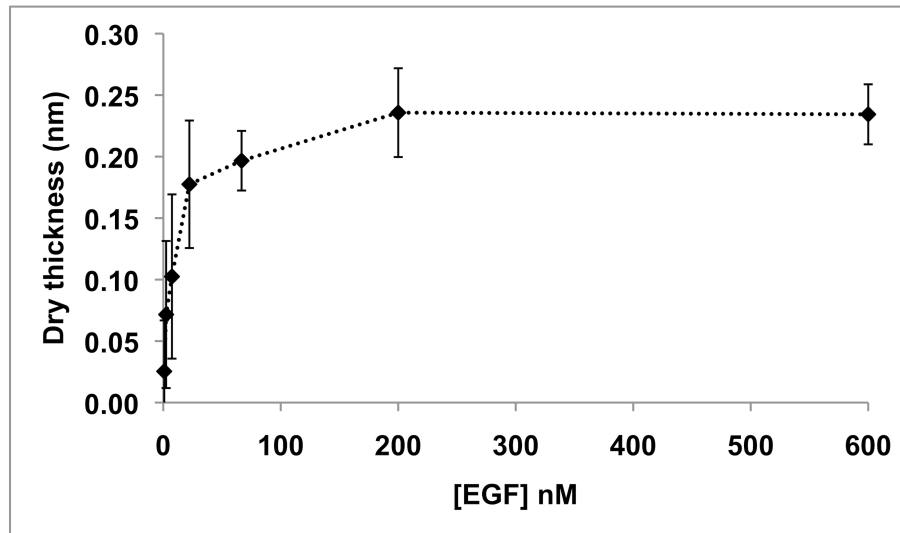


Figure 29 : Dry thickness of CS+EGF coating assessed by ellipsometry as a function of EGF concentration ($n \geq 5$).

4.2.5.2 Biological Characterization

Cell adhesion was evaluated on TCPS, amino-coated, CS-coated and EGF+CS-coated glass slides. All the results were normalized to TCPS control ($100 \pm 17\%$). Cell adhesion on amino-coated glass slides ($94 \pm 18\%$) was similar to that on TCPS (data not shown). As expected, CS significantly inhibited cell adhesion ($81 \pm 9\%$) when compared to all other surfaces ($p < 0.05$). The presence of grafted EGF on CS coatings, on the other hand, significantly increased ($p < 0.01$) VSMC adhesion ($99 \pm 17\%$) to levels statistically similar to those observed on TCPS. Typical images of cell adhesion are presented in Figure 30 to illustrate the difference in cell count and morphology.

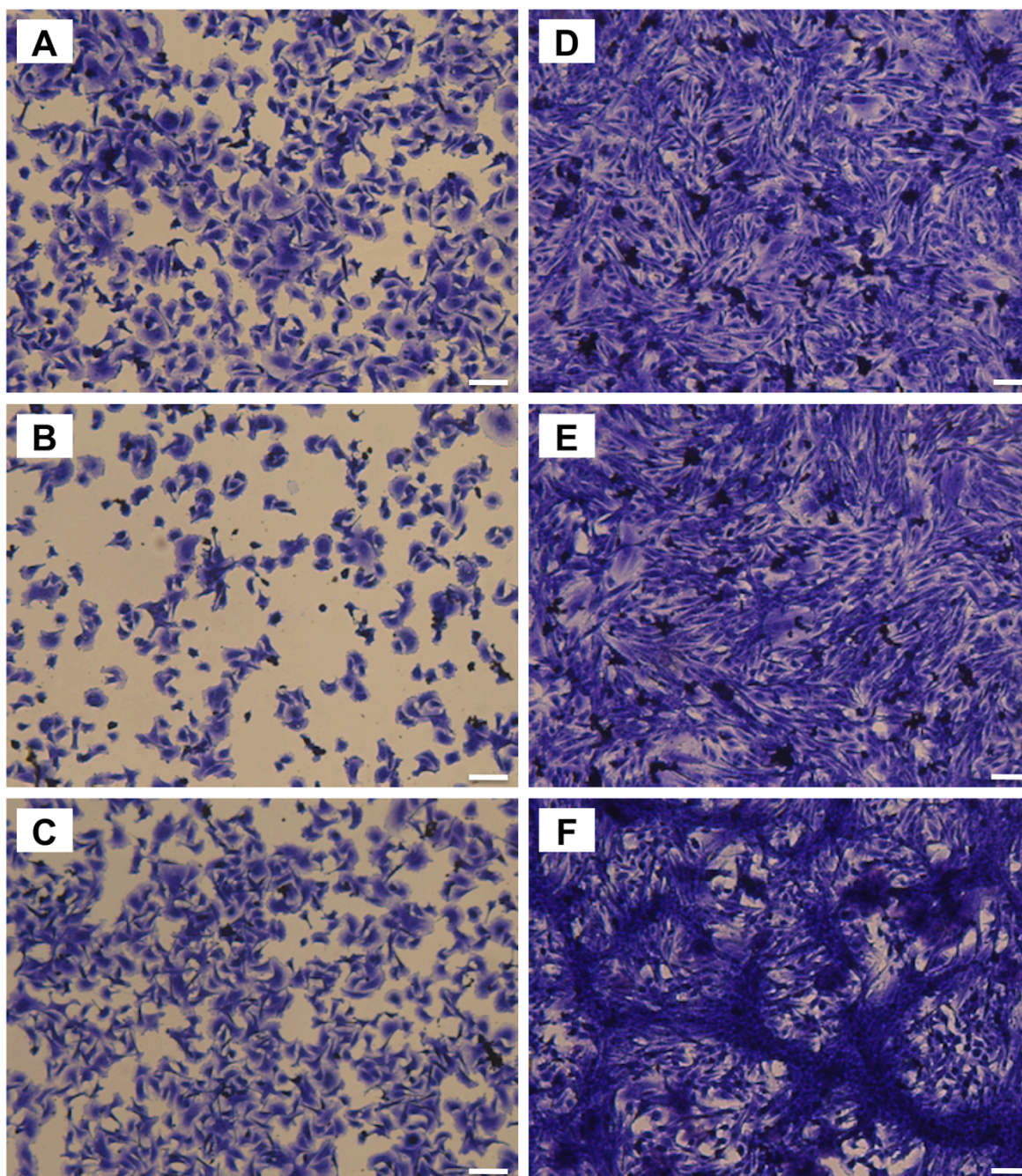


Figure 30 : VSMC crystal violet staining after 4- hours of adhesion (A-C) and 7- days of cell growth (D-F) on amino-coated (A and D), CS-coated (B and E) and EGF+CS-coated glass slides (C and F). Scale bars correspond to 100 μm .

As can be seen in Figure 31, VSMC cell count ratios were similar after 1, 4 and 7 days of cell growth on TCPS and amino-coated glass slides. However, for surfaces corresponding to CS coatings on which EGF had been covalently grafted, VSMC growth was significantly higher when compared to all other surfaces ($p < 10^{-6}$ after 4 and 7 days). After 7 days of cell culture, VSMC multilayers were present on EGF-coated surfaces (Figure 30F), which resulted in underestimated cell counts. This behaviour was not observed on TCPS (not shown), on amino-coated glass slides (Figure 30D) or on CS-coated glass slides (Figure 30E), thus highlighting the unique effect of grafted EGF on CS. Actin and nucleus immunohistochemistry labelling of VSCM was performed after 7 days of cell growth (Figure 32). VSMC on CS-coated surfaces (Figure 32B) contained noticeably more actin than cells grown on uncoated surfaces (Figure 32A) or on EGF-coated surfaces (Figure 32C).

Finally, cell apoptosis was assessed after 6 and 24 hours in a serum-free medium (SS) (Figure 33). CS coatings drastically decreased VSMC apoptotic levels when compared to TCPS control after 6 ($p < 0.001$) and 24 hours ($p < 1 \times 10^{-7}$) in SS. EGF+CS-coated surfaces further decreased the proportion of apoptotic cells after 6 h in SS media ($p < 0.02$) when compared to CS-coating. After 24h in SS, the same trend was demonstrated but the difference was not statistically significant ($p = 0.09$). CS-coated glass slides in the presence of soluble EGF (10 ng/ml) showed the same results as those related to EGF+CS-coated glass slides after 6h ($p = 0.83$) and 24h ($p = 0.88$) in SS.

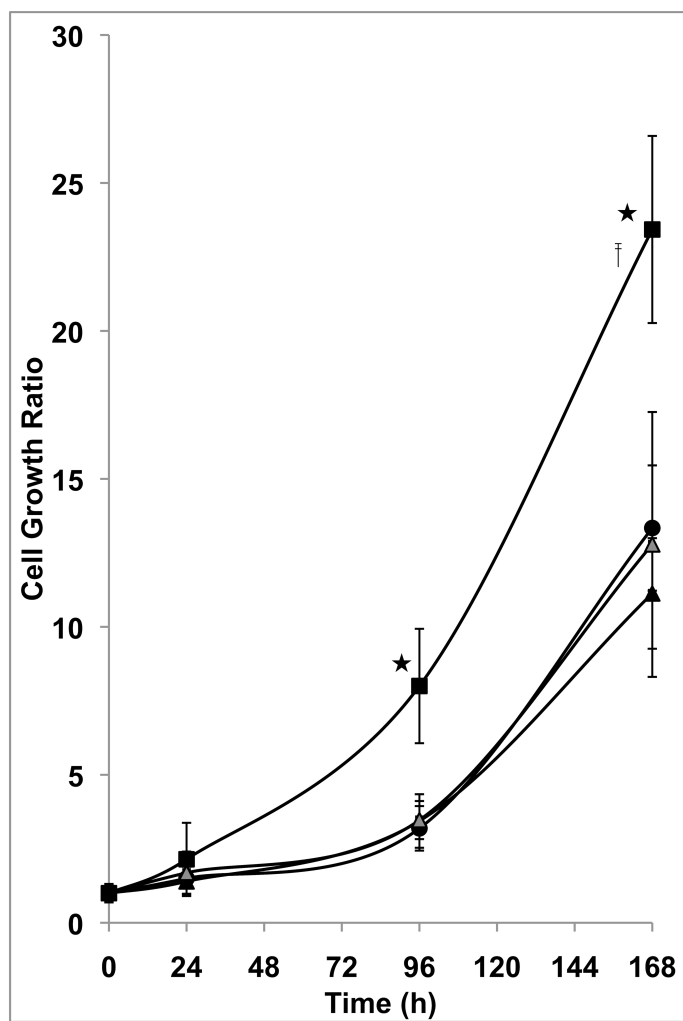


Figure 31 : VSMC growth on TCPS (▲) and amino-coated (●), CS-coated (△) and EGF+CS-coated glass slides (■). The graph presents the ratios of cell counts on each surface, after 24 hours, 4 days and 7 days, compared to their respective initial cell count after 4h of cell adhesion ($n \geq 10$). Results after 7 days of cell growth on EGF+CS-coated glass slides (‡) were underestimated as VSMC formed multilayers as illustrated in Figure 30.

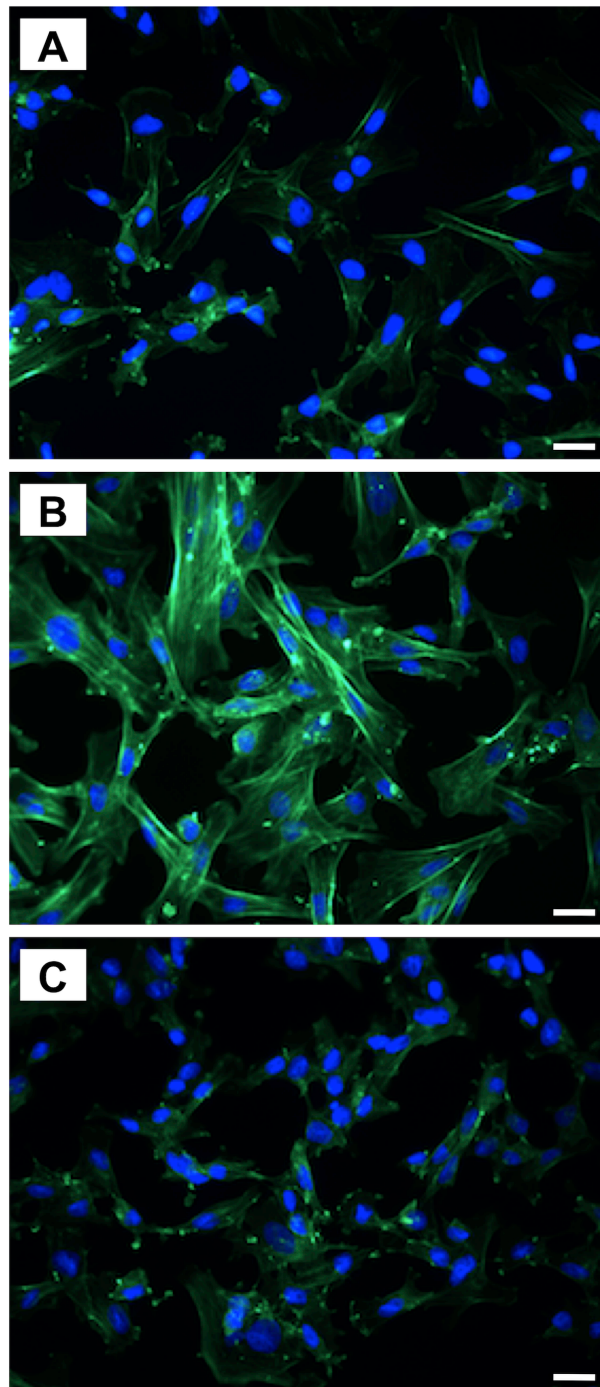


Figure 32 : Actin and nucleus staining of VSMC on amino-coated (A), CS-coated (B) and EGF+CS-coated glass slides (C) (Scale bars: 100 μm). Actin was stained with phalloidin-Alexa 488 (green) and nucleus with HT (blue) after 7 days of cell culture.

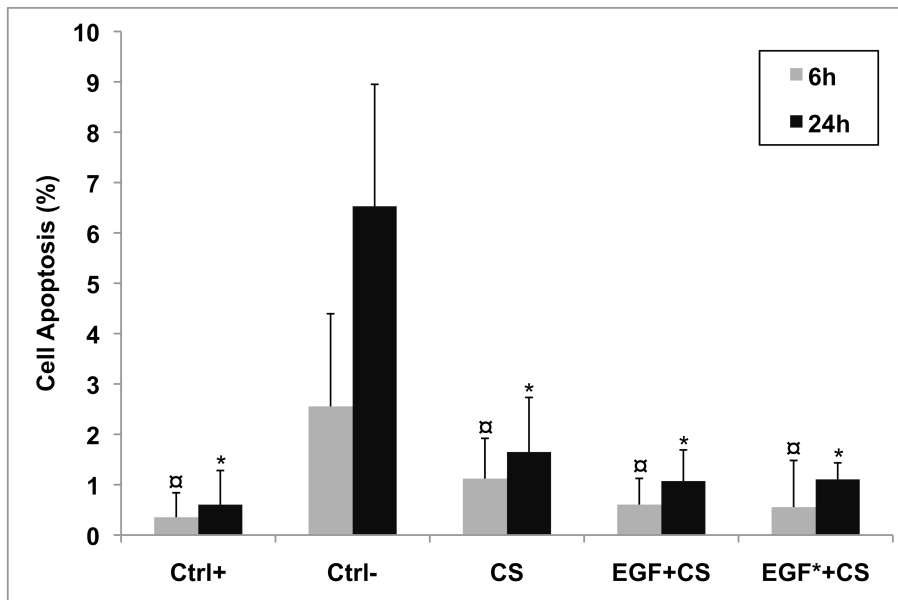


Figure 33 : Proportion of apoptotic cells on PCP with normal medium (Ctrl+), PCP with serum-free (SS) medium (Ctrl-), CS-coated glass slides with SS medium (CS), EGF+CS-coated glass slides with SS medium (EGF+CS) and CS-coated glass slides + 10 ng/ml EGF in solution with SS medium (EGF*+CS). Cell apoptosis was significantly lower on all surfaces after 6 and 24 hours when compared to the negative control (α and * $p < 0.05$ compared to Ctrl- at 6h and 24h respectively, $n \geq 9$).

4.2.6 Discussion

The immobilization of bioactive molecules to trigger cell-specific pathways with the ultimate goal of generating more appropriate biological responses around implants is an interesting (and growing) approach to improve healing without modifying biomaterials' mechanical properties. As discussed in the introduction, resistance to apoptosis is a major challenge for several vascular applications where access to nutrients and O₂ is limited and where a pro-apoptotic phenotype is present. Such is the case after endovascular treatment of AAA. In that specific situation, cell apoptosis is believed to play a central role in the deficient healing of the tissues surrounding stent-grafts after EVAR. Only a few research groups have focused on the surface modification of stent-grafts to stimulate the creation of a complete neointima [67, 68, 183, 184]. To our knowledge, no study has yet specifically focused on preventing apoptosis around stent-grafts. Therefore, in the present study a bioactive coating including anti-apoptotic mediators was developed.

Vascular injury is known to stimulate the release of a wide variety of paracrine mediators, such as growth factors, proteins and proteoglycans like CS, that inhibit cell apoptosis and lead to neointimal formation. Recent findings have shown that CS in solution inhibits apoptosis of fibroblasts and VSMC in serum-free media [120, 121]. This highly soluble polysaccharide, which contains repetitive units of glucuronic acid and galactosamine, is a good candidate for the development of bioactive coatings since it is inexpensive, sterilizable and stable at different pHs and temperatures. Furthermore, CS can easily be grafted on aminated surfaces through its carboxylic acid groups. The repetitive carboxyl groups can also be used to anchor other biological macromolecules such as growth factors.

In this study, CS was first covalently grafted on aminated surfaces through EDC/NHS chemistry to avoid uncontrolled release of CS in aqueous solution. EDC/NHS was chosen since its use as a coupling agent has been extensively documented [67, 168, 181] and since unreacted species could easily be eliminated by simple cleaning procedures.

Maximum dry thickness of the CS coating was shown to be 0.81 ± 0.10 nm, a result similar to that obtained by Popplewell *et al.* [185] when CS was covalently bound to hydrazide-functionalized surfaces (0.71 ± 0.33 nm). As explained in their work, the measured CS layer thickness implies that CS is horizontally oriented to the surface. ToF-SIMS analysis allowed us to confirm CS grafting homogeneity. CS immobilization on APTES-coated silicon wafers significantly increased the wettability of the surface. This was expected, since CS is a highly soluble polysaccharide characterized by an overall negative charge. This may have a positive impact by creating a low-fouling surface that limits non-specific adsorption of proteins while preserving the bioactivity of the further attached growth factors, here EGF.

In vitro cell assays showed that CS coating significantly increased cell resistance to apoptosis in SS. This serum starvation assay was chosen in an effort to mimic the nutrient-limited environment after EVAR; it is a classic pro-apoptotic stimulus that has been used extensively within our research group [120, 121, 172]. Other pro-apoptotic stimuli, such as hypoxia and TNF- α exposure, could also be used to replicate such a hypoxic and inflammatory environment. The cell mechanisms leading to improved resistance to apoptosis in the presence of CS are still not well understood. Previous work has shown that CS in solution induced ERK 1/2 phosphorylation, in turn leading to increased Bcl-xL levels and inhibition of VSMC apoptosis [121]. Further studies would be required, however, to elucidate the exact mechanism(s) by which immobilized CS inhibits cell apoptosis.

Cell adhesion assays revealed that CS significantly decreased cell adhesion on CS-coated surfaces. These findings concur with those previously reported by Chupa *et al.*, who showed that CS, when added to chitosan membranes, inhibited adhesion of vascular endothelial cells and VSCM [138]. Lower cell adhesion on CS-coated surfaces was therefore expected. Moreover, no pro-proliferative effect of CS on VSMC was observed on CS-coated surfaces when compared to our control. In that respect, the anti-adhesive property of CS could be responsible for the limited cell growth observed. To benefit from the bioactive properties of CS, it is therefore crucial to counteract the anti-adhesive

properties of CS. Our study demonstrates that subsequent grafting of EGF onto CS coating solves this issue.

EGF was chosen in view of the fact that it is a known proliferative and chemotactic growth factor for VSMC and that it stimulates the production of extracellular matrix elements, such as collagen and fibronectin [93]. EGF was also shown to inhibit apoptosis in VSMC by stimulating pro-survival signals, through the activation of EGFR [112]. It is assumed that the immobilization of growth factors, such as EGF, should sustain cell activation pathways by holding back their internalization, thus extending their exposure time to the cells [91]. The immobilization of EGF was proven to be successful in many applications, such as covalent binding through sulfo-EMCS crosslinker on thiol-modified glass slides with A431 cells [91] and conjugation with sulfo-SANPH and UV photopolymerization on TCPS with human epidermal keratinocytes [148]. EGF was also tethered in an oriented fashion through the addition of a histidine tag at its C terminus or, alternatively, coil peptide at its N terminus, followed by incubation on nickel chelated surfaces or surfaces harbouring complementary coil peptide, respectively. In both cases, tethered EGF was unambiguously demonstrated to increase neural stem [145] and human corneal epithelial [186] cell proliferation, respectively. In another study, covalent tethering of EGF through homobifunctional PEG spacers on plasma polymerized PDMS surfaces stimulated human corneal epithelial cell adhesion and growth [149]. In the latter report, immobilized EGF was shown to produce similar results to soluble EGF.

In the present study, CS+EGF coating was created on aminated surfaces with a two-step procedure using the same coupling system (EDC/NHS). EGF was tethered on CS-coated surfaces through its available primary amine groups from either its N-terminus or its lysine side chains located at positions 28 and 48 on the available carboxylic acids of CS. Such random covalent immobilization could offer lower bioactivity compared to oriented immobilization, by different molecular orientations and lower cell recognition. However, pro-adhesive and proliferative results obtained on VSMC show that random immobilization did not totally suppress the bioactivity of the EGF molecules.

Indeed, EGF grafting significantly increased VSMC adhesion when compared to CS coating alone and up to levels reached on TPCS. Moreover, the immobilization of EGF on CS coating drastically increased cell growth, leading to the formation of multilayers of VSMC. EGF+CS-coated surfaces also showed higher resistance to apoptosis in SS compared to our negative control. EGF+CS-coated surfaces even increased cell resistance to apoptosis compared to CS alone. A significant difference was revealed after 6 hours of incubation in SS. Immobilized EGF gave statistically similar results to those obtained with 10 ng/ml of soluble EGF. It is difficult, however, to draw conclusions from our results regarding the respective roles of CS and immobilized EGF upon resistance to apoptosis when VSMC are cultured on CS+EGF coatings. Previous unpublished work showed similar results with CS and EGF in solution. Overall, our results suggest that CS is still accessible for VSMC after EGF immobilization and that EGF slightly contributes as an anti-apoptotic mediator, while considerably stimulating cell adhesion and growth. Further work would be required to prove this assumption, however. EGF in solution is known to inhibit cell apoptosis through the activation of different cell signalling pathways (PI3K/AKT, RAS/ERK and JAK/STAT), which in turn stimulates anti-apoptotic proteins (Bcl-2 family, IAP, CREB, mTOR, NF- κ B and HIF-1 α) and inhibits pro-apoptotic proteins (BAD, Caspase 9 and FOXO) [144]. Once again, additional work would be needed to evaluate whether tethered EGF triggers the same cell signalling pathways once combined with CS.

An interesting effect on cell morphology was also revealed by immunostaining. VSMC cultured for 7 days on CS-coated surfaces contained a large number of actin filaments, as opposed to EGF+CS-coated surfaces. These results, taken together with findings on cell growth, suggest that VSMC on CS-coated surfaces possess a contractile phenotype while VSMC on EGF+CS-coated surfaces hold more of a pro-proliferative phenotype. Further studies are needed to evaluate the phenotypic modulation of VSMC in the presence of CS alone or with EGF. In that respect, CS might stimulate α SMA production and promote a contractile phenotype in VSMC, which could be beneficial to tissue healing. Moreover, since EGF is a chemotactic growth factor and CS in solution has

been shown to promote cell migration on nitrogen-rich coatings [65], the ability of the coating to attract VSMC onto the surface will be assessed in future work.

Using the method described in this paper, we were able to create a coating that incorporates CS and EGF while maintaining their respective bioactivities. CS+EGF coatings that had been created on aminated glass surfaces increased VSMC adhesion, growth and resistance to apoptosis. A coating combining all these properties constitutes a very promising approach to promoting vascular repair around stent-grafts where cells are in an apoptotic environment. Transfers on realistic biomaterial surfaces can be performed through the functionalization of PET or ePTFE surfaces with primary amine groups and will be the subject of future studies. As stated earlier, further studies are needed to elucidate the exact mechanisms in which these bioactive molecules inhibit cell apoptosis and modulates cell phenotype in VSMC. Moreover, although the anti-apoptotic properties of soluble CS have been already demonstrated on primary human aortic VMSC [11], our results will have to be reproduced on human aortic VSMC to validate the bioactive properties of our coating on cells from a human origin.

As discussed earlier, the loss of VSMC through the pathophysiology of AAA and the pro-apoptotic environment that is intensified with the deployment of a stent-graft are key factors contributing to the deficient healing of tissues surrounding the implant and to aneurysm progression. Development of an anti-apoptotic pro-proliferative coating on stent-grafts could counteract the pathophysiology and prevent aneurysm progression with time, promote healing in the aneurismal sac and thus reduce the incidence of clinical complications after EVAR. Moreover, such bioactive coatings could be useful for several other vascular applications, in particular tissue engineering where cell apoptosis is also a major challenge. Growth factor grafting on surfaces and 3D scaffolds is increasingly studied to promote angiogenesis. Yet, promoting resistance to apoptosis is essential until neovessel formation occurs.

4.2.7 Conclusions

In this study, we showed that CS could be covalently immobilized on aminated surfaces while maintaining its anti-apoptotic bioactivity. We also showed that CS can be used as a support to immobilize EGF and that CS+EGF coating increases VSMC adhesion, growth and resistance to apoptosis in serum-free medium. Further work is needed to transfer this coating onto biomaterials used for stent-graft manufacturing, but these results show great potential for CS and EGF to fulfill their purpose as bioactive anti-apoptotic and proliferative coatings designed to promote healing around cardiovascular implants.

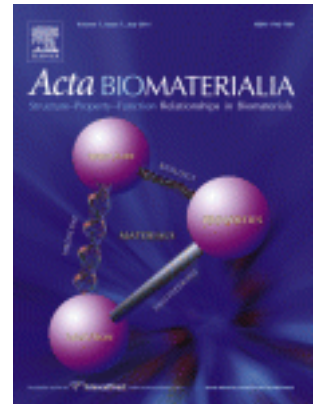
4.2.8 Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; Grant RMP-72548), the Fondation des Maladies du Coeur du Québec (FMCQ) and the Canada Research Chairs on endovascular implants and biomaterials (S.L.) and protein-enhanced biomaterials (G.D.C.). We also acknowledge a full scholarship (C. C.) grant from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and FMCQ. The authors would also like to thank Emilie Dubeau, Nicolas Hegerle and Cyril Boucher for their help or advice during the experimental work.

Chapitre 5: Transfert du revêtement bioactif sur des biomatériaux polymériques (Article 3)

5.1 Présentation de l'article

Cet article intitulé « **Chondroitin sulfate and epidermal growth factor immobilization after plasma polymerization : a versatile anti-apoptotic coating to promote healing around stent-grafts** » a récemment été soumis à *Acta Biomaterialia*. L'objectif principal de ce travail consistait à démontrer que le revêtement de CS et EGF, présenté au chapitre 4, pouvait être transposé sur des matériaux utilisés dans les prothèses vasculaires, comme le PET et le ePTFE.



Pour ce faire différentes méthodes de modification de surface par plasma ont été étudiées, dans le but de créer des groupements d'amines primaires sur des films de PET. Plus particulièrement, la fonctionnalisation par plasma à l'ammionaque a été comparée à la polymérisation par plasma à basse pression et pression atmosphérique. Les trois techniques de modification ont permis de créer des groupements amines en surface et d'immobiliser la CS.

La polymérisation par plasma à basse pression a été choisie pour sa versatilité et le greffage successif de la CS et de l'EGF qui a permis, une fois de plus, d'inhiber l'apoptose des CMLV, dans des conditions pro-apoptotiques, et de favoriser la croissance des cellules. Cette étude démontre que le revêtement de CS+EGF peut être déposé sur des polymères, préalablement inertes, par des techniques de modification par plasma, tout en maintenant sa bioactivité.

5.2 Chondroitin sulfate and epidermal growth factor immobilization after plasma polymerization : a versatile anti-apoptotic coating to promote healing around stent-grafts

Cindy Charbonneau^{a, b}, Juan-Carlos Ruiz^c, Marie-Josée Hébert^a, Gregory De Crescenzo^c, Michael R. Wertheimer^c and Sophie Lerouge^{a, b} *

^a Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 1560 rue Sherbrooke Est, Montréal (Qc), Canada, H2L 4M1

^b Department of Mechanical Engineering, École de technologie supérieure (ÉTS), 1100 boul. Notre-Dame Ouest, Montréal (Qc), Canada, H3C 1K3

^c Department of Engineering Physics, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (Qc), Canada, H3C 3A7

^d Biomedical Engineering Institute, Université de Montréal, P.O. Box 6128, succ. Centre-Ville, Montréal (Qc), Canada, H3C 3J7

^e Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (Qc), Canada, H3C 37A

*Corresponding author :

Sophie Lerouge, PhD

Laboratoire de biomatériaux endovasculaires (LBeV),

CRCHUM, Notre-Dame Hospital

1560 rue Sherbrooke Est, Montréal, QC, Canada, H2L 4M1.

Tel: + 1 514 890 8000 x 28821

Fax: +1 514 412 7785

5.2.1 Abstract

The inertness of synthetic polymers combined with the pro-apoptotic environment of abdominal aortic aneurysm explain the lack of healing observed around stent-grafts after endovascular aneurysm repair (EVAR). We recently showed that chondroitin sulfate (CS) and epidermal growth factor (EGF), immobilized on aminated glass slides, increased VSMC adhesion, growth and resistance to apoptosis. The purpose of this present work was to develop a method to graft these bio-molecules on realistic biomaterial surfaces used in stent-grafts, namely PET, and to demonstrate that the bioactivity of CS and EGF are preserved. To render PET chemically active and thus allow grafting of bio-molecules, amino groups were created on the PET using three different plasma techniques, namely ammonia plasma treatment and atmospheric- or low-pressure plasma polymerization. After CS immobilization, surface characterization and cell apoptosis assays were used to choose the optimal surface modification technique. Low-pressure plasma polymerization presented the greatest potential and was therefore used to further graft EGF. CS+EGF coating was shown to decrease cell apoptosis and cell depletion in serum-free medium, while increasing cell growth, compared to unmodified PET but also to polystyrene culture plates positive control. Altogether, our results demonstrated that CS+EGF coating was successfully transferred onto PET and that they hold promise in promoting vascular repair after EVAR.

5.2.2 Keywords

Chondroitin sulfate, epidermal growth factor, surface functionalization, plasma polymerization, anti-apoptotic coatings, stent-grafts.

5.2.3 Introduction

Abdominal aortic aneurysms (AAA) are characterized by a permanent dilation and weakening of the aortic wall, causing a progressive loss of mechanical integrity. If not treated, AAA can lead to a sudden rupture of the aorta and death of the patient as a result of massive internal bleeding. In industrialized countries, AAA ruptures are responsible for 1-3% of all deaths among 65 to 85 year-old men [1]. To prevent rupture, endovascular aneurysm repair (EVAR) with a stent-graft (SG) has been increasingly used this last decade as a minimally invasive alternative to open surgery. Although EVAR offers a significantly lower short-term mortality/morbidity rate [45, 47, 48], its success is limited by frequent complications such as SG migration and persistence of endoleaks, in approximately 15% [156] and 25% [157] of all cases, respectively. These complications can be related to the lack of healing observed around the SG, and more specifically at the aortic neck, which compromises its biological incorporation and fixation [56, 57].

Deficient healing around SG can be explained by several factors. The pathophysiology of AAA leads to a sustained increase in vascular smooth muscle cell (VSMC) apoptosis [25], leading to depletion of contractile cells within the aneurysm wall, which in turn favours progression of the aneurysm [160]. Cell apoptosis is likely to increase after EVAR, since the implant excludes the aneurysm from blood flow, therefore limiting cell access to nutrients and oxygen. In addition, the inertness of the materials currently used in stent-grafts, such as poly(ethylene terephthalate) (PET, Dacron®) or expanded poly(tetrafluoroethylene) (ePTFE), prevents the stimulation of proper cell mechanisms implicated in vascular repair, such as adhesion and accumulation of contractile cells and the formation of an extracellular matrix. We assumed that a bioactive coating applied on the external surface of the SG, one that includes anti-apoptotic mediators, could improve the healing process and SG incorporation into the vessel wall. In order to promote tissue growth, the biomaterial should not only increase cell adhesion and proliferation, but also promote the development of a state of resistance to apoptosis [165].

To that purpose, we recently proposed to combine chondroitin sulfate (CS) and epidermal growth factor (EGF) [177]. CS, a polysaccharide containing repeating units of glucuronic acid and galactosamine, has been previously shown to increase resistance to apoptosis of VSMCs in solution [121]. EGF in solution is also known to stimulate VSMC growth [93], in addition to triggering pro-survival signals through EGF-receptor (EGFR) signalling, and thus inhibiting VSMC apoptosis [112]. We showed that CS and EGF can be grafted on inert glass surfaces, initially functionalized with primary amines using carbodiimide chemistry, without losing their bioactivity. Our original approach exploits the carboxylic acid groups of CS to create amide bonding with an aminated surface, followed by immobilization of the EGF. The immobilization of both molecules on glass not only increased the growth of VSMC but, even more important, their resistance to apoptosis in serum-free (SS) medium, the latter being a classic pro-apoptotic stimulus [177].

However, several issues remained regarding how to implement such a bioactive coating on realistic synthetic graft surfaces, and whether they would improve the biological response compared with the untreated polymeric biomaterials currently used. The aim of the present work has therefore been to graft CS and EGF on PET films and to study their potential benefits when compared with pristine PET.

CS immobilization requires primary amine functional groups on the polymeric surface. Much work has already been published regarding functionalization of PET and PTFE surfaces using, among others, wet chemistry and ammonia- or nitrogen-containing plasmas [73]. Plasma polymerization (PP) of allylamine, alkylamine or other “monomers” is another possible strategy to obtain coatings that are rich in primary amines. In fact, the development of so-called “plasma polymerized ethylene enriched with nitrogen” (designated “PPE:N”) coatings has been a focus of our team for the past few years [65, 78, 79]. This approach has several advantages over simple plasma functionalization, even over PP of amine-containing “monomers” mentioned above; of salient interest, this strategy is very versatile, and coatings can be deposited on any kind of biomaterial surface.

In this study, low-pressure (“L-PPE:N”) and atmospheric-pressure (“high”, “H-PPE:N”) plasma polymerization techniques were compared to surface functionalization with 'classical' ammonia plasma treatment in regard to their ability to generate primary amine groups for the subsequent grafting of CS on PET. To shorten the manuscript, the abbreviations “LP” and “HP” will be used throughout the text in place of “L-PPE:N” and “H-PPE:N”, the symbols used in our earlier publications. Untreated PET and modified PET, before and after CS grafting, were characterized by static water contact angle (WCA) measurements, X-Ray photoelectron spectroscopy (XPS), and scanning electron microscopy (SEM). The stability of the various coatings in aqueous solution was also tested. Cell resistance to apoptosis on modified PET after CS grafting was chosen as the ultimate assay for selecting the most effective technique for our application. The latter was then chosen to further graft EGF on the CS. Complementary biological assays such as cell growth, cell resistance to apoptosis, and actin/vinculin staining through immunohistochemistry were then conducted on rat VSMC to confirm the bioactivity of the CS+EGF coating.

5.2.4 Materials and methods

5.2.4.1 Chemicals and reagents

Poly(ethylene terephthalate) (PET), in the form of 50 μm -thick film, was purchased from Goodfellow (Huntingdon, England). Chondroitin-4-sulfate (CS), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS) and 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada). Recombinant human EGF was obtained from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA) and the EGF receptor (EGFR) inhibitor, PD153035, from Calbiochem (San Diego, CA, USA).

5.2.4.2 Cell culture

For cell culture experiments, A7R5 cells (under 20 passages), a clonal smooth muscle cell line from rat embryonic thoracic aorta (ATCC, Manassas, VA), were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F-12 Ham's Medium (DMEM/F12; Gibco BRL, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; MEDICORP, Montreal, QC, Canada) and 1% penicillin-streptomycin (PS, Gibco BRL, Invitrogen, Grand Island, NY, USA). RPMI medium (Gibco BRL, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) was used for serum-free (SS) cell culture experiments. Propidium Iodide (PI, Molecular Probes, Invitrogen, Grand Island, NY, US) and Hoechst 33342 (HT, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) were used for apoptosis assays. Costar[®] (Corning Life Sciences, Acton, MA, USA) tissue culture polystyrene (TCPS) 24-well plates were used as control in cell experiments.

5.2.4.3 PET surface modification

5.2.4.3.1 Low-pressure plasma polymerization (L-PPE:N)

LP coatings were deposited on PET films with a low-pressure radio-frequency (r.f.) glow discharge, as previously detailed in [79]. Briefly, PET samples were first introduced into a cylindrical aluminium/steel reactor chamber, then evacuated to a base pressure of $< 10^{-4}$ Pa. Mixtures of anhydrous ammonia (NH_3) and ethylene (C_2H_4) (of 99.9% and 99.5% purity, respectively; Air Liquide, Montreal, QC, Canada) were admitted into the chamber using electronic flow meter/controller and a 'shower head' gas distributor, at flow rates of 15 and 20 standard cubic centimeters per minute (sccm), respectively; the corresponding gas flow ratio, R ($\equiv F_{\text{NH}_3} / F_{\text{C}_2\text{H}_4}$), was 0.75. The use of $R = 0.75$ was based on our recent stability studies of LP coatings in air and, more important, in aqueous solvents [80], where the resulting coating was found to be quasi-insoluble. The pressure during plasma operation was set and maintained constant at 80 Pa, and the power at 10 W, resulting in a negative d.c. bias voltage of $V_B = -40$ V. The time of deposition was set so as to obtain ca. 120 nm-thick coatings.

5.2.4.3.2 Atmospheric-pressure plasma polymerization (H-PPE:N)

HP coatings were deposited on PET films with an atmospheric-pressure, dielectric barrier discharge (AP-DBD) apparatus, as described elsewhere [79, 187]. Briefly, PET samples were placed on a 2 mm thick glass plate, between a cylindrical dielectric-coated stainless steel high voltage (HV) electrode and a planar Al electrode; the glass plate served as a second dielectric layer, leaving a discharge gap of 1 mm. The precursor gas mixture of ethylene and nitrogen (N_2) (of 99.9% and 99.998% purity, respectively; Air Liquide, Montreal, QC, Canada) was introduced by a gas diffuser. Flow rates were kept constant at 50 sccm and 10 standard liters / min (slm) for C_2H_4 and N_2 , respectively. A plasma zone of approximately 1 cm width was generated, using a commercial HV power source and transformer at a typical frequency of 10 kHz and peak-to-peak voltage of 18 kV. The

substrate was made to move back and forth under the HV electrode at precisely controlled speed of 10 mm/s for about 20 cycles, so as to obtain a film thickness of ca. 120 nm.

5.2.4.3.3 Plasma functionalization

Surface modification (functionalization) of PET surfaces was achieved by way of NH₃ plasma treatment in the same chamber, and using the same power and pressure conditions as those employed for LP deposition. In analogy to the symbols LP and HP, functionalized PET will henceforth be referred as PETf, to shorten the text. The obvious difference between plasma treatment and the deposition of LP coatings resided in the use of only anhydrous ammonia as the reagent gas: hereby amine groups were grafted to the PET surface, but no new material was added to it (unlike the case of LP coating). The NH₃ flow rate was kept constant at 20 sccm. As just stated, ammonia plasma treatment is known to create new functional groups on the PET backbone, for example, primary amines, imines, and nitriles [188]. Samples that were aged for one day in ambient air were used for subsequent experimental steps, because they had to be transported across town to another laboratory.

5.2.4.4 CS and EGF immobilization

The immobilization of CS and EGF on LP, HP and PETf surfaces was achieved through EDC/NHS chemistry, as optimized and described previously [177]. Briefly, treated surfaces were exposed to a 1% w/w CS solution, containing 40% v/v ethanol, 50 mM MES, EDC (EDC/COOH: 1) and NHS (NHS/EDC: 0.2) for 60 min at room temperature. All surfaces were thoroughly rinsed with PBS (2 min) and Milli-Q water (2 x 2 min) in an ultrasonic bath, in order to remove any unbound CS. EGF was then covalently bonded to the grafted CS using the same coupling reagents. The CS-modified surfaces were exposed to an aqueous solution containing 40% v/v ethanol, 22.8 mM EDC and 4.6 mM NHS, for 15 min at room temperature, to activate the carboxylic acid groups of CS. The surfaces were rinsed with Milli-Q water to remove residual EDC/NHS and to avoid possible intra-

molecular bonding of EGF. A 100 mM aqueous solution of EGF was then applied to the CS-modified surfaces for 60 min at room temperature. Then, the surfaces were rinsed once with PBS 1x and twice with Milli-Q water. For cell experiments, all surfaces were immersed in a solution of 70% v/v ethanol and then in sterile water prior to testing.

5.2.4.5 Physical and chemical surface characterizations

5.2.4.5.1 X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

Surface compositions were characterized using X-Ray photoelectron spectroscopy (XPS) analyses, performed in a VG ESCALAB 3MkII instrument, using non-monochromatic Mg K α radiation. Spectra were acquired at 0° emission angles (i.e. normal to the surface), and charging was corrected by referencing all peaks with respect to the carbon (C1s) peak at binding energy, BE=285.0eV. For elemental compositions, the quantification was performed on broad-scan spectra using Avantage v4.12 software (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA), by integrating the area under a specific peak after a Shirley-type background subtraction, and by using the sensitivity factors from the Wagner table. Three surfaces were analyzed for each condition.

The primary amine concentrations, [NH₂], on the modified or coated PET surfaces were determined with the help of a selective derivatization reaction, namely, with 4-(trifluoromethyl)benzaldehyde vapor (TFBA, Alfa Aesar) [79, 80, 187]. TFBA was thereby covalently bonded to primary amines via imine bonds. The [NH₂] values could then be deduced from fluorine concentrations [F] at the surface, also via XPS analyses. CS concentrations were evaluated by measuring the atomic concentrations of sulphur at the surfaces (since CS contains one sulfate group for each disaccharide unit [12]).

5.2.4.5.2 Static water contact angle goniometry (WCA)

The wettability of the various coatings was measured by way of the static contact angle, with a FTA200 goniometer (First Ten Ångstroms, Portsmouth, VA, USA) equipped

with a data analysis software package (FTA32 Video). Three measurements were taken on each surface using Milli-Q water as the probe liquid. Three surfaces were prepared for each condition.

5.2.4.5.3 Scanning electron microscopy (SEM)

A JEOL model 'JSM-7600 TFE' field-emission scanning electron microscope was used to assess surface morphology. Images of both LP and HP with or without CS were acquired and analyzed, in order to evaluate whether or not CS immobilization altered the surface morphology of the PP-coated surfaces.

5.2.4.5.4. Stability of the coatings

Dissolution of CS coatings in physiological buffer

The stability of CS coatings on treated PET surfaces was evaluated by quantifying CS released into solution with dimethylmethylene blue (DMMB) assay [171]. Samples were immersed in 500 μ l of PBS 1x for 24 h, 48 h, 1, 2, 3 and 4 weeks at 37°C. A sealed 24-well plate was used for the experiment. Three different samples were analyzed for each condition and duration. After each immersion time, PBS was recovered in separate micro-centrifuge tubes and frozen for further analysis. A DMMB solution was prepared by mixing 8 mg of DMMB in 500 ml of an aqueous solution containing 40.5 mM NaCl, 40.5 mM glycine and 9.5 mM HCl [171]. For the quantification, 10 μ l of each sample was mixed with 250 μ l of the DMMB solution in a 96-well plate, and the absorbance was read at λ_{525} . CS concentration was calculated from a calibration curve obtained through linear regression of samples with known CS concentrations.

Stability of the LP and HP coatings during CS grafting

To assess the stability of the plasma polymerized coatings during CS grafting, the thicknesses of the coatings were measured by ellipsometry after exposure in the CS immobilization solutions described in section 5.2.4.4. For comparative purposes, the

coatings were also immersed for 60 min in different aqueous solutions such as pure water, PBS, and immobilization solution without CS (brought to a pH value of 5.5, similar to the immobilization conditions, to avoid any bias resulting from differing pH) as described in Table 1. The dry thickness of each sample was measured before and after immersion with a spectro-ellipsometer (Model M2000, J.A. Woollam Co., Inc., Lincoln, NE, USA) equipped with data acquisition software (Complete EASE). The measurements were performed at room temperature with a 75° angle of incidence and data were acquired within a wavelength range of 245-1650 nm. A refractive index of $n = 1.465$ [182] with a Cauchy model was used for the measurements. Three measurements were taken on each surface. The dry thickness was obtained using the WVase 32 analysis software package.

Stability of coatings in air and the ability to graft CS

CS was immobilized on coatings left in ambient air for different durations after plasma modification, starting immediately after modification and up to one week. The sulfur content on the surfaces was measured by XPS, as described in section 2.5.1 and results were compared with one another to verify that the modified PET was indeed stable enough to immobilize CS after one week of storage.

Tableau 5: Solutions used for assessing the stability of the different coatings

Conditions	Aqueous solutions						
	MES (50 mM)	EDC (21.8 mM)	NHS (4.6 mM)	CS (1% w/v)	EtOH (40% v/v)	Milli-Q	PBS 1X
1	✓	✓	✓	✓	✓		
2	✓	✓	✓		✓		
3						✓	
4							✓

5.2.4.6 Biological characterization

5.2.4.6.1 Cell growth

VSMC were incubated on each surface for 4 h at 37°C and 5% CO₂ with an initial cell density of 1×10^5 cells/ml, in 200 µl of normal medium (N, DMEM/F12 medium supplemented with 10% FBS and 1% PS). Cloning cylinders were used to limit the area and to retain the films at the bottoms of the wells. After 4 h of adhesion, cloning cylinders were removed, the surfaces were washed once with PBS 1x to remove non-adherent cells, and cells were then left to grow for 1, 4 and 7 days at 37°C and 5% CO₂ in 500 µl of N medium. The medium was changed every 2 days. Adherent cells were coloured with a 0.075% w/v crystal violet solution for 15 min, rinsed 3 times with Milli-Q water and dried at room temperature. Images were captured by optical microscopy and cells were counted. Three images were taken per surface, with a minimum of 4 samples per condition, and each experiment was performed in duplicate. The cell growth cell growth rate was calculated as a ratio of the cell count after each time interval over the initial cell count after 4 h of adhesion.

5.2.4.6.2 Cell apoptosis

Resistance to apoptosis for cells adhered on bare and coated PET was tested as follows: cells were left to adhere and grow until 80% of confluence on each surface. They were then washed with PBS to remove any trace of growth factor from the medium. Half of the surfaces were exposed to normal medium, the other half to SS medium (RPMI without serum or growth factors) for 6 or 24 h, to provoke apoptosis [120]. To assess the extent of apoptosis, VSMC were stained with HT/PI: 1 µg/ml of HT was incorporated in the medium of each condition and incubated for 10 min at 37°C. Cells were washed with PBS to prevent further intake of HT. A 5 µg/ml solution of PI in PBS was added to each condition. Images were captured through fluorescence microscopy with an excitation filter of 360-425 nm. HT/PI staining made it possible to distinguish between viable, primary necrotic, early apoptotic and late apoptotic cells, as described previously [177]. The proportion of

apoptotic cells was calculated for each condition. The number of residual cells after 24 hours in SS medium was also compared to the number of cells in N medium for each condition and was designated as cell loss. Since SS medium mostly incites cell apoptosis, cell loss was considered an indicator of cell apoptosis as well. Three images were taken per surface, with a minimum of 4 samples per condition and each experiment was performed in duplicate.

To determine whether CS could maintain its bioactivity after EGF grafting, similar tests for cell apoptosis were performed after blocking EGF-receptors (EGFR) on VSMCs. PD153035, a chemical EGFR inhibitor, was shown to successfully suppress the EGFR-dependent anti-apoptotic response in human mesenchymal stem cells, [122] and it was thus chosen for this study. Therefore, PD153035 was incorporated into the media at a concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$. First, the inhibitor was added in the medium 1 hour prior to cell seeding. Cells were left to grow in the presence of the inhibitor. Then, the same method as described in the previous section was used for assaying cell apoptosis, using SS medium for 24 h in the presence of PD153035 (1 $\mu\text{g/ml}$).

5.2.4.6.2 *Staining of actin, vinculin and nuclei*

Cell phenotype and focal adhesion were studied for each surface by immunostaining. After 4h of adhesion and 7 days of cell growth, VSMC were fixed with a 4% w/v solution of para-formaldehyde for 10 min at room temperature and rinsed with PBS. The cells were permeabilized with 0.4% v/v Triton X100 for 10 min and rinsed with PBS. A 10% goat serum solution in 0.1% v/v Triton X-100 / PBS was used as blocking agent. Vinculin staining was carried out with mouse anti-vinculin primary antibody (1/100 dilution, MAB3574, Millipore) and donkey anti-mouse Alexa 555 secondary antibody (1/500 dilution, A21127, Molecular Probes). After each antibody addition, cells were incubated for 1 h and rinsed with blocking solution. Actin staining was achieved by incubating phalloidin-Alexa 488 (1/40 dilution, A12379, Molecular Probes) in PBS for 50 min. Nucleus staining was achieved by adding 10 μl of Hoechst solution (5 $\mu\text{g/ml}$),

followed by a 10-min incubation. Surfaces were washed with PBS and transferred to microscope slides. Fluoromount was used as a mounting medium. Once dried, the samples were observed by fluorescence microscopy.

5.2.4.7 Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analysis was carried out using independent two-sample *t*-test with equal variances following ANOVA with Tukey's post hoc analysis. A *p* value < 0.05 was considered significant for all tests.

5.2.5 Results

5.2.5.1. CS grafting on LP, HP and PETf surfaces

5.2.5.1.1 Physical characterization

PET needs to be modified in order to graft biomolecules such as CS. Three different techniques were implemented here to create primary amine groups on PET surfaces, namely low- and atmospheric- pressure plasma polymerization, yielding LP and HP coatings, respectively, and NH_3 plasma functionalization (yielding PETf). CS was immobilized on each of these amine-containing surfaces. WCA and XPS data relating to untreated PET, LP, HP and PETf, with or without CS, are presented in Table 2. All modified surfaces were found to be more hydrophilic (lower WCA) than pristine PET films, the apparent effect being much more pronounced for PETf than for LP or HP. CS grafting was observed to significantly lower the WCA on LP and PETf, as expected, but it increased on HP.

XPS survey spectra allowed us to compare the elemental compositions of all surfaces, in order to confirm amination of the PET (based on measurements of [N] and $[\text{NH}_2]$) and grafting of CS (deduced from [S]). The data are presented in atomic % (at. %), based on 100 atoms of C, N and O (and S when present on the surface). The measured elemental composition of pristine PET agreed with the “theoretical” values (71.4 at.% C, 28.6 at.% O), calculated from its chemical structure ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$). Substantial net increases in nitrogen content, [N], were noted on LP, HP and PETf surfaces (of course, none detected on PET), as previously reported ([79, 186]). Grafting of primary amines $[\text{NH}_2]$ was also unambiguously confirmed on each surface by TFBA derivatization. While [N] was higher on HP (~ 16 at. %) than on LP (~ 15 at. %) and PETf (~ 12 at. %), $[\text{NH}_2]$ was higher on the LP surface (~ 7.5 at. %), than on the other two (~ 5 at. %). In-depth characterization of HP and LP coatings’ by a variety of techniques (NEXAFS, XPS and IR) [79, 80] have shown that these coating comprise several types of N-functionalities, namely amines, imines,

nitriles, and amides. Among the three surfaces, the so-called amine-selectivity, ($[\text{NH}_2]/[\text{N}]$), a key parameter, was found to be highest on LP. Oxygen [O] was also observed on the three treated surfaces. HP and LP incorporate bound oxygen, [O], due to reactions between free radicals or unstable functional groups and atmospheric oxygen [80].

Tableau 6 : Hydrophilicity and chemical compositions of pristine and modified PET surfaces, obtained by WCA and XPS measurements respectively (n = 3)

<i>Surfaces</i>	WCA (°)	XPS					N/C	[NH ₂] (at. %)
		C 1s (at. %)	O 1s (at. %)	N 1s (at. %)	S 2p (at. %)			
<i>PET</i>	71.0 ± 2.1	70.3 ± 0.1	29.7 ± 0.1	ND	ND	N/A	ND	
<i>LP</i>	66.8 ± 1.4	79.2 ± 0.6	6.0 ± 0.2	14.8 ± 0.5	ND	0.19 ± 0.01	7.5 ± 0.2	
<i>LP/CS</i>	61.1 ± 0.7	67.9 ± 0.6	17.1 ± 0.2	14.7 ± 0.5	0.3 ± 0.0	0.22 ± 0.01	ND	
<i>HP</i>	63.2 ± 1.4	76.7 ± 0.5	7.2 ± 0.4	16.2 ± 0.1	ND	0.21 ± 0.00	5.1 ± 0.2	
<i>HP/CS</i>	66.7 ± 1.6	67.5 ± 0.3	19.5 ± 0.2	12.1 ± 0.3	1.0 ± 0.1	0.18 ± 0.00	ND	
<i>PET_F</i>	40.2 ± 0.8	64.2 ± 0.4	24.1 ± 0.2	11.7 ± 0.4	ND	0.18 ± 0.01	5.0 ± 0.6	
<i>PET_F/CS</i>	35.4 ± 2.1	65.9 ± 0.6	28.9 ± 0.0	5.2 ± 0.6	0.1 ± 0.1	0.08 ± 0.01	ND	

CS grafting was confirmed by the presence of sulfur, [S], on all treated surfaces (while undetected on any of them prior to CS binding). Interestingly, [S] on HP/CS was more than 3 times and almost 10 times higher than that on LP/CS and PETf/CS, respectively. As expected, CS grafting also increased the values of [O] on LP, HP and PETf.

To assay the stability of immobilized CS on LP, HP and PETf, we attempted to quantify the amounts of soluble CS released in PBS at 37°C with DMMB for different time intervals up to 4 weeks. No significant amounts of CS were detected for any of the surfaces, even after 4 weeks of immersion, suggesting that CS was covalently bonded to LP, HP and PETf. In addition, SEM images were acquired for LP and HP before and after CS grafting, to compare surface morphologies (Figure 34). The surface morphology of LP was shown to be smooth, also after CS grafting; on the other hand, HP presented the same rough, “cauliflower-like” surface morphology (Figure 34 C,D) that we had already reported earlier [18].

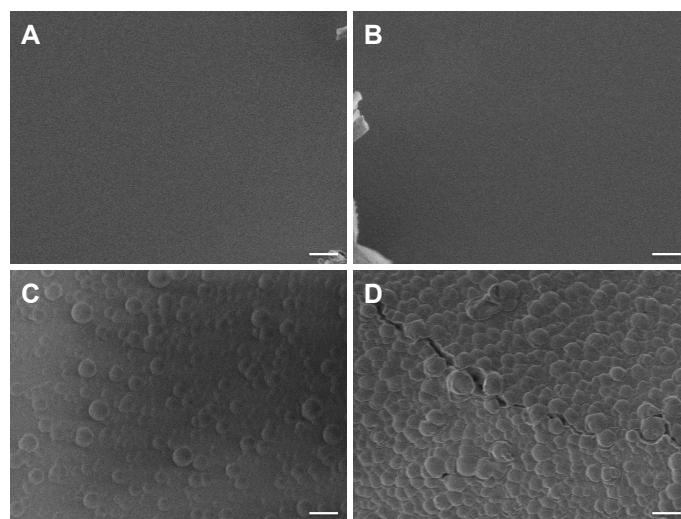


Figure 34 : Field-emission scanning electron microscopy images of A) LP B) LP/CS C) HP C) HP/CS (Scale bars: 1 μm).

5.2.5.1.2 Cell apoptosis

Cell apoptosis was assessed on pristine PET, LP, HP, and PETf surfaces with or without CS after 24 hours in SS medium (SS) (Figure 35). Cells adhering on untreated PET were found to be very sensitive to apoptosis when in SS medium, almost 30% of them being apoptotic ($29.6 \pm 16.5\%$) after 24h. The proportion of apoptotic cells was significantly lower on all of the aminated surfaces: LP ($16.7 \pm 9.2\%$), HP ($19.8 \pm 7.1\%$) and PETf ($9.5 \pm 3.1\%$). CS grafting further decreased cell apoptosis on LP/CS ($3.7 \pm 1.9\%$), and on PETf/CS ($7.1 \pm 1.8\%$), but this further reduction was not observed on HP/CS ($19.5 \pm 8.5\%$). Interestingly, cell apoptosis was significantly lower on LP/CS than on PETf/CS ($p < 1 \times 10^{-5}$). Cell loss during that time was also calculated, by comparing the residual number of cells in SS medium to their counterparts exposed to N medium only (data not shown). Cell loss varied greatly between PET ($75.1 \pm 19.8\%$) and the modified surfaces, LP ($62.6 \pm 16.5\%$), HP ($72.7 \pm 20.7\%$) and PETf ($33.3 \pm 19.2\%$). Similar to cell apoptosis, cell loss was lower on LP/CS ($28.8 \pm 11.2\%$) and PETf/CS ($12.1 \pm 35.3\%$), but higher on HP/CS ($77.3 \pm 35.0\%$). Based on these results and on the versatility of the LP coating procedure, LP was selected for all further studies.

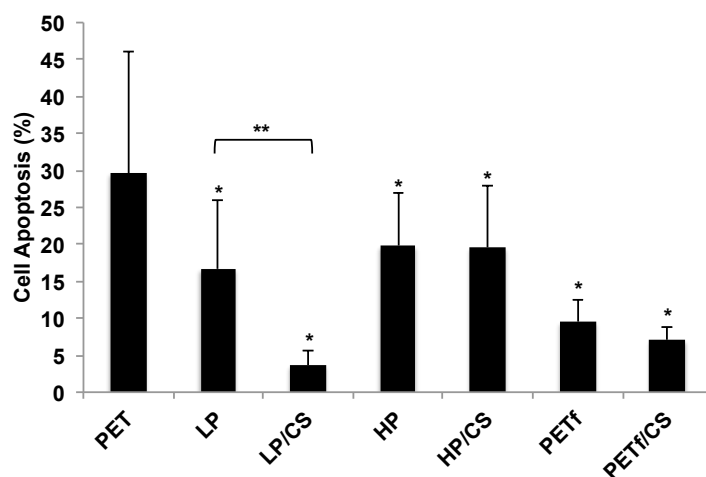


Figure 35 : Cell apoptosis on PET, LP, LP/CS, HP, HP/CS, PETf and PETf/CS in serum-free medium after 24 h. Proportions of apoptotic cells were significantly lower on all surfaces compared with PET (* $p < 0.001$). CS grafting also decreased cell apoptosis on LP (** $p < 1 \times 10^{-6}$). Cell apoptosis was significantly lower on LP/CS compared with PETf/CS ($p < 1 \times 10^{-5}$) ($n \geq 6$).

5.2.5.2 CS and EGF grafting on LP

5.2.5.2.1 Stability of LP

One of the main advantages of using plasma polymerization over simple plasma functionalization is the enhanced surface stability and reduced ageing [80]. We therefore investigated whether CS could be grafted on LP for up to seven days after coating deposition. XPS survey spectra (data not shown) indeed demonstrated that [S] after CS grafting on LP was constant throughout that time interval (*i.e.* immediately following deposition, up to and including one week after deposition).

Even though LP had already been shown to be stable in aqueous solutions, it was felt that the conditions used for CS grafting might potentially affect the coatings' stability, because the solutions are acidic and contain cross-linking agents during grafting with

EDC/NHS chemistry. By measuring the dry thickness after immersion via ellipsometry we were able to assess possible partial dissolution of LP in various aqueous solutions (Figure 3). LP thicknesses prior to and after immersion in water or PBS did not differ significantly. A significant loss in LP thickness (12.5 ± 4.1 %, corresponding to approximately 15 nm) was measured after 60 min in MES+EDC+NHS (designated Sol 2); the grafting solution with CS (Sol 1), however, led to no net loss in thickness ($p = 0.88$). We had previously shown that CS grafted onto aminated glass slides increased the overall coating thickness by ca. 0.81 nm [177], while the diameter of the CS molecule in solution was estimated to be 1.2 nm [189]. Therefore, one may conclude that grafted CS can totally block, or at least significantly impede the dissolution of LP. Altogether, it was judged that LP could be considered stable in the grafting solution in the presence of CS.

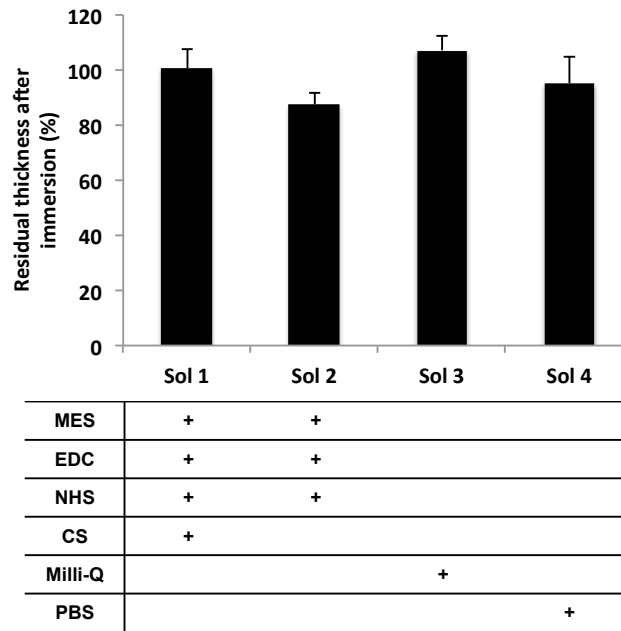


Figure 36 : Residual thickness of LP coating after immersion in MES+EDC+NHS+CS (Sol 1), MES+EDC+NHS (Sol 2), Milli-Q water (Sol 3), and PBS 1x (Sol 4) for 60 min. Residual thicknesses were calculated from initial thickness measurement of LP (100%) and final measurements after immersion.

5.2.5.2.2 Bioactivity of LP/CS+EGF coating

Cell growth and morphology

Cell growth on each of the surfaces investigated, expressed as the cell count ratio with respect to that after 4h adhesion, are presented in Figure 4. VSMC growth on LP/CS+EGF coatings was significantly higher than on all other surfaces tested (including TCPS positive control) after 4 and 7 days ($p < 0.005$). Moreover, cell counts on LP/CS+EGF were more likely underestimates, since multi-layers of cells could be observed on these latter surfaces. Increased cell numbers and the presence of multi-layers on LP/CS+EGF compared to LP/CS strongly suggest that EGF grafting was effective.

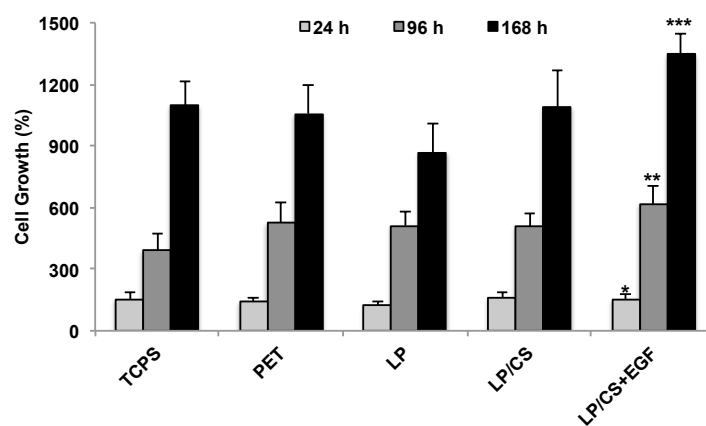


Figure 37 : VSMC growth on TCPS, PET, LP, LP/CS and LP/CS+EGF. The graph presents cell counts on each surface, after 24, 96 and 168 h, after normalization to their respective initial cell count, i.e., after 4 h of cell adhesion ($n = 8$). Cell growth was significantly more important on surfaces where CS and EGF were both grafted (* $p < 0.005$ compared to LP at 24 h, ** $p < 0.005$ compared to all surfaces at 96 h and *** $p < 0.005$ compared to all surfaces at 168 h).

Immunostaining of actin, vinculin and nuclei in VSCM, performed after 4 h of cell adhesion and 7 days of cell growth, are presented in [Figure 5](#). VSMC on LP/CS contained more actin than cells grown on PET, LP or even LP/CS+EGF surfaces, both after 4 h and 7 days. Vinculin staining after 4 h, a marker of focal adhesion, was more concentrated at the cell-edges for the case of LP/CS+EGF, and near the nucleus for that of LP. After 7 days, vinculin staining results were very similar and relatively uniform for all cells grown on LP/CS and on LP/CS+EGF. However, differences were observed for PET, where vinculin intensity was greater near the nucleus, and LP, where it was intense throughout the cells' extents.

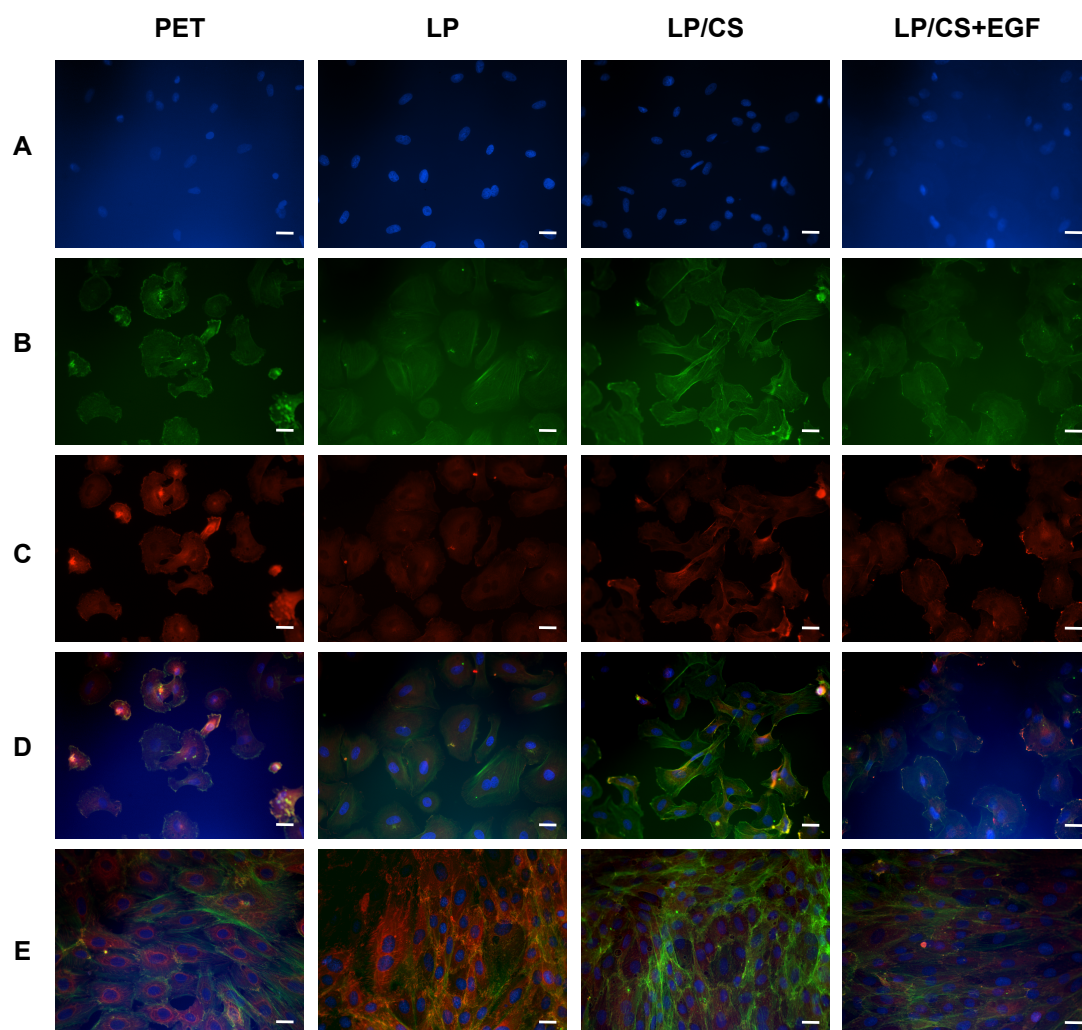


Figure 38 : Actin, vinculin and nucleus staining of VSMC on PET, LP, LP/CS and LP/CS+EGF (Scale bars: 100 μm). Nucleus (blue / row A) was stained with HT, actin (green / row A) with phalloidin-Alexa 488 and vinculin (red / row B) with mouse anti-vinculin (primary antibody) + anti-mouse Alexa 555 (secondary antibody) and after 4 h of cell culture. Rows D and E represent a merge of actin, vinculin and nucleus staining after 4 h and 7 days of cell culture.

Resistance to apoptosis

Cell apoptosis in SS medium was assessed after 6 and 24 h (Figure 39). Once again, apoptosis of VSMCs adhering on PET surfaces attained higher levels than in the case of cells on TCPS. LP coating on PET significantly decreased apoptosis; moreover, CS and CS+EGF grafting further decreased the proportion of apoptotic cells, compared with LP alone: In both cases and after both time intervals, apoptosis decreased significantly compared with LP, PET and TCPS. However, no significant differences were observed between LP/CS and LP/CS+EGF in terms of percentage of apoptotic cells after 6h ($p = 0.94$) or 24h ($p = 0.42$). On the other hand, differences in cell numbers and morphologies were observed between the two coatings after 24 h in SS medium, cell loss being lower on LP/CS+EGF ($28 \pm 35\%$) compared to LP/CS ($38 \pm 18\%$), although not significantly. The number of lost cells, when normalized to their number cultured in normal medium on either surface, indicated significantly lower depletion on LP/CS+EGF compared with LP ($57 \pm 11\%$) and PET ($68 \pm 20\%$) ($p < 1 \times 10^{-5}$). The anti-apoptotic effect of CS+EGF is illustrated in Figure 40.

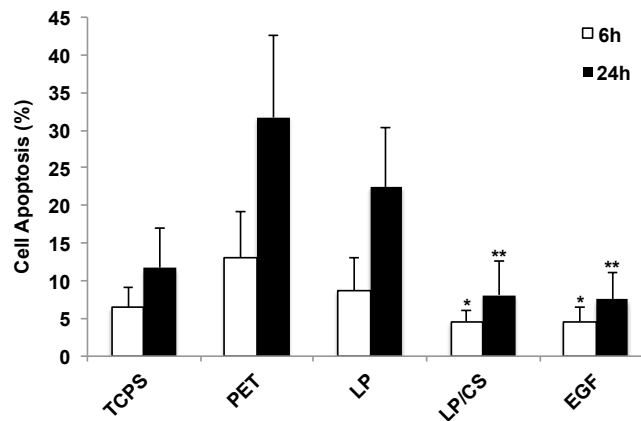


Figure 39 : Cell apoptosis on TCPS, PET, LP, LP/CS and LP/CS+EGF in SS medium after 6 and 24 h. Proportion of apoptotic cells was significantly higher on PET compared to all the surfaces ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$ after 6 and 24 h respectively). Cell apoptosis on

LP/CS and LP/CS+EGF was significantly lower compared to LP after at 6 h (* $p < 0.002$) and 24 h (** $p < 1 \times 10^{-16}$) ($n \geq 8$).

To further evaluate the impact of immobilized EGF, a chemical inhibitor, PD153035, was used to block EGF receptors on VSMCs during the apoptosis assay. VSMCs were also grown on LP/CS+EGF coatings in the presence of the inhibitor. PD153035 was added to the SS medium to inhibit the effect of EGF on cell apoptosis. The proportion of apoptotic cells in the presence of the EGFR inhibitor remained the same ($7.3 \pm 2.8\%$) as for LP/CS ($p = 0.42$) and LP/CS+EGF ($p = 0.82$). Figure 40 illustrates the morphology of VSMC on LP/CS, LP/CS+EGF, and LP/CS+EGF with PD153035. After 24h in SS medium, cells present on LP/CS+EGF with PD153035 resembled those on LP/CS, with larger nuclei, while a significantly more important cell loss ($47 \pm 13\%$) was also observed when compared with LP/CS+EGF alone.

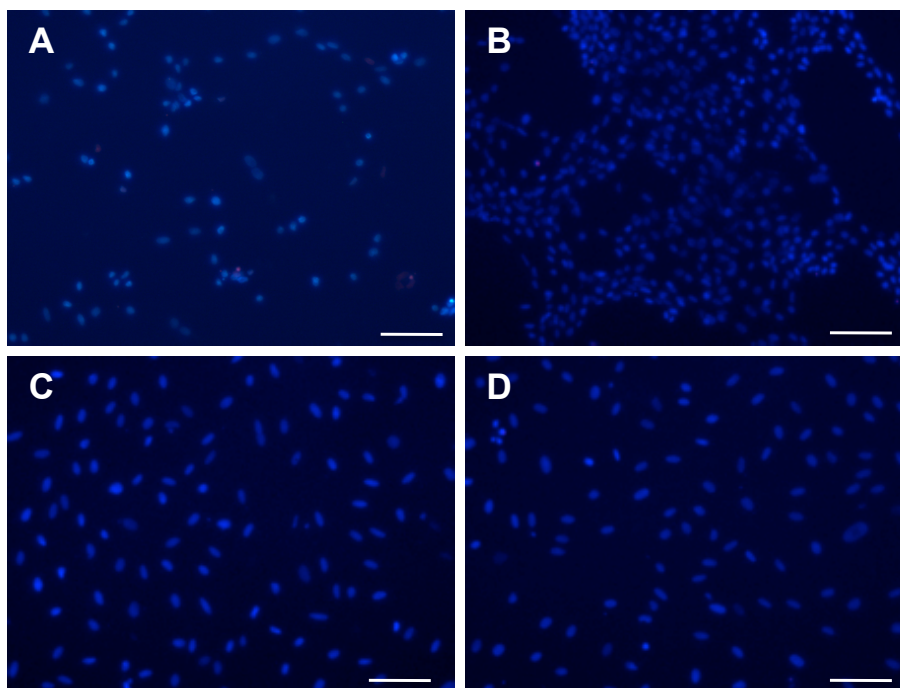


Figure 40 : HT/PI staining of VSMC after 24 h in SS medium on A) PET B) LP/CS+EGF and C) LP/CS (Scale bars: 100 μm). The experiment was also conducted on D) LP/CS+EGF with VSMC exposed to PD153035 a chemical inhibitor of EGFR.

5.2.6 Discussion

The ability of PET to promote cell adhesion, -growth and -survival is known to be limited; therefore, several types of surface modifications, with or without immobilization of bio-molecules, have previously been reported [74, 75, 85, 190]. In the present study, we have investigated a new bioactive coating specifically designed to counteract the pro-apoptotic environment found around SG after EVAR. The limitations of PET in this application emerge clearly from the high level of apoptosis obtained when VSMC adhered to PET are subjected to SS medium, a condition that mimics the lack of nutrients in AAA after SG deployment. In our recent study [177], the immobilization of CS and EGF on aminated glass slides was shown to significantly stimulate cell growth and to reduce cell apoptosis. In the present work, we examined whether such coatings might be successfully implemented on PET, and whether they maintained bioactivity and improved VSMC behaviour compared with untreated PET.

In order to covalently immobilize CS on PET, primary amine functional groups first had to be created. This can be achieved in several ways, including wet chemistry, such as grafting of macromolecules; or by means of plasma-based techniques, UV irradiation, -spraying, ion implantation, and plasma polymerization [191, 192]. Plasma techniques offer several advantages over others. Most important, they enable one to specifically functionalize a wide variety of different materials in a reproducible manner [73]. Beside their versatility and flexibility, they have also proven to be economically and ecologically advantageous [193]. However, plasma-functionalized surfaces tend to undergo rapid loss of surface-near functional groups (hydrophobic recovery) [73]. Over the past few years, these laboratories have optimized new plasma- and photochemical polymerization methods for creating stable coatings with high concentrations of nitrogen functionalities, in particular primary amines [65, 78-80, 187]. Plasma polymers tend to be highly cross-linked, which minimizes so-called hydrophobic recovery (time-dependent loss of polar groups from the surface). Plasma polymerized (PPE:N) coatings therefore tend to be more stable, less prone to ageing in air and aqueous solutions than plasma-functionalized surfaces.

In this study, two types of plasma polymers (LP, HP) were compared with an ammonia-plasma functionalized surface (PETf) for their ability to permit CS grafting and the creation of bioactive surfaces [79, 186]. All techniques enabled to create primary amines on PET surfaces, LP reaching higher density than the other two. The presence of bound sulfur, [S], after CS grafting unambiguously confirmed covalent immobilization of CS molecules onto PETf, LP and HP surfaces, but with evident differences in concentrations (0.1, 0.3 and 1 at.%, respectively), [S] being the lowest on PETf. While LP contained more [NH₂], it was expected to allow more CS to be grafted, but [S] values indicate instead that more CS was immobilized on HP. This might conceivably be explained by the rough morphology and larger surface area of HP, as illustrated in Figure 34 C,D, compared with the very smooth surfaces of LP and PETf. Sizeable increases in [O] on each surface (Table 2) further confirmed the surface-grafting of CS molecules, because the latter contain 14 O atoms per disaccharide unit. Even more additional confirmation of CS immobilization comes from observed decreases in WCA for the cases of LP and PETf surfaces: CS, a strongly hydrophilic polysaccharide with an overall negative charge, is indeed expected to increase the surface's wettability after grafting. However, in the case of CS-grafted HP, WCA was seen to rise from 63° to 67°. This is most probably associated with its above-mentioned rough surface morphology, well-known to drastically affect contact angle measurements [194].

CS grafting on HP was found not to reduce VSMC apoptosis induced by SS medium. This result led us to eliminate HP as a candidate-substrate for CS grafting through EDC/NHS. In sharp contrast, CS grafting on LP and PETf led to significant reductions in cell apoptosis, as previously observed for the case of CS immobilized on aminated glass [177]. Cell resistance to apoptosis was significantly ($p < 1 \times 10^{-5}$, *t*-test) greater for the case of LP/CS (3.7% of apoptosis) than for PETf/CS (7.1 %), a difference that might be attributable to the fact that the former contains more CS than the latter, but this remains to be confirmed. Because LP is a versatile coating that can readily be deposited on most

biomaterial surfaces, for example even on PTFE [31], we therefore chose LP surfaces to further study CS+EGF grafting.

First, we demonstrated the stability of the LP/CS coating. Although $[\text{NH}_2]$ on LP had been shown to decrease during the first few days after deposition (presumably by conversion of amines into amides [79]), the efficiency of grafting CS was found to be unaffected even after 1 week, as demonstrated by $[\text{S}]$ measurements. The time-dependent stability LP/CS coating was also shown to be excellent, since no trace of CS was found after 4 weeks in physiological buffer at 37° . We conclude that low-pressure plasma polymerization followed by CS grafting resulted in a stable coating; EGF was then grafted on LP/CS and its bioactivity was assessed by cell growth assay.

EGF grafting on LP/CS significantly increased cell growth, although to a lesser extent than previously reported for the case of aminated glass slides [177]. The concentrations of EGF on these two surfaces were not compared and at this stage, it is difficult to determine whether the above-described observations are due to differences in concentrations or in bioactivities of the immobilized EGF. LP contains more primary amines than the aminated glass slides ($[\text{NH}_2] \sim 3\%$ for the latter, unpublished data), and it should enable more CS to be grafted, hence higher amounts of bound EGF. However, while we assumed that CS constituted a monolayer, a macromolecular LP network could be more complex and result in a lesser number of accessible COOH groups for EGF grafting. Effective grafting of EGF was also confirmed by differences in cell morphologies between LP/CS and LP/CS+EGF VSMCs cultured on LP/CS contained more actin filaments, both after 4 h and 7 days, suggesting a more contractile phenotype on LP/CS and a more “proliferative” phenotype on LP/CS+EGF. Such phenotypic modulation of VSMCs on these surfaces is the object of an ongoing study.

Addition of EGF on LP/CS did not further decrease the number of apoptotic cells on the surface after incubation in SS medium but decreased cell loss, although not significantly. Moreover, the presence of EGFR inhibitor (PD153035) did change VSMC growth and nuclear morphology on LP/CS+EGF. As a matter of a fact, cells grown on

LP/CS and on LP/CS+EGF with PD153035 presented the same morphologies and contained roughly the same numbers of cells. VSMCs grown in the presence of the inhibitor were more strongly depleted in SS medium after 24 hours than cells grown in the absence of inhibitor. Altogether, these results strongly suggest that CS is still recognized by VSMCs after EGF grafting, and that EGF does not interfere through steric hindrance, but they do not shed light on whether CS alone or both molecules are responsible for the observed reductions in cell apoptosis.

Improving VSMC and fibroblast growth at the external surface of SG to improve their fixation and sealing with the aorta is critical to the long-term success of EVAR. Yet very few studies so far have reported surface modifications of SG [68, 183, 195], and to the best of our knowledge, none of them aims to counteract the apoptosis-related depletion of VSMCs in AAA. Although untreated PET does allow cell growth, cells adhered on this polymer are very sensitive to apoptosis and prone to depletion when cultured in SS medium, as shown here and in previous research [65]. In this current work we showed that LP/CS+EGF coatings significantly decreased cell apoptosis induced by SS medium, when compared with untreated PET and even with TCPS (positive control). Furthermore, we have demonstrated that this promising coating can be incorporated onto realistic biomaterial surfaces (i.e. PET) and that it retains key characteristics that are important to promote vascular repair in an apoptotic environment. Further validation of the coatings on actual SG will require its testing on woven PET, along with the use of human aortic VSMCs. In those endeavours, the apparatus and protocols used for LP deposition can readily be transferred to 3D SG surfaces of different materials (PET or ePTFE).

5.2.7 Conclusions

A new bioactive coating incorporating CS, an extracellular matrix component recently shown to induce a state of resistance to apoptosis in VSMC, and EGF was successfully created on polymeric PET surfaces. The coating significantly increased VSMC growth and resistance to apoptosis. While further work is needed to fully understand the cell mechanisms involved and to evaluate its applicability to human cells, the LP/CS+EGF coating appears to be a promising candidate for SG coating, as well as for other applications where resistance to apoptosis is an important challenge, such as in 3D matrices for tissue engineering. In the context of EVAR, this coating could thus counteract vascular cell depletion at the aortic neck and stimulate proper cell growth and sealing between the SG and the aortic wall.

5.2.8 Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (CHRP grant 351050-2008), the *Fondation des Maladies du Coeur du Québec* (FMCQ), and the Canada Research Chairs on endovascular implants and biomaterials (S.L.) and protein-enhanced biomaterials (G.D.C.). We also acknowledge full scholarship grants (to C. C.) from the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec* (FRSQ) and FMCQ. The authors thank Mathilde Soulez and Benoît Liberelle for their help or advice during the experimental work, and Janet Crosby (CRCHUM) for fluorescence microscopy.

Chapitre 6: Discussion et recommandations

La guérison inadéquate autour des SG s'avère être l'un des principaux facteurs d'échec reliés à EVAR et afin d'en assurer le succès, un joint hémostatique entre l'endoprothèse couverte et la paroi aortique doit se développer. Cette thèse visait donc à développer un revêtement bioactif pour la surface externe des SG favorisant la croissance de cellules musculaires lisses vasculaires et des fibroblastes, afin d'obtenir l'incorporation de la prothèse dans les tissus environnants.

Tel que mentionné dans la revue de littérature, le SG déployé dans un anévrisme de l'aorte abdominale constitue un environnement pro-apoptotique par la composition des matériaux polymériques, l'ajout de la prothèse qui réduit l'accès aux nutriments, et finalement le phénotype pro-apoptotique des cellules dans le contexte anévrisimal, créant ainsi une déplétion cellulaire notable. Suite à ces observations, nous avons jugé que la création d'un revêtement anti-apoptotique pourrait favoriser la guérison des tissus aortiques en contrecarrant les caractéristiques pathophysiologiques des anévrismes. L'objectif à long terme de ce projet consistait donc à développer un revêtement anti-apoptotique intégrant des médiateurs connus pour activer les mécanismes de la réparation vasculaire et influencer la résistance à l'apoptose, ainsi que la migration, la prolifération et la différenciation des CMLV et/ou des fibroblastes.

Des études sur le phénomène du remodelage vasculaire, déclenché par des désordres fibroprolifératifs (*ex.* athérosclérose, hypertension, resténose, etc.) et conduisant à un épaississement myointimal, ont mené à la mise en évidence de l'effet anti-apoptotique de plusieurs médiateurs impliqués dans la réparation vasculaire, dont la CS et l'EGF [120, 122, 196]. Dans une approche biomimétique, il s'avérait donc particulièrement intéressant d'utiliser ces médiateurs. Tel que démontré dans la revue de littérature, des essais préliminaires nous ont tout d'abord permis de confirmer l'influence de de la CS et de l'EGF en solution sur la résistance à l'apoptose et la déplétion cellulaire, chez les CMLV de rat. À partir de concentrations de 125 µg/ml et 10 ng/ml, pour la CS et l'EGF respectivement, le taux d'apoptose s'est avéré significativement amoindri par rapport au contrôle négatif, le

milieu sans sérum. De plus, la combinaison de l'EGF à la CS en solution a permis de diminuer significativement la déplétion cellulaire par rapport à la CS seule.

Dans la littérature, il existe peu de données sur l'effet anti-apoptotique de la CS et les mécanismes déclenchés en présence de cette macromolécule en solution. Les travaux de recherche effectués dans les laboratoires du D^r Marie-Josée Hébert ont cependant permis d'identifier que la CS diminuait le taux d'apoptose par la voie de ERK 1/2, chez les CMLV. La présence de la CS a mené à une phosphorylation soutenue de ERK 1/2, en surexprimant ainsi une protéine anti-apoptotique, le Bcl-xL. La présence d'un inhibiteur MAPK, le PD98059, a renversé l'influence de la CS sur l'apoptose chez les CMLV humaines et de rats [196]. D'autres analyses ont également démontré que la CS diminuait l'apoptose chez les fibroblastes, via la voie de PI3K, en surexprimant une fois de plus la protéine anti-apoptotique Bcl-xL et en prévenant la régulation à la hausse de Bim-EL [120].

Dans d'autres équipes, il a été démontré que la CS permettait de diminuer la mort des cellules contenues dans des tranches hippocampiques de rats privées d'oxygène et de glucose [197]. Dans ces conditions, la CS a inhibé la phosphorylation de p38 MAPK, mais sans influence sur l'activation de la voie ERK 1/2. Elle a également inhibé l'activité de l'oxyde nitrique synthétase (NOS), une protéine enzymatique qui produit l'oxyde nitrique (NO), un composé chimique impliqué dans la progression des AAA [198] et dans l'apoptose des CMLV [199].

Dans un autre ordre d'idées, l'efficacité de la CS a clairement été établie dans le traitement de l'arthrose, entre autre par la réduction de l'inflammation dans les jointures et le renforcement des fonctions articulaires [200]. Plusieurs biomatériaux à base de CS ont démontré une efficacité *in vitro* et *in vivo* dans le domaine des cartilages et de l'orthopédie [178, 201, 202]. Dans une étude menée par Campo et al., il a été démontré que la CS diminuait significativement l'inflammation d'un modèle murin de l'arthrite [203]. Il a été illustré que la CS diminuait la production des espèces ROS, inhibait l'activation de NFκB, une protéine régulant également la réponse inflammatoire, et la perte de IκBα, une protéine qui inhibe le facteur de transcription de NFκB. De plus, il a été démontré que la CS

diminuait l'expression des caspases-3 et -7, l'accumulation des polymorphonucléaires et de MMP-13, une collagénase. Il est bien connu que les cellules inflammatoires et espèces ROS participent à l'apoptose des CMLV dans les AAA [204]. La présence de la CS pourrait donc influencer la réaction inflammatoire et ainsi diminuer l'apoptose cellulaire dans un contexte d'AAA. Globalement, tout ceci laisse à penser que la CS constitue une biomolécule bien adaptée pour contrecarrer les mécanismes d'apoptose cellulaire et la progression de la dégénérescence de la paroi anévrismale. L'objectif de cette thèse n'était cependant pas d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués dans cette réponse à la CS, mais bien de démontrer la conservation de la bioactivité une fois greffée et son potentiel pour un revêtement anti-apoptotique.

Bioactivité de la CS greffée

La CS immobilisée sur du verre aminolysé ou des films de PET modifiés par polymérisation plasma à basse pression ou fonctionnalisation, a significativement diminué le taux d'apoptose induit par un milieu sans sérum. Ceci nous a permis de conclure que l'immobilisation de cette macromolécule, par des liaisons amides, permettait de maintenir une bioactivité suffisante pour les CMLV.

Les techniques d'induction de l'apoptose les plus fréquemment utilisées sont l'exposition au TGF- β 1, au milieu sans sérum et à des agents chimiothérapeutiques, comme le cisplatine, l'adriamycine et l'etoposide [205]. Le choix d'utiliser le milieu sans sérum dans notre étude se justifie essentiellement par le fait qu'il reproduit l'environnement pauvre en nutriments des AAA, et qu'il s'agit d'une technique pro-apoptotique classique, couramment utilisée dans nos laboratoires [120, 121, 172]. D'autres stimuli pourraient être utilisés pour reproduire un environnement hypoxique et inflammatoire, comme la culture en conditions hypoxiques et hypercholestérolémiques, ainsi que l'exposition à des cytokines telles que le TNF- α , dont la présence a été notée chez les patients ayant un AAA. Des tests préliminaires ont d'ailleurs été effectués sur le revêtement de CS, après 4 heures dans des conditions hypoxiques (Figure 41). Une fois de plus l'ajout de la CS a significativement diminué le

taux d'apoptose. Il importe de mentionner, par contre, que ce test n'a été effectué qu'une seule fois, et ce sur le PET recouvert de H-PPE:N (tel que détaillé dans l'article 3 de cette thèse). Il serait donc nécessaire de reproduire l'expérience en le comparant au PET recouvert de L-PPE:N et aussi en présence d'EGF. Le graphique présenté à la Figure 41 laisse tout de même sous-entendre que la CS aurait des propriétés anti-apoptotiques dans des conditions similaires à l'environnement des AAA autre que le milieu sans sérum.

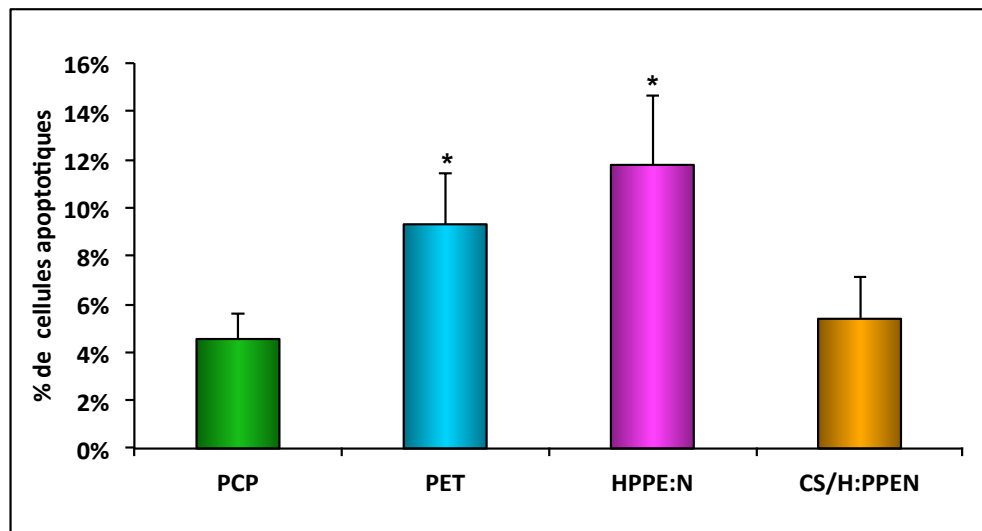


Figure 41: Variation du pourcentage de cellules apoptotiques en présence du revêtement de CS après 4 heures d'hypoxie (*p < 0.001 par rapport à CS/H:PPEN)

Puisque les AAA contiennent également des protéines pro-apoptotiques déclenchant la voie extrinsèque de l'apoptose, l'utilisation de cytokines pourrait être aussi une avenue intéressante pour vérifier si le revêtement inhibe l'apoptose via les deux chemins. Parmi ces agents, les cellules inflammatoires qui s'infiltrant dans la paroi vasculaire des anévrismes, comme les macrophages et les lymphocytes T, relâchent des médiateurs pro-apoptotiques, dont le FasL, TNF- α et la perforine [7]. Le TGF- β 1 qui est également présent dans les AAA pourrait aussi induire l'apoptose des CMLV [206].

Recommandation #1: Il serait intéressant de compléter les analyses d'apoptose présentées dans ce travail, en utilisant d'autres facteurs pro-apoptotiques. Plus spécifiquement, l'influence d'un environnement hypoxique ou hypercholestérolémique sur des CMLV exposées au revêtement de CS+EGF mériterait une attention particulière. De plus, la voie extrinsèque de l'apoptose pourrait être stimulée par l'utilisation de cytokines comme le TNF- α et le TGF- β 1.

Activité anti-apoptotique du revêtement CS+EGF

Tout comme les résultats concernant la CS et l'EGF en solution, présentés dans la revue de littérature, l'ajout de l'EGF sur le revêtement de CS n'a pas diminué le pourcentage de cellules en surface ayant un phénotype apoptotique, tel que déterminé par coloration HOPI. Par contre, il a significativement diminué le taux de déplétion cellulaire observé après 24h en milieu sans sérum. La déplétion cellulaire ne peut pas être totalement associée à l'apoptose, puisqu'il peut également y avoir nécrose, par contre ce résultat peut tout de même être un indicateur important de la résistance à l'apoptose, par la capacité des cellules à survivre 24 heures dans un milieu sans sérum. La présence d'un inhibiteur du récepteur de l'EGF dans le milieu sans sérum, a inversé la tendance de l'EGF sur la déplétion cellulaire, mais n'a pas influencé le pourcentage d'apoptose en surface. De plus, la morphologie des CMLV en présence de l'inhibiteur était très similaire aux cellules cultivées sur le revêtement de CS seul. Ceci nous laisse croire que la CS demeure visible aux CMLV après l'ajout de l'EGF, mais ne nous permet pas de distinguer le rôle de chacune des molécules dans la diminution de l'apoptose sur le revêtement CS+EGF.

La diminution de l'apoptose et de la déplétion cellulaire devrait pouvoir être confirmée par une augmentation marquée de protéines anti-apoptotiques. Tel que mentionnée dans la revue de littérature, il a été démontré que la CS et l'EGF en solution activent la voie de signalisation de ERK 1/2. Des essais préliminaires par Western blot ont permis d'illustrer l'activation de la voie ERK 1/2 sur le revêtement CS+EGF, après une exposition de 45 minutes en milieu sans sérum (Figure 42), l'activation étant plus élevée

pour le revêtement CS+EGF, qui atteint des niveaux aussi élevés que le contrôle positif (milieu normal).

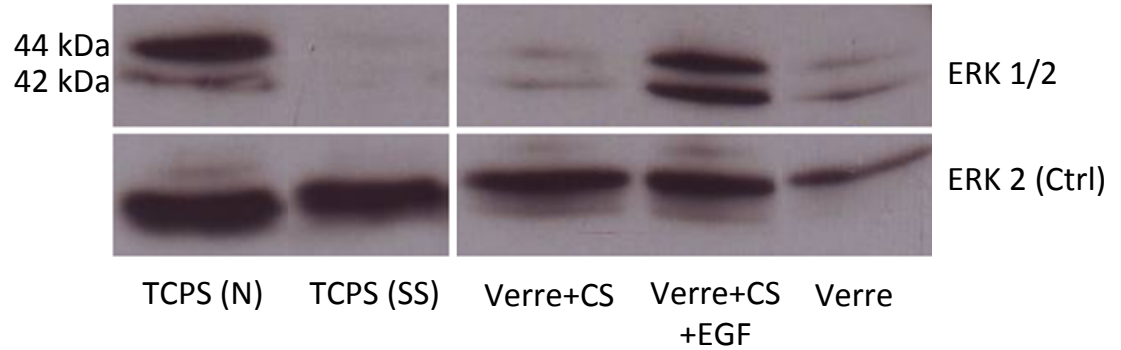


Figure 42: Phosphorylation de ERK 1/2 du revêtement greffé sur verre aminolysé

Il a été mentionné dans la revue de littérature que l'activation du récepteur de l'EGF provoque l'activation des voies de signalisation des kinases MAP et PI3K, ainsi que les facteurs STAT [142, 144]. Puisque l'activation du EGFR déclenche une multitude de voies de signalisation en parallèle, il peut être difficile de distinguer l'impact de la CS dans le revêtement de CS+EGF. L'EGF risque de masquer l'influence de la CS, mais il est tout de même important de comprendre l'impact du revêtement sur la modulation intracellulaire.

Recommandation #2 : Il serait intéressant d'étudier l'influence du revêtement de CS+EGF sur l'activation des voies de signalisation menant plus particulièrement à la survie, pour bien comprendre les mécanismes impliqués. À titre d'exemple, la présence de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL pourrait être une avenue démontrant l'influence du revêtement sur la voie intrinsèque de l'apoptose. Une autre voie consisterait à évaluer le niveau NFκB, puisque la CS et l'EGF influencent la transcription de cette protéine impliquée dans la réponse immunitaire. Il serait également intéressant d'observer le niveau des caspases initiatrices (caspases 8 et 9) et effectrices en présence du revêtement (caspase 3).

Bioactivité de EGF greffé

La diminution de l'apoptose et l'augmentation de la croissance des CMLV après l'ajout de l'EGF, tel qu'illustré dans les articles 2 et 3, suggèrent que celui-ci conserve sa bioactivité une fois greffé sur la CS. Cependant, la croissance des CMLV s'est avérée plus élevée sur les revêtements créés sur surfaces de verre que sur celles créées sur le L-PPE:N (x23 versus x14 en 7 jours, respectivement). À l'heure actuelle, il n'est pas possible de discerner si la différence est due à la bioactivité de l'EGF immobilisé ou bien la concentration d'EGF en surface, puisque cette quantité n'a pas été identifiée. On peut noter que l'angle de contact après greffage de CS sur le LPPEN est plus élevé que lorsque la CS est greffée sur le verre (62° versus 43°). Le L-PPE:N ne présente pas une surface aussi régulière que le verre aminolysé. La disposition des amines primaires et le fait que le L-PPE:N en contient plus que le verre aminolysé, pourraient influencer la disposition de la CS et ainsi l'accès aux groupements COOH pour le greffage de l'EGF. Toutefois, malgré cette différence, entre le revêtement déposé sur le verre aminolysé ou le PET modifié, la croissance demeure significativement supérieure en présence d'EGF. Il peut donc être supposé que l'EGF immobilisé est suffisamment bioactif, pour stimuler la croissance des CMLV.

Si l'ajout d'EGF apporte un avantage indéniable par rapport au revêtement de CS, il est plus difficile de conclure quant à l'importance de la CS dans la bioactivité du revêtement. La CS est une macromolécule très hydrosoluble contenant plusieurs groupements à charge négative. Tel qu'attendu, l'immobilisation de la CS sur les surfaces aminées a permis d'augmenter la mouillabilité. Il est donc probable que la présence de la CS limite l'adsorption non-spécifique des protéines, par rapport aux surfaces aminées, et favorise ainsi le greffage covalent de l'EGF, plutôt que son adsorption via des liaisons électrostatiques. Ceci pourrait être vérifié en étudiant l'adsorption de protéines sur la CS notamment par rapport au L-PPE:N, en utilisant par exemple une technologie comme une microbalance à cristal de quartz avec mesure de la dissipation (QCM-D, pour *quartz crystal microbalance with dissipation monitoring*).

En plus de sa bioactivité et de sa capacité d'augmenter la mouillabilité de la surface, la CS peut être considérée comme bras espaceur pour le greffage de l'EGF, donnant ainsi un meilleur accès aux cellules qui entrent en contact avec la surface. Il est présumé que l'utilisation de l'EDC/NHS pour greffer l'EGF favorise la création de liens amides entre les carboxyles résiduels de la CS et les amines primaires de l'EGF, qui se retrouvent soit au *N*-terminal ou aux lysines 28 et 48. Il est tout de même possible qu'il y ait également présence de liaisons électrostatiques entre les groupements à charge négative de la CS (*i.e.* sulfate et acide carboxylique) et les acides aminés contenant des groupements à charge positive de l'EGF, comme l'arginine ou l'hystidine.

L'immobilisation par liens covalents est un avantage puisqu'il devrait permettre de prolonger l'activité de l'EGF. Il a en effet été démontré par plusieurs études que l'immobilisation de l'EGF empêche l'internalisation du complexe EGF/EGFR, prolongeant ainsi l'activation du récepteur [91, 145, 148, 149]. La dimérisation du récepteur de l'EGF et la liaison à son ligand provoque l'activation du domaine kinase et l'autophosphorylation du EGFR. Habituellement, pour l'EGF en solution, le complexe EGF/EGFR est rapidement internalisé dans la cellule, et les signaux des kinases peuvent continuer à être activés à l'intérieur des endosomes [207]. Il est à noter par contre que la durée de la signalisation est dictée par la vitesse de l'internalisation et de recyclage du EGFR [208]; l'activité de l'EGF en solution est donc limitée. L'immobilisation de l'EGF devrait de ce fait prolonger la signalisation en comparaison avec l'EGF en solution.

Par contre l'immobilisation entre les carboxyles de la CS et les amines de l'EGF, via l'EDC/NHS, mène à un greffage non uniforme et non orienté, puisque l'EGF humain contient plus d'un groupement amine. La conjugaison aux amines de la lysine, des facteurs de croissance tel l'EGF, génère des surfaces hétérogènes provoquant des orientations et des activités fonctionnelles variables [147]. La bioactivité de l'EGF peut être altérée, puisque des sites réactionnels peuvent devenir inaccessibles, ou être limitée par encombrement stérique ou une position inadéquate de l'EGF.

Une solution envisageable est l'utilisation d'une étiquette, afin de favoriser la disponibilité des sites interactionnels du facteur de croissance en produisant une immobilisation unidirectionnelle. Une technique utilisant une étiquette spiralée sur l'EGF (peptide E5), a récemment été développée par le groupe de De Crescenzo [209]. Lors de cette technique, un peptide spiralé, comportant une combinaison Cys-Gly-Cys à l'extrémité du N-terminal (peptide K5), est immobilisé à la surface par des liens covalents du type disulfide, entre les groupements thiols du peptide et les groupements pyridiles disulfides d'un coupleur attachée à la surface, le succinimidyl 6-[30-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate (LC-SPDP) [186]. Le facteur de croissance étiqueté par le peptide E5 est ensuite immobilisé au peptide K5 par une hétérodimérisation. Il a déjà été démontré que ce type d'immobilisation (*i.e.* hétérodimérisation entre les spirales E5 et K5) possède une vitesse de dissociation relativement faible et qu'elle permet de greffer des facteurs de croissance présentant une orientation uniforme. Ils ont démontré, qu'en plus de créer une surface dense et orientée, que le système coiled-coil pouvait maintenir la phosphorylation du récepteur de l'EGF sur une plus grande période et plus intensément que l'EGF immobilisé de façon non orientée [146].

Recommandation #3 : Il serait donc intéressant de comparer les résultats obtenus dans cette étude avec une telle méthode d'immobilisation permettant d'orienter l'EGF et offrir une surface plus répétable et probablement augmenter la disponibilité de l'EGF. Il serait également intéressant de quantifier l'EGF, sur la surface actuelle et la surface avec l'EGF orienté, pour déterminer si la quantité d'EGF influence le comportement cellulaire, plus particulièrement la croissance.

Effet du revêtement sur le phénotype cellulaire

La différence de phénotype exprimée par les CMLV sur les revêtements CS et CS+EGF est un autre signe de l'immobilisation de l'EGF. Il a été noté, par le marquage de l'actine, la vinculine et des noyaux, que les CMLV adhérentes depuis 7 jours sur le verre et le L-PPE:N modifiés semblaient posséder des phénotypes différents sur la CS que sur la

CS+EGF. Nous avons en effet montré que les CMLV sur les surfaces de CS renfermaient plus de filaments d'actine et que l'ajout de l'EGF diminuait la présence des filaments d'actine. En lien avec ces résultats, il a déjà été illustré que la CS en solution participait à la différenciation myofibroblastique, par une augmentation du taux de α SMA dans les fibroblastes [120]. Puisque les CMLV contiennent plus d'actine sur le revêtement de CS et qu'elles croissent plus rapidement sur le revêtement de CS+EGF, il est donc probable qu'il y ait une modulation phénotypique entre les deux revêtements.

Théoriquement, les CMLV ont deux phénotypes différents comportant des propriétés très distinctes l'un de l'autre. Plusieurs facteurs environnementaux, comme par exemple les conditions de stress et les maladies vasculaires (*i.e.* athérosclérose, resténose, anévrismes et angiogenèse tumorale) peuvent influencer la modulation d'un phénotype à l'autre (Figure 43). Une altération de l'endothélium peut également provoquer une modulation phénotypique. D'une part, le phénotype contractile est retrouvé lorsque les cellules contiennent plus de myofilaments et synthétisent très peu d'éléments de la MEC tandis que le phénotype synthétique est retrouvé lorsque les cellules migrent et prolifèrent plus facilement, synthétisent beaucoup plus d'éléments de la MEC et internalisent plus de lipoprotéines [210]. Lors de la formation néointimale, les CMLV, préalablement à l'état contractile, passent à un état synthétique favorisant la migration et la prolifération de celles-ci, pour ensuite reprendre le phénotype contractile, une fois la néointima complétée [211]. Cette modulation phénotypique des CMLV contribue aussi à la croissance des plaques athérosclérotiques [212].

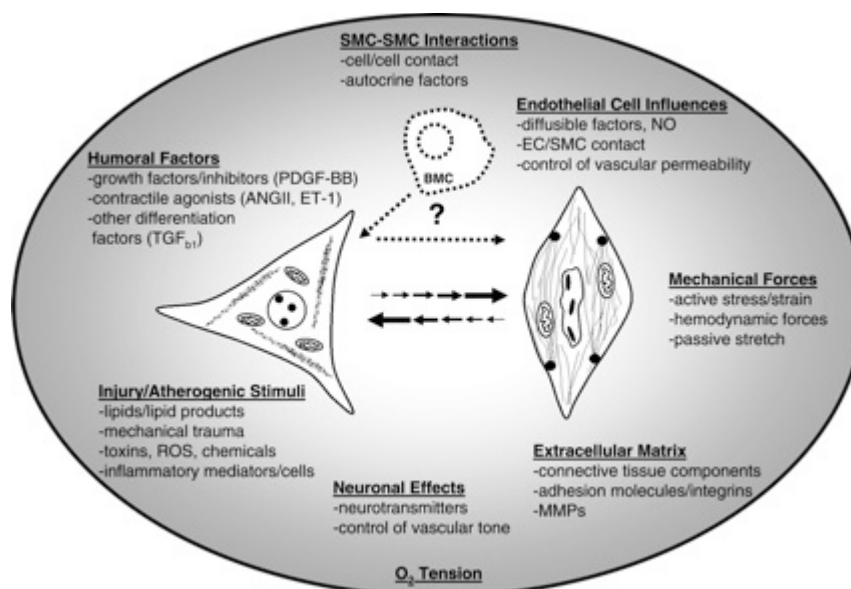


Figure 43: Facteurs pouvant influencer le phénotype des CMLV [213]

Dans le contexte de la réparation vasculaire, les cellules doivent pouvoir migrer, croître et produire les éléments de la MEC nécessaires, pour bien incorporer la prothèse dans le vaisseau, mais elles doivent également offrir une contractilité, pour assurer la fonction structurale de l'aorte. Il est donc important de bien évaluer le phénotype que les CMLV présentent sur le revêtement. Il est possible d'observer les différents phénotypes des CMLV, par la présence de marqueurs distincts. La calponine, l' α SMA et les chaînes lourdes de myosine du muscle lisse se retrouvent surtout chez les CMLV contractiles, tandis que la vimentine et l'actine non musculaire (β NMA) sont perceptibles chez les CMLV synthétiques [210]. Il est plutôt rare que les CMLV arborent un phénotype à 100%; plus souvent qu'autrement elles se situent entre ces deux phénotypes.

Recommandation #4: Il serait intéressant de vérifier si le revêtement de CS+EGF permet de stimuler à la fois la production d'éléments de la MEC, tout en comportant suffisamment d' α SMA pour éventuellement fournir une fonction contractile. Enfin, l'effet du revêtement sur les fibroblastes (qui jouent un rôle très

important dans la réparation vasculaire), notamment sur la différenciation en myofibroblastes contractiles est à étudier dans le futur, par la présence d' α SMA.

Autres travaux futurs

Malgré ces résultats prometteurs, d'autres analyses restent à faire avant de passer aux tests *in vivo*. Tout d'abord, cette étude s'est limitée à l'étude du revêtement sur des films de PET lisses, qui ne correspondent pas à la réalité clinique des SG. Le PET que l'on retrouve sur les SG est en effet sous forme de fibres de PET tissées ou tricotées. De plus, d'autres implants utilisent le ePTFE, un biomatériau très peu favorable pour l'adhésion et la croissance cellulaire. Il est connu que la rugosité de surface et la porosité de la surface, qui augmentent la surface réelle disponible pour les cellules, influencent le comportement des cellules et que pour chaque type cellulaire, il existe une rugosité optimale [62]. Il est donc possible, et fort probable, que l'utilisation de polymères tissés influencera le comportement des CMLV. Les films de PET ont été utilisés tout au long de cette étude, car ils permettent un meilleur contrôle de la caractérisation physico-chimique et des réponses cellulaires. Le PET en film comporte plusieurs avantages, par rapport au PET tissé, en ce qui a trait aux techniques d'analyses, étant donné son homogénéité, sa surface plane et sa transparence, ainsi que son faible coût.

***Recommandation #5* : Il sera nécessaire de démontrer que le revêtement peut être créé sur le PET tissé ou le ePTFE et qu'il y procure les mêmes avantages, en terme de résistance à l'apoptose et d'augmentation de la croissance cellulaire. Ceci ne devrait pas constituer un obstacle puisque l'utilisation des revêtements plasma a l'avantage de permettre une grande versatilité de ce revêtement bioactif. Il reste également à démontrer que ce revêtement a aussi un effet bénéfique sur les cellules aortiques humaines (AOSMC) qui sont reconnues pour être plus résistantes à l'apoptose que les CMLV de rat. De plus, l'effet chimiotactique de l'EGF et son influence sur la migration des cellules vers la surface reste aussi à vérifier car c'est un point majeur pour favoriser la guérison autour des SG.**

Comparaison du revêtement par rapport à la littérature

À ce jour, il existe très peu d'études proposant des modifications de surface des SG pour améliorer la guérison des tissus aortiques après EVAR. Au meilleur de nos connaissances, aucune ne propose d'utiliser des revêtements bioactifs visant spécifiquement à inhiber l'apoptose des cellules vasculaires. Les rares approches développées jusqu'à maintenant pour cette application clinique utilisent un revêtement de collagène imprégné de facteurs de croissance, généralement le facteur de croissance de fibroblastes basique (bFGF).

Van der Bas et al. ont ainsi démontré *in vitro* [67] et *in vivo*, chez des modèles porcins, [68] qu'il était possible de stimuler la réparation vasculaire par l'entremise d'un SG imprégnée de collagène, d'héparine et du facteur de croissance de fibroblastes basique (bFGF). Les limites de cette étude reposent principalement sur trois points; 1) le modèle porcine ne reproduit pas le manque de guérison observé chez l'humain; 2) malgré le caractère mitogénique du bFGF, ce facteur de croissance est également angiogénique, ce qui peut maintenir dans un premier temps la présence de fuites sanguines via la formation de nouveaux vaisseaux et dans un second temps la venue des cellules inflammatoires et 3) l'utilisation de l'héparine, un anticoagulant, peut ralentir la formation d'un thrombus organisé.

Kajimoto et al. ont combiné la transplantation cellulaire de myoblastes et fibroblastes autologues dans un gel de collagène à la création d'un revêtement en imprégnant des SG dans un mélange d'élastine, d'héparine et de bFGF [69]. Malgré une accélération marquée de la formation d'un thrombus organisé, cette étude comporte quelques limites; 1) tout comme l'étude précédente, l'utilisation de l'héparine peut retarder la formation d'un caillot sanguin, 2) la reconstitution des fuites sanguines, par l'entremise de trous dans le SG, ne permet pas de simuler les fuites sanguines de type I et 3) une fois de plus, le bFGF est un facteur de croissance angiogénique pouvant influencer la présence de fuites sanguines et la présence de monocytes.

De plus, l'utilisation du collagène dans ces deux cas, peut avoir des limitations du point de vue de l'approbation en clinique étant donné les soucis d'immunogénicité et de transmission des prions (dans le cas du collagène bovin) ou de coût (collagène de synthèse), de la dégradation rapide *in vivo* et du manque d'adhérence au substrat, en particulier sur le ePTFE.

Ces limites ont été illustrées dans le cadre de notre étude, lorsqu'un premier revêtement à base de CS et collagène a été créé (chapitre 3). Ce revêtement était prometteur puisque des tests de viabilité cellulaire nous ont permis de constater qu'il augmentait la survie cellulaire par un test au MTT qui mesure l'activité métabolique des cellules. Les revêtements de collagène, en présence ou absence de CS, ont significativement augmenté l'adhésion des CMLV par rapport aux films de PET vierge, en milieu normal. Nonobstant cette particularité du collagène, grandement exploitée dans la littérature, l'ajout de la CS dans le revêtement semblait tout de même diminuer l'adhésion des CMLV par rapport au collagène seul. Il est probable que l'immobilisation de la CS sur le collagène diminue le nombre de groupements fonctionnels disponibles à la surface du collagène, par encombrement stérique. Suite à ces résultats, nous avons évalué le taux d'apoptose, via la coloration HOPI. Malgré le fait que la CS semblait augmenter la résistance à l'apoptose, nous avons constaté, après plusieurs lavages, que le revêtement se détachait plutôt facilement de la surface de PET. Ceci pourrait être amélioré et la matrice collagène-CS utilisée pour imprégner et relarguer de l'EGF. Cependant, les avantages de l'immobilisation covalente sur la bioactivité (décrit plus haut), ainsi que la dégradation rapide et la faible adhésivité du revêtement au PET qui rendait les expérimentations difficiles, ont fait que nous avons préféré modifier notre approche. C'est pourquoi, plutôt que d'optimiser le revêtement, nous avons décidé de greffer la CS directement sur les biomatériaux, grâce à une technique de polymérisation par plasma.

En effet, le PET en film tout comme le PET tissé sont relativement inertes et doivent être modifiés pour permettre le greffage de biomolécules. La modification de biomatériau comme le PET, par la création d'un polymère riche en azote par plasma à basse

pression, le L-PPE:N, comporte plusieurs avantages par rapport à d'autres méthodes. Cette technique de polymérisation permet de créer un film fin, très riche en azote, notamment en amines primaires et permet d'augmenter l'énergie de surface par l'ajout de groupements polaires [78]. Tel que discuté au Chapitre 5, la polymérisation par plasma à basse pression permet d'ajouter une quantité totale d'amines primaires supérieure aux autres techniques de modification de surface, tel la fonctionnalisation par plasma. Les principaux avantages du revêtement L-PPE:N, par rapport à d'autres techniques de modification sont; 1) l'augmentation de la concentration en azote, 2) un vieillissement relativement faible, 3) une très bonne uniformité de surface et 4) le fait que le revêtement est hautement réticulé empêche sa restructuration en un matériel hydrophobe pour être thermodynamiquement plus stable, et ce malgré son énergie de surface élevée [65]. De plus, cette technique de modification peut être utilisée autant sur les greffons de PET que de ePTFE, ainsi que sur d'autres polymères ou métaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire, autant sur des surface 2D que 3D.

Pour conclure cette partie de discussion et perspectives, ce travail doit obligatoirement être complété par des essais *in vivo*. Un modèle canin d'AAA, reproduisant les fuites de type I, a préalablement été développé dans nos laboratoires [214]. Les études *in vivo* permettront d'étudier l'efficacité des surfaces bioactives que nous avons développées, sur la croissance et la résistance à l'apoptose autour du SG. Bien que ce modèle ne reproduise pas la déplétion cellulaire associée à la pathologie, il permet de recréer un environnement pro-apoptotique généré par la présence du SG qui limite l'apport en O₂, nutriments et facteurs de croissance. Ces analyses permettront, entre autre, d'estimer si la quantité de CS et d'EGF greffée sur le revêtement est optimale par rapport à la croissance cellulaire, ou encore qu'elle est insuffisante ou génère des effets biologiques néfastes. D'autres part, des effets indésirables associés à l'utilisation de surfaces bioactives pourront être décelés par ces essais (ex. la pharmacocinétique des produits de dégradation du revêtement ou la surexpression irrégulière des cellules vasculaires). Cette partie d'étude est indispensable pour espérer un passage en phase de recherche clinique.

Le revêtement de CS+EGF étudié dans cette thèse se limite à la surface des SG. Il est donc présumé que les interactions cellulaires, après l'introduction de la prothèse, se feront essentiellement aux collets, plutôt que dans le sac anévrismal. Une fois en contact avec la paroi vasculaire, le revêtement devrait stimuler la migration des CMLV et fibroblastes de l'adventice, inhiber leur apoptose, favoriser leur croissance et stimuler la production d'éléments de la MEC pour bien sceller le SG en place et empêcher sa migration et la présence d'endofuites. Dans un contexte clinique, le revêtement devrait donc majoritairement diminuer l'incidence d'endofuites aux collets, par la création d'un joint homéostatique entre la prothèse et la paroi vasculaire. Il pourrait aussi limiter la progression de la maladie anévrismale, qui tend à s'étendre avec le temps. De plus, il est souhaité que le revêtement favorise la migration des cellules le long du SG, pour ainsi stimuler le processus de guérison et former une paroi complète.

Chapitre 7 : Conclusion

Mon travail de doctorat a permis le développement d'une surface bioactive pour le traitement des AAA par la réparation endovasculaire. Les travaux très multidisciplinaires présentés dans cette thèse constituent les premières étapes dans le développement clinique d'un SG bioactif, soit la conception, la preuve de concept et l'optimisation.

L'objectif à long terme de ce projet consistait à créer un revêtement bioactif, permettant d'améliorer la guérison des tissus vasculaires autour des SG, dans le but de diminuer les complications après EVAR et ainsi augmenter le nombre de patients pouvant être traités. Dans le cadre de ce projet, nous avons démontré le potentiel de la chondroïtine-4-sulfate, qui a récemment été identifiée comme l'un des médiateurs impliqués dans la réparation vasculaire. Bien qu'il reste de nombreux points à éclaircir et optimiser, ce projet ouvre la voie au développement d'une 3^{ème} génération de SG dont les propriétés de surface favoriseront la formation néointimale et l'incorporation biologique de l'implant dans l'anévrisme.

À l'heure actuelle, il existe très peu d'études proposant des modifications de surface des SG pour améliorer la guérison des tissus aortiques après EVAR. Aucune ne propose d'utiliser la CS comme revêtement bioactif. Il s'agit d'un projet original et novateur qui propose d'utiliser de récentes découvertes en biologie moléculaire dans le domaine des biomatériaux. Les résultats présentés dans les chapitres 3 à 5 sont prometteurs en ce qui a trait à la bioactivité des médiateurs choisis en vue d'une nouvelle génération de SG permettant de stimuler une guérison adéquate des tissus vasculaires. De plus, il s'agit d'une approche très versatile, grâce à l'utilisation des revêtements déposés par plasma.

À notre connaissance, notre équipe est la seule à évaluer le potentiel de médiateurs impliqués dans la réparation vasculaire, visant spécifiquement à inhiber l'apoptose des cellules vasculaires dans le contexte des AAA. De plus, la fonctionnalisation des polymères utilisés pour les SG, par la création d'un polymère riche en azote, le PPE:N, comporte plusieurs avantages par rapport à d'autres techniques de modifications. Tout d'abord, il permet de créer un polymère relativement stable, uniforme et ayant un taux de

vieillissement assez faible. Il est également possible d'y immobiliser des ligands à la surface par l'entremise d'une réticulation biocompatible et reproductible, l'EDC/NHS. Finalement, cette technique de fonctionnalisation peut être utilisée autant sur les greffons de PET que de ePTFE, ainsi que sur d'autres polymères utilisés dans l'ingénierie tissulaire. En bref, le revêtement bioactif et anti-apoptotique proposé dans ce travail de recherche possède des propriétés essentielles à la guérison des tissus vasculaires et peut être adapté à différentes surfaces polymériques pour une multitude d'applications.

Bibliographie

1. Sakalihan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* 2005;365(9470):1577-1589.
2. Lindsay TF. Canadian Society for Vascular Surgery consensus statement on endovascular aneurysm repair. *Cmaj* 2005;172(7):867-868.
3. Hoyert DL, Arias E, Smith BL, Murphy SL, Kochanek KD. Deaths: final data for 1999. *Natl Vital Stat Rep* 2001;49(8):1-113.
4. Uflacker R, Robison J. Endovascular treatment of abdominal aortic aneurysms: a review. *Eur Radiol* 2001;11(5):739-753.
5. Marieb EN. Anatomie et physiologie humaines. 2e éd. ed. Saint-Laurent, Qué.: Éd. du Renouveau pédagogique; 1999.
6. Lindsay J, Hurst JW. *The Aorta*. New York: Grune & Stratton; 1979.
7. Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whittemore AD, Knox J, Libby P. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 1999;99(1):96-104.
8. Liao S, Curci JA, Kelley BJ, Sicard GA, Thompson RW. Accelerated replicative senescence of medial smooth muscle cells derived from abdominal aortic aneurysms compared to the adjacent inferior mesenteric artery. *J Surg Res* 2000;92(1):85-95.
9. Libby P, Lee RT. Matrix Matters. *Circulation* 2000;102(16):1874-1876.
10. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2003;57(5-6):195-202.

11. Hellenthal FA, Buurman WA, Wodzig WK, Schurink GW. Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration. *Nat Rev Cardiol* 2009;6(7):464-474.
12. Horton HR. *Principles of biochemistry*. 4th ed. Upper Saddle River, N.J.: Pearson Prentice Hall; 2006.
13. Raju SM, Madala B. *Illustrated medical biochemistry*. 1st ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2005.
14. Dumitriu S. *Polymeric biomaterials*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc.; 2002.
15. Upchurch GR, Jr., Schaub TA. Abdominal aortic aneurysm. *Am Fam Physician* 2006;73(7):1198-1204.
16. Canada. Santé Canada. Centre de prévention et de contrôle des maladies chroniques, Société canadienne de cardiologie, Fondation des maladies du coeur du Canada. *Le fardeau croissant des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux au Canada*, 2003. Ottawa: Fondation des maladies du coeur du Canada; 2003.
17. Vardulaki KA, Walker NM, Day NE, Duffy SW, Ashton HA, Scott RA. Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 2000;87(2):195-200.
18. Choke E, Cockerill G, Wilson WR, Sayed S, Dawson J, Loftus I, et al. A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;30(3):227-244.
19. Zankl AR, Schumacher H, Krumsdorf U, Katus HA, Jahn L, Tiefenbacher CP. Pathology, natural history and treatment of abdominal aortic aneurysms. *Clin Res Cardiol* 2007;96(3):140-151.

20. Wassef M, Upchurch GR, Jr., Kuivaniemi H, Thompson RW, Tilson MD, 3rd. Challenges and opportunities in abdominal aortic aneurysm research. *J Vasc Surg* 2007;45(1):192-198.
21. Choke E, Cockerill GW, Dawson J, Wilson RW, Jones A, Loftus IM, et al. Increased angiogenesis at the site of abdominal aortic aneurysm rupture. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1085:315-319.
22. Holmes DR, Liao S, Parks WC, Thompson RW. Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications. *J Vasc Surg* 1995;21(5):761-771; discussion 771-762.
23. Theocharis AD, Tsolakis I, Tsegenidis T, Karamanos NK. Human abdominal aortic aneurysm is closely associated with compositional and specific structural modifications at the glycosaminoglycan level. *Atherosclerosis* 1999;145(2):359-368.
24. Jacob T, Ascher E, Hingorani A, Gunduz Y, Kallakuri S. Initial steps in the unifying theory of the pathogenesis of artery aneurysms. *J Surg Res* 2001;101(1):37-43.
25. Rowe VL, Stevens SL, Reddick TT, Freeman MB, Donnell R, Carroll RC, et al. Vascular smooth muscle cell apoptosis in aneurysmal, occlusive, and normal human aortas. *J Vasc Surg* 2000;31(3):567-576.
26. Thompson RW, Liao S, Curci JA. Vascular smooth muscle cell apoptosis in abdominal aortic aneurysms. *Coron Artery Dis* 1997;8(10):623-631.
27. Satta J, Mennander A, Soini Y. Increased medial TUNEL-positive staining associated with apoptotic bodies is linked to smooth muscle cell diminution during evolution of abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 2002;16(4):462-466.

28. Rodriguez-Campos A, Ruiz-Enriquez P, Farauto S, Badimon L. Mitogen-induced p53 downregulation precedes vascular smooth muscle cell migration from healthy tunica media and proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(2):214-219.
29. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495-516.
30. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5(11):897-907.
31. D'Archivio M, Santangelo C, Scazzocchio B, Vari R, Filesi C, Masella R, et al. Modulatory effects of polyphenols on apoptosis induction: relevance for cancer prevention. *Int J Mol Sci* 2008;9(3):213-228.
32. Rong Y, Distelhorst CW. Bcl-2 Protein Family Members: Versatile Regulators of Calcium Signaling in Cell Survival and Apoptosis. *Annual Review of Physiology* 2008;70(1):73-91.
33. van Heerde WL, Robert-Offerman S, Dumont E, Hofstra L, Doevendans PA, Smits JF, et al. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovasc Res* 2000;45(3):549-559.
34. Lopez-Candales A, Holmes DR, Liao S, Scott MJ, Wickline SA, Thompson RW. Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol* 1997;150(3):993-1007.
35. Ihling C, Szombathy T, Nampoothiri K, Haendeler J, Beyersdorf F, Uhl M, et al. Cystic medial degeneration of the aorta is associated with p53 accumulation, Bax upregulation, apoptotic cell death, and cell proliferation. *Heart* 1999;82(3):286-293.

36. Forester ND, Cruickshank SM, Scott DJA, Carding SR. Functional characterization of T cells in abdominal aortic aneurysms. *Immunology* 2005;115(2):262-270.
37. Li P-F, Dietz R, von Harsdorf Rd. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Letters* 1997;404(2-3):249-252.
38. Sinha I, Sinha-Hikim AP, Hannawa KK, Henke PK, Eagleton MJ, Stanley JC, et al. Mitochondrial-dependent apoptosis in experimental rodent abdominal aortic aneurysms. *Surgery* 2005;138(4):806-811.
39. Schermerhorn M. A 66-Year-Old Man With an Abdominal Aortic Aneurysm. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 2009;302(18):2015-2022.
40. De Bruin JL, Baas AF, Buth J, Prinssen M, Verhoeven ELG, Cuypers PWM, et al. Long-Term Outcome of Open or Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysm. *New England Journal of Medicine* 2010;362(20):1881-1889.
41. Schermerhorn ML, O'Malley AJ, Jhaveri A, Cotterill P, Pomposelli F, Landon BE. Endovascular vs. Open Repair of Abdominal Aortic Aneurysms in the Medicare Population. *New England Journal of Medicine* 2008;358(5):464-474.
42. Faries PL, Dayal R, Rhee J, Trocciola S, Kent KC. Stent graft treatment for abdominal aortic aneurysm repair: recent developments in therapy. *Curr Opin Cardiol* 2004;19(6):551-557.
43. Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Annals of Vascular Surgery* 1991;5(6):491-499.

44. Rutherford RB, Krupski WC. Current status of open versus endovascular stent-graft repair of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2004;39(5):1129-1139.
45. Johnson ML, Bush RL, Collins TC, Lin PH, Liles DR, Henderson WG, et al. Propensity score analysis in observational studies: outcomes after abdominal aortic aneurysm repair. *Am J Surg* 2006;192(3):336-343.
46. Matsumura JS, Brewster DC, Makaroun MS, Naftel DC. A multicenter controlled clinical trial of open versus endovascular treatment of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2003;37(2):262-271.
47. Prinssen M, Verhoeven EL, Buth J, Cuypers PW, van Sambeek MR, Balm R, et al. A randomized trial comparing conventional and endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2004;351(16):1607-1618.
48. Nagpal AD, Forbes TL, Novick TV, Lovell MB, Kribs SW, Lawlor DK, et al. Midterm results of endovascular infrarenal abdominal aortic aneurysm repair in high-risk patients. *Vasc Endovascular Surg* 2007;41(4):301-309.
49. Veith FJ, Baum RA, Ohki T, Amor M, Adiseshiah M, Blankensteijn JD, et al. Nature and significance of endoleaks and endotension: summary of opinions expressed at an international conference. *J Vasc Surg* 2002;35(5):1029-1035.
50. Riddell JM, Black JH, Brewster DC, Dunn PF. Endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *Int Anesthesiol Clin* 2005;43(1):79-91.
51. Agarwal PP, Chughtai A, Matzinger FRK, Kazerooni EA. Multidetector CT of Thoracic Aortic Aneurysms1. *Radiographics* 2009;29(2):537-552.

52. Franks SC, Sutton AJ, Bown MJ, Sayers RD. Systematic Review and Meta-analysis of 12 Years of Endovascular Abdominal Aortic Aneurysm Repair. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2007;33(2):154-171.
53. Soulez G, Lerouge S, Darsaut T, Salazkin I, Oliva VL, Raymond J. Role of the Endothelial Lining in Endoleak Formation and Persistence after Endovascular Repair of Aneurysm. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2008;19(7):1070-1078.
54. Fogarty TJ, Arko FR, Zarins CK. Endograft technology: highlights of the past 10 years. *J Endovasc Ther* 2004;11 Suppl 2:II192-199.
55. Towne JB. Endovascular treatment of abdominal aortic aneurysms. *Am J Surg* 2005;189(2):140-149.
56. Major A, Guidoin R, Soulez G, Gaboury LA, Cloutier G, Sapoval M, et al. Implant degradation and poor healing after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: an analysis of explanted stent-grafts. *J Endovasc Ther* 2006;13(4):457-467.
57. Malina M, Brunkwall J, Ivancev K, Jonsson J, Malina J, Lindblad B. Endovascular healing is inadequate for fixation of Dacron stent-grafts in human aortoiliac vessels. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19(1):5-11.
58. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(5):349-363.
59. Chlupac J, Filova E, Bacakova L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol Res* 2009;58 Suppl 2:S119-139.

60. Bezuidenhout D, Zilla P. Vascular Surgery: Biomaterials. In: Buschow KHJr, Robert WC, Merton CF, Bernard I, Edward JK, Subhash M, et al., editors. Encyclopedia of Materials: Science and Technology. Oxford: Elsevier; 2001. p. 9513-9518.
61. Palmaz JC. Review of Polymeric Graft Materials for Endovascular Applications. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 1998;9(1):7-13.
62. Bacakova L, Filova E, Rypacek F, Svorcik V, Stary V. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res* 2004;53 Suppl 1:S35-45.
63. Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(12):2146-2154.
64. Marty B, Leu AJ, Mucciolo A, von Segesser LK. Biologic fixation of polyester-versus polyurethane-covered stents in a porcine model. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13(6):601-607.
65. Lerouge S, Major A, Girault-Lauriault PL, Raymond MA, Laplante P, Soulez G, et al. Nitrogen-rich coatings for promoting healing around stent-grafts after endovascular aneurysm repair. *Biomaterials* 2007;28(6):1209-1217.
66. Miyake T, Morishita R. Pharmacological treatment of abdominal aortic aneurysm. *Cardiovascular Research* 2009;83(3):436-443.
67. van der Bas JM, Quax PH, van den Berg AC, van Hinsbergh VW, van Bockel JH. Ingrowth of aorta vascular cells into basic fibroblast growth factor-impregnated vascular prosthesis material: a porcine and human in vitro study on blood vessel prosthesis healing. *J Vasc Surg* 2002;36(6):1237-1247.

68. van der Bas JM, Quax PH, van den Berg AC, Visser MJ, van der Linden E, van Bockel JH. Ingrowth of aorta wall into stent grafts impregnated with basic fibroblast growth factor: a porcine in vivo study of blood vessel prosthesis healing. *J Vasc Surg* 2004;39(4):850-858.
69. Kajimoto M, Shimono T, Hirano K, Miyake Y, Sawada Y, Kato N, et al. Development of a new method for endovascular aortic repair: combination therapy of cell transplantation and stent grafts with a drug delivery system. *Circulation* 2006;114(1 Suppl):I378-383.
70. Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24(24):4353-4364.
71. Ozdemir M, Yurteri CU, Sadikoglu H. Physical polymer surface modification methods and applications in food packaging polymers. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1999;39(5):457-477.
72. Goddard JM, Hotchkiss JH. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science* 2007;32(7):698-725.
73. Siow KS, Britcher L, Kumar S, Griesser HJ. Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review. *Plasma Processes and Polymers* 2006;3(6-7):392-418.
74. Bisson I, Kosinski M, Ruault S, Gupta B, Hilborn J, Wurm F, et al. Acrylic acid grafting and collagen immobilization on poly(ethylene terephthalate) surfaces for adherence and growth of human bladder smooth muscle cells. *Biomaterials* 2002;23(15):3149-3158.

75. Ai-Ping Zhu FZNF. Regulation of vascular smooth muscle cells on poly(ethylene terephthalate) film by O-carboxymethylchitosan surface immobilization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2008;86A(2):467-476.
76. Dai L, StJohn HAW, Bi J, Zientek P, Chatelier RC, Griesser HJ. Biomedical coatings by the covalent immobilization of polysaccharides onto gas-plasma-activated polymer surfaces. *Surface and Interface Analysis* 2000;29(1):46-55.
77. Chu PK, Chen JY, Wang LP, Huang N. Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 2002;36(5-6):143-206.
78. Girard-Lauriault PL, Mwale F, Iordanova M, Demers C, Desjardins P, Wertheimer MR. Atmospheric Pressure Deposition of Micropatterned Nitrogen-Rich Plasma-Polymer Films for Tissue Engineering. *Plasma Processes and Polymers* 2005;2(3):263-270.
79. Truica-Marasescu F, Girard-Lauriault P-L, Lippitz A, Unger WES, Wertheimer MR. Nitrogen-rich plasma polymers: Comparison of films deposited in atmospheric- and low-pressure plasmas. *Thin Solid Films* 2008;516(21):7406-7417.
80. Ruiz JC, St-Georges-Robillard A, Thérésy C, Lerouge S, Wertheimer MR. Fabrication and Characterisation of Amine-Rich Organic Thin Films: Focus on Stability. *Plasma Processes and Polymers* 2010:n/a-n/a.
81. Ratner BD. *Biomaterials science : an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press; 2004.
82. Wnek GE, Bowlin GL. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*. New York: Marcel Dekker; 2004.

83. Rusmini F, Zhong Z, Feijen J. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* 2007;8(6):1775-1789.
84. Bilitewski U. Protein-sensing assay formats and devices. *Analytica Chimica Acta* 2006;568(1-2):232-247.
85. Yunxiao Liu THHSCG. Layer-by-layer assembly of biomacromolecules on poly(ethylene terephthalate) films and fiber fabrics to promote endothelial cell growth. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2007;81A(3):692-704.
86. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 2003;24(24):4385-4415.
87. Palsson B, Hubbell JA, Plonsey R, Bronzino JD. *Tissue engineering*. Boca Raton: CRC Press; 2003.
88. Durrieu MC. Conception, elaboration et caracterisation de materiaux bioactifs. *ITBM-RBM* 2005;26(3):229-237.
89. Vallieres K, Petitcherc E, Laroche G. Covalent grafting of fibronectin onto plasma-treated PTFE: influence of the conjugation strategy on fibronectin biological activity. *Macromol Biosci* 2007;7(5):738-745.
90. Cloft HJ, Kallmes DF, Lin HB, Li ST, Marx WF, Hudson SB, et al. Bovine type I collagen as an endovascular stent-graft material: biocompatibility study in rabbits. *Radiology* 2000;214(2):557-562.
91. Ichinose J, Morimatsu M, Yanagida T, Sako Y. Covalent immobilization of epidermal growth factor molecules for single-molecule imaging analysis of intracellular signaling. *Biomaterials* 2006;27(18):3343-3350.

92. Mii S, Ware JA, Kent KC. Transforming growth factor-beta inhibits human vascular smooth muscle cell growth and migration. *Surgery* 1993;114(2):464-470.
93. Kaiura TL, Itoh H, Kubaska SM, 3rd, McCaffrey TA, Liu B, Kent KC. The effect of growth factors, cytokines, and extracellular matrix proteins on fibronectin production in human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 2000;31(3):577-584.
94. Mann BK, Schmedlen RH, West JL. Tethered-TGF-beta increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells. *Biomaterials* 2001;22(5):439-444.
95. Dorafshar AH, Angle N, Bryer-Ash M, Huang D, Farooq MM, Gelabert HA, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits mitogen-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Surg Res* 2003;114(2):179-186.
96. Zhang G, Suggs LJ. Matrices and scaffolds for drug delivery in vascular tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59(4-5):360-373.
97. Bategay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage EH, Pech M. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *The Journal of Cell Biology* 1994;125(4):917-928.
98. Saik JE, Gould DJ, Watkins EM, Dickinson ME, West JL. Covalently immobilized platelet-derived growth factor-BB promotes angiogenesis in biomimetic poly(ethylene glycol) hydrogels. *Acta Biomater* 2011;7(1):133-143.
99. Reigstad LJ, Sande HM, Fluge ò, Bruland O, Muga A, Varhaug JE, et al. Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-C, a PDGF Family Member with a Vascular Endothelial Growth Factor-like Structure. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278(19):17114-17120.

100. Major TC, Keiser JA. Inhibition of Cell Growth: Effects of the Tyrosine Kinase Inhibitor CGP 53716. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283(1):402-410.
101. Gobin AS, West JL. Effects of epidermal growth factor on fibroblast migration through biomimetic hydrogels. *Biotechnol Prog* 2003;19(6):1781-1785.
102. Reynolds CM, Eguchi S, Frank GD, Motley ED. Signaling mechanisms of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2002;39(2 Pt 2):525-529.
103. Rask F, Dallabrida SM, Ismail NS, Amoozgar Z, Yeo Y, Rupnick MA, et al. Photocrosslinkable chitosan modified with angiopoietin-1 peptide, QHREDGS, promotes survival of neonatal rat heart cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2010;95A(1):105-117.
104. Harrison BS, Eberli D, Lee SJ, Atala A, Yoo JJ. Oxygen producing biomaterials for tissue regeneration. *Biomaterials* 2007;28(31):4628-4634.
105. Fan VH, Tamama K, Au A, Littrell R, Richardson LB, Wright JW, et al. Tethered epidermal growth factor provides a survival advantage to mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007;25(5):1241-1251.
106. Prasad CK, Muraleedharan CV, Krishnan LK. Bio-mimetic composite matrix that promotes endothelial cell growth for modification of biomaterial surface. *J Biomed Mater Res A* 2007;80(3):644-654.
107. Li X, Lee C, Tang Z, Zhang F, Arjunan P, Li Y, et al. VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? *Cell Adh Migr* 2009;3(4):322-327.

108. Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1995;95(5):2266-2274.
109. Bai H-z, Pollman MJ, Inishi Y, Gibbons GH. Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis : Modulation of Bad by a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Pathway. *Circ Res* 1999;85(3):229-237.
110. Pollman MJ, Naumovski L, Gibbons GH. Vascular Cell Apoptosis : Cell Type-Specific Modulation by Transforming Growth Factor- β 1 in Endothelial Cells Versus Smooth Muscle Cells. *Circulation* 1999;99(15):2019-2026.
111. Wang CH, Verma S, Hsieh IC, Hung A, Cheng TT, Wang SY, et al. Stem cell factor attenuates vascular smooth muscle apoptosis and increases intimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(3):540-547.
112. Ying WZ, Zhang HG, Sanders PW. EGF receptor activity modulates apoptosis induced by inhibition of the proteasome of vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(1):131-142.
113. Cui R-R, Mao D-A, Yi L, Wang C, Zhang X-X, Xie H, et al. Apelin suppresses apoptosis of human vascular smooth muscle cells via APJ/PI3-K/Akt signaling pathways. *Amino Acids* 2010;39(5):1193-1200.
114. Wang S, Wang Y, Jiang J, Wang R, Li L, Qiu Z, et al. 15-HETE protects rat pulmonary arterial smooth muscle cells from apoptosis via the PI3K/Akt pathway. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2010;91(1-2):51-60.

115. Lee S, Maharjan S, Kim K, Kim N-J, Choi H-J, Kwon Y-G, et al. Cholesterol-derived novel anti-apoptotic agents on the structural basis of ginsenoside Rk1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010;20(23):7102-7105.
116. Bachar AR, Scheffer L, Schroeder AS, Nakamura HK, Cobb LJ, Oh YK, et al. Humanin is expressed in human vascular walls and has a cytoprotective effect against oxidized LDL-induced oxidative stress. *Cardiovascular Research* 2010;88(2):360-366.
117. Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM. Oxidized Low-Density Lipoprotein Induces Apoptosis of Human Endothelial Cells by Activation of CPP32-Like Proteases : A Mechanistic Clue to the 'Response to Injury' Hypothesis. *Circulation* 1997;95(7):1760-1763.
118. Wu J, Parungo C, Wu G, Kang PM, Laham RJ, Sellke FW, et al. PR39 inhibits apoptosis in hypoxic endothelial cells: role of inhibitor apoptosis protein-2. *Circulation* 2004;109(13):1660-1667.
119. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362(6423):801-809.
120. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AM, Langelier Y, et al. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol* 2005;174(9):5740-5749.
121. Raymond MA, Desormeaux A, Laplante P, Vigneault N, Filep JG, Landry K, et al. Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VSMC. *Faseb J* 2004;18(6):705-707.

122. Soulez M, Sirois I, Brassard N, Raymond M-A, Nicodème F, Noiseux N, et al. Epidermal Growth Factor and Perlecan Fragments Produced by Apoptotic Endothelial Cells Co-Ordinately Activate ERK1/2-Dependent Antiapoptotic Pathways in Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* 2010;28(4):810-820.
123. Mathews MB. Macromolecular properties of isomeric chondroitin sulfates. *Biochim Biophys Acta* 1959;35:9-17.
124. Lamari FN, Theocharis AD, Asimakopoulou AP, Malavaki CJ, Karamanos NK. Metabolism and biochemical/physiological roles of chondroitin sulfates: analysis of endogenous and supplemental chondroitin sulfates in blood circulation. *Biomed Chromatogr* 2006;20(6-7):539-550.
125. Jensen M, Birch Hansen P, Murdan S, Frokjaer S, Florence AT. Loading into and electro-stimulated release of peptides and proteins from chondroitin 4-sulphate hydrogels. *Eur J Pharm Sci* 2002;15(2):139-148.
126. Handley CJ, Samiric T, Ilic MZ. Structure, metabolism, and tissue roles of chondroitin sulfate proteoglycans. *Adv Pharmacol* 2006;53:219-232.
127. Theocharis AD, Tsolakis I, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Chondroitin Sulfate as a Key Molecule in the Development of Atherosclerosis and Cancer Progression. In: Nicola V, editor. *Advances in Pharmacology*: Academic Press; 2006. p. 281-295.
128. Wang L-F, Shen S-S, Lu S-C. Synthesis and characterization of chondroitin sulfate-methacrylate hydrogels. *Carbohydrate Polymers* 2003;52(4):389-396.
129. Wang DA, Varghese S, Sharma B, Strehin I, Fermanian S, Gorham J, et al. Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue-biomaterial integration. *Nat Mater* 2007;6(5):385-392.

130. Sintov A, Di-Capua N, Rubinstein A. Cross-linked chondroitin sulphate: characterization for drug delivery purposes. *Biomaterials* 1995;16(6):473-478.
131. Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwipp H, Schneiders W. Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials* 2006;27(32):5561-5571.
132. Li Q, Williams CG, Sun DD, Wang J, Leong K, Elisseeff JH. Photocrosslinkable polysaccharides based on chondroitin sulfate. *J Biomed Mater Res A* 2004;68(1):28-33.
133. van Susante JLC, Pieper J, Buma P, van Kuppevelt TH, van Beuningen H, van Der Kraan PM, et al. Linkage of chondroitin-sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes in vitro. *Biomaterials* 2001;22(17):2359-2369.
134. Reyes JM, Herretes S, Pirouzmanesh A, Wang DA, Elisseeff JH, Jun A, et al. A modified chondroitin sulfate aldehyde adhesive for sealing corneal incisions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(4):1247-1250.
135. Gilbert ME, Kirker KR, Gray SD, Ward PD, Szakacs JG, Prestwich GD, et al. Chondroitin sulfate hydrogel and wound healing in rabbit maxillary sinus mucosa. *Laryngoscope* 2004;114(8):1406-1409.
136. Mi FL, Shyu SS, Peng CK, Wu YB, Sung HW, Wang PS, et al. Fabrication of chondroitin sulfate-chitosan composite artificial extracellular matrix for stabilization of fibroblast growth factor. *J Biomed Mater Res A* 2006;76(1):1-15.
137. Liu Y, He T, Song H, Gao C. Layer-by-layer assembly of biomacromolecules on poly(ethylene terephthalate) films and fiber fabrics to promote endothelial cell growth. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2007;81A(3):692-704.

138. Chupa JM, Foster AM, Sumner SR, Madihally SV, Matthew HW. Vascular cell responses to polysaccharide materials: in vitro and in vivo evaluations. *Biomaterials* 2000;21(22):2315-2322.
139. Penc SF, Pomahac B, Winkler T, Dorschner RA, Eriksson E, Herndon M, et al. Dermatan Sulfate Released after Injury Is a Potent Promoter of Fibroblast Growth Factor-2 Function. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273(43):28116-28121.
140. Zou XH, Foong WC, Cao T, Bay BH, Ouyang HW, Yip GW. Chondroitin Sulfate in Palatal Wound Healing. *Journal of Dental Research* 2004;83(11):880-885.
141. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990;265(14):7709-7712.
142. Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H, Ferns GA. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006;186(1):38-53.
143. Boonstra J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, van Bergen en Henegouwen P. The epidermal growth factor. *Cell Biol Int* 1995;19(5):413-430.
144. Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal* 2006;18(12):2089-2097.
145. Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Arima Y, Iwata H. Oriented immobilization of epidermal growth factor onto culture substrates for the selective expansion of neural stem cells. *Biomaterials* 2007;28(24):3517-3529.

146. Boucher C, Liberelle Bt, Jolicoeur M, Durocher Y, De Crescenzo G. Epidermal Growth Factor Tethered through Coiled-Coil Interactions Induces Cell Surface Receptor Phosphorylation. *Bioconjugate Chemistry* 2009;20(8):1569-1577.
147. Backer MV, Patel V, Jehning BT, Claffey KP, Backer JM. Surface immobilization of active vascular endothelial growth factor via a cysteine-containing tag. *Biomaterials* 2006;27(31):5452-5458.
148. Stefonek TJ, Masters KS. Immobilized gradients of epidermal growth factor promote accelerated and directed keratinocyte migration. *Wound Repair and Regeneration* 2007;15(6):847-855.
149. Klenkler BJ, Griffith M, Becerril C, West-Mays JA, Sheardown H. EGF-grafted PDMS surfaces in artificial cornea applications. *Biomaterials* 2005;26(35):7286-7296.
150. Charbonneau C, Gautrot JE, Hebert MJ, Zhu XX, Lerouge S. Chondroitin-4-Sulfate: A Bioactive Macromolecule to Foster Vascular Healing around Stent-Grafts after Endovascular Aneurysm Repair. *Macromol Biosci* 2007:746-752.
151. Merhi Y, King M, Guidoin R. Acute thrombogenicity of intact and injured natural blood conduits versus synthetic conduits: neutrophil, platelet, and fibrin(ogen) adsorption under various shear-rate conditions. *J Biomed Mater Res* 1997;34(4):477-485.
152. Cejna M, Virmani R, Jones R, Bergmeister H, Loewe C, Schoder M, et al. Biocompatibility and performance of the Wallstent and the Wallgraft, Jostent, and Hemobahn stent-grafts in a sheep model. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13(8):823-830.
153. Benson AE, Palmaz JC, Tio FO, Sprague EA, Encarnacion CE, Josephs SC. Polytetrafluoroethylene-encapsulated stent-grafts: use in experimental abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Interv Radiol* 1999;10(5):605-612.

154. Mohan IV, Harris PL, van Marrewijk CJ, Laheij RJ, How TV. Factors and Forces Influencing Stent-Graft Migration After Endovascular Aortic Aneurysm Repair. *Journal of Endovascular Therapy* 2002;9(6):748-755.
155. Kalliafas S, Albertini J-N, Macierewicz J, Yusuf SW, Whitaker SC, Davidson I, et al. Stent-Graft Migration After Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysm. *Journal of Endovascular Therapy* 2002;9(6):743-747.
156. England A, Butterfield JS, Jones N, McCollum CN, Nasim A, Welch M, et al. Device migration after endovascular abdominal aortic aneurysm repair: experience with a talent stent-graft. *J Vasc Interv Radiol* 2004;15(12):1399-1405.
157. Schurink GW, Aarts NJ, van Bockel JH. Endoleak after stent-graft treatment of abdominal aortic aneurysm: a meta-analysis of clinical studies. *Br J Surg* 1999;86(5):581-587.
158. White GH, Yu W, May J, Chaufour X, Stephen MS. Endoleak as a Complication of Endoluminal Grafting of Abdominal Aortic Aneurysms: Classification, Incidence, Diagnosis, and Management. *Journal of Endovascular Surgery* 1997;4(2):152-168.
159. McArthur C, Teodorescu V, Eisen L, Morrissey N, Faries P, Hollier L, et al. Histopathologic analysis of endovascular stent grafts from patients with aortic aneurysms: Does healing occur? *J Vasc Surg* 2001;33(4):733-738.
160. Zhang J, Schmidt J, Ryschich E, Schumacher H, Allenberg JR. Increased apoptosis and decreased density of medial smooth muscle cells in human abdominal aortic aneurysms. *Chin Med J (Engl)* 2003;116(10):1549-1552.

161. Tang PC, Coady MA, Lovoulos C, Dardik A, Aslan M, Elefteriades JA, et al. Hyperplastic cellular remodeling of the media in ascending thoracic aortic aneurysms. *Circulation* 2005;112(8):1098-1105.
162. Stehbens. Pathology and pathogenesis of degenerative atherosclerotic aneurysms. In: PB KRaD, editor. *Development of aneurysms: Eureka Edition*; 2000. p. 84-125.
163. Malik N, Francis SE, Holt CM, Gunn J, Thomas GL, Shepherd L, et al. Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty. *Circulation* 1998;98(16):1657-1665.
164. Guevara NV, Kim HS, Antonova EI, Chan L. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat Med* 1999;5(3):335-339.
165. Pollman MJ, Hall JL, Mann MJ, Zhang L, Gibbons GH. Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med* 1998;4(2):222-227.
166. Diez J, Fortuno MA, Zalba G, Etayo JC, Fortuno A, Ravassa S, et al. Altered regulation of smooth muscle cell proliferation and apoptosis in small arteries of spontaneously hypertensive rats. *Eur Heart J [Proceedings Paper]* 1998;19:G29-G33.
167. White DJ, Puranen S, Johnson MS, Heino J. The collagen receptor subfamily of the integrins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004;36(8):1405-1410.
168. Pieper JS, Oosterhof A, Dijkstra PJ, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. *Biomaterials* 1999;20(9):847-858.

169. Staros JV, Wright RW, Swingle DM. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal Biochem* 1986;156(1):220-222.
170. Gratzner PF, Lee JM. Control of pH alters the type of cross-linking produced by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) treatment of acellular matrix vascular grafts. *J Biomed Mater Res* 2001;58(2):172-179.
171. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 1986;883(2):173-177.
172. Raymond MA, Vigneault N, Luyckx V, Hebert MJ. Paracrine repercussions of preconditioning on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291(2):261-269.
173. Potter K, Kidder LH, Levin IW, Lewis EN, Spencer RG. Imaging of collagen and proteoglycan in cartilage sections using Fourier transform infrared spectral imaging. *Arthritis Rheum* 2001;44(4):846-855.
174. Raines EW, Koyama H, Carragher NO. The Extracellular Matrix Dynamically Regulates Smooth Muscle Cell Responsiveness to PDGF α . *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;902(1):39-52.
175. Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *Faseb J* 2006;20(1):9-22.
176. Bullett NA, Bullett DP, Truica-Marasescu F-E, Lerouge S, Mwale F, Wertheimer MR. Polymer surface micropatterning by plasma and VUV-photochemical modification for controlled cell culture. *Applied Surface Science* 2004;235(4):395-405.

177. Charbonneau C, Liberelle B, Hebert MJ, De Crescenzo G, Lerouge S. Stimulation of cell growth and resistance to apoptosis in vascular smooth muscle cells on a chondroitin sulfate/epidermal growth factor coating. *Biomaterials* 2011;32(6):1591-1600.
178. Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwipp H, Schneiders W. Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials* 2006;27(32):5561-5571.
179. Seuryneck-Servoss SL, White AM, Baird CL, Rodland KD, Zangar RC. Evaluation of surface chemistries for antibody microarrays. *Analytical Biochemistry* 2007;371(1):105-115.
180. Liberelle B, Banquy X, Giasson S. Stability of Silanols and Grafted Alkylsilane Monolayers on Plasma-Activated Mica Surfaces. *Langmuir* 2008;24(7):3280-3288.
181. Grabarek Z, Gergely J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal Biochem* 1990;185(1):131-135.
182. Wetterö J, Askendal A, Bengtsson T, Tengvall P. On the binding of complement to solid artificial surfaces in vitro. *Biomaterials* 2002;23(4):981-991.
183. Kusanagi M, Matsui O, Sanada J, Ogi T, Takamatsu S, Zhong H, et al. Hydrogel-Mediated Release of Basic Fibroblast Growth Factor From a Stent-Graft Accelerates Biological Fixation With the Aortic Wall in a Porcine Model. *Journal of Endovascular Therapy* 2007;14(6):785-793.
184. Masaki K, Takatsugu S, Koji H, Yoichiro M, Noriyuki K, Kyoko I-Y, et al. Basic fibroblast growth factor slow release stent graft for endovascular aortic aneurysm repair: A canine model experiment. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for*

Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter 2008;48(5):1306-1314.

185. Popplewell JF, Swann MJ, Ahmed Y, Turnbull JE, Fernig DG. Fabrication of carbohydrate surfaces by using nonderivatised oligosaccharides, and their application to measuring the assembly of sugar-protein complexes. *Chembiochem* 2009;10(7):1218-1226.

186. Boucher C, Ruiz J-C, Thibault M, Buschmann MD, Wertheimer MR, Jolicoeur M, et al. Human corneal epithelial cell response to epidermal growth factor tethered via coiled-coil interactions. *Biomaterials* 2010;31(27):7021-7031.

187. Girard-Lauriault PL, Desjardins P, Unger WES, Lippitz A, Wertheimer MR. Chemical Characterisation of Nitrogen-Rich Plasma-Polymer Films Deposited in Dielectric Barrier Discharges at Atmospheric Pressure. *Plasma Processes and Polymers* 2008;5(7):631-644.

188. Girardeaux C, Zammateo N, Art M, Gillon B, Pireaux J, Caudano R. Amination of Poly(ethylene-terephthalate) polymer surface for biochemical applications. *Plasmas and Polymers* 1996;1(4):327-346.

189. TANAKA K. Physicochemical Properties of Chondroitin Sulfate. *Journal of Biochemistry* 1978;83(3):655-659.

190. Loïc Bech TMBLPR. Chemical surface modification of poly(ethylene terephthalate) fibers by aminolysis and grafting of carbohydrates. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2007;45(11):2172-2183.

191. Ma Z, Mao Z, Gao C. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007;60(2):137-157.

192. McArthur SL, McLean KM. Surface Modification. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering 2004:1421 - 1431.
193. Förch R, Zhang Z, Knoll W. Soft Plasma Treated Surfaces: Tailoring of Structure and Properties for Biomaterial Applications. Plasma Processes and Polymers 2005;2(5):351-372.
194. Strobel M, Lyons CS. An Essay on Contact Angle Measurements. Plasma Processes and Polymers 2011;8(1):8-13.
195. Kajimoto M, Shimono T, Hirano K, Miyake Y, Kato N, Imanaka-Yoshida K, et al. Basic fibroblast growth factor slow release stent graft for endovascular aortic aneurysm repair: A canine model experiment. Journal of Vascular Surgery 2008;48(5):1306-1314.
196. Raymond M-A, D'Ormeaux A, Laplante P, Vigneault N, Filep JG, Landry K, et al. Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on vascular smooth muscle cells. The FASEB Journal 2004.
197. Martín-de-Saavedra MD, del Barrio L, Cañas N, Egea J, Lorrio S, Montell EI, et al. Chondroitin sulfate reduces cell death of rat hippocampal slices subjected to oxygen and glucose deprivation by inhibiting p38, NF[κ]B and iNOS. Neurochemistry International 2011;In Press, Corrected Proof.
198. Lizarbe TR, Tarín C, Gúmez M, Lavin B, Aracil E, Orte LM, et al. Nitric Oxide Induces the Progression of Abdominal Aortic Aneurysms through the Matrix Metalloproteinase Inducer EMMPRIN. The American Journal of Pathology 2009;175(4):1421-1430.

199. Channon KM, Qian H, George SE. Nitric Oxide Synthase in Atherosclerosis and Vascular Injury : Insights From Experimental Gene Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(8):1873-1881.
200. Iovu M, Dumais G, du Souich P. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008;16(Supplement 3):S14-S18.
201. Pieper JS, van der Kraan PM, Hafmans T, Kamp J, Buma P, van Susante JL, et al. Crosslinked type II collagen matrices: preparation, characterization, and potential for cartilage engineering. *Biomaterials* 2002;23(15):3183-3192.
202. Sechriest VF, Miao YJ, Niyibizi C, Westerhausen-Larson A, Matthew HW, Evans CH, et al. GAG-augmented polysaccharide hydrogel: a novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis. *J Biomed Mater Res* 2000;49(4):534-541.
203. Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Traina P, Calatroni A. Chondroitin-4-sulphate inhibits NF-kB translocation and caspase activation in collagen-induced arthritis in mice. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008;16(12):1474-1483.
204. McCormick ML, Gavrila D, Weintraub NL. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(3):461-469.
205. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepe S, Livingston EH. Screening and Detection of Apoptosis. *Journal of Surgical Research* 2007;139(1):143-156.
206. Fukui D, Miyagawa S, Soeda J, Tanaka K, Urayama H, Kawasaki S. Overexpression of transforming growth factor beta1 in smooth muscle cells of human abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;25(6):540-545.

207. Platt MO, Roman AJ, Wells A, Lauffenburger DA, Griffith LG. Sustained epidermal growth factor receptor levels and activation by tethered ligand binding enhances osteogenic differentiation of multi-potent marrow stromal cells. *Journal of Cellular Physiology* 2009;221(2):306-317.
208. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TPJ, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research* 2003;284(1):31-53.
209. De Crescenzo G, Pham PL, Durocher Y, O'Connor-McCourt MD. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding to the extracellular domain of the type II TGF-beta receptor: receptor capture on a biosensor surface using a new coiled-coil capture system demonstrates that avidity contributes significantly to high affinity binding. *J Mol Biol* 2003;328(5):1173-1183.
210. Worth NF, Rolfe BE, Song J, Campbell GR. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 2001;49(3):130-145.
211. Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Dryjski M. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell and Tissue Research* 1995;281(3):421-433.
212. Orr AW, Hastings NE, Blackman BR, Wamhoff BR. Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis. *J Vasc Res* 2010;47(2):168-180.

213. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiological Reviews* 2004;84(3):767-801.

214. Soulez G, Lerouge S, Salazkin I, Darsaut T, Oliva VL, Raymond J. Type I and Collateral Flow in Experimental Aneurysm Models Treated with Stent-Grafts. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2007;18(2):265-272.

