



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I**

**Faculté de Médecine**

**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ-ENVIRONNEMENT**

---

**THESE**



Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I**

**Spécialité : Bioingénierie**

Présentée et soutenue publiquement

Par

**Cédric BOURA**

Le 16 Décembre 2003

**INTERETS DES FILMS MINCES MULTICOUCHES DE POLYELECTROLYTES  
DANS LA CONCEPTION DE SUBSTITUTS VASCULAIRES**

Directeur de thèse : Professeur J.F. STOLTZ

**JURY**

|               |                |            |                    |
|---------------|----------------|------------|--------------------|
| Rapporteurs : | M. P. SCHAAF   | Professeur | ICS, Strasbourg    |
|               | M. R. SANTUS   | Professeur | MNHN, Paris        |
| Examineurs :  | M. J.F. STOLTZ | Professeur | UHP, Nancy I       |
|               | M. P. MENU     | MCU        | UHP, Nancy I       |
|               | Mme S. MULLER  | CR         | INSERM, Nancy      |
|               | M. J.C. VOEGEL | DR         | INSERM, Strasbourg |
|               | Mme E. PAYAN   | CR         | CNRS, Nancy        |

***Avant-propos et remerciements***

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique entre le laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA-UMR CNRS 7563 (Faculté de Médecine de Nancy) et l'unité INSERM 595 (Faculté de Médecine, Strasbourg).

*A Amélie, que j'aime.*

*A mes parents, à mon frère, à toute ma famille,  
ainsi qu'à tous mes amis, pour leur soutien et leurs encouragements.*

*Au terme de ce travail, je tiens avant tout à adresser mes remerciements chaleureux à tous ceux qui m'ont aidé au cours de sa réalisation.*



*Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur **Jean-François STOLTZ**, mon directeur de thèse, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour la confiance qu'il a su m'apporter lors de la réalisation de ce travail.*

*J'exprime également ma reconnaissance à Monsieur **Patrick MENU**, maître de conférence à la faculté de pharmacie de Nancy, pour sa disponibilité et ses encouragements depuis mes premiers pas dans le monde de la recherche.*

*J'exprime ma sincère reconnaissance à Madame **Sylvaine MULLER**, chargée de recherche à l'INSERM, pour son implication dans mon travail au cours de ma thèse et pour son aide et ses conseils précieux.*

*Je remercie très sincèrement Monsieur **Jean Claude VOEGEL**, directeur de recherche de l'unité INSERM 595, pour sa disponibilité, ses encouragements ainsi que pour ses conseils concernant ce travail.*

*Je remercie également Madame **Elisabeth PAYAN**, chargée de recherche au CNRS, pour ses conseils concernant ce travail.*

*J'exprime toute ma gratitude et mon profond respect à Monsieur le Professeur **René SANTUS** et Monsieur le Professeur **Pierre SCHAAF** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.*

*Je tiens à remercier Monsieur **Dominique DUMAS**, ingénieur de recherche, pour ses conseils et son aide notamment concernant la microscopie de fluorescence.*

*Je remercie également Monsieur **Dominique VAUTIER** pour son aide concernant la microscopie à force atomique.*

*Mes remerciements vont également vers mes chers collègues et amis du laboratoire pour m'avoir encouragé et supporté durant ces années :*

*Brigitte, Annie, Céline, Claude, Christophe, Ghislaine, Lei, Like, Lina, Mariama, Monique, Natalia, Shalaw, Xiong, Véronique, Walter.*

*Enfin, je tiens également à remercier les personnes du laboratoire d'Hématologie et Physiologie de la faculté de Pharmacie de Nancy pour leur sympathie :*

*Béatrice, Géraldine, Isabelle, Marie, Paulo, Sandra.*

***Table des matières***



## Table des matières

|                                                                                                             |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Avant-propos et remerciements .....                                                                         | 2      |
| Table des matières.....                                                                                     | 7      |
| Liste des publications et communications .....                                                              | 11     |
| Liste des abréviations.....                                                                                 | 13     |
| Tables des illustrations.....                                                                               | 16     |
| <br>INTRODUCTION GENERALE .....                                                                             | <br>20 |
| <br>CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....                                                                | <br>24 |
| I.1. L'endothélium vasculaire. ....                                                                         | 26     |
| I.1.1. Organisation de l'endothélium vasculaire. ....                                                       | 26     |
| I.1.2. Fonctionnalités de l'endothélium vasculaire. ....                                                    | 27     |
| I.1.2.1. Barrière de perméabilité sélective. ....                                                           | 27     |
| I.1.2.2. Effet anti-thrombogénique.....                                                                     | 28     |
| I.1.2.3. Synthèse des médiateurs vasoactifs. ....                                                           | 29     |
| I.1.3. Forces hémodynamiques agissant sur l'endothélium vasculaire. ....                                    | 30     |
| I.1.3.1. Récepteurs des signaux mécaniques.....                                                             | 31     |
| I.1.3.2. Facteurs mécaniques et expression des gènes dans les cellules endothéliales. ...                   | 34     |
| I.2. Interaction des cellules endothéliales avec leur environnement.....                                    | 35     |
| I.2.1. Interaction des cellules endothéliales avec la matrice extracellulaire. ....                         | 35     |
| I.2.1.1 Constituants de la membrane basale et du sous-endothélium. ....                                     | 35     |
| I.2.1.2. Les intégrines.....                                                                                | 36     |
| I.2.1.3. Les adhésions focales et la kinase d'adhésion focale (FAK). ....                                   | 39     |
| I.2.2. Interactions des cellules endothéliales avec les cellules sanguines. ....                            | 42     |
| I.2.2.1. les molécules d'adhérences endothéliales impliquées dans l'adhésion leucocytaire. ....             | 43     |
| I.2.2.2. les différentes étapes de la diapédèse leucocytaire.....                                           | 47     |
| I.3. Ingénierie tissulaire des vaisseaux.....                                                               | 49     |
| I.3.1. Les différentes approches de construction des substituts vasculaires par ingénierie tissulaire. .... | 50     |
| I.3.1.1 Endothélialisation de prothèses synthétiques. ....                                                  | 50     |
| I.3.1.2. Constructions basées sur le collagène.....                                                         | 51     |
| I.3.1.3 Assemblage de feuillets cellulaires.....                                                            | 52     |
| I.3.1.4 Polymères poreux et cellules vasculaires cultivées en condition dynamique.....                      | 53     |
| I.3.2. Les différentes sources de cellules endothéliales. ....                                              | 55     |
| I.3.3. Modifications de surfaces appliquées aux matériaux synthétiques. ....                                | 56     |
| I.3.3.1 Adsorption de protéines ou de peptides.....                                                         | 56     |
| I.3.3.2 Traitements physiques.....                                                                          | 58     |
| I.3.4. Films multicouches de polyelectrolytes.....                                                          | 59     |
| I.4.Objectifs.....                                                                                          | 64     |
| <br>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES .....                                                               | <br>65 |
| II.1 Méthodologie générale.....                                                                             | 66     |
| II.1.1. Culture des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC).....                         | 66     |
| II.1.1.1 Réactifs et matériels.....                                                                         | 66     |
| II.1.1.2 Culture des HUVEC.....                                                                             | 67     |

|                                                                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| II.1.2 Stimulation et traitements des cellules endothéliales. ....                                                                                        | 69  |
| II.1.2.1. Stimulation mécanique : contraintes de cisaillement .....                                                                                       | 69  |
| II.1.2.2. Stimulation biochimique par la cytokine TNF $\alpha$ .....                                                                                      | 71  |
| II.1.2.3. Inhibition de la polymérisation de la F-actine .....                                                                                            | 71  |
| II.1.3 Construction des films multicouches de polyélectrolytes. ....                                                                                      | 72  |
| II.1.3.1. Lavage des lames de verre .....                                                                                                                 | 72  |
| II.1.3.2. Solution de Polyélectrolytes .....                                                                                                              | 72  |
| II.1.3.3. Préparations des films multicouches de polyélectrolytes. ....                                                                                   | 73  |
| II.2 Méthodologie spécifique. ....                                                                                                                        | 74  |
| II.2.1. Cytotoxicité : activité métabolique (test MTT) .....                                                                                              | 74  |
| II.2.2. Numération cellulaire : adhésion initiale et croissance. ....                                                                                     | 75  |
| II.2.3. Interactions cellules/surfaces .....                                                                                                              | 77  |
| II.2.3.1 Attachement des cellules soumises aux contraintes de cisaillement .....                                                                          | 77  |
| II.2.3.1. Attachement des cellules traitées par la trypsine .....                                                                                         | 78  |
| II.2.4 Cytométrie en flux .....                                                                                                                           | 79  |
| II.2.4.1 : Immuno-fluorescence indirecte .....                                                                                                            | 79  |
| II.2.4.2 : Protocole de marquage des molécules étudiées .....                                                                                             | 80  |
| II.2.4.3 Analyse des échantillons cellulaires .....                                                                                                       | 81  |
| II.2.4.4. Mesure de la densité antigénique des récepteurs membranaires .....                                                                              | 82  |
| II.2.5: Microscopie de fluorescence .....                                                                                                                 | 86  |
| II.2.5.1 : Marquage des échantillons cellulaires .....                                                                                                    | 86  |
| II.2.5.2 : Microscopie à sectionnement optique .....                                                                                                      | 87  |
| II.2.5.3 : Microscopie confocale à balayage laser .....                                                                                                   | 88  |
| II.2.6 Microscopie à force atomique (AFM) .....                                                                                                           | 90  |
| II.2.6.1 Principe : .....                                                                                                                                 | 90  |
| II.2.6.2 Préparation des échantillons cellulaires et acquisition des images .....                                                                         | 90  |
| II.2.7 Expression de FAK pY397 par western blotting : .....                                                                                               | 91  |
| II.2.8 Analyses Statistiques .....                                                                                                                        | 93  |
| CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION .....                                                                                                              | 94  |
| III.1. Biocompatibilité des films multicouches de polyélectrolytes .....                                                                                  | 95  |
| III.1.1 Résultats .....                                                                                                                                   | 96  |
| III.1.1.1 Morphologie cellulaire .....                                                                                                                    | 96  |
| III.1.1.2 Cytotoxicité des surfaces (test MTT) .....                                                                                                      | 97  |
| III.1.1.3. Adhésion initiale et croissance cellulaire .....                                                                                               | 98  |
| III.1.1.4 Activité métabolique cellulaire .....                                                                                                           | 101 |
| III.1.1.5 Contrôle du phénotype des cellules endothéliales : expression du facteur von Willebrand (vWf) .....                                             | 102 |
| III.1.2. Discussion .....                                                                                                                                 | 103 |
| III.2. Implication des films multicouches dans l'activation des cellules endothéliales : étude de la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) ..... | 106 |
| III.2.1. Résultats .....                                                                                                                                  | 107 |
| III.2.1.1 Effet de la stimulation par le TNF $\alpha$ sur l'expression d'ICAM-1 .....                                                                     | 107 |
| III.2.1.2 Inhibition de la réorganisation du cytosquelette sur l'expression d'ICAM-1 .....                                                                | 110 |
| III.2.1.3 Effet de la contrainte mécanique sur l'expression d'ICAM-1 .....                                                                                | 113 |
| III.2.2. Discussion .....                                                                                                                                 | 114 |
| III.3 Adhésion des cellules sur les films de polyélectrolytes .....                                                                                       | 117 |
| III.3.1 Résultats .....                                                                                                                                   | 118 |
| III.3.1.1 Morphologie cellulaire par microscopie à force atomique (AFM) .....                                                                             | 118 |
| III.3.1.2. Evaluation des interactions cellules/surfaces .....                                                                                            | 121 |

|                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.3.1.4 Expression membranaire des intégrines $\beta 1$ .....             | 125 |
| III.3.1.5 Expression de FAK pY397 : transduction du signal d'adhésion ..... | 129 |
| III.3.2 Discussion .....                                                    | 130 |
| CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....                              | 134 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....                                            | 139 |
| PUBLICATIONS.....                                                           | 159 |

***Liste des publications et communications***

Liste des publications et communications

**Publications dans des revues internationales :**

Boura C., Menu P., Payan E., Picart C., Voegel J.C., Muller S., Stoltz J.F. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered thin films : an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials*, 24: 3521-3530, 2003.

Boura C., Caron A., Longrois D., Mertes P.M., Labrude P., Menu P. Volume expansion with modified hemoglobin solution, colloids, or crystalloid after hemorrhagic shock in rabbits : effects in skeletal muscle oxygen pressure and use versus arterial blood velocity and resistance. *Shock*, 19: 176-182, 2003.

**Communications dans des congrès :**

Boura C., Muller S., Voegel J.C., Menu P., Payan E., Stoltz J.F. ICAM-1 expression on endothelial cells seeded on multilayered polyelectrolyte thin films. 2<sup>nd</sup> Meeting of the European Tissue Engineering Society (ETES), Genoa, Italy, September 3-6, 2003.

Dumas D., Viriot M.L., Boura C., Gigant C., Latger-Cannard V., Stoltz J.F. Permeability oxygen through endothelial cells monolayer using time-resolved fluorescence microscopy: effect of human plasma viscosity. Multiphoton microscopy in the biomedical science II. San Jose, USA, January 19-25, 2002.

Boura C., Caron A., Longrois D., Mertes P.M., Labrude P., Menu P. Resuscitation from severe hemorrhage with conjugated hemoglobin : consequences on skeletal muscle oxygen tension, lactate, and adenosine concentrations in rabbits. Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology. San diego, USA, p 137, 2001.

Boura C., Jouan V., Longrois D., Mertes P.M., Labrude P., Menu P. Mise au point d'un modèle d'étude in vivo du transport et de l'utilisation de l'oxygène tissulaire. 42e congrès national d'anesthésie et de réanimation. Paris, France, p 137, 21-24 septembre 2000.

*Liste des abréviations*

Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

AFM : microscopie à force atomique

ARNm: acide ribonucléique messenger

BSA: albumine sérique bovine

DMEM :

EDRF : facteur relaxant dérivé de l'endothélium

EDTA : acide éthylènedinitrilotétraacétique

FAK : focal adhesion kinase

FAT: focal adhesion targeting

(b)FGF: (basic) fibroblast growth factor

FN: fibronectine

HS-PG: heparane sulfate protéoglycane

HUVEC : cellule endothéliale de veine ombilicale humaine

ICAM: intercellular adhesion molecule

IFN: interferon

IL: interleukines

LM: laminine

m : membrane

madCAM: mucosal addressin cell adhesion molecule

MTT: bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2yl)-2,5 diphényltétrazolium

n : noyau

NO : oxyde nitrique ou monoxyde d'azote

NOs : nitric oxyde synthase

PAF: paraformaldéhyde

PAH: poly(allylamine hydrochloride)

PAI : inhibiteur de l'activateur du plasminogène

PBS: phosphate buffer saline

PDGF: platelet derived growth factor

PDL: poly(D-lysine)

PECAM: platelet endothelial cell adhesion molecule

PEI: poly(ethylenimine)

PET: polyéthylènetéréphtalate

PGA: acide poly(L-glutamique)

~PGA-PDL : PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL

PGI<sub>2</sub> : prostacycline

PKC: protéine kinase C

PSS : poly(sodium 4-styrene sulfonate)

~PSS-PAH: PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>

PTFE(e): polytétrafluoroéthylène (expansé)

PU: polyuréthane

SSRE: shear stress responsive element

tcps: tissue culture polystyrene

TGF: transforming growth factor

TNF: tumor necrosis factor

tPA : activateur tissulaire du plasminogène

VCAM: vascular cell adhesion molecule

VEGF : vascular endothelial growth factor

vWf: facteur von Willebrand

WP : corps de Weibel Palade



***Tables des illustrations***

## Figures

## Chapitre I : Etude bibliographique

|                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure I.1 : Structure pariétale d'une artère. ....                                                                                                                                                                | 25 |
| Figure I.3 : Représentation des forces hémodynamiques au contact de la paroi vasculaire. ....                                                                                                                      | 30 |
| Figure I.4 : récepteurs impliqués dans la mécanotransduction. ....                                                                                                                                                 | 33 |
| Figure I.5 : Schéma de l'interaction d'une cellule endothéliale avec la matrice extracellulaire. ....                                                                                                              | 36 |
| Figure I.6 : Représentation schématique des sous unités $\alpha$ $\beta$ d'une intégrine et relation avec la matrice extracellulaire par la séquence RGD de la fibronectine. ....                                  | 37 |
| Figure I.7 : Interaction des intégrines avec les protéines du cytosquelette. ....                                                                                                                                  | 40 |
| Figure I.8 : Structure et organisation des domaines de la FAK. ....                                                                                                                                                | 40 |
| Figure I.9 : Représentation des principales fonctions cellulaires régulées par l'interaction des cellules endothéliales avec la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de FAK. ....                           | 41 |
| Figure I.10: Représentation schématique des 3 types de sélectines et de la liaison sélectine avec la glycoprotéine contenant le tétrasaccharide terminal. ....                                                     | 44 |
| Figure I.11 : Représentation schématique d'une molécule d'adhérence de la superfamille des immunoglobulines. ....                                                                                                  | 46 |
| Figure I.12 : Représentation schématique des différentes étapes du phénomène d'adhésion leucocytaire et de transmigration sur les cellules endothéliales. ....                                                     | 48 |
| Figure I.13 : Représentation schématique d'une prothèse synthétique endothélialisée. ....                                                                                                                          | 50 |
| Figure I.14 : Représentation schématique d'une construction à base de collagène. ....                                                                                                                              | 52 |
| Figure I.15 : Représentation schématique d'un assemblage de feuillets cellulaires. ....                                                                                                                            | 53 |
| Figure I.16 : Polymère biodégradable d'acide poly-glycolique recouvert d'une mince couche de poly-4-hydroxybutyrate (PGA/P4HB). Des cellules musculaires sont ensemencées dans les pores. ....                     | 53 |
| Figure I. 17: Description schématique d'un système de flux pulstile in vitro (bioreacteur)....                                                                                                                     | 54 |
| Figure I.18 : Les étapes de la construction d'un film multicouches de polyélectrolytes. ....                                                                                                                       | 59 |
| Figure I.19 : Structure chimique des différents polyélectrolytes utilisés pour la construction des films multicouches de polyélectrolytes. ....                                                                    | 60 |
| Figure I.20 : Evolution du potentiel zeta obtenu en potentiel d'écoulement au cours de la construction d'un film multicouche PEI-(PSS-PAH) <sub>5</sub> . ....                                                     | 61 |
| Figure I.21 : Evolution de l'épaisseur des films PEI-(PSS-PAH) <sub>n</sub> (évolution linéaire) et PEI-(PGA-PLL) <sub>n</sub> (évolution exponentielle) en fonction du nombre de paires de couches déposées. .... | 61 |
| Figure I.22 : Image topographique par microscopie à force atomique (AFM) du film PEI-(PSS-PAH) <sub>2</sub> -PGA-PDL. ....                                                                                         | 62 |

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure II.1. Aspect des HUVEC à confluence. ....                                                      | 68 |
| Figure II.2 : schéma de la chambre d'écoulement. ....                                                 | 69 |
| Figure II.3 : schéma du système en flux. ....                                                         | 70 |
| Figure II.4 : Etalonnage de la pompe péristaltique. ....                                              | 71 |
| Figure II.5 : Représentation schématique des étapes de formation des films multicouches. ....         | 73 |
| Figure II.6 : Courbe étalon de la densité cellulaire en fonction de l'intensité de fluorescence. .... | 76 |
| Figure II.7 : visualisation des noyaux marqués avec le Hoechst 33342. ....                            | 77 |
| Figure II.8 : Principe de l'immunofluorescence indirecte. ....                                        | 79 |

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure II.9 : Histogrammes de fluorescence. Cellules endothéliales incubées avec l'anticorps anti intégrines $\beta 1$ ..... | 82 |
| Figure II.10 : Utilisation de l'étalon. ....                                                                                 | 85 |
| Figure II.11 : Principe de la microscopie par sectionnement optique.....                                                     | 88 |
| Figure II.12 : Principe de la microscopie confocale à balayage laser.....                                                    | 89 |
| Figure II.13 : Schéma du principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique .....                                   | 90 |

### Chapitre III : Résultats et discussion

|                                                                                                                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure III.1 : Influence des différentes modifications de surface sur la morphologie des HUVEC.....                                                                                                                        | 96  |
| Figure III.2 : Cytotoxicité des différentes modifications de surfaces .....                                                                                                                                                | 97  |
| Figure III.3 : Influence des différentes modifications de surface sur le pourcentage d'adhésion des HUVEC après 3h de culture. ....                                                                                        | 98  |
| Figure III.4 : Influence des différentes modifications de surface sur le nombre des HUVEC                                                                                                                                  | 99  |
| Figure III.5 : Influence des différentes modifications de surface sur le temps de doublement des HUVEC. ....                                                                                                               | 100 |
| Figure III.6 : Influence des différentes modifications de surface sur l'activité métabolique mitochondriale cellulaire.....                                                                                                | 101 |
| Figure III.7 : Influence des modifications de surface sur le pourcentage de cellules exprimant le facteur von Willebrand.....                                                                                              | 102 |
| Figure III.8 : Influence des différentes modifications de surface sur l'expression membranaire d'ICAM-1 des HUVEC en condition basale ou stimulées par $TNF\alpha$ pendant 3h et 16h. ....                                 | 108 |
| Figure III.9 : Influence des différentes modifications de surfaces sur la distribution membranaire d'ICAM-1 .....                                                                                                          | 109 |
| Figure III.10 : Influence des différentes modifications de surface sur l'expression membranaire d'ICAM-1 d'HUVEC en condition basale, traitées par la cytochalasine D ou la cytochalasine D + $TNF\alpha$ pendant 3h ..... | 111 |
| Figure III.11 : Influence des différentes modifications de surface sur la distribution membranaire de l'expression d'ICAM-1. Les HUVEC sont traitées par la cytochalasine D + $TNF\alpha$ pendant 3h. ....                 | 112 |
| Figure III.12 : Influence des différentes modifications de surface sur l'expression d'ICAM-1 d'HUVEC soumises à une contrainte de cisaillement .....                                                                       | 113 |
| Figure III.13: Images AFM des HUVEC après 3h de contact.....                                                                                                                                                               | 119 |
| Figure III.14: Images AFM des HUVEC après 48h de culture s.....                                                                                                                                                            | 120 |
| Figure III.15 : Influence des modifications de surface sur l'attachement des HUVEC soumises à une contrainte de cisaillement de 6 dynes/cm <sup>2</sup> .....                                                              | 122 |
| Figure III.16 : Influence des modifications de surface sur l'attachement des HUVEC soumises à une contrainte de cisaillement de 12 dynes/cm <sup>2</sup> . ....                                                            | 123 |
| Figure III.17 : Influence du traitement à la trypsine (0,0025 %, 5 min) sur l'attachement des HUVEC.....                                                                                                                   | 124 |
| Figure III.18 : Influence des différentes modifications de surface sur l'expression des intégrines $\beta 1$ (CD29) après 3h et 48h de culture. ....                                                                       | 126 |
| Figure III.19.a : Expression des intégrines $\beta 1$ par microscopie de fluorescence.....                                                                                                                                 | 127 |
| Figure III.19.b : Expression des intégrines $\beta 1$ par microscopie de fluorescence .....                                                                                                                                | 128 |
| Figure III.20 : Influence des différentes modifications de surface sur l'expression de FAK pY397. ....                                                                                                                     | 129 |

## Tableaux

## Chapitre I : Etude bibliographique

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau I.1 : Résumé des différents facteurs intervenant dans la balance des propriétés thrombogéniques des cellules endothéliales .....                   | 29 |
| Tableau I.2 : Classification et fonctions principales des intégrines et de leur ligands exprimées au niveau des cellules endothéliales.....                | 38 |
| Tableau I.3 : Relation entre facteurs de croissance et intégrines induisant des réponses cellulaires différentes .....                                     | 39 |
| Tableau I.4 : Signaux pro- et anti-inflammatoire agissant sur les cellules endothéliales .....                                                             | 43 |
| Tableau I.5. : Principales molécules d'adhésion intervenant dans le processus d'adhésion leucocytaire.....                                                 | 47 |
| Tableau I.6 : Premières études in vitro utilisant des polymères synthétiques pour l'ensemencement des cellules endothéliales en ingénierie tissulaire..... | 50 |
| Tableau I.7 : Principaux essais cliniques de prothèses vasculaires ensemencées avec des cellules endothéliales. ....                                       | 51 |
| Tableau I.8 : Situation actuelle des différents substituts vasculaires.....                                                                                | 55 |
| Tableau I.9 : Caractéristiques des films PEI-(PSS-PAH) <sub>2</sub> -PGA-PDL et PEI-(PSS-PAH) <sub>3</sub> ....                                            | 62 |

## Chapitre II: Matériels et Méthodes

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau II.1 : Caractéristiques des anticorps utilisés pour le marquage en immunofluorescence indirecte..... | 80 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|



## INTRODUCTION GENERALE

Les pathologies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans les pays industrialisés, en France, ces pathologies représentent environ 180 000 décès par an. La principale cause des maladies cardiovasculaires est l'athérosclérose. Cette lésion des vaisseaux induit progressivement une obstruction de la lumière des vaisseaux, conduisant à terme à un défaut de l'irrigation sanguine et à une nécrose des tissus. Ces pathologies nécessitent, dans les situations extrêmes, le remplacement des vaisseaux lésés de façon chirurgicale par des vaisseaux autologues tels que les veines saphènes qui constituent actuellement un matériaux de premier choix pour la chirurgie vasculaire. Malheureusement, de nombreux patients ne disposent pas de vaisseaux appropriés pour une utilisation en chirurgie, soit parce qu'ils sont déjà endommagés, soit parce qu'ils ont déjà été utilisés lors d'une précédente intervention.

Actuellement, les prothèses synthétiques sont utilisées avec succès dans le traitement des pathologies touchant les grosses artères. Néanmoins, le remplacement des artères moyennes (< 6 mm de diamètre) avec ce type de prothèse ne permet pas de restaurer une fonctionnalité à long terme (Abbott et al 1993). En effet, les matériaux synthétiques utilisés bien que biocompatibles partagent l'inconvénient d'être potentiellement thrombogènes. Leur pérennité fonctionnelle est encore insuffisante et nécessite des traitements anti-thrombotiques contraignants pour les patients. Des progrès importants restent à accomplir avant de pouvoir utiliser des prothèses vasculaires permettant d'éviter de tels traitements. Il serait nécessaire de contrôler la relation entre le sang et la paroi des prothèses, ceci nécessite la mise au point de biomatériaux qui possèdent des propriétés garantissant une hémocompatibilité similaire à celle trouvée *in vivo*.

Depuis ces dernières années, l'émergence de l'ingénierie tissulaire a permis de développer différentes approches dans la conception de substituts vasculaires dans le but de recréer des substituts proches des vaisseaux natifs. L'une des approches, la plus ancienne et la plus simple dans la conception des vaisseaux de remplacement, consiste au recouvrement des prothèses synthétiques par une monocouche de cellules endothéliales. La construction d'un tel substitut bioartificiel posséderait ainsi les propriétés anti-thrombogéniques nécessaires à la fonctionnalité des substituts vasculaires. Un des problèmes à résoudre est de faire adhérer et proliférer les cellules endothéliales sur les composantes synthétiques. Les recherches actuelles visent à modifier la surface de ces prothèses synthétiques afin de permettre la formation d'un endothélium vasculaire et d'éviter également le détachement de ce tissu, après son implantation.

Notre travail a pour but d'évaluer l'intérêt des films multicouches de polyélectrolytes utilisés comme modification de surface dans la conception des substituts vasculaires. En effet, il est nécessaire d'interposer une matrice de nature appropriée, qui puisse favoriser l'adhésion et le développement des cellules endothéliales. Les films multicouches de polyélectrolytes développés par Decher dans le début des années 1990 (Decher et al 1992), offrent de nombreux avantages pouvant être appliqués aux biomatériaux (Elbert et al 1999). Plus particulièrement, grâce à leur charge superficielle, ces assemblages permettraient de créer des interactions électrostatiques favorisant dans un premier temps l'adhésion cellulaire. De plus, les caractéristiques physicochimiques des films tel que l'hydrophilicité, la rugosité, ou les polymères utilisés pourraient également augmenter l'adhésion cellulaire. Ainsi, les films permettraient de créer une nano-architecture favorable au développement des cellules endothéliales sur des surfaces réfractaires à leur adhésion.

Pour notre travail, nous avons utilisés différents polycations : poly(éthylénimine) (PEI), poly(D-lysine) (PDL) et poly(allylamine hydrochloride) (PAH) et différents polyanions : poly(sodium-4-styrène sulfonate) (PSS) et l'acide poly(L-glutamique) (PGA). Ces polyélectrolytes nous ont permis de construire deux films ayant les architectures suivantes : PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL et PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub> (noté respectivement par la suite films ~PGA-PDL et ~PSS-PAH). Pour évaluer les propriétés des films multicouches au niveau de l'endothélium vasculaire, nous avons utilisées des cellules endothéliales primaires de veines ombilicales humaines.

Néanmoins, des études récentes ont montré que les propriétés physico-chimiques des surfaces jouaient un rôle important dans l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire (Imbert et al 1998, Deroanne et al 2001). Dans un premier temps, nous avons observé le comportement des cellules en étudiant les principaux paramètres de biocompatibilité des films multicouches comme la morphologie, l'activité métabolique, l'adhésion et la croissance cellulaire, et l'expression d'un marqueur phénotypique (facteur von Willebrand). Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'influence des films multicouches sur l'expression de la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) impliquée dans le mécanisme de réponse inflammatoire des cellules endothéliales. Enfin, nous avons tenté d'évaluer et de comprendre les phénomènes d'adhésion des cellules sur les films multicouches.

Dans le chapitre I, nous présenterons une étude bibliographique détaillant l'endothélium vasculaire, les interactions des cellules endothéliales avec leur environnement, l'ingénierie tissulaire des vaisseaux.

Le chapitre II rapportera la méthodologie générale du travail et le matériel utilisé dans le cadre des différents types d'expérience. Nous présenterons en particulier la culture primaire de cellules endothéliales humaines, les techniques utilisées pour caractériser la biocompatibilité et l'adhésion cellulaire, et étudier qualitativement et quantitativement les différentes molécules étudiées.

Dans le chapitre III, nous présenterons les résultats expérimentaux qui comporteront trois parties: i) l'étude de la biocompatibilité des cellules sur les films de polyélectrolytes, ii) l'activation des cellules endothéliales à travers l'expression de ICAM-1 dans différentes conditions de stimulation, iii) l'évaluation de l'adhésion des cellules sur les films multicouches.

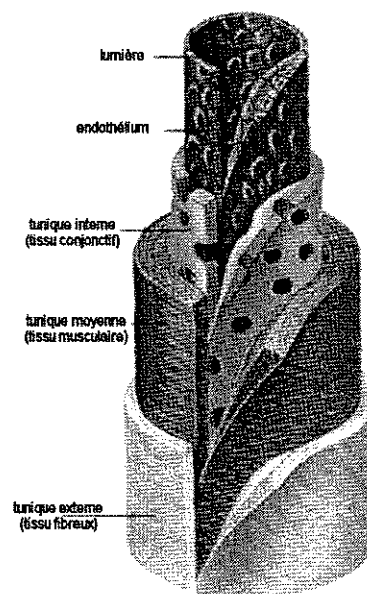
Enfin, le chapitre IV sera consacré aux conclusions et perspectives de notre travail.



## **CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

La fonction des vaisseaux sanguins est de transporter le sang aux différents tissus de l'organisme afin de permettre leur oxygénation et par conséquent leur fonctionnement. Les vaisseaux forment un système branché d'artères, de veines, et de capillaires, avec des tailles et des propriétés mécaniques et biochimiques différentes. Cependant, la paroi de tous les vaisseaux sanguins est constituée des mêmes éléments, avec une importance variable d'une paroi à une autre, conférant à chacun des secteurs vasculaires des propriétés propres. Une paroi vasculaire comprend trois tuniques concentriques et solidement réunies (figure I.1) : une tunique interne ou intima, une tunique moyenne ou média, et une tunique externe ou adventice. L'adventice est une couche de tissu conjonctif lâche qui fixe le vaisseau au tissu conjonctif environnant. La média est composée d'une à plusieurs couches de cellules musculaires lisses et permet la régulation du calibre du vaisseau. La couche interne est composée d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur un tissu conjonctif. Cette monocouche de cellules endothéliales se présente toujours à la lumière vasculaire et elle est directement soumise au contact du sang.

Dans notre travail, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'endothélium vasculaire afin de montrer l'importance de ce tissu dans le contrôle des interactions de la paroi vasculaire avec le sang et les éléments qui le composent et par conséquent son intérêt dans la construction des substituts vasculaires.



**Figure I.1 : Structure pariétale d'une artère. La tunique interne représente approximativement le dixième de l'épaisseur de la paroi vasculaire. Elle est recouverte vers la lumière d'un endothélium reposant sur une membrane basal discontinue, elle même ancrée sur le réseau fibrillaire du sous endothélium (d'après Withfield 1996).**

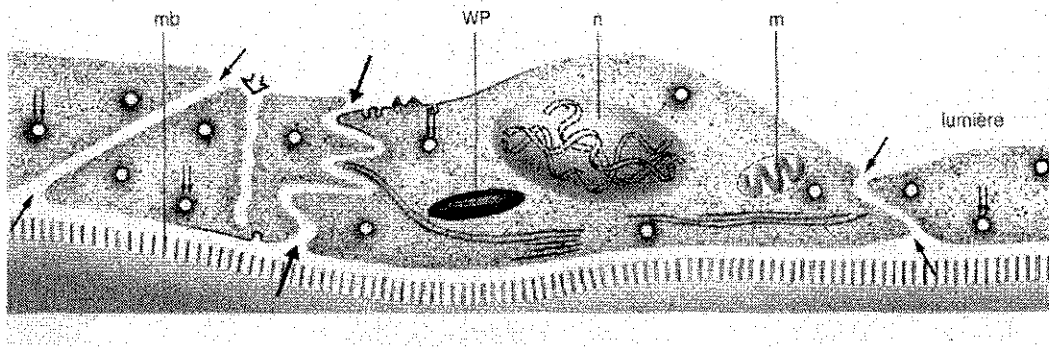
## **I.1. L'endothélium vasculaire.**

### ***I.1.1. Organisation de l'endothélium vasculaire.***

L'endothélium est formé d'une monocouche uniforme de cellules polygonales et allongées, longues de 25 à 50  $\mu\text{m}$ , larges de 10 à 15  $\mu\text{m}$ , orientées dans le sens du flux sanguin. Leur surface est recouverte d'une enveloppe cellulaire (glycocalyx) riche en protéoglycanes (héparane sulfate protéoglycane en particulier). Cette enveloppe joue un rôle important dans la thromborésistance de l'endothélium. C'est à dire que les cellules endothéliales ne réagissent pas avec les plaquettes, les leucocytes, et le système de la coagulation : la cause réside probablement dans les nombreuses charges électronégatives de l'héparane sulfate (Legrand 1987).

Les constituants intracellulaires sont ceux que l'on retrouve habituellement dans le cytoplasme de toutes les cellules, tel que les mitochondries, les réticulums endoplasmiques lisses et rugueux, le cytosquelette, etc. Cependant, les cellules endothéliales (Fig. I.2) se distinguent par la présence d'une structure qu'elles partagent avec les mégacaryocytes et que l'on connaît sous le nom de corps de Weibel Palade. Ceux-ci se présentent sous la forme de bâtonnets de 3  $\mu\text{m}$  de long sur 0,1  $\mu\text{m}$  de large, résultant de la juxtaposition de petits tubules de 15 nm d'épaisseur, orientés parallèlement au grand axe de la cellule et entourés par une structure membranaire. Les corps de Weibel Palade sont des lieux de stockage du facteur Von Willebrand (Williams et al 1995, Chappey et al 1997), facteur impliqué dans les phénomènes d'hémostase.

De plus, les cellules endothéliales présentent la particularité d'être polarisées. Le versant supérieur est en contact avec le sang circulant (pôle apical), tandis que le versant inférieur est en contact avec le sous endothélium (pôle basal). Cette polarité est également fonctionnelle, puisque les composés fabriqués par les cellules endothéliales qui doivent se retrouver du côté de la lumière vasculaire sont sécrétés ou exposés du côté apical.



**Figure I.2 : Représentation schématisée d'une cellule endothéliale.**

Ce schéma montre les communications possibles entre la lumière du vaisseau et la membrane basale du sous-endothélium par les jonctions interendothéliales (↓) et des canaux transendothéliaux (⇓). Une vésicule d'endocytose (□) et différentes vésicules (↘) cytoplasmiques sont également visibles. n : noyau ; m : mitochondrie ; WP : corps de Weibel Palade ; mb : membrane basale (d'après Legrand 1987.)

### ***1.1.2. Fonctionnalités de l'endothélium vasculaire.***

#### **1.1.2.1. Barrière de perméabilité sélective.**

Les cellules endothéliales sont contiguës les unes avec les autres grâce à des jonctions qui diffèrent suivant leur localisation niveau de l'arbre vasculaire : dans les artères, ces jonctions sont étroites, alors que dans les veines elles sont beaucoup plus lâches : d'où les noms respectifs de « tight junction » et « gap junction » que l'on trouve dans la littérature anglaise pour les différencier. Ces jonctions sont importantes dans le contrôle des échanges trans-endothéliaux de l'eau, des gaz et des ions. L'endothélium vasculaire est une barrière de perméabilité sélective (fig. I.2) qui permet et régule les échanges de molécules de taille variable, eau, ions, protéines, entre le sang et les tissus (Tedgui 1994). Les voies de transport au travers de la barrière endothéliale varient selon leur localisation artérielle, veineuse ou microcirculatoire. La perméabilité sélective de cette interface cellulaire est essentielle, notamment lors de la réponse inflammatoire.

Les échanges avec les tissus environnants peuvent se faire de nombreuses façons :

- par diffusion cytoplasmique passive (gaz, ions, etc)
- par transport intracellulaire par pinocytoses (protéines, lipides)
- par le biais de transporteurs membranaires
- au travers de l'espace intercellulaire permettant le passage des cellules migratrices (diapédèse).

### **I.1.2.2. Effet anti-thrombogénique.**

L'endothélium normal n'est pas thrombogène. Notamment, la thromborésistance des cellules endothéliales a été énoncée à propos de la nature de leur glycocalyx qui présente une charge négative élevée capable de repousser les plaquettes. Celle-ci n'en est pas la seule raison et d'autres causes variées s'y ajoutent. Elles sont liées en parties aux activités de synthèse de la cellule endothéliale elle-même. Les cellules endothéliales sécrètent l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'inhibiteur du facteur tissulaire. De plus, elles synthétisent la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ), un inhibiteur très puissant de l'agrégation plaquettaire. Une action fondamentale de l'endothélium dans ce domaine est la production et l'expression d'une glycoprotéine transmembranaire : la thrombomoduline, récepteur de la thrombine. L'endothélium exerce des activités anticoagulantes par d'autres voies telles que la capture et la dégradation de substances thrombogènes (ADP, 5-HTP) et par l'effet des produits vasomoteurs sur les plaquettes.

Néanmoins, dans des conditions physiopathologiques, les cellules endothéliales possèdent également une activité thrombosante. Dans ce cas, la thrombomoduline est sous-régulée et n'apparaît plus à la surface endothéliale. De plus, les cellules expriment un facteur tissulaire capable de se lier au facteur VIIa plasmatique. A partir de là, la production de thrombine pourra s'effectuer d'autant plus facilement que les facteurs IXa et X ont des sites de liaison sur l'endothélium. Sur le plan de la fibrinolyse, le PAI-1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène d'origine endothéliale, est augmenté et le t-PA est sous régulé au niveau génique. Ces phénomènes activateurs et inhibiteurs de la thrombogénèse sont résumés dans le tableau I.1.

De plus, les cellules endothéliales possèdent également des propriétés antiadhésives, ou adhésives vis à vis des éléments figurés du sang comme les leucocytes et les plaquettes. Ces éléments adhèrent à l'endothélium et en particulier, l'adhésion des leucocytes est particulièrement importante lors de la formation des plaques d'athérome ou dans le cas d'inflammation aiguë (Stoltz et al 1999).

**Tableau I.1 : Résumé des différents facteurs intervenant dans la balance des propriétés thrombogéniques des cellules endothéliales (d'après Najman et al 1994).**

| THROMBORESISTANCE                     | THROMBOFORMATION                           |
|---------------------------------------|--------------------------------------------|
| Charge négative élevée                | Collagène                                  |
| Prostacycline (PGI <sub>2</sub> )     | Fibronectine                               |
| Thrombomoduline                       | Facteur von Willebrand                     |
| Héparane sulfate                      | Facteur tissulaire                         |
| Pro urokinase                         | Inhibiteur de l'activateur du plasminogène |
| Activateur tissulaire du plasminogène |                                            |
| ADPase                                |                                            |

### I.1.2.3. Synthèse des médiateurs vasoactifs.

L'endothélium peut synthétiser et sécréter de nombreuses substances vasoactives qui diffusent vers le muscle sous-jacent et provoque sa contraction ou sa relaxation. La substance la plus largement étudiée est le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF), découvert par Furchgott et Zawadzki en 1980 (Furchgott et Zawadzki 1980) et caractérisé en 1987 comme du monoxyde d'azote (NO) ou un composé contenant du NO (Palmer et al 1987).

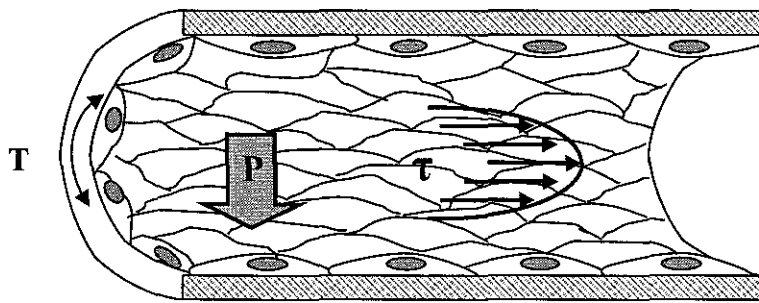
L'EDRF est synthétisé par l'action catalytique d'une enzyme, la nitric oxide synthase (NOS), présente sous sa forme constitutive dans la cellule endothéliale, sur la L-arginine, pour former NO et la L-citrulline (Moncada et al 1991). L'enzyme constitutive, NOS<sub>c</sub>, est Ca<sup>2+</sup>-calmoduline dépendante et peut être rapidement activée. L'inductible, NOS<sub>i</sub>, est dépendante de la tétrahydrobioptérine et nécessite un certain délai avant d'être activée par les médiateurs immuno-inflammatoires, cytokines et endotoxines. Un inhibiteur de synthèse protéique (cycloheximide) et un corticoïde (dexaméthasone) inhibe l'induction de la NOS<sub>i</sub>, révélant la nécessité d'une synthèse protéique de novo. L'endothélium synthétise d'autres substances vasodilatatrices, principalement la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et un facteur hyperpolarisant (Endothelium derived hyperpolarizing factor ou EDHF), différent de l'EDRF, qui augmente le potentiel de membrane du muscle lisse et participe à sa relaxation (Feletou et Vanhoutte 1988).

De nombreuses substances, directement ou indirectement vasoconstrictrices, sont également produites par l'endothélium : l'endothéline, les prostaglandines, l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui participe à la formation de l'angiotensine II, ainsi que

l'anion superoxyde dont on a récemment suggéré une action constrictrice (Harrison 1997). Trois types d'endothéline existent composés de peptides de 18 acides aminés. L'endothéline-1, fabriqué par l'endothélium humain est le plus puissant vasoconstricteur endogène connu (Yanagisawa et al 1988).

### ***1.1.3. Forces hémodynamiques agissant sur l'endothélium vasculaire.***

La paroi vasculaire est normalement exposée à deux types de forces mécaniques : les contraintes tangentielles et les contraintes de cisaillement (fig. I.3). Ces forces mécaniques agissent directement sur la fonctionnalité et le comportement des cellules endothéliales (Lehoux et Tedgui in press).



**Figure I.3 : Représentation des forces hémodynamiques au contact de la paroi vasculaire. P représente la pression exercée par le sang et induit une contrainte tangentielle T en fonction de la nature du vaisseau (diamètre et épaisseur).  $\tau$  représente la contrainte de cisaillement due à l'écoulement sanguin.**

#### **-contraintes tangentielles**

La pression sanguine exerce sur la paroi vasculaire des forces perpendiculaires à la surface endoluminale. Celles-ci sont compensées par des forces intra pariétales, dans les directions longitudinale et tangentielle, exercées par les différents éléments de cette paroi et s'opposant aux effets de distension de la pression sanguine. Dans la direction tangentielle, la force par unité de longueur du vaisseau, ou tension pariétale (T), est liée à la pression sanguine (P) et au rayon du vaisseau (r), selon la loi de Laplace :

$$T = Pr$$

La relation qui existe entre la tension tangentielle et la déformation du vaisseau dépend à la fois de la géométrie et des caractéristiques élastiques de sa paroi. La tension tangentielle est

en réalité supportée par toute l'épaisseur de la paroi vasculaire. La tension rapportée à l'unité d'épaisseur représente la contrainte qui s'exerce sur la paroi dans la direction tangentielle.

Elle s'exprime comme :

$$T = Pr / h$$

où  $h$  est l'épaisseur de la paroi.

#### -Contraintes de cisaillement

Lorsque le sang s'écoule, il exerce une force de frottement à la surface vasculaire. Cette force se traduit par une contrainte de cisaillement ( $\tau$ ) au niveau de l'endothélium défini comme le produit de la viscosité du sang et du gradient de vitesse sanguine mesuré au niveau de la paroi. La contrainte de cisaillement transmise à l'endothélium par le courant sanguin tend à déplacer l'endothélium et la couche intimale dans la direction de l'écoulement.

Dans le cas d'un écoulement laminaire, la contrainte de cisaillement s'exprime comme :

$$\tau = 4\mu Q / r^3$$

où  $\mu$  est la viscosité,  $Q$  le débit et  $r$  le rayon du vaisseau. On peut remarquer que le rayon intervient au dénominateur à la puissance 3 ; ainsi, une faible diminution de diamètre vasculaire entraîne, pour un débit volumique constant, une augmentation beaucoup plus importante des contraintes de cisaillement.

#### **I.1.3.1. Récepteurs des signaux mécaniques.**

Il existe différents récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales qui pourraient être impliqués dans la transmission des forces mécaniques générées par la pression ou par le flux (figure I.4). Néanmoins, l'identité d'un tel mécanorécepteur responsable de la réponse endothéliale n'a pas encore été clairement établie (Ali et Schumacker 2002).

- **Intégrines**

Il s'avère que la capacité des cellules à sentir la contrainte mécanique, et la réponse biochimique qui en découle, puissent dépendre de l'interaction d'intégrines avec la matrice extracellulaire (Jalali 2001). En effet, les intégrines, principaux récepteurs d'adhésion couplées aux protéines du cytosquelette, participent non seulement à l'attachement des cellules à leur substrat, mais aussi à la transmission intracellulaire des signaux mécaniques. Le domaine cytoplasmique des intégrines interagit avec des protéines du cytosquelette qui sont



fonctionnellement liées à une protéine tyrosine kinase, la FAK (focal adhesion kinase), qui pourrait intervenir dans la mécanotransduction (Tanabe et al 2000).

Ainsi, ces protéines ont fait l'objet d'une partie de notre travail de recherche car les intégrines sont présentes aux sites d'apposition étroite de la surface des cellules et de la matrice extracellulaire, et elles forment une passerelle de signalisation entre les protéines de la matrice et le cytosquelette (cf. paragraphe I.2.1.2).

- Canaux ioniques

Deux types de canaux ioniques sensibles aux stimuli mécaniques sont décrits dans les cellules endothéliales : les canaux potassiques activés par le cisaillement et les canaux ioniques activés par l'étirement (stretch activated channels). Ces canaux ioniques activés par l'étirement cellulaire sont cations spécifiques et possèdent une activité électrique, principalement détectée lors de l'ouverture. Leur activation conduit à un influx de calcium suivi d'un phénomène de dépolarisation membranaire (Sackin 1995).

- Proteines G

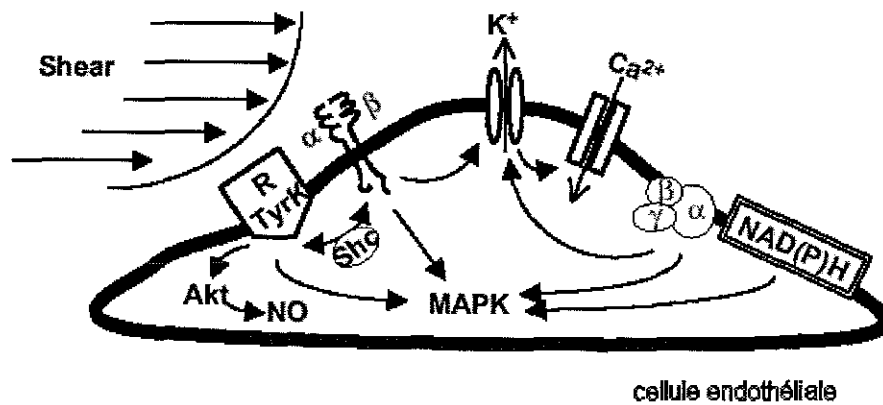
Hansen et al (Hansen et al 1994) ont rapporté que la sous-unité gamma de la protéine G était présente au niveau des sites d'adhésions focales contenant les intégrines. Par conséquent, la co-localisation des protéines G et des intégrines permettrait donc, à un même signal, d'activer simultanément deux familles de récepteurs transmembranaires (les récepteurs couplés à la protéine G et les intégrines). Par conséquent, il semblerait que la protéine G soit impliquée indirectement dans la voie de signalisation induite par les intégrines.

- Récepteurs Tyrosine Kinase

Une autre classe de récepteurs membranaires, de type tyrosine kinase, participerait également à la mécanotransduction. Le cisaillement induit la phosphorylation transitoire du récepteur au VEGF (Flk-1) et son association avec Shc (Src homology 2 collagen) et les intégrines  $\alpha v \beta 3$  et  $\beta 1$  (Chen et al 1999). Si le rôle de Flk-1 dans la mécanotransduction n'est pas encore parfaitement établi, il n'en reste pas moins que la prévention de l'association de Shc avec Flk-1, ou d'autres protéines, atténue les cascades d'activation en aval ainsi que la transcription de gènes stimulés par le cisaillement.

- Radicaux libres oxygénés

Des données récentes suggèrent que les radicaux libres oxygénés, de même que les antioxydants endogènes, ont probablement des fonctions de signalisation critiques dans les cellules. La production de radicaux libres oxygénés est enregistrée dans les cellules endothéliales exposées à un étirement cyclique de 10 à 12 % (Cheng et al 1998). L'activation de la protéine kinase C (PKC), qui est stimulé par l'étirement et qui peut induire la NADPH oxydase pourrait dans certains cas précéder la génération d' $O_2^-$ . Il a été également proposé qu'une augmentation d' $H_2O_2$  dans les cellules endothéliales peut induire la réorganisation de la F-actine, caractérisé par la formation de fibres de stress (Huot et al 1997).



**Figure I.4 : récepteurs impliqués dans la mécanotransduction (d'après Lehoux et Tedgui in press)**

### I.1.3.2. Facteurs mécaniques et expression des gènes dans les cellules endothéliales.

Outre les modifications structurales induites par les forces mécaniques, celles-ci déclenchent des cascades complexes d'événements biochimiques qui conduisent à des changements fonctionnels dans la cellule endothéliales.

La régulation de l'expression génique de molécules produites par les cellules endothéliales et intervenant dans ses différentes fonctions, comme l'endothéline-1 (Morita et al 1993), l'activateur tissulaire du plasminogène (Diamond et al 1990), le PDGF (platelet derived growth factor)  $\alpha$  et  $\beta$  (Hsieh et al 1992), les molécules d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et vasculaire-1 (VCAM-1) (Nagel et al 1994, Sampath et al 1995, Ando et al 1994) sont influencées par différents stimuli chimiques et mécaniques (en particulier par l'écoulement sanguin). Si l'on connaît plusieurs voies de signalisation susceptibles de conduire à la modulation phénotypique des cellules endothéliales, l'identification du profil des gènes demeure encore très sommaire. Des travaux antérieurs ont démontré que le cisaillement et l'étirement augmentaient l'expression de c-fos et c-jun, qui, sous forme de protéines dimériques, se fixaient aux sites de transcription sur les promoteurs de l'ADN et agissaient comme activateurs ou répresseurs transcriptionnels. Les sites sur lesquels les dimères c-fos et c-jun se fixent sont les éléments des promoteurs (TRE) (TPA response element) et CRE (cAMP response element). Cependant l'expression des facteurs de transcription, lorsque celle-ci est médiée par une stimulation mécanique, peut initier une transduction des signaux par l'intermédiaire de promoteurs sensibles aux stimuli mécaniques, et conduire à l'activation de certains gènes. Cet élément de réponse au cisaillement, SSRE (shear stress responsive element) est décrit par Resnick (Resnick et al 1993) dans le promoteur de PDGF- $\beta$ , t-PA, TGF $\beta$ 1, c-fos et c-jun. L'expression de la molécule d'adhérence ICAM-1 est également régulée positivement par le flux de façon transitoire (Nagel et al, 1994), alors que l'expression de VCAM-1 est régulée négativement de manière force dépendante (Ohtsuka et al, 1993). Des études ont montré que le gène de ICAM-1 contient le SSRE dans son promoteur, alors qu'il n'est pas exprimé dans VCAM-1. Ces résultats suggèrent que la régulation de cette molécule est un mécanisme secondaire de la signalisation hémodynamique.

L'ensemble de ces facteurs présente une importance primordiale pour la construction des substituts vasculaires. En effet, il est accepté que la condition essentielle devait être la capacité des cellules endothéliales à résister et à s'adapter aux contraintes mécaniques (Nerem

et Seliktar 2001). Il a été montré que les greffes artificielles cellulaires étaient capables de mieux s'adapter si elles étaient pré-stimulées par une contrainte mécanique (Nikolson et al 1999) (cf. paragraphe I.3.1).

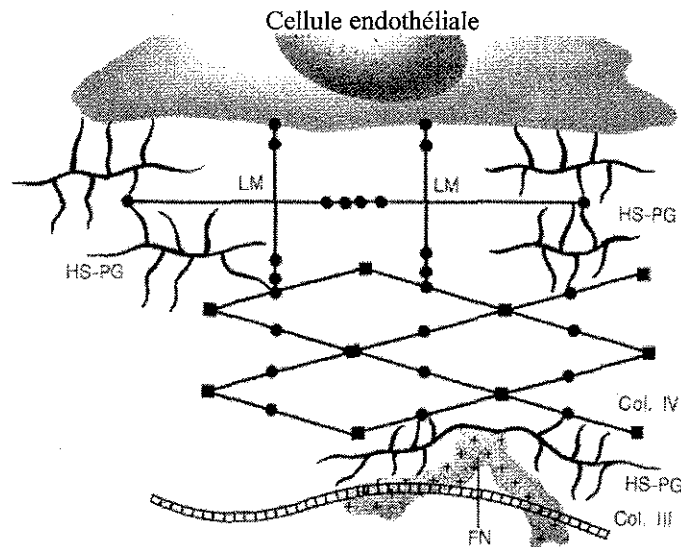
## **I.2. Interaction des cellules endothéliales avec leur environnement.**

### ***I.2.1. Interaction des cellules endothéliales avec la matrice extracellulaire.***

Les cellules endothéliales possèdent à leur surface des protéines leur permettant d'interagir entre elles et avec leur environnement extracellulaire. Ces protéines d'adhérence cellulaire sont des protéines ancrées dans la membrane cellulaire, possédant un domaine cytoplasmique, un domaine membranaire, et un domaine extracellulaire. Ces protéines d'adhérence établissent un lien entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule, car leur domaine cytoplasmique peut se lier aux protéines du cytosquelette intracellulaire, tandis que le domaine extracellulaire interagit avec des protéines de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine ou le collagène. De ce fait, ces protéines ayant une grande importance dans le développement et la survie des cellules endothéliales ont fait l'objet d'une attention particulière.

#### **I.2.1.1 Constituants de la membrane basale et du sous-endothélium.**

Toutes les macromolécules constitutives de la membrane basale et de la matrice extracellulaire sont synthétisées et secrétées par les cellules endothéliales. Il faut mentionner que la synthèse de la plupart d'entre elles n'est pas réellement spécifique des cellules endothéliales et que d'autres cellules peuvent les élaborer. La membrane basale sert de support aux cellules endothéliales. Son rôle dépasse celui de simple support en ce sens que ces constituants servent en fait à ancrer les cellules endothéliales à la paroi vasculaire. La matrice extracellulaire vasculaire contient un mélange hétérogène de protéines structurales et adhésives, parmi lesquelles on trouve : la laminine, les collagènes de type III et IV, l'élastine, la fibronectine, la vitronectine, et une variété de protéoglycanes et des glycoaminoglycanes (fig. I.5).



**Figure I.5 : Schéma de l'interaction d'une cellule endothéliale avec la matrice extracellulaire.** Ce schéma montre comment des molécules de laminine (LM) reconnaissables à leur aspect cruciforme, associées entre elles et à des agrégats d'héparane sulfate protéoglycane (HS-PG) servent de ponts entre une cellule endothéliale et le collagène de type IV. De même, des molécules de fibronectine (FN) attachent HS-PG lié au collagène de type IV à la matrice extracellulaire du sous-endothélium et plus particulièrement au collagène de type III (Col. III).

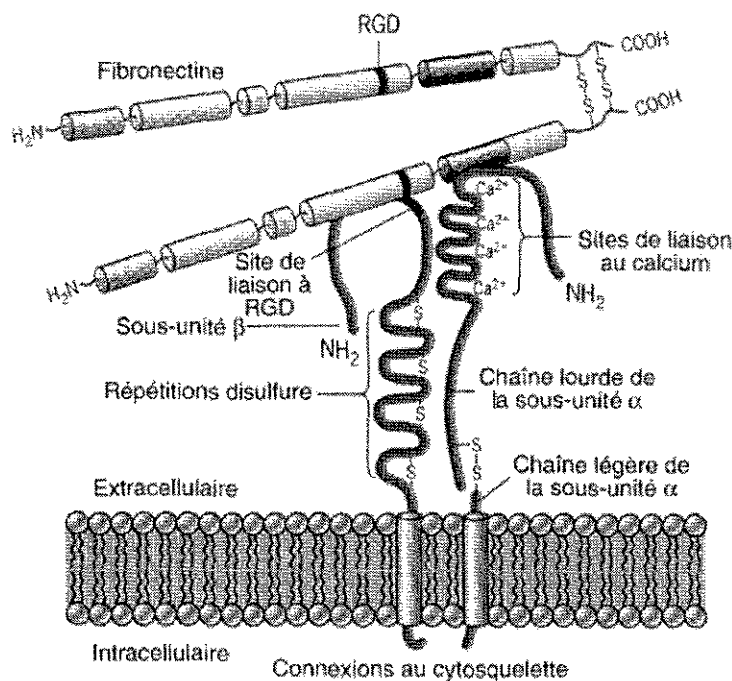
### I.2.1.2. Les intégrines.

Les intégrines constituent les principaux récepteurs impliqués dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (Hynes 1992). Les intégrines sont des protéines hétéro-dimériques (fig. I.4.), résultant de l'association d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  liées d'une manière non covalente. Les deux sous-unités contribuent à la liaison avec le ligand. A ce jour, 18 chaînes  $\alpha$  et 8 chaînes  $\beta$  sont connues chez les mammifères et forment 24 intégrines différentes. Certaines chaînes, comme  $\alpha_4$ , ne peuvent s'associer qu'avec une forme de chaîne  $\beta$  ( $\beta_6$ ), alors que  $\beta_1$  peut former des hétéro-dimères avec une dizaine de chaînes  $\alpha$ , formant des intégrines qui ont chacune une spécificité différentes. Les cations  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  sont essentiels pour la fonctionnalité des intégrines, et la nature de l'ion peut affecter l'affinité et la spécificité des ligands. Pour l'adhérence à la matrice extracellulaire, les intégrines de la sous famille  $\beta_1$ , et  $\alpha_v\beta_3$  (Hynes, 1987) apparaissent être les plus importantes.

Les intégrines sont composées d'un domaine extracellulaire qui se lie au ligand, d'un court domaine transmembranaire, et d'une partie cytoplasmique courte qui relie ces récepteurs au cytosquelette de la cellule (fig. I.6). La structure des différentes sous unités  $\alpha$  est très similaire : elles contiennent toutes des domaines répétés homologues de trente à quarante acides aminés dans leur zone extracellulaire, espacés par des domaines de vingt à trente acides

aminés. Les trois ou quatre domaines répétés qui sont le plus extracellulaires contiennent des séquences pouvant lier des cations. Ces séquences sont sans doute impliquées dans la liaison des intégrines à leur ligand, car cette interaction est cation-dépendante.

La liaison des intégrines se fait via une reconnaissance spécifique de séquences ou de motifs structuraux. Les sites de reconnaissance des ligands peuvent être attribués à une courte séquence de peptides. La première séquence à être définie comme étant un site de liaison aux intégrines était le tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD), trouvé sur la fibronectine, la vitronectine, et une variété d'autres molécules adhésives. D'autres motifs sont reconnus par les intégrines comme la séquence Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (KQAGDV) dans la chaîne-γ de la molécule de fibrinogène. Beaucoup d'intégrines sont des récepteurs pour les protéines de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine, la laminine, ou les collagènes (tableau I.2). Certaines intégrines participent aussi à des interactions cellule-cellule, et jouent un rôle important dans la biologie vasculaire et le système immunitaire. Par exemple, les intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  sont impliquées dans la vasculogenèse et l'angiogenèse.



**Figure I.6 : Représentation schématique des sous unités  $\alpha$   $\beta$  d'une intégrine et relation avec la matrice extracellulaire par la séquence RGD de la fibronectine (D'après Karp 1998).**

L'activation des intégrines est conditionnée par leur affinité de liaison au ligand (O'Toole et col, 1994). En effet, à l'état basal, les intégrines se lient avec peu d'affinité à leur ligand. En réponse à un facteur externe et après émission d'un signal à l'intérieur de la cellule,

une information est transmise au dehors de la cellule (signal « inside-out ») pour induire un changement de conformation des intégrines permettant d'augmenter leur affinité pour leur ligand. Les intégrines après fixation à leur ligand, sont aussi capables de transmettre des signaux vers l'intérieur de la cellule. Ces signaux peuvent initier des réponses cellulaires variées comme la différenciation, la prolifération, ou encore la migration cellulaire. Les intégrines jouent un rôle fondamental dans l'adhérence des cellules à la membrane basale, la polarisation des cellules et la migration des cellules sur et à travers la matrice extracellulaire.

**Tableau I.2 : Classification et fonctions principales des intégrines et de leur ligands exprimées au niveau des cellules endothéliales (CE).**

| Intégrines                                 | Distribution cellulaire                                                  | Ligand            | Fonction                                                        |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------|
| $\alpha 0\beta 1$                          | Fibroblastes, lymphocytes, monocytes, plaquettes, CE                     | FN, VN, LM        | Adhésion/migration                                              |
| $\alpha F\beta 1$                          | Fibroblastes, lymphocytes, monocytes, plaquettes, CE                     | FN                |                                                                 |
| $\alpha PS1\beta 1$<br>$\alpha PS2\beta 1$ | Fibroblastes, lymphocytes, monocytes, plaquettes, CE                     | /                 | Interactions durant la morphogénese                             |
| $\alpha 1\beta 1$                          | Lymphocytes T, fibroblastes de peau, cellules glomérules de malpighi, CE | Collagène, LM     | Adhésion cellule – cellule et cellule – matrice extracellulaire |
| $\alpha 2\beta 1$                          | Lymphocytes T, fibroblastes, CTL, épithélium, monocytes, CE, plaquettes  | Collagène, LM     |                                                                 |
| $\alpha 3\beta 1$                          | fibroblastes, CTL, épithélium, monocytes, CE                             | FN, LM, collagène |                                                                 |
| $\alpha 5\beta 1$                          | lymphocytes, monocytes, neutrophiles, tissus macrophages, CE             | FN                |                                                                 |
| $\alpha 6\beta 1$                          | Plaquettes, épithélium, système nerveux périphérique, CE                 | LM                |                                                                 |
| $\alpha III\beta 3$                        | CE, plaquettes                                                           | FN, VN, FB, vWF   |                                                                 |
| $\alpha v\beta 3$                          | CE, plaquettes                                                           | VN, FB, vWF       |                                                                 |
| $\alpha v\beta 5$                          | CE, épithélium                                                           | FN, VN            | Adhésion cellule – matrice extracellulaire                      |

FN : fibronectine, VN : vitronectine, LM : laminine, FB : fibrinogène, PS : position specific antigens, CTL : cloned cytotoxic T lymphocytes, CE : cellules endothéliales, vWF : facteur von Willebrand, / : non déterminé.

De plus, Il a été récemment montré qu'il existait une relation étroite entre les intégrines et les facteurs de croissance induisant des réponses spécifiques des cellules

endothéliales tels la migration, la prolifération, ou l'adhésion (Eliceiri 2001). Ces relations entre intégrines et facteurs de croissance sont représentées dans le tableau I.3.

**Tableau I.3 : Relation entre facteurs de croissance et intégrines induisant des réponses cellulaires différentes (d'après Eliceiri 2001).**

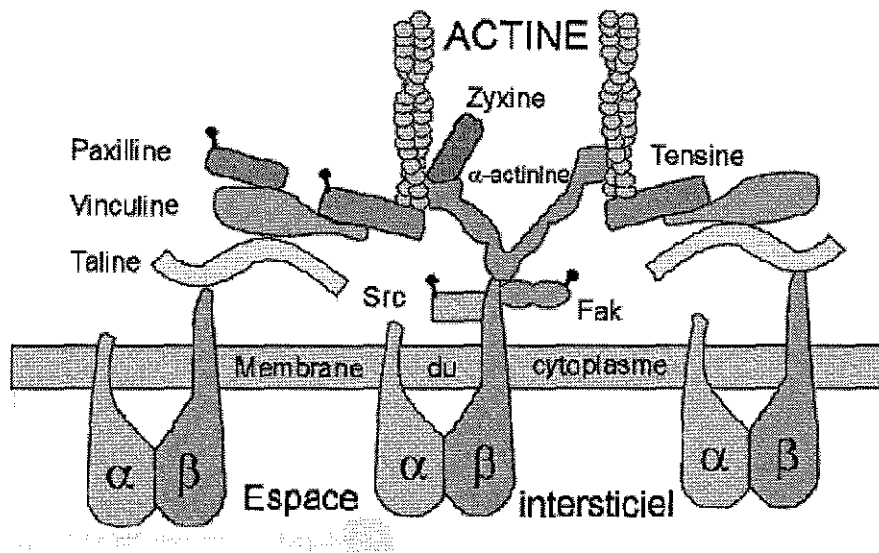
| intégrines                                          | Facteurs de croissance | réponses                 |
|-----------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| $\alpha v\beta 3$                                   | PDGF                   | Prolifération, migration |
| $\alpha v\beta 3, \alpha 5\beta 1$                  | bFGF                   | Angiogenèse, migration   |
| $\alpha v\beta 5$                                   | VEGF                   | Angiogenèse              |
| $\alpha v\beta 5, \alpha v\beta 3, \beta 1$         | VEGF                   | Adhésion, migration      |
| $\alpha 2\beta 1, \alpha 1\beta 1, \alpha v\beta 3$ | VEGF                   | Angiogenèse, migration   |
| $\alpha v\beta 5$                                   | EGF                    | Migration, métastase     |
| $\alpha v\beta 5$                                   | IGF/insuline           | Migration, métastase     |

bFGF : basic fibroblast growth factor, EGF: epithelium growth factor, IGF: insulin growth factor, PDGF, platelet derived growth factor, VEGF: vascular endothelial growth factor.

#### **I.2.1.3. Les adhésions focales et la kinase d'adhésion focale (FAK).**

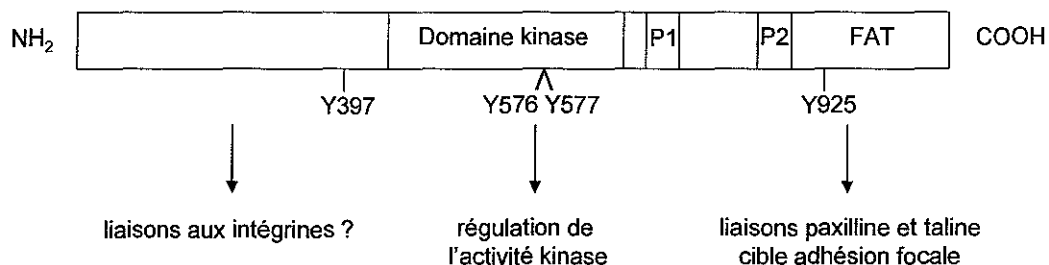
La liaison des intégrines avec la matrice extracellulaire conduit à la formation de complexes protéiques appelés contacts focaux ou adhésions focales. Suite à la liaison du ligand à l'intégrine, des réactions en cascade intracellulaires se déclenchent selon un processus nommé « outside-in signaling » et faisant intervenir des complexes multimoléculaires. Au niveau des sites d'adhésion, le domaine cytoplasmique des intégrines est associé avec différentes protéines du cytosquelette comme la taline, l' $\alpha$ -actinine, la vinculine, la paxilline et la tensine comme le montre la figure I.7. La transduction du signal induit notamment la phosphorylation de la kinase d'adhésion focale (FAK, focal adhesion kinase).





**Figure I.7 : Interaction des intégrines avec les protéines du cytosquelette et phosphorylation (\*) induisant la transduction du signal (Vuori et al 1998).**

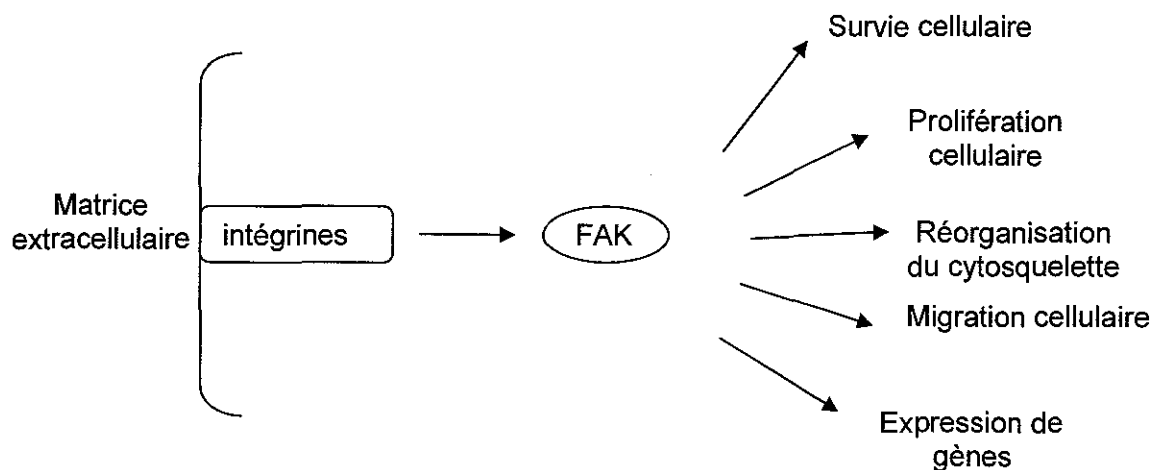
La structure moléculaire de FAK est peu commune. Elle peut être divisée en trois domaines (N-terminal, Kinase, C-terminal), chacun contenant environ 400 acides aminés (fig I.8.) (Vuori 1998). Le domaine N-terminal serait susceptible de permettre l'adhésion de la FAK au niveau des intégrines, le domaine Kinase permettrait de réguler l'activité enzymatique de la kinase, le domaine C-terminal permettrait le recrutement au niveau des sites d'adhésions focales (fig. I.8). La region FAT (focal adhesion targeting), située dans le domaine carboxy terminal est nécessaire pour la localisation dans le complexe d'adhérence par l'intermédiaire de la liaison avec la taline et paxilline. La taline, médiateur de l'activation de FAK par les intégrines, permet l'interaction avec le réseau de filaments d'actine nécessaire pour l'activation de FAK (Chen 1995).



**Figure. I.8 : Structure et organisation des domaines de la FAK. Quatre des six sites connus de phosphorylation (Y) de FAK sont indiqués avec le rôle fonctionnel de chaque domaine. Deux sites riches en proline (P1 et P2) sont indiqués et sont impliqués dans la liaison à d'autres molécules signalétiques (d'après Vuori et al 1998).**

La protéine FAK activée par les intégrines va subir une phosphorylation en cascade des résidus tyrosine. C'est d'abord le résidu tyrosine 397 qui est le témoin de son activation (Schaller et al 1994). L'activation de la FAK est donc le point central du signal de transduction. Après son activation, la FAK phosphorylée libère plusieurs sites de fixation pour des protéines contenant des domaines SH2 (src homology 2). Dans un second temps, les différentes protéines vont subir à leur tour une activation entraînant la mise en route de cascades de voies régulatrices importantes comme erk/MAPK.

Les adhésions focales jouent un rôle non seulement dans les phénomènes d'ancrage des cellules à leur environnement extérieur mais conduisent également à l'activation d'une variété d'événements, comme le montre la figure I.9. Les interactions entre les intégrines et la matrice extracellulaire participent aux processus vitaux cellulaires. A travers toutes ses interactions, FAK est donc impliquée dans la migration cellulaire (Parsons 2000). En effet, des cellules déficitaires en FAK, liées à la fibronectine, ont une forte diminution de leur capacité migratoire. Ces résultats sont bien démontrés pour des lignées de fibroblastes pour lesquelles le gène FAK a été invalidé (Owen 1999). FAK, par ses interactions avec les intégrines est nécessaire pour la prolifération (Gilmore 1996). De plus, l'inhibition de l'expression de FAK entraîne l'apoptose de cellules tumorales par perte d'adhérence (Xu 1996, Maung 1999). Le signal de survie engendrée par FAK pourrait par ailleurs inhiber la voie apoptotique de p53 (Almeida 2000).



**Figure I.9 : Représentation des principales fonctions cellulaires régulées par l'interaction des cellules endothéliales avec la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de FAK.**

FAK est donc au cœur d'un système régulateur impliquant l'adhérence à la matrice extracellulaire. Mais on ne connaît pas encore le rôle réel de FAK dans les cellules *in vivo*.

### ***I.2.2. Interactions des cellules endothéliales avec les cellules sanguines.***

Situé à l'interface entre le sang et les tissus, l'endothélium occupe une position critique dans tous les processus inflammatoires. Les cellules endothéliales interviennent dans la défense immunitaire par leurs fonctions biologiques, en particulier dans la re-circulation lymphocytaire et le recrutement des leucocytes circulants lors des états inflammatoires. L'inflammation constitue l'un des plus importants mécanismes de défense de l'organisme. Elle représente la réponse locale des tissus à toute forme d'agression. Mais c'est également le mécanisme pathologique de base d'un grand nombre d'affections. La réaction inflammatoire met en jeu des interactions complexes entre cellules inflammatoires et cellules endothéliales. Une catégorie de médiateurs occupe une place centrale dans l'orchestration des interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales : il s'agit des cytokines, médiateurs peptidiques solubles considérés à l'origine comme les molécules assurant la communication intercellulaire dans le système immunitaire, et comprenant les Interleukines (IL), les *Tumor Necrosis Factors* (TNF)  $\alpha$  et  $\beta$ , les interférons (IFN), les facteurs hématopoïétiques (*Colony Stimulating Factors*, CSF) et les chimiokines, comme l'IL-8. De nombreuses cytokines et des facteurs de croissance sont présents aux sites de l'inflammation, et chacun d'eux peut potentiellement influencer la nature de la réponse inflammatoire. Les cellules endothéliales reçoivent des signaux provenant à la fois de la circulation et du tissu, sous la forme de facteurs solubles ou des forces hémodynamiques (tableau I.4). Les cellules endothéliales doivent intégrer les signaux produits par ces multiples facteurs pour régler de façon pertinente la réponse immuno-inflammatoire à travers l'expression entre autres des molécules d'adhérence leucocytaire, des cytokines pro- et anti-inflammatoires.

**Tableau I.4 : Signaux pro- et anti-inflammatoire agissant sur les cellules endothéliales (d'après Tedgui et Mallat 2002).**

| Médiateurs             | Signaux pro-inflammatoires                                                        | Signaux anti-inflammatoires                          |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Cytokines              | TNF $\alpha$ , IL-1, IL-8, IFN $\gamma$ ,<br>Oncostatine M, IL-4, IL-13,<br>IL-18 | TGF $\beta$ , IL-10, IL-1ra, IL-<br>18BP, IL-13(+/-) |
| Facteurs angiogéniques | VEGF                                                                              | VEGF (+/-)                                           |
| Facteurs de croissance | PDGF                                                                              | FGF-1, FGF-2                                         |
| Agents vasoactifs      | Angiotensine-II, endothéline                                                      | NO                                                   |
| Neuropeptides          | Substance-P                                                                       |                                                      |
| Forces mécaniques      | Etirement, <b>cisaillement bas</b><br>ou oscillatoire                             | Cisaillements physiologiques                         |
| Autres                 | LPS, Esters de phorbol,<br>thrombine                                              | HDL, acide gras n-3                                  |

FGF : fibroblast growth factor, HDL: high density lipoprotein, IL: interleukine, IFN: interféron, LPS: lipopolysaccharide, TGF: transforming growth factor, TNF: tumor necrosis factor, VEGF : vascular endothelial growth factor

Les cellules endothéliales expriment à leur surface des protéines qui régulent le trafic des cellules circulantes dans le sang. Ces protéines interviennent lors de la migration des leucocytes vers les organes cibles en conditions normales, et contrôlent l'augmentation de cette migration lors des phénomènes d'inflammation. Plus récemment, les molécules exprimées à la surface de l'endothélium ont été impliquées dans l'adhérence des plaquettes et des globules rouges lors de pathologies associées à une occlusion vasculaire.

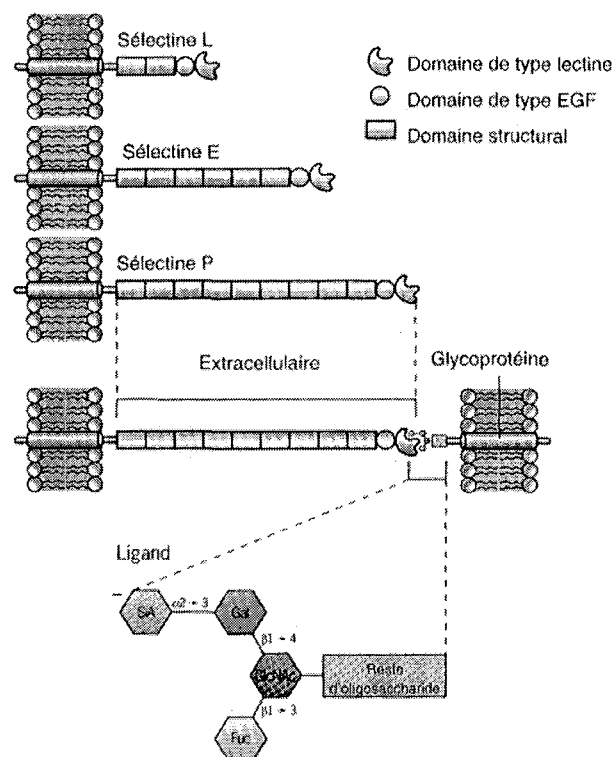
#### **I.2.2.1. les molécules d'adhérences endothéliales impliquées dans l'adhésion leucocytaire.**

Les cellules endothéliales expriment à leur surface vasculaire de façon constitutive ou après induction soit biochimique, par la thrombine ou des cytokines inflammatoires ou mécaniques, des récepteurs d'adhésion pour les leucocytes polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes, les monocytes, et les plaquettes.

Trois familles de molécules d'adhésion vont principalement intervenir dans les processus d'adhésion et d'extravasation leucocytaire : les sélectines, les membres de la superfamille des immunoglobulines, et les cadhérines.

- Les sélectines

Les sélectines sont impliquées dans l'attachement initial des leucocytes circulants à l'endothélium vasculaire durant la capture et l'étape de roulement (rolling) du mécanisme d'adhésion lors de processus inflammatoires. Les sélectines reconnaissent des carbohydrates sialysés, fucosylés et/ou sulfatés, interagissent notamment avec des glycoprotéines contenant les tétrasaccharides sialyl-lewis<sup>x</sup> et Lewis<sup>a</sup>. Ces interactions sélectines/carbohydrates sont labiles et permettent aux leucocytes de rouler le long de l'endothélium vasculaire dans la direction du flux sanguin. Il existe trois types de sélectines : les L(leucocyte)-, P(platelet)- et E(endothelial)-sélectines (fig. I.10). Chacune comprend un domaine N-terminal de reconnaissance des carbohydrates (c-type lectin domain).



**Figure I.10:** Représentation schématique des 3 types de sélectines et de la liaison sélectine avec la glycoprotéine contenant le tétrasaccharide terminal (d'après Karp 1998).

- Superfamille des immunoglobulines (Ig SF)

La superfamille des immunoglobulines représente la plus abondante famille des molécules de la surface cellulaire. Leur structure est caractérisée par les domaines répétitifs semblables à ceux trouvés sur les immunoglobulines (fig. I.11). En effet, bien que le roulement des leucocytes soit un pré-requis pour une adhérence ferme sur la paroi vasculaire, l'adhésion des leucocytes via les sélectines ne permet pas une adhésion réelle à moins que des molécules de la superfamille des immunoglobulines n'interagissent. Pour les interactions cellules endothéliales/leucocytes, les membres les plus importants de cette famille sont : ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, qui servent de ligand pour les intégrines LFA-1 et VLA-4. ICAM-1 et 2 sont des ligands pour l'intégrine de la sous unité  $\beta 2$ , LFA-1 (CD11a/CD18). Ces molécules d'adhésion diffèrent cependant par leur répartition et leur fonction.

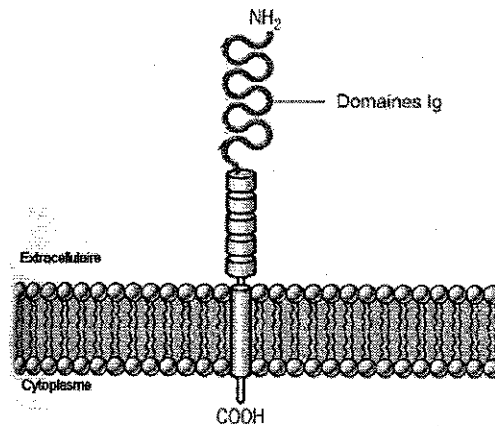
-ICAM-1 est fortement exprimée dans les cellules endothéliales activées par des cytokines ou par les contraintes de cisaillement locales, etc., mais ne se trouve qu'en faible quantité dans les cellules endothéliales au repos. Elle semble jouer un rôle important au cours de l'inflammation et dans le développement de l'athérosclérose.

-ICAM-2 est en revanche principalement trouvée dans les cellules au repos, ainsi que dans les leucocytes. Son expression n'est pas augmentée par l'activation des cellules.

-VCAM-1 est exprimée à la surface des cellules endothéliales activées et absente sur des cellules endothéliales au repos. Elle se lie aux intégrines  $\alpha 4\beta 1$ , est peut être régulée par les médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines. Parmi les autres molécules de cette famille, il faut également signaler :

-PECAM-1 (CD 31, platelet endothelial cell adhesion molecule-1) est exprimée de manière prédominante dans les cellules endothéliales et les plaquettes. Elle est nécessaire pour la migration transendothéliale des leucocytes à travers les jonctions intercellulaires endothéliales vasculaires.

-MadCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) est impliquée au niveau des nodules lymphoïdes et des tissus lymphoïdes muqueux.



**Figure I.11 : Représentation schématique d'une molécule d'adhérence de la superfamille des immunoglobulines (d'après Karp 1998).**

- Les cadhérines

Les cadhérines sont des molécules qui jouent un rôle très important dans le développement et la maintenance de tous les tissus solides, et tous les types cellulaires composant ces tissus expriment des membres de cette famille. Il existe plusieurs types de cadhérine, la cadhérine-5 étant la cadhérine spécifique de l'endothélium vasculaire plus connue sous le nom de VE-cadhérine. Néanmoins l'endothélium vasculaire exprime différentes cadhérines. La N-cadhérine (neuronal) y est abondamment exprimée à la différence des autres types cellulaires (cellules nerveuses et musculaires), elle n'est pas localisée au niveau des jonctions, mais elle est très diffuse à la surface de la cellule.

Comme toutes les cadhérines, la VE-cadhérine interagit, via son domaine cytoplasmique, avec les caténines, qui lui permettent de s'ancrer solidement au cytosquelette d'actine.

Les études fonctionnelles réalisées sur la VE-cadhérines ont permis de montrer son implication dans le contrôle et le maintien de l'intégrité vasculaire, mais également son rôle dans l'angiogénèse. La VE-cadhérine, spécifiquement localisée au niveau des jonctions intercellulaires, a tout lieu d'être impliquée dans le phénomène d'extravasation des leucocytes au cours du processus inflammatoire (Johnsn-leger et al 2000).

### I.2.2.2. les différentes étapes de la diapédèse leucocytaire.

La réaction inflammatoire permet à l'organisme de localiser et de détruire la cause de l'irritation, et aussi de réparer les tissus endommagés. La réponse inflammatoire comprend trois étapes principales : i) une dilatation des capillaires, qui permet une augmentation du débit sanguin ; ii) des modifications de perméabilité vasculaire, qui entraînent un échappement de plasma vers les tissus ; iii) la diapédèse leucocytaire, dernière étape, qui entraîne une accumulation de leucocytes au niveau de la lésion. La diapédèse leucocytaire est constituée d'une cascade d'événements adhésifs et d'activation, permettant l'extravasation du leucocyte. Cette séquence d'événements peut être divisée en cinq étapes principales, qui sont la capture, le roulement, le roulement lent associé à l'activation, l'adhérence ferme, et la migration trans-endothéliale (figure I.12).

Les principales molécules d'adhésion intervenant dans le processus d'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales sont résumées dans le tableau I.5.

**Tableau I.5. : Principales molécules d'adhésion intervenant dans le processus d'adhésion leucocytaire.**

| <i>Cellule</i>              | <i>Contact initial et roulement</i>       | <i>Adhésion ferme</i> | <i>transmigration</i> |
|-----------------------------|-------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                             | P, E-sélectines                           |                       |                       |
| <b>Cellule endothéliale</b> | CD 34                                     | ICAM-1, 2             | ICAM-1, 2             |
|                             | MadCAM-1                                  | VCAM-1                | VCAM-1                |
|                             | Ligand de L-sélectine                     | MadCAM-1              | PECAM-1               |
| <b>Leucocyte</b>            |                                           | $\beta 1$ intégrines  | PECAM-1               |
|                             | sLe <sup>x</sup> , SLe <sup>a</sup> , etc | $\beta 2$ intégrines  | $\beta 1$ intégrines  |
|                             | L-sélectine                               | $\beta 7$ intégrines  | $\beta 2$ intégrines  |
|                             |                                           |                       | $\beta 7$ intégrines  |



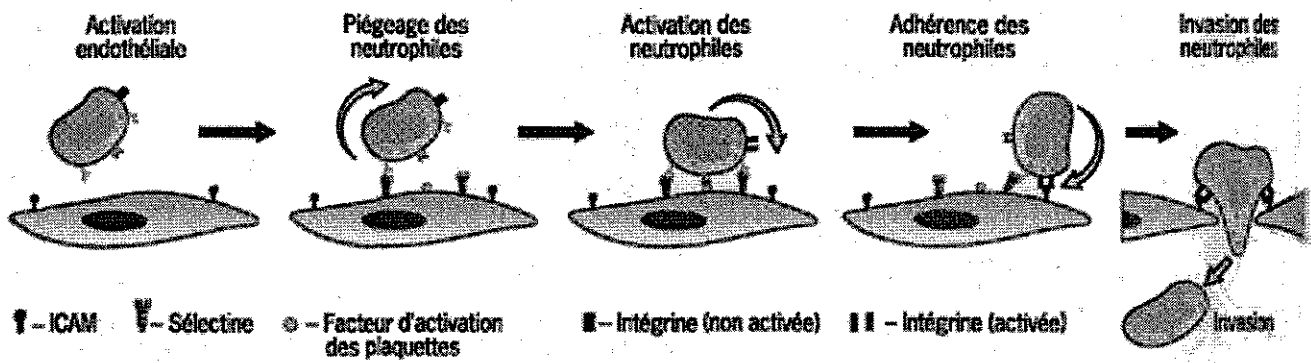


Figure I.12 : Représentation schématique des différentes étapes du phénomène d'adhésion leucocytaire et de transmigration sur les cellules endothéliales (d'après Karp 1998).

### I.3. Ingénierie tissulaire des vaisseaux.

Les maladies cardiovasculaires qui touchent les vaisseaux sont l'une des causes principales de morbidité et de mortalité en Europe et aux Etats-Unis (Yusuf 1998). Habituellement, le vaisseau lésé est remplacé de manière chirurgicale par un vaisseau autologue (veine saphène). Néanmoins, dans de nombreux cas les patients ne possèdent pas de vaisseaux appropriés, soit parce que les autres vaisseaux sont malades, soit parce qu'ils ont déjà été utilisés lors d'une précédente intervention. Dans ce cas, le chirurgien peut actuellement utiliser différents substituts vasculaires ayant une origine diverse (biologique ou synthétique) :

- Les tissus biologiques, prélevés chez l'animal ou l'homme, permettent la préparation de biomatériaux hémocompatibles. Après réduction du pouvoir antigénique, stabilisation des liaisons entre les fibres de collagènes par une réaction biochimique (le glutaraldéhyde, le formaldéhyde, les polyglycols), les matériaux apparaissent à la fois inertes et stables, sous la forme d'une matrice protéique.
- De nombreux matériaux de synthèses tels les polyesters, les polypropylènes, les polyuréthanes, le chlorure de polyvinyle, les silicones permettent la préparation de prothèses vasculaires tissées, tricotées ou moulées.

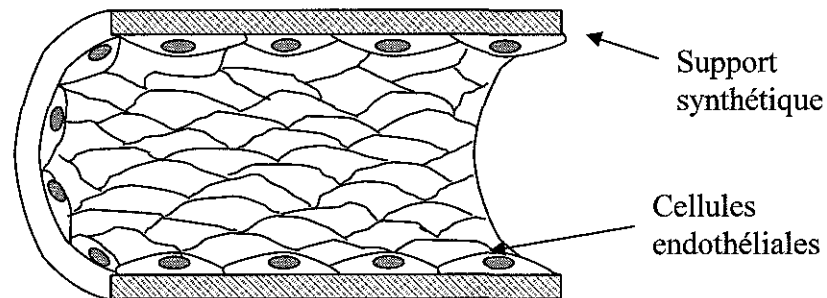
Néanmoins, les matériaux actuels présentent de nombreux inconvénients. Notamment, les produits d'origine biologique présentent des risques de contamination par différents agents pathogènes (ESB, HIV), des risques de réactions immunitaires, et certains problèmes d'approvisionnement. Quant aux prothèses synthétiques, elles peuvent convenir pour le remplacement de vaisseaux de diamètre important comme l'aorte, mais dès que le vaisseau endommagé a un diamètre inférieur à 6 mm (coronaires, artères des membres inférieures), les surfaces synthétiques entraînent une agrégation plaquettaire et la formation de thromboses diminuant à long terme la pérennité de ces prothèses artificielles (Abbott et al 1993, Stoltz et al 2001).

L'ingénierie tissulaire permettrait de fournir des substituts vasculaires proches des vaisseaux natifs et de limiter les inconvénients rencontrés avec les précédents substituts.

### ***1.3.1. Les différentes approches de construction des substituts vasculaires par ingénierie tissulaire.***

#### **1.3.1.1 Endothélialisation de prothèses synthétiques.**

Cette approche consiste à ensemercer des cellules endothéliales sur la surface luminale des prothèses synthétiques, permettant ainsi la formation d'une monocouche de cellules endothéliales avant leur implantation (fig. I.13). Cette procédure, couplée avec l'utilisation de nouveaux biomatériaux possédant des caractéristiques de biocompatibilité et des propriétés mécaniques proches des vaisseaux natifs comme le polyuréthane (tableau I.6) offre des possibilités intéressantes pour le remplacement des vaisseaux de petit diamètre (Salacinski et al 2001).



**Figure I.13 : Représentation schématique d'une prothèse synthétique endothélialisée. La prothèse est recouverte d'une monocouche de cellules endothéliales induisant une interface sang-biomatériau proche des vaisseaux natifs.**

**Tableau I.6 : Premières études in vitro utilisant des polymères synthétiques pour l'ensemencement des cellules endothéliales en ingénierie tissulaire.**

| Surfaces synthétiques                    | références               |
|------------------------------------------|--------------------------|
| Polytertrafluoroéthylène (PTFE)          | Schmidt 1985             |
| Polytertrafluoroéthylène expansé (PTFEe) | Lindbald 1987            |
| Dacron                                   | Schmidt 1984             |
| Polyuréthane                             | Zhang 1995               |
| Polyéthylenterephtalate (PET)            | Ramires 2000, Cenni 1996 |
| Poly(ether urethane urea) (PEUU)         | Brunstedt 1993           |
| Acide perfluorosulfonique (Nafion)       | Mc Auslan 1988           |
| Polyvinyl chloride (PVC)                 | Storck 1996              |

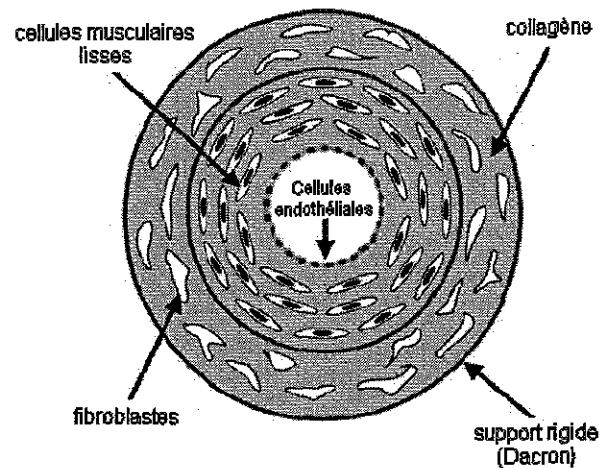
Dans une étude clinique récente (Deutsch et al 1999), des implants périphériques utilisant le polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe) comme substrat synthétique et des cellules endothéliales autologues ont montré une durée de vie des substituts de 65 % au bout de 9 ans d'implantation. De nombreux chercheurs s'intéressent à cette méthode de recouvrement des prothèses synthétiques par les cellules endothéliales et plusieurs essais cliniques ont été réalisés au cours de ces dernières années (tableau I.7).

**Tableau I.7 : Principaux essais cliniques de prothèses vasculairesensemencées avec des cellules endothéliales.**

| Auteurs            | Polymères utilisés | Nombre de substituts implantés | Durée de vie des substituts/an |
|--------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Laube et al 2000   | PTFE               | 14                             | 91 % à 2,5 ans                 |
| Deutsch et al 1999 | PTFEe              | 113                            | 65 % à 9 ans                   |
| Leseche et al 1995 | Dacron             | 21                             | 67 ± 37 % à 6,3 ans            |
| Herring et al 1994 | PTFE               | 66                             | 38 % ± 9 % à 2,5 ans           |

### **I.3.1.2. Constructions basées sur le collagène.**

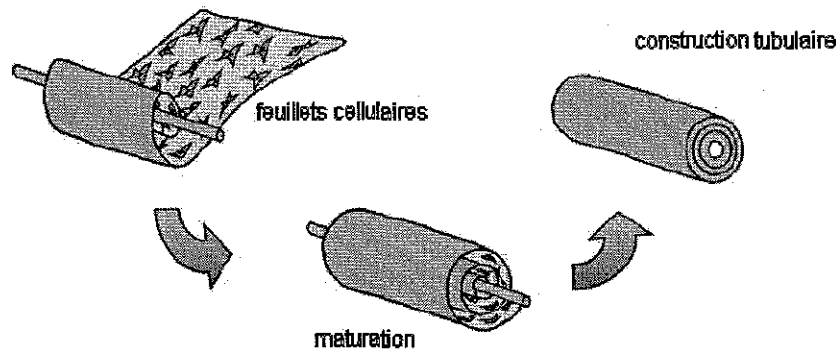
Dans cette approche, le collagène agit comme un substrat idéal pour l'attachement et le signalement des cellules (fig. I.14). Néanmoins, le collagène présente un manque de solidité face aux contraintes physiques. En effet, Weinberg et Bell (Weinberg et Bell 1986) ont montré que la pression de rupture d'un tel substitut était de 10 mmHg seulement. Il devient donc indispensable d'incorporer au niveau de ce type de substitut un support synthétique tel le Dacron, introduisant inévitablement des limitations d'adaptation biologique et/ou de vasomotricité.



**Figure I.14 : Représentation schématique d'une construction à base de collagène. La configuration contient différentes couches analogues à un vaisseau normal (adventice, media, endothélium) (d'après Nerem et al 2001).**

### **I.3.1.3 Assemblage de feuillets cellulaires.**

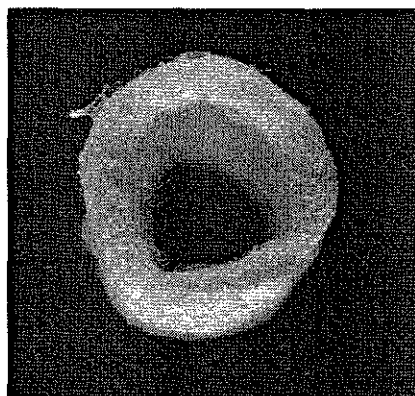
Un model développé par l'Heureux et al (l'Heureux et al 1998) a été imaginé à partir des substituts de peau. Le substitut vasculaire est construit à partir d'une méthode d'assemblage de feuillets cellulaires (fig. I.15). Les fibroblastes, et les cellules musculaires lisses sont cultivés séparément puis après obtention de feuillets cellulaires, ils sont enroulés autour d'un mandrin pour former une structure tubulaire. Enfin des cellules endothéliales sontensemencées au niveau de la lumière du substitut. Ce substitut présente l'avantage de pouvoir résister à de fortes pressions de rupture. Néanmoins, le problème majeur de ce type de construction est qu'elle nécessite un temps très long de maturation, de l'ordre de 3 mois, pouvant fortement limiter son application médicale.



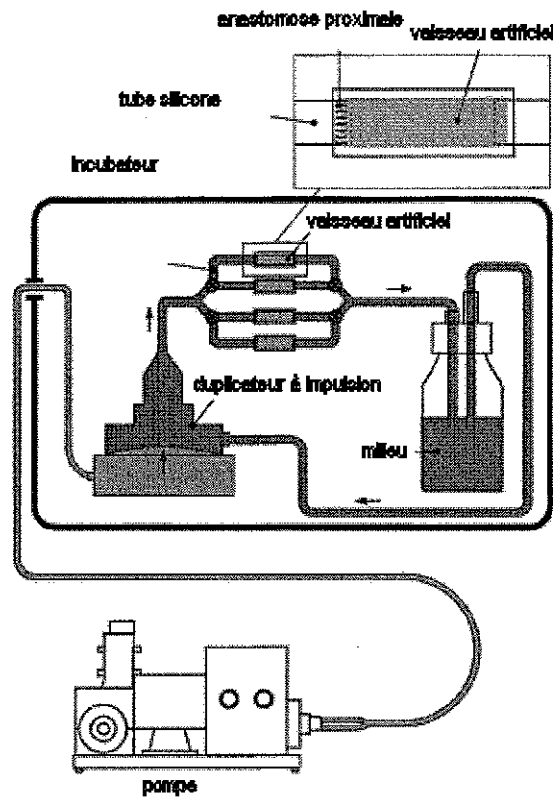
**Figure I.15 :** Représentation schématique d'un assemblage de feuillets cellulaires. Les cellules vasculaires sont cultivées pour former un feuillet continu de cellules avec une matrice extracellulaire et sont ensuite enroulée autour d'un mandrin. La construction est mature après 12 semaines, permettant aux cellules de s'organiser en une construction tubulaire mécaniquement stable (d'après Nerem et al 2001).

#### I.3.1.4 Polymères poreux et cellules vasculaires cultivées en condition dynamique.

Ce type d'approche utilisant des polymères biocompatibles (dégradables ou non) offre la capacité de former des tissus relativement rapidement avec la forme et les propriétés des tissus natifs (Nikolson et al 1999; Hoerstrup et al 2001). Des cellules musculaires lisses sont ensemencées dans un polymère poreux (acide poly-glycolique, polyuréthane) cylindrique (figure I.16) puis cultivées au sein d'un bioréacteur pouvant générer des distensions radiales pulsatiles mimant celles d'un vaisseau sanguin (fig. I.17). Après 8 semaines de culture, des cellules endothéliales sont ensemencées dans la surface luminale. On obtient par conséquent un substitut avec deux tuniques d'un vaisseau natif pouvant résister à des pressions de l'ordre de 2000 mmHg.



**Figure I.16 :** Polymère biodégradable d'acide poly-glycolique recouvert d'une mince couche de poly-4-hydroxybutyrate (PGA/P4HB). Des cellules musculaires sont ensemencées dans les pores. La construction est cultivée pendant 8 semaines de façon dynamique, permettant aux cellules de proliférer et de produire une matrice extracellulaire organisée (d'après Hoerstrup et al 2001).



**Figure I.17:** Description schématique d'un système de flux pulsatile in vitro (bioreacteur). Le flux pulsatile du milieu nutritif est généré par une membrane élastique dilatée périodiquement par une pompe à air (d'après Hoerstrup et al 2001).

La situation actuelle dans l'utilisation des différents substituts vasculaires est représentée dans le tableau I.8.

**Tableau I.8 : Situation actuelle des différents substituts vasculaires.**

| Type de substituts         | Application expérimentale | Essais cliniques         | Utilisation courante en chirurgie |
|----------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Veines autologues          | ✓                         | ✓                        | ✓                                 |
| Prothèses synthétiques     |                           |                          |                                   |
| PTFEe                      | ✓                         | ✓                        | ✓                                 |
| Dacron                     | ✓                         | ✓                        | ✓                                 |
| PU                         | ✓                         | Fin des essais cliniques | non                               |
| Ingénierie tissulaire      |                           |                          |                                   |
| Prothèses endothélialisées | ✓                         | ✓                        | non                               |
| Reconstruction de vaisseau | ✓                         | non                      | non                               |

### ***I.3.2. Les différentes sources de cellules endothéliales.***

Un problème majeur en ingénierie tissulaire est la source de cellule pouvant être utilisée. Différents possibilités d'approvisionnement sont envisageables pour les cellules endothéliales.

Du point de vue de l'acceptation par le système immunitaire, la meilleure source de cellules endothéliales proviendrait de cellules autologues, dérivée par exemple des tissus adipeux, ou des cellules progénitrices endothéliales du sang périphérique (Rehman et al 2003). Peu de choses sont connus sur ces dernières, notamment leur efficacité en tant qu'endothélium et leurs réponses face aux stimuli mécaniques.

Une source allogénique de cellules endothéliales pourrait également être utilisée, mais il se pose alors un problème lié à la réponse immunitaire.

De même, des études sont actuellement réalisées afin de modifier génétiquement des fibroblastes humains ou des cellules endothéliales d'origine animale (Fishbeck et al 2001) afin de permettre respectivement la sécrétion des substances antithrombogéniques, et de limiter les interactions avec le système immunitaire.

Finalement, les cellules souches adultes ou embryonnaires (Carpenter et al 2003) pourraient être la réponse attendue. Mais, il reste encore beaucoup de questions sur le comportement de ces cellules vis à vis du système immunitaire et l'influence des stimuli



mécaniques sur le processus de différenciation. De plus, il se pose un problème éthique quant à l'utilisation de cellules souches d'origine embryonnaire.

### ***I.3.3. Modifications de surfaces appliquées aux matériaux synthétiques.***

Il existe différents types de modifications permettant d'améliorer l'adhésion des cellules sur les surfaces synthétiques (Salacinski et al 2001). Ces modifications pour la plus-part ont pour but d'augmenter les interactions entre la surface et les cellules endothéliales en mimant la structure de la matrice extracellulaire. Elles permettent d'améliorer d'une part l'attachement cellulaire et d'autre part la rétention des cellules soumises aux contraintes mécaniques de l'écoulement sanguin.

#### **I.3.3.1 Adsorption de protéines ou de peptides**

- Le collagène utilisé en ingénierie tissulaire montre une augmentation 3 fois plus importante de l'attachement cellulaire comparé à des surfaces non traitées (Budd et al 1989, Haergerstrand et al 1993). Cependant, le collagène est significativement plus néfaste quant à la rétention des cellules sous une contrainte mécanique (Vohra et al 1991).

- La fibronectine (FN) est la protéine la plus utilisée pour augmenter l'attachement et la rétention cellulaire. Pour un attachement cellulaire optimum une concentration de 20-50µg/mL de FN doit être utilisée. Des concentrations trop importantes diminuent le pourcentage d'attachement (>250µg/mL). Des études comparatives montrent que la FN augmente l'attachement cellulaire en comparaison du collagène, gélatine, laminine, albumine et gélatine (Budd et al 1989).

- La laminine augmente de 3 fois l'attachement et la rétention cellulaire (Sank et al 1992). Mais cette molécule diminue significativement l'attachement cellulaire sur des surfaces de polystyrène comparé au recouvrement par la FN ou la gélatine.

- La gélatine augmente également l'attachement cellulaire par comparaison à des surfaces non traitées (Budd et al 1989).

- La poly-lysine n'a montré actuellement aucun bénéfice quant au recouvrement des surfaces par cette molécule. Quelques fois, elle améliore l'attachement et la rétention des cellules et d'autres fois elle diminue ces paramètres (Budd et al 1989, Stansby et al 1991).
- La combinaison de plusieurs molécules comme le collagène, la laminine, la fibronectine et l'élastine, montre de meilleurs résultats sur l'attachement cellulaire et la rétention que la fibronectine, le collagène et/ou la gélatine seule (Schneider et al 1992).
- Les peptides adhésifs, comme YIGSR (séquence adhésive de la laminine) et RGD (séquence adhésive de la fibronectine), ont montré qu'ils augmentaient l'adhésion des cellules endothéliales et pouvaient influencer la migration cellulaire (Kouvroukoglou et al 2000). Une autre séquence peptidique (WQPPRARI) dérivée de la chaîne carboxy-terminale de la molécule de fibronectine et correspondant aux domaines de liaison de l'héparine augmentent également l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales (Huebsch et al 1996). De plus, le couplage RGD/polylysine montre de meilleurs résultats que la fibronectine seule sur le poly(éther)uréthane (Walluscheck et al 1996).
- Les facteurs de croissance peuvent également être utilisés pour augmenter la croissance et la prolifération des cellules endothéliales. Par exemple, la liaison de bFGF (basic fibroblast growth factor) sur une matrice de collagène montre une augmentation progressive de la prolifération des cellules endothéliales en fonction de la quantité de bFGF fixé (Wissink et al 2000). Takahashi (Takahashi 1997) a montré la possibilité d'absorber directement le bFGF sur un substitut synthétique tel le Dacron. En effet, *in vitro*, 40 % du bFGF était libéré dans les premières 24h et le reste était libéré progressivement pendant 2 semaines. De plus, cette expérience a montré la possibilité d'absorber un tel facteur de croissance sans perte de son activité biologique.

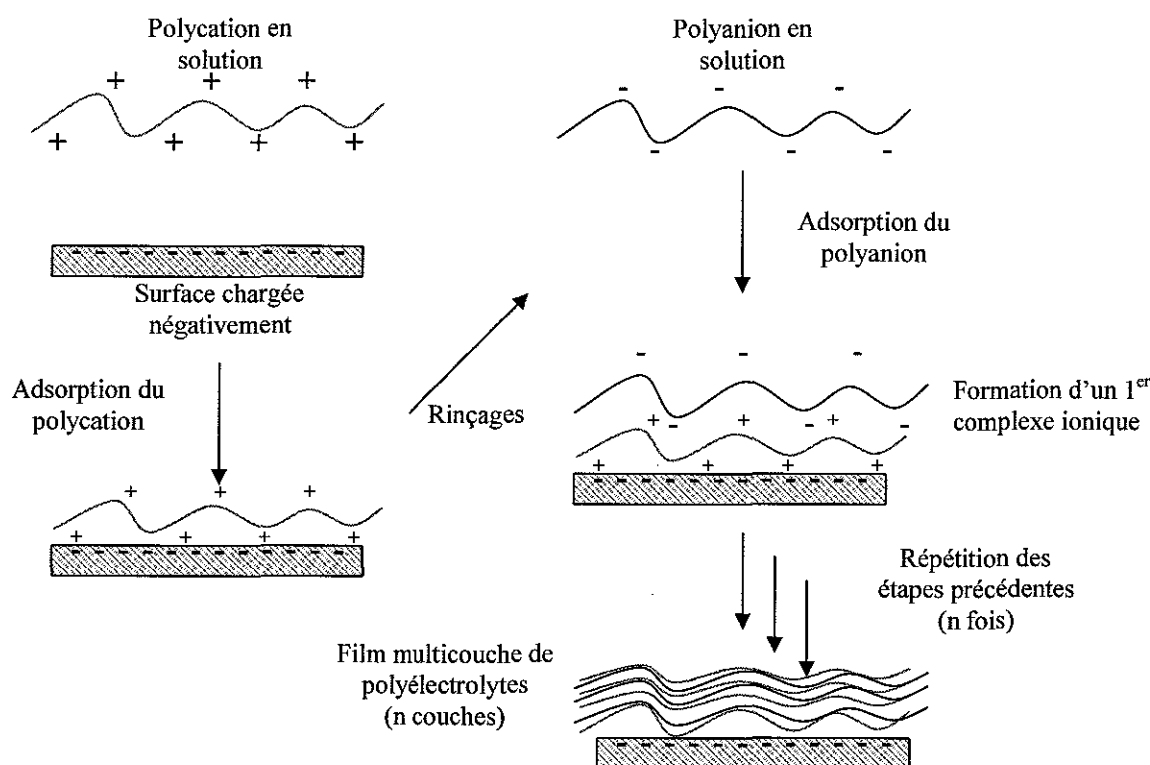
Néanmoins, l'adsorption de protéines ou de peptide est un phénomène difficile à contrôler notamment du point de vue de la quantité de matière adsorbée. Pour répondre à ce problème, les chercheurs ont développé des traitements physiques des surfaces.

### I.3.3.2 Traitements physiques

Les traitements physiques offrent la possibilité de modifier les caractéristiques de surface des matériaux sans affecter les propriétés physiques de ces matériaux. Il existe différentes techniques tels l'implantation ionique (Kurotobi et al 2000, Bacakova et al 2000), le traitement par plasma (Ramires et al 2000), l'irradiation par UV ou rayon gamma (Magnani et al 2003, Heitz et al 2003). Ils permettent, suivant le traitement, d'implanter une grande variété de molécules chimiques comme  $\text{He}^+$ ,  $\text{F}^+$  ou d'incorporer des groupements fonctionnels chimiques comme  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ . Ces techniques ont montré *in vitro* qu'elles pouvaient promouvoir l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales. Néanmoins, elles restent difficiles à mettre en œuvre et certaines d'entre elles ne permettent pas de traiter les surfaces poreuses.

### I.3.4. Films multicouches de polyélectrolytes.

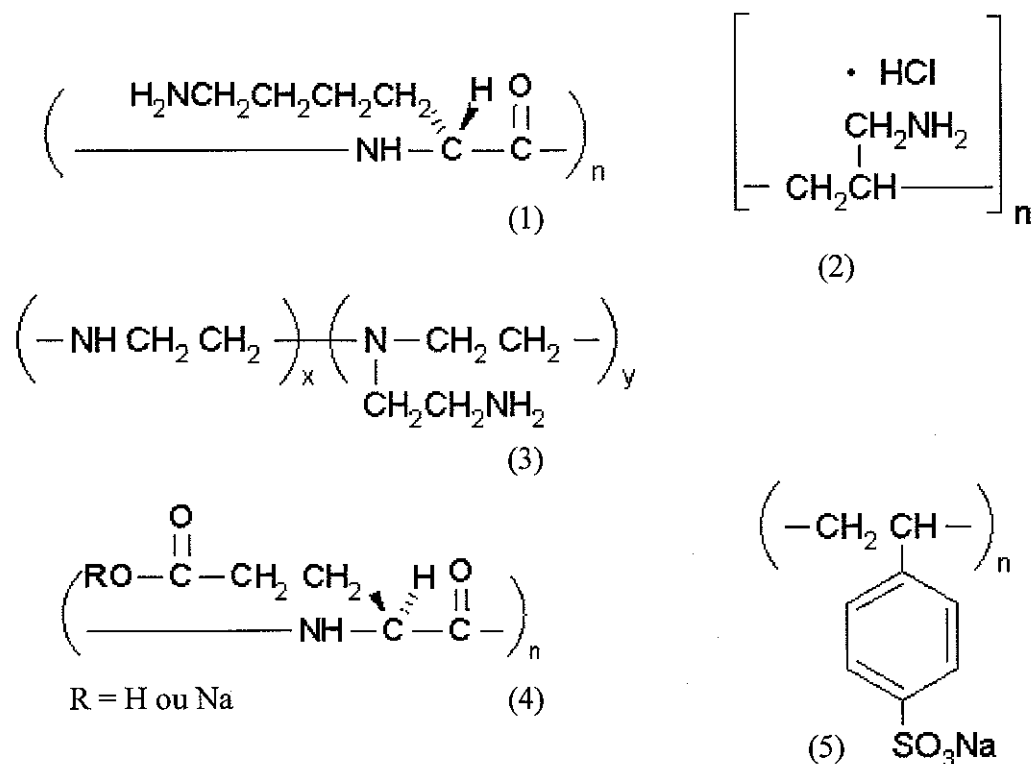
Dans le début des années 1990, Decher (Decher 1992) a développé une technique nouvelle permettant la construction de films minces de polymères hydrophiles polyélectrolytes, appelés films multicouches de polyélectrolytes. Ces films sont formés par un assemblage alternatif de polyélectrolytes de charges opposées (fig. I.18). La cohésion de la structure est principalement due aux forces électrostatiques entre les différents polyélectrolytes et à une participation non négligeable des interactions hydrophobes qui permettent une certaine stabilité du complexe (Kotov et al 1999).



**Figure I.18 : Les étapes de la construction d'un film multicouches de polyélectrolytes.**

Depuis quelques années, de nombreux chercheurs se sont intéressés à ce nouveau procédé trouvant des applications dans un grand nombre de domaines telles, la création de microcapsules ou de nanoparticules (Caruso et al 2000, Berth et al 2002, Shenoy et al 2003, Schönhoff et al 2003), la fabrication de membranes (Tieke et al 2001), l'adhérence (ou non) cellulaire (Elbert et al 1999, Tryoen-Toht et al 2002, Vautier et al 2002, Mendelsohn et al 2003)

Dans notre travail, nous avons utilisé différents polyélectrolytes, chargés positivement comme la poly(D-lysine) (PDL), le poly(allylamine hydrochloride) (PAH), le poly(éthylénimine) (PEI) et d'autres chargés négativement comme le poly(sodium 4-styrène sulfonate) (PSS), ou l'acide poly(L-glutamique) (PGA) pour la construction des films. La structure chimique des polyélectrolytes est représentée à la figure I.19. Certains polyélectrolytes comme la poly(lysine) sont depuis longtemps utilisés pour favoriser l'adhésion des cellules sur leur surface de culture (Cohen et al 1977).



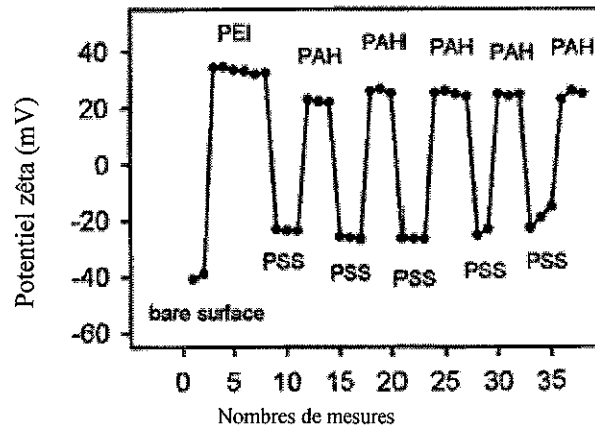
**Figure I.19 : Structure chimique des différents polyélectrolytes utilisés pour la construction des films multicouches de polyélectrolytes. (1) poly(D-lysine), (2) poly(allylamine hydrochloride), (3) poly(éthylénimine), (4) acide poly(L-glutamique), (5) poly(sodium 4-styrène sulfonate).**

Ces polyélectrolytes ont été utilisés dans notre travail de thèse pour la construction de deux films multicouches de polyélectrolytes:



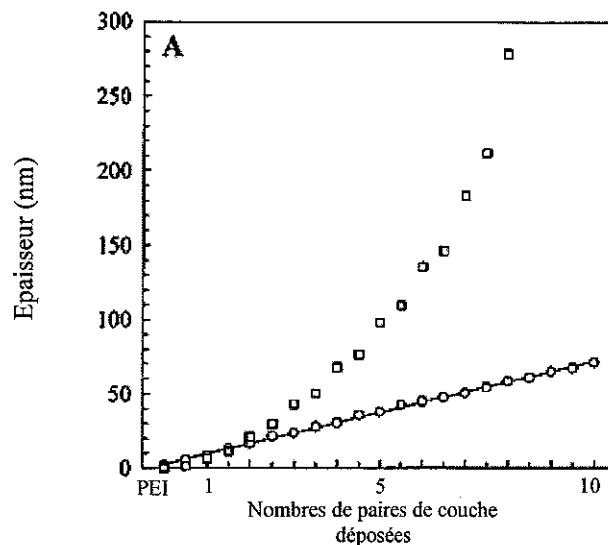
Ces deux films multicouches de polyélectrolytes ont déjà été évalués avec d'autres types cellulaires (cellules de chondrosarcomes, d'ostéosarcomes, de ligament) et ont montré une amélioration de l'adhésion initiale (Tryoen-toht et al 2002, Vautier et al 2002).

Une propriété intéressante concerne la charge de surface des films multicouches qui varie alternativement positivement ou négativement, en fonction du dernier polyelectrolyte déposé comme le montre la mesure du potentiel zêta sur la figure I.20 (Ladam et al 2000a).



**Figure I.20 : Evolution du potentiel zeta obtenu en potentiel d'écoulement au cours de la construction d'un film multicouche PEI-(PSS-PAH)<sub>5</sub> (Ladam et al 2000a).**

De plus, l'épaisseur et la masse des films augmentent en fonction du nombre de couches déposées. La croissance des films multicouches peut cependant augmenter de manière linéaire ou exponentielle en fonction du type de polyelectrolytes utilisés comme le montre la figure I.21 (Lavalley et al 2002). Le nombre de couche modifie également d'autres propriétés des films comme la viscoélasticité, la rugosité ou même la porosité (Mendelsohn et al 2000, Fery et al 2001).



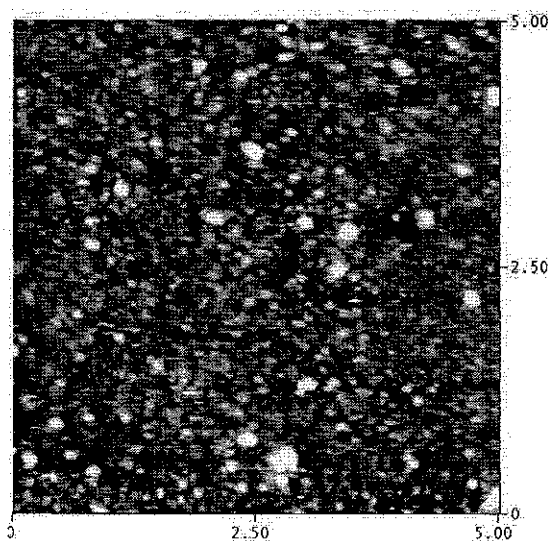
**Figure I.21 : Evolution de l'épaisseur des films PEI-(PSS-PAH)<sub>n</sub> (évolution linéaire) et PEI-(PGA-PLL)<sub>n</sub> (évolution exponentielle) en fonction du nombre de paires de couches déposées mesurée par spectroscopie optique par guide d'onde (d'après Lavalley et al 2002).**

Il est alors possible de moduler finement et de manière reproductible les propriétés physico-chimiques des surfaces traitées afin d'améliorer les phénomènes d'adhésion cellulaire. De plus, le procédé de fabrication des films multicouches de polyélectrolytes permet de recouvrir totalement des matériaux complexes, avec des tailles et des formes différentes, sans altérer les propriétés mécaniques de ces matériaux.

La nature chimique des polyélectrolytes, la force ionique (Dubas et al 1999), le pH (Shiratori et al 2000) modifient la nature du complexe formé par les polyions et peuvent par conséquent entraîner des modifications des propriétés physico-chimiques des films. Il convient donc de caractériser précisément les propriétés de chaque film (tableau I.9, figure I.22) pour tenter de déterminer une relation entre la structure des films et les résultats obtenus au niveau du comportement cellulaire.

**Tableau I.9 : Caractéristiques des films PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL et PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>.**

| <i>Architecture des films</i>       | <i>Épaisseur (nm)</i> | <i>Masse absorbée (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</i> | <i>Rugosité (nm)</i> | <i>Morphologie superficielle</i> |
|-------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------|
| PEI-(PSS-PAH) <sub>2</sub> -PGA-PDL | 19,7                  | 1,62                                                         | ~2,6                 | granules de 50 à 100 nm          |
| PEI-(PSS-PAH) <sub>3</sub>          | 38,1                  | 2,80                                                         | ~10                  | granules de 30 à 80 nm           |



**Figure I.22 : Image topographique par microscopie à force atomique (AFM) du film PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL (5 x 5  $\mu\text{m}$ ) (d'après Boura et al 2003).**

Certaines protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine ou la vitronectine, contenues dans le sérum de culture, sont importantes pour l'adhésion et le développement des cellules endothéliales (Van Wachem et al 1987). Les propriétés physico-chimiques des surfaces comme la charge de surface, la rugosité affectent l'adsorption des protéines sériques et par conséquent l'adhésion des cellules.

De nombreuses études ont été réalisées afin de comprendre ces phénomènes d'adsorption des protéines sur les films multicouches de polyélectrolytes (Müller et al 2001, Ladam et al 2000b, Ladam et al 2001, Schwinté et al 2002). Il semblerait que les interactions électrostatiques jouent un rôle important dans les processus d'adsorption. Il a également été montré dans le cas de polyélectrolytes faibles (dont la densité de charge change avec le pH) que l'adsorption des protéines est dépendante du type de polyanion, du pH et de la force ionique de la solution (Müller et al 1999, Müller et al 2001).

Concernant le film PSS/PAH, il a été récemment montré que l'adsorption de protéine individuelle, telle que l'albumine, est maximum lorsque la protéine et le film sont de charge opposée (Ladam et al 2001). Mais, une adsorption de la protéine est également observée en quantité moindre lorsque le film est de charge identique.

Dans le cas du film PGA/PLL, une grande quantité de protéines, contenues dans le sérum, semble s'adsorber, à pH 7,4, sur les films finissant par la poly(lysine) (Richert et al, 2002).

Par conséquent, les films que nous avons utilisés permettent par simple contact d'adsorber à leur surface une grande variété de protéines. Cependant, il n'a pas encore été déterminé quelles protéines contenues dans le sérum pouvaient s'adsorber préférentiellement sur les films multicouches.

Par ailleurs, il a été montré récemment qu'il était possible d'insérer dans l'architecture d'un film (PGA-PLL)<sub>n</sub> un peptide qui conservait son activité biologique (Chluba et al 2002). Par conséquent, il serait possible de déposer dans les films une protéine de la matrice extracellulaire favorisant ainsi une adhésion spécifique des cellules sur les surfaces traitées.



## I.4.Objectifs

Les objectifs de ce travail ont été d'évaluer les intérêts des films multicouches de polyélectrolytes utilisés comme modification de surface pour favoriser l'attachement et le développement des cellules endothéliales.

Dans un premier temps, les films multicouches ont été évalués au niveau de la biocompatibilité cellulaire par l'étude de différents paramètres telles que la morphologie cellulaire, l'activité métabolique, l'adhésion initiale, la croissance cellulaire, et l'expression d'un marqueur spécifique des cellules endothéliales (facteur von Willebrand).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'activation des cellules endothéliales par l'expression membranaire d'une molécule d'adhésion (ICAM-1), impliquée dans l'adhérence leucocytaire des cellules endothéliales. Les cellules ont été stimulées biochimiquement par une cytokine pro-inflammatoire (TNF $\alpha$ ) ou mécaniquement par une contrainte de cisaillement. Le rôle du cytosquelette, jouant un rôle dans l'expression d'ICAM-1, a également été évalué par l'utilisation d'un agent bloquant du cytosquelette (cytochalasine D).

Dans un dernier temps, nous avons évalué les phénomènes d'adhésion des cellules sur les films. Les interactions des cellules sur les films multicouches ont été estimées en utilisant des approches mécanique et biochimique. L'expression des récepteurs d'adhésion à la matrice extracellulaire (intégrines  $\beta$ 1) a été étudiée, de même que l'activation de la kinase d'adhésion focale (FAK) responsable de la transduction intracellulaire du signal d'adhésion.

## **CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES**

## II.1 Méthodologie générale

### II.1.1. Culture des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC)

La mise en culture d'HUVEC est effectuée selon la méthode de Jaffe modifiée (Jaffe et al 1973).

#### I.1.1.1 Réactifs et matériels

- **Milieu de culture**

Le milieu de culture est constitué des milieux de base M199 et RPMI 1640, et de certains additifs

La composition du milieu de culture est la suivante :

- 20% de sérum humain AB (provenant de donneurs volontaires sains) décomplémenté
- M199 et RPMI 1640 v/v (GibcoBRL, France)
- 2 mM de glutamine (GibcoBRL, France)
- 100 U/mL de pénicilline (GibcoBRL, France)
- 100 µg/mL de Streptomycine (GibcoBRL, France)
- 2.5 µg/mL de Fungizone (GibcoBRL, France)
- 20 mM HEPES (Sigma, France)

- **Tampon HBSS (Hank's balanced salts solution)**

HBSS (Sigma, France) sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  sous forme de poudre est reconstitué de la manière suivante :

- Ajouter 0.35g de  $\text{NaHCO}_3$  (Sigma, France)
- Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 1000 mL (pH 7.2)
- Filtrer la solution sur 0.22 µm
- Conserver à 4°C

Ce tampon contient : KCl 0.4g/L, NaCl 8.0g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.06g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.04778 g/L, D-glucose 1.0g/L et Rouge de phénol 0.011g/L.

- **Solutions de digestion**

- **Détachement des HUVEC de la veine ombilicale**

Solution trypsine-EDTA à 0,25% (Sigma, France), soit 2.5g de trypsine porcine et 0.2g de EDTA-Na<sub>4</sub> dans 100 ml de HBSS

- **Détachement des HUVEC des supports de culture**

Dans ce cas, la solution de digestion précédente est diluée avec du tampon HBSS à la concentration de 0.125%.

### **II.1.1.2 Culture des HUVEC**

- 1) **Recueil des cordons**

Les cordons proviennent de donneurs sains provenant de la maternité régionale de Nancy. Recueilli dès l'expulsion placentaire, le cordon est coupé à une dimension de 20 à 25 cm et immédiatement mis dans un flacon de culture de 75 cm<sup>2</sup> contenant 150 mL de HBSS stérile. Placé rapidement à 4°C, le cordon est utilisé le plus tôt possible. Il peut se garder entre 4 et 6 heures à 4°C.

- 2) **Lavage de la veine ombilicale**

Le tampon HBSS est éliminé de la boîte et le cordon est déposé dans une boîte de culture stérile. L'extérieur du cordon est nettoyé avec de l'éthanol. Un robinet est fixé par une extrémité dans l'orifice de la veine et ligaturé fortement autour du cordon. A l'aide d'une seringue reliée au robinet, la veine est lavée trois fois avec du tampon HBSS préchauffé à 37°C pour éliminer le sang. Après les lavages, l'autre extrémité du cordon est fermée avec une pince de chirurgien.

- 3) **Détachement des cellules**

A l'aide de la seringue, la veine est rempli avec 15-20 mL de la solution de digestion préchauffée à 37°C, jusqu'à ce que celle-ci soit gonflée. Le cordon immergé dans du tampon est placé au bain-marie pendant 10 min à 37°C. Le cordon est alors retiré, posé sur une boîte de pétri, massé doucement quelques secondes. L'extrémité fermée par la pince est coupée et la solution de digestion est recueillie dans un tube plastique de 50 mL contenant 1 mL de sérum humain pour arrêter l'action de la trypsine. La veine est lavée trois fois avec 10 mL de tampon HBSS. La suspension cellulaire est centrifugée à 300 g pendant 6 minutes, à température ambiante. Après centrifugation, un petit culot de cellules est visible. Le surnageant est jeté et les cellules sont lavées dans 10 mL de milieu de culture. Après la deuxième centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans 5 mL de milieu de

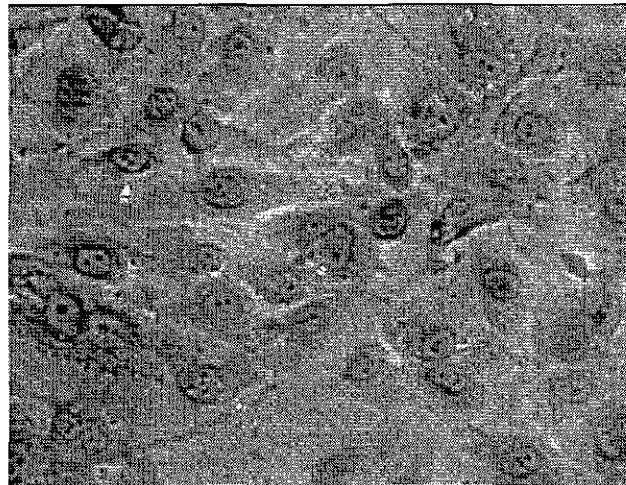
culture. Les cellules sont ensemencées dans un flacon de culture de 25 cm<sup>2</sup>, puis placées dans un incubateur à 37°C (5% CO<sub>2</sub> et 95% d'air).

#### 4) Evolution de la culture

Dès le lendemain, l'examen au microscope inversé à contraste de phase montre que la plupart des cellules ont adhéré au fond de la boîte, sous forme de nombreux îlots de cellules endothéliales. On fait subir à la boîte quelques mouvements oscillatoires et on jette le milieu contenant des érythrocytes. Les cellules sont lavées deux fois dans la boîte avec HBSS. Elles sont remises dans l'incubateur avec 5 mL de milieu de culture. Normalement après 5-7 jours, les cellules sont confluentes.

#### 5) Aspect des cultures

A confluence, les cellules forment une mosaïque homogène en « pavés de chaussée » caractéristique des cellules endothéliales (fig. II.1.). Les cellules sont polygonales et jointives, leur noyau est ovalaire contenant 2 ou 3 nucléoles. Cet aspect est différent de celui des fibroblastes, qui présente une morphologie plus longue, mince et fusiforme. Leur croissance s'arrête par inhibition de contact.



**Figure II.1. Aspect des HUVEC à confluence. Images obtenues par microscope inversé à contraste de phase (Olympus, IMT-2 ; objectif x 20, photo personnelle).**

#### 6) Passage en subcultures

A confluence, les cellules sont lavées 2 fois avec 5 mL de tampon HBSS préchauffé à 37°C. Les cellules sont détachées en laissant agir pendant 2 minutes à 37°C 4 mL de trypsine-EDTA 0,125 % filtrée. Ensuite, la digestion est arrêtée avec 4mL de milieu de culture. La suspension cellulaire est recueillie dans des tubes coniques stériles, puis centrifugée à 300 g pendant 6 minutes. Après avoir été lavées, les cellules sont remises en suspension dans 5 mL de milieu de culture.

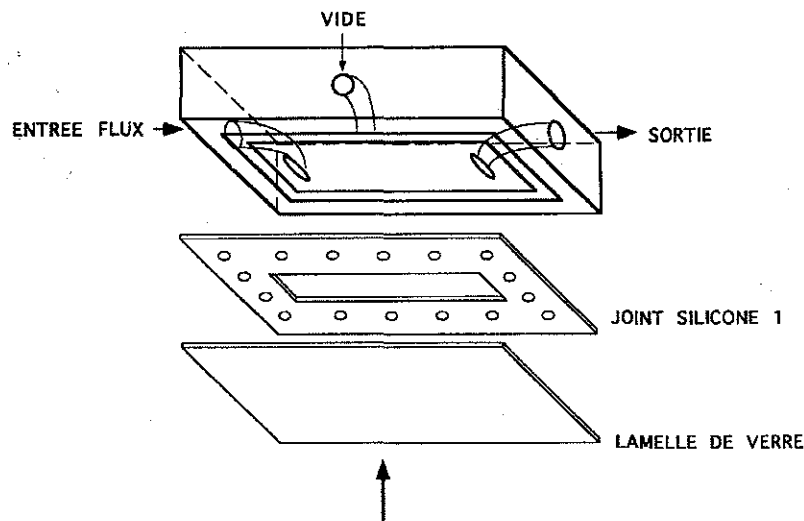
Après leur deuxième passage (P2), les cellules sont alorsensemencées à des densités cellulaires de 2 ou  $3.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> sur les différentes surfaces de culture préparées.

### ***II.1.2 Stimulations et traitements des cellules endothéliales.***

#### **II.1.2.1. Stimulation mécanique : contraintes de cisaillement**

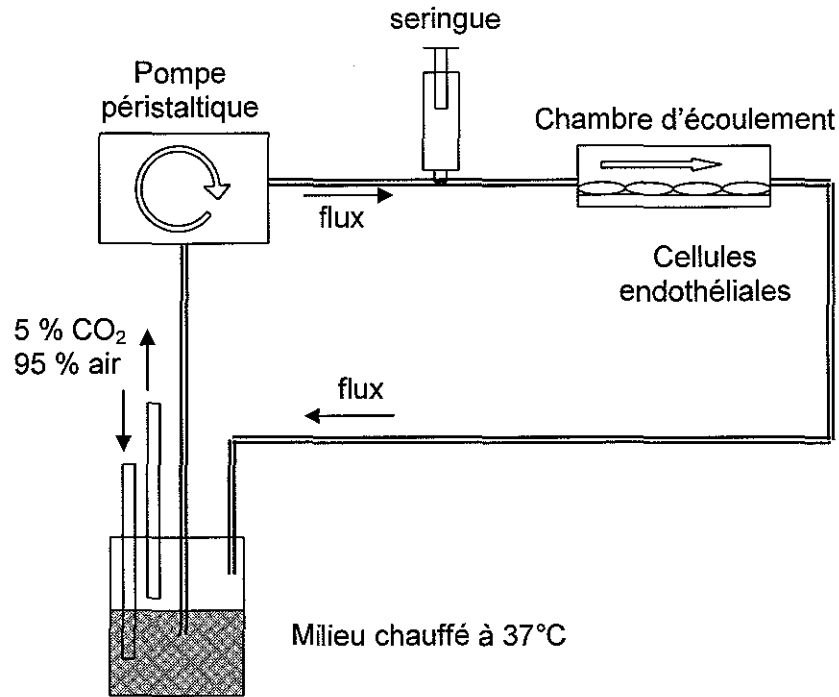
L'influence des contraintes de cisaillement sur les HUVEC cultivées sur les films multicouches a été réalisée dans une chambre d'écoulement (Fig. II.2). Les cellules endothéliales sont exposées à des flux laminaires de 0,6 ou 1,2 Pa (6 ou 12 dynes/cm<sup>2</sup>), pendant des durées de 1 ou 3h selon les expérimentations.

Un joint de silicone a été déposé sur la chambre de flux conférant un canal où l'écoulement est laminaire. La chambre, la lame de verre ensemencée avec les HUVEC et le joint en silicone sont assemblés sous un vide de -400 mbar grâce à une pompe à vide.



**Figure II.2 : schéma de la chambre d'écoulement.**

Une pompe péristaltique (Ismatech, Suisse) permet une circulation du milieu de culture. En amont de la chambre, une seringue est ajoutée au circuit, permettant de créer une modulation sinusoïdale afin d'amortir les fluctuations parasites de l'écoulement. Un mélange gazeux (5% CO<sub>2</sub> et 95% air) est introduit dans le réservoir de milieu pour réguler les variations de pH. Le milieu de culture est maintenu à 37°C dans un bain marie (Fig. II.3.)



**Figure II.3 : schéma du système en flux.**

La contrainte de cisaillement est calculée par l'équation suivante :

$$\tau = 6Q\mu/H^2w$$

$\tau$  = contrainte de cisaillement (dynes/cm<sup>2</sup>)

$\mu$  = viscosité du milieu (milieu de culture = 0,0072 Poise, DMEM = 0,0082 Poise ; à 37°C)

$Q$  = débit (cm<sup>3</sup>/s)

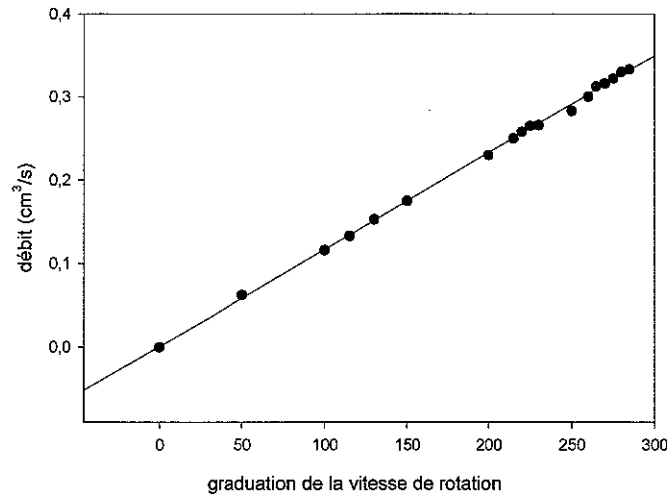
$w$  = largeur du canal d'étude (1,8 cm)

$H$  = hauteur du canal d'étude (0,025 cm)

Par conséquent, la valeur du débit de la pompe péristaltique permet de connaître la contrainte de cisaillement exercée au niveau des cellules. Nous avons étalonné la pompe péristaltique en réalisant une mesure du débit en fonction de la vitesse de rotation (Fig. II.4). Suite à cet étalonnage, nous avons obtenu la relation suivante par régression linéaire :

$$\text{Débit (cm}^3/\text{s)} = 0,458e^{-3} \text{ vitesse de rotation (graduation)} + 7,049e^{-4}$$

nous permettant de choisir précisément la contrainte de cisaillement appliquée.



**Figure II.4 : Etalonnage de la pompe péristaltique permettant de relier la graduation de la vitesse de rotation au débit (cm<sup>3</sup>/s).**

#### **II.1.2.2. Stimulation biochimique par la cytokine TNF $\alpha$**

La solution de TNF $\alpha$  (10  $\mu$ g/mL, Sigma, France) est diluée dans du milieu de culture et aliquotée à une concentration de 1  $\mu$ g/mL. Cette solution est conservée à -80°C jusqu'au moment de l'expérience.

Les cellules endothéliales sont stimulées avec TNF $\alpha$  à une concentration finale de 1 ng/mL (100 UI/mL). La solution de TNF $\alpha$  est ajoutée directement au contact des cellules et l'incubation se fait pendant des temps de 3h ou 16h, à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

#### **II.1.2.3. Inhibition de la polymérisation de la F-actine**

Pour étudier le rôle du cytosquelette sur la fonctionnalité des cellules endothéliales, la cytochalasine-D, connue pour inhiber la polymérisation des fibres d'actine, est ajoutée à une concentration finale de 2  $\mu$ M directement au contact des cellules 20 minutes avant la stimulation par TNF $\alpha$  (D'Alessio et al 1998).



### ***II.1.3 Construction des films multicouches de polyélectrolytes.***

Les films multicouches de polyélectrolytes ont été construits sur des lames de verre de tailles et formes différentes suivant nos expériences. Nous avons utilisés essentiellement des lamelles de verre rondes (diamètre 14 mm) pouvant être insérées dans des puits de plaques 24 puits et des lames de verre rectangulaires (58 x 71 mm) servant pour les expériences de flux.

#### **II.1.3.1. Lavage des lames de verre**

Afin de mettre en évidence la silice ( $\text{Si}^-$ ) et de rendre la surface des lames négative, les lames de verre sont lavées pendant 15 min à 100°C dans une solution de SDS (0.01M), suivis de lavages avec de l'eau distillée filtrée sur 0,22  $\mu\text{m}$ . Ensuite, les lames sont lavées pendant 15 min à 100°C dans une solution d'HCl (0.12M) suivis de lavages avec de l'eau distillée filtrée. Les lames de verre sont gardées dans l'eau distillée filtrée avant leur utilisation.

#### **II.1.3.2. Solution de Polyélectrolytes**

Tous les polyélectrolytes sont préparés dans une solution de NaCl à 1M filtrée à 0,22 $\mu\text{m}$ .

#### **Polycations :**

- **Poly(éthylènimine) (PEI)** (Sigma, France, MW = 750 000), 0.1 g/ L.
- **Poly(allylamine hydrochloride) (PAH)** (Sigma, France, MW : 70 0000), 5 g/L.
- **Poly(D-lysine hydrobromide) (PDL)** (Sigma, France, MW = 30 000-70 000), 1 g/L.

#### **Polyanions :**

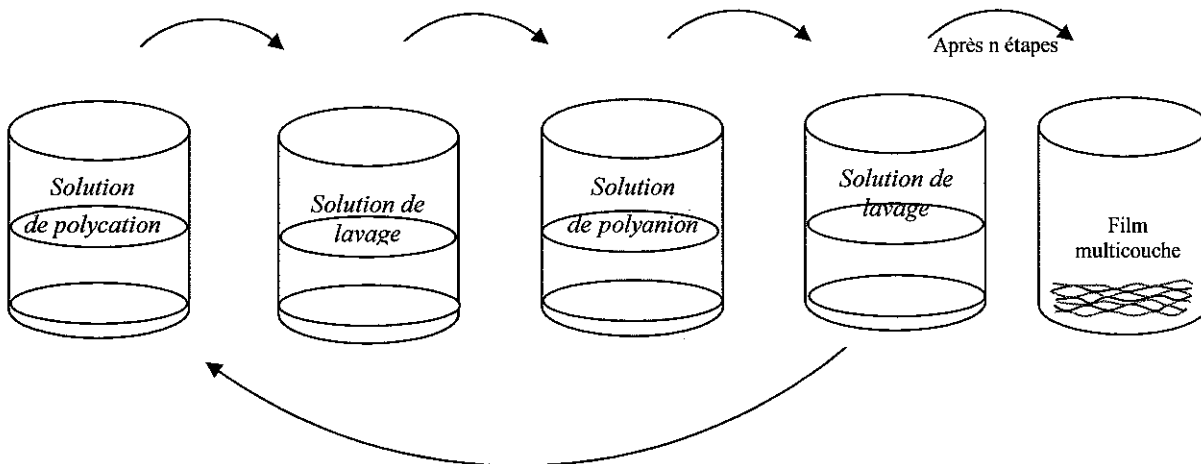
- **Poly(sodium 4-styrène sulfonate) (PSS)** (Sigma, France, MW = 70 000), 5 g/L.
- **Acide poly(L-glutamique) (PGA)** (Sigma, France, MW = 50 000-100 000), 1 g/L.

### II.1.3.3. Préparations des films multicouches de polyélectrolytes.

Les polyélectrolytes sont déposés à température ambiante dans l'ordre suivant :

- **PEI** (30 min)
- 2 X {
  - **PSS** (20 min)
  - **PAH** (20 min)
- **PGA ou PSS** (20 min)
- **PDL ou PAH** (20 min)

Chaque déposition est suivie de trois lavages de 5 min avec de l'eau distillée filtrée sur 0,22  $\mu\text{m}$ . Les étapes de formation des films multicouches de polyélectrolytes sont représentées sur la figure II.2.



**Figure II.5 : Représentation schématique des étapes de formation des films multicouches**

La déposition des différents polyélectrolytes permet l'obtention des architectures suivantes sur les lames de verre :



Les films multicouches sont ensuite séchés au minimum une nuit à 4°C avant leur utilisation et sont conservés au maximum 15 jours à 4°C. Avant chaque expérience, les films multicouches sont exposés sous une lampe UV germicide pendant 10 min.

## II.2 Méthodologie spécifique.

### II.2.1. Cytotoxicité : activité métabolique (test MTT)

#### II.2.1.1 Principe :

Le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphényltétrazolium) est un colorant vital, marqueur fonctionnel des mitochondries. Le MTT est un sel hydrosoluble de couleur jaune qui est converti en un cristal insoluble pourpre (formazan) par les succinates déshydrogénases mitochondriales ( $\text{NADH}^+$  dépendante). Cette conversion n'est effectuée que par les cellules ayant une activité métabolique mitochondriale, donc par les cellules vivantes. La mesure de la densité optique en fonction du temps de culture permettra d'évaluer une éventuelle cytotoxicité des différents support de culture.

#### II.2.1.2. Réactifs et matériels :

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sans rouge de phénol (GibcoBRL, France)
- Phosphate Buffer Saline (PBS) : NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 mM
- MTT : 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide ; blue Thiazolyl (Sigma, France) à 4,8 mM dans PBS
- Isopropanol acidifié : 0.04 N HCl dans de l'isopropanol absolu, (Sigma, France)
- Spectrophotomètre (DU 600, Beckman, USA)

#### II.2.1.3. Protocole :

Les cellules sontensemencées à une densité de  $2.10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> sur les différentes surfaces que nous avons préparées et cultivées pendant 1, 3, 7 et 10 jours. Au temps fixé, le milieu de culture contenant du rouge phénol est remplacé par 500µl de DMEM sans rouge de phénol, préalablement chauffé à 37°C. Puis, 125µL de MTT dissous dans du PBS à 2mg/ml sont ajoutés dans chaque puit.

Après 3h30 d'incubation à 37°C, les cristaux pourpres de formazan sont dissous avec 800 µL d'isopropanol acidifié à l'aide d'une pipette. Le surnageant est récupéré dans des tubes eppendorffs et brièvement centrifugé (600 g, 2 min). Enfin, la densité optique est mesurée à une longueur d'onde de mesure de 570 nm et une longueur d'onde de référence de 700 nm.

## ***II.2.2. Numération cellulaire : adhésion initiale et croissance.***

### **II.2.2.1 Principe**

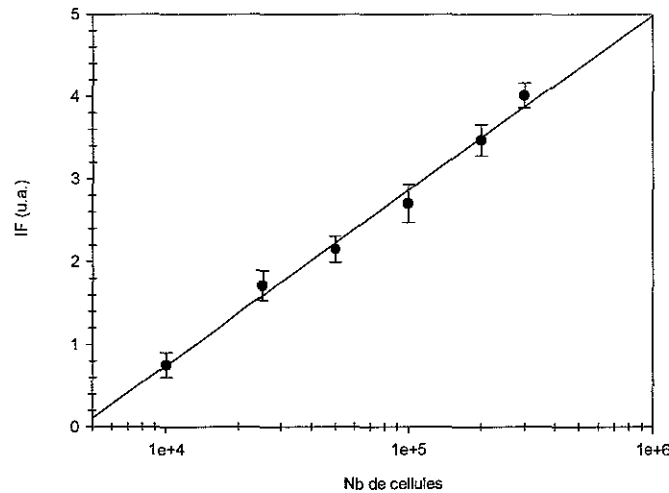
L'incorporation du Hoechst 33342, fluorochrome vital spécifique des bases AT de l'acide désoxyribonucléique (ADN) permet de quantifier précisément le nombre de cellules en évaluant le contenu exact en ADN de chaque puits de culture.

### **II.2.2.2 Réactifs et matériels**

- Solution de Hoechst 33342 (Sigma, France) 1,8 mM dans de l'eau distillée
- Méthanol absolu à -20 °C (Sigma, France)
- Milieu DMEM sans rouge de phénol (Sigma, France)
- PBS
- Ethanol dénaturé
- Spectrofluorimètre (SLM, Aminco, Urbana, USA)

### **II.2.2.3 Protocole :**

Les cellules sontensemencées sur les différentes surfaces et cultivées à 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Au temps fixé, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont lavées deux fois avec du PBS à 37°C, puis fixées avec du méthanol absolu (-20°C) pendant 10 min. Ensuite les cellules sont lavées encore deux fois avec du PBS pour éliminer complètement le méthanol. Avant chaque manipulation la solution de fluorochrome est diluée au 1/50 dans du milieu sans rouge de phénol. Ensuite 500 µL de la solution diluée sont ajoutés dans chaque puit. Après 30 minutes d'incubation, la solution est éliminée et les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS pendant 2 min afin d'éliminer le fluorochrome non lié. Le complexe ADN-fluorochrome est extrait par l'ajout de 1 ml d'éthanol dénaturé dans chaque puit. Après 5 min, le contenu de chaque puit est transféré dans des cuves transparentes aux UV contenant 1 ml d'éthanol dénaturé. La fluorescence est mesurée aux longueurs d'excitation et d'émission de 360 et 460 nm respectivement. Le blanc standard est effectué par une mesure d'éthanol dénaturé. Afin de quantifier le nombre de cellules, une courbe étalon de différentes densités de cellules connus en fonction de l'intensité de fluorescence a été réalisée (fig. II.6).



**Figure II.6 : Courbe étalon de la densité cellulaire en fonction de l'intensité de fluorescence (IF) (n = 6).**

La relation ci-dessous a été obtenue par régression linéaire et permet de calculer le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence mesurée :

$$\text{Nombre de cellules} = 10^{(IF + 7,76) / 2,12}$$

Cette technique nous a permis d'une part d'évaluer l'adhésion initiale après 3h de contact sur les différentes surfaces (densité initialeensemencée de  $3 \cdot 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>).

D'autre part, elle nous a permis également de mesurer la croissance cellulaire après 24h et 72h de culture (densité initialeensemencée de  $2 \cdot 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>).

De plus, à partir du nombre de cellules obtenu à 24h et 72h, le temps de doublement (TD), temps pour lequel la population cellulaire est capable de doubler son nombre d'individu, a été calculé par la relation suivante :

$$TD = (t_{72h} - t_{24h}) \log 2 / \log Nt_{72h} - \log Nt_{24h}$$

Où  $t_{24h}$  et  $t_{72h}$  sont les temps après 24h et 72h de culture, et  $Nt_{24h}$  et  $Nt_{72h}$  sont le nombre de cellules au temps  $t_{24h}$  et  $t_{72h}$ .

### **II.2.3. Interactions cellules/surfaces**

#### **II.2.3.1 Attachement des cellules soumises aux contraintes de cisaillement**

##### **II.2.3.1.1. Principe**

Afin d'estimer l'adhésion des cellules sur les surfaces, les cellules ont été soumises à des contraintes de cisaillement de 6 et 12 dynes/cm<sup>2</sup>. Le nombre de cellules restant adhérentes au cours du temps permet d'estimer les forces d'adhésion des cellules sur les différentes surfaces.

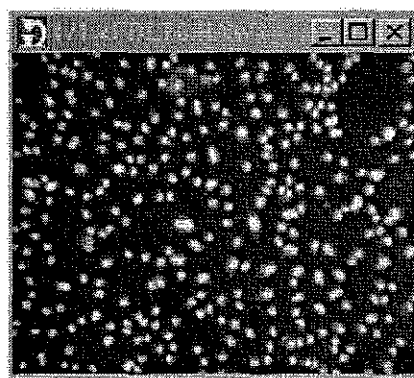
##### **II.2.3.1.2. Réactifs et matériels**

- Hoechst 33342 à 1mg/ml
- DMEM sans rouge de phénol
- Système en flux (cf. paragraphe I.3.1)
- Microscope à fluorescence (Olympus IX-70, Japan)

##### **II.2.3.1.3. Protocole :**

Les cellules sontensemencées sur les surfaces étudiées pendant 48h (37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Ensuite, les cellules sont incubées 30 min avec une solution de Hoechst vital 33342 (dilué au 1/50) directement dans le milieu de culture. 2 lavages de 5 min avec du milieu DMEM sans rouge de phénol à 37°C sont réalisés. Les lames sont ensuite montées sur une chambre de flux, et fixées sur le microscope de fluorescence (objectif 10x). Les images sont prises à différents temps : 0, 5, 10, 15, 30, 60 min.

Enfin, pour chaque image prise, un comptage des noyaux est effectué (figure II.7) et le pourcentage du nombre de cellules restant adhérentes au cours du temps est calculé.



**Figure II.7 : visualisation des noyaux marqués avec le Hoechst 33342 (CellScan, Scanalytics, USA). (objectif x10)**

### II.2.3.1. Attachement des cellules traitées par la trypsine

#### II.2.3.2.1 Principe :

La trypsine est une enzyme protéolytique qui hydrolyse les liaisons peptidiques, c'est à dire qu'elle est capable de couper les protéines impliquées dans l'adhésion des cellules à leur environnement. Par conséquent, cet essai permet d'estimer les interactions entre les cellules et les surfaces étudiées.

#### II.2.3.2.2 Réactifs :

- Trypsine-EDTA 0.0025% (sigma, France)

#### II.2.3.2.3 Protocole :

Les cellules sont cultivées sur les différentes surfaces pendant 48h. Ensuite, le milieu de culture est éliminée, deux lavages sont réalisées avec une solution de HBSS afin d'éliminer le sérum. Ensuite, les tapis cellulaires sont traitées pendant 5 min à température ambiante, avec 500 µl de Trypsine-EDTA à 0.0025% diluée dans du PBS sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ . Le temps d'incubation de 5 min et la concentration de Trypsine-EDTA à 0.0025% ont été préalablement définis pour obtenir un détachement partiel des cellules sur les surfaces contrôles. L'inactivation de la digestion enzymatique est provoquée par l'ajout de 500µl de milieu de culture. Le nombre d'HUVEC restant adhérees au fond des puits est évalué par une mesure fluorométrique à l'aide du fluorochrome Hoechst 33342. De même, un témoin sans traitement enzymatique (nombre de cellules totales) est réalisé permettant d'estimer le pourcentage de cellules restant adhérees par le calcul suivant:

(Nombre de cellules dans les puits traités / Nombre de cellules dans les puits témoin) x 100.

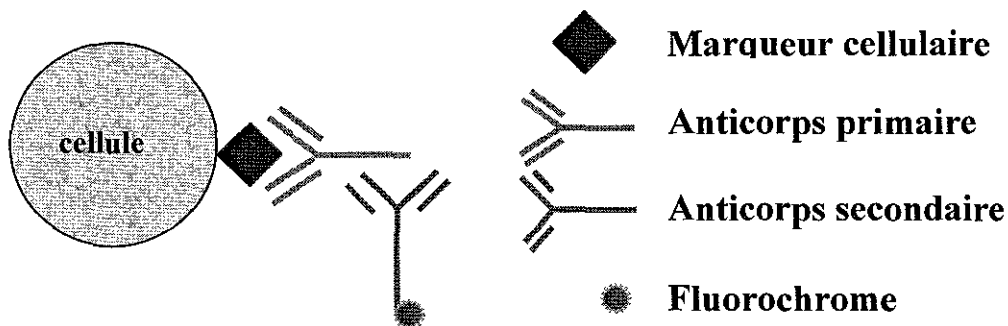
## II.2.4 Cytométrie en flux

Cette technique a permis d'une part d'évaluer l'influence des surfaces sur le phénotype des cellules endothéliales par l'étude du facteur von Willebrand (vWf) et d'autre part de quantifier l'expression des molécules d'adhérence impliquées soient dans la réponse inflammatoire comme ICAM-1, soient dans l'adhésion à la matrice extracellulaire comme les intégrines de la famille  $\beta 1$ .

Cette technique repose sur la mesure de paramètres physiques (taille, volume, granulosité) et biologiques (marquage de molécules par immunofluorescence) de cellules défilant à une grande vitesse devant un faisceau lumineux monochromatique exciteur. Les signaux lumineux émis par les cellules sont recueillis et traités par un système informatique.

### II.2.4.1 : Immuno-fluorescence indirecte

Les récepteurs exprimés à la surface des cellules (marqueurs cellulaires) sont reconnus spécifiquement par un anticorps (Anticorps primaire). Afin de mettre en évidence la formation du complexe récepteur-anticorps primaire, un deuxième anticorps est utilisé (Anticorps secondaire). Ce dernier est couplé à un fluorochrome et il est dirigé spécifiquement contre la partie Fc (fragment commun) de l'anticorps primaire (Figure II.8).



**Figure II.8 : Principe de l'immunofluorescence indirecte.**



### II.2.4.2 : Protocole de marquage des molécules étudiées

Nous avons utilisés différents anticorps qui nous ont permis de réaliser des immuno-marquages indirectes. Les caractéristiques des anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules: vWf, ICAM-1, intégrines  $\beta_1$  ainsi que celles de l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor® 488 sont présentés dans le tableau II.1

**Tableau II.1 : Caractéristiques des anticorps utilisés pour le marquage en immunofluorescence indirecte.**

| <u>Anticorps</u>                                                                           | <u>Spécificité de l'espèce</u> | <u>Isotype</u> | <u>Clone</u> | <u>Origine commerciale</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------|--------------|----------------------------|
| Anticorps anti vWf                                                                         | Humain                         | Souris IgG1    | F8/86        | Dako                       |
| Anticorps anti ICAM-1 (CD54)                                                               | Humain                         | Souris IgG1    | 84H10        | Immunotech                 |
| Anticorps anti intégrines $\beta_1$ (CD29)                                                 | Humain                         | Souris IgG2a   | K20          | Dako                       |
| Anticorps anti IgG-Alexa fluor® 488<br>( $\lambda_{ex}$ : 488 nm, $\lambda_{em}$ : 519 nm) | Souris                         | Chèvre         |              | Molecular Probes           |

Autres réactifs :

- PBS-BSA 0,5% (BSA : Albumine Sérique Bovine, Sigma, France) utilisé à 0,5% (p/v dans PBS). La BSA est utilisée afin d'empêcher toute fixation aspécifique des anticorps.
- Solution de fixation : Paraformaldéhyde (Sigma, France) à 1% p/v dans PBS.
- Solution de perméabilisation : Triton X100 (Sigma, Fance) à 0,1% dans PBS.

**Immuno-marquage des molécules d'adhérence : ICAM-1, intégrines  $\beta_1$** 

- 1) Les cellules sont détachées avec 500  $\mu$ L de trypsine-EDTA (0,05%), placées dans des tubes de cytométrie, puis lavées et suspendues dans 200 $\mu$ L de PBS-BSA 0.5%.
- 2) 4  $\mu$ L d'anticorps primaire (dilution 1/50) sont ajoutés aux cellules pendant 30 min à 37°C.
- 3) Les cellules sont lavées trois fois avec 500 $\mu$ L de PBS-BSA 0.5% (300 g pendant 5min)
- 4) Les cellules sont suspendues dans 200  $\mu$ L de PBS-BSA 0.5%
- 5) 4  $\mu$ L d'anticorps secondaire (dilution 1/50) sont ajoutés, les suspensions sont incubées pendant 30 min à 37°C.
- 6) Lavages des cellules trois fois avec 500 $\mu$ L PBS-BSA 0.5%
- 7) Les cellules sont suspendues dans 200  $\mu$ L de PBS et conservé à 4°C à l'obscurité jusqu'à l'analyse en cytométrie.

Un contrôle négatif (cellules sans anticorps) et un contrôle isotypique (cellules incubées avec un anticorps monoclonal isotypique couplé au fluorochrome) sont préparés et analysés en même temps que les échantillons.

**Immuno-marquage intracellulaire du facteur von Willebrand (vWf).**

Pour un marquage intracellulaire, les cellules sont détachées par la trypsine-EDTA 0,125 %. Ensuite les cellules sont fixées avec la solution de fixation (PAF 1%) pendant 10 min à température ambiante, puis lavées avec du PBS. Ensuite les cellules sont perméabilisées à l'aide de la solution de Triton 0,1% pendant 2 à 3 min à température ambiante. La suite du marquage est identique à ce qui a été décrit précédemment.

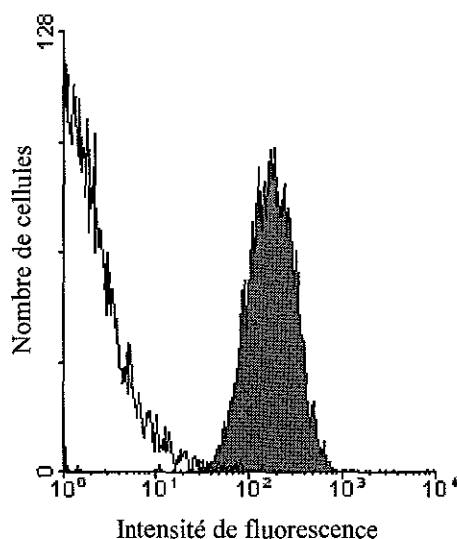
**II.2.4.3 Analyse des échantillons cellulaires**

Les cellules endothéliales sont analysées sur un cytomètre FACScan (Becton Dickinson, France). 10 000 évènements ont été collectés lors de chaque analyse.

La population cellulaire est repérée sur le scattogramme en fonction de la taille et de la granulosité (Figure II-10). Une fenêtre prenant en compte uniquement cette population est dessinée afin d'éliminer les débris cellulaires, ou les doublets et triplets de cellules.

Sur l'histogramme de la fluorescence, la tension du photomultiplicateur (PMT) est réglée de manière à ce que les cellules non marquées, ainsi que le contrôle isotypique (cellules incubées en présence d'immunoglobulines non spécifiques) apparaissent négatives, entre 0 et 1 sur l'échelle logarithmique (Figure II.9). La tension du PMT ne doit plus être touchée après ce réglage afin de ne pas faire d'erreur sur la lecture des intensités de fluorescence des

échantillons analysés. L'intensité de fluorescence de la population cellulaire est mesurée automatiquement par le cytomètre et analysée à l'aide du logiciel WinMDI.



**Figure II.9 : Histogrammes de fluorescence. Cellules endothéliales incubées avec l'anticorps anti intégrines  $\beta 1$ .**

Les résultats obtenus par cytométrie en flux sont soit exprimés en pourcentage de cellules positives soit en intensité moyenne de fluorescence (IMF), cette IMF sera pour les récepteurs membranaire corrélée à une densité antigénique.

#### **II.2.4.4. Mesure de la densité antigénique des récepteurs membranaires**

La quantification du nombre de récepteurs exprimés à la surface des cellules est réalisée en reliant l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) au nombre de sites antigéniques par cellule par un étalonnage adapté. Cette équivalence est possible uniquement si la fixation de l'anticorps utilisé est monovalente (Poncelet et al 1996).

Le calibrant se présente sous forme de billes de latex, simulant les cellules, recouvertes de quantités croissantes d'immunoglobulines de souris, ce qui permet, après marquage à l'aide d'un fluorochrome et analyse cytométrique, de tracer une droite d'étalonnage corrélant l'IMF (unité arbitraire) au nombre de sites antigéniques par cellule (unité absolue).

### **Intérêt de la quantification**

L'analyse semi-quantitative des données exprimées en IMF manque de standardisation du fait de la variation dans la préparation de l'échantillon, de l'hétérogénéité des appareils et des réactifs proposés par les fournisseurs.

Par conséquent, l'exploitation des mesures de fluorescence est limitée à la détermination de cellules "positives" ou "négatives" au sein d'une population cellulaire. Le seuil de positivité est arbitrairement fixé à 1 sur l'échelle logarithmique comprenant 4 décades. Les paramètres sont réglés de telle façon que l'auto-fluorescence de la population cellulaire analysée et le contrôle isotypique soient situés dans la première décade, c'est-à-dire avant 1. Il apparaît donc que la positivité de fluorescence d'une population cellulaire est fixée par rapport à l'auto-fluorescence des cellules. Il est à noter que l'auto-fluorescence varie selon chaque type cellulaire. La quantification, en utilisant toujours la même valeur de la tension du photomultiplicateur (PMT) pour l'analyse des cellules, permet d'éviter ces artéfacts de mesure.

### **Marquage des billes de calibration**

Le kit de calibration Qifikit (Dako, France) est spécifique des immunomarquages indirects. Il se compose de 5 populations de billes en latex de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre. Une droite étalon est réalisée pour l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (utilisé pour la quantification des récepteurs à la surface des cellules endothéliales).

100  $\mu\text{L}$  du calibrant (kit Qifikit) sont déposés dans chaque tube ainsi que 10  $\mu\text{L}$  d'anticorps couplé au fluorochrome. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, les billes de calibration sont lavées (300 g, 5 minutes) et suspendues dans 300  $\mu\text{L}$  de PBS

Les billes sont analysées en même temps que les échantillons cellulaires, dans un délai de 2 heures après la fin de l'immunomarquage.

### **Analyse des billes de calibration**

Sur le cytogramme représentant la taille cellulaire en fonction de la granulosité, les valeurs de SSC (Side Scatter) et de FSC (Forward Scatter) sont réglées de façon à bien visualiser les billes de calibration (Figure II.10).

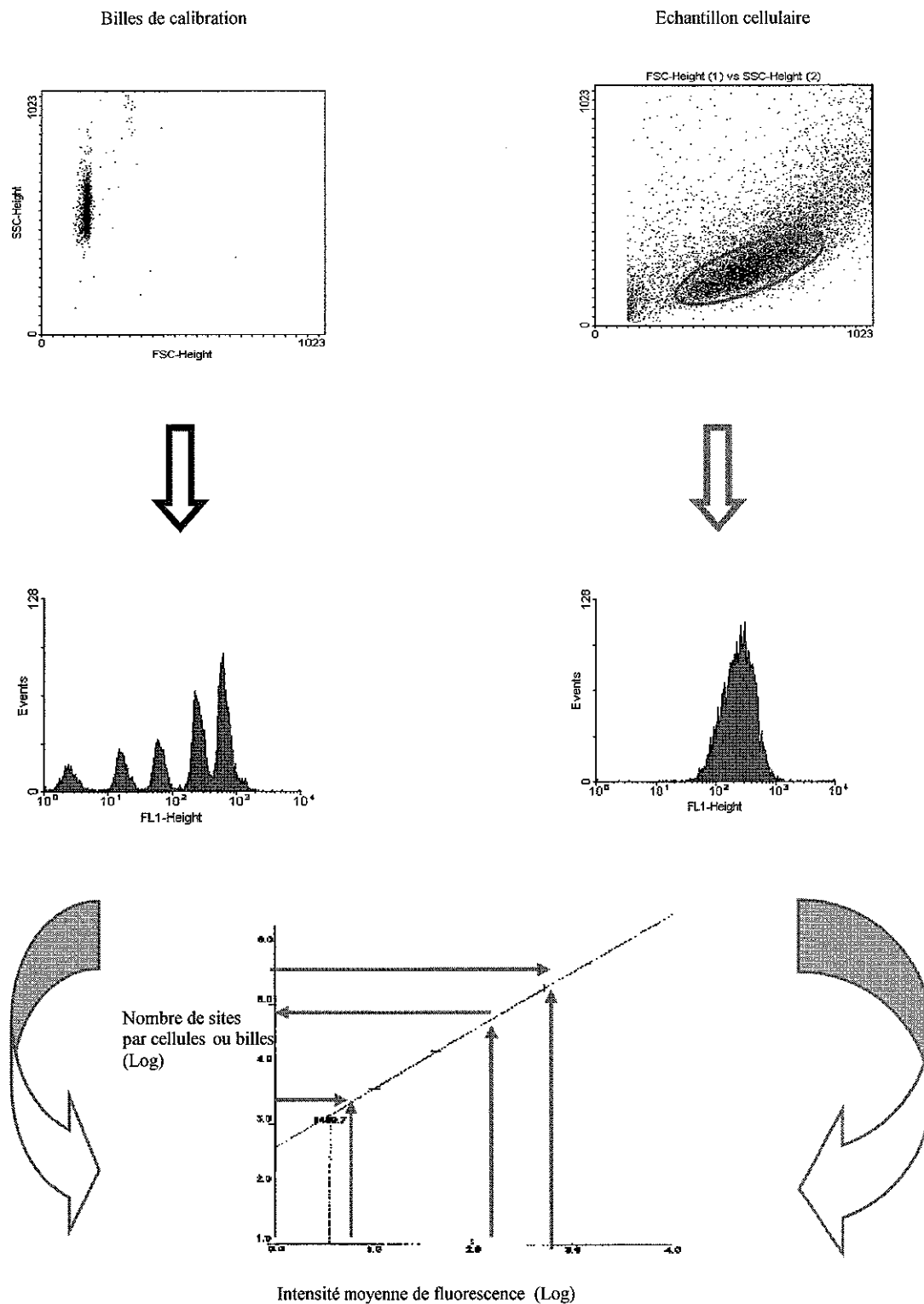
Sur l'histogramme de fluorescence, la tension du PMT est réglée de la même manière pour que les billes de calibration et pour les échantillons cellulaires. Il apparaît ainsi sur

l'histogramme de fluorescence plusieurs pics correspondant aux diverses populations de billes de calibration.

### **Construction de la droite d'étalonnage**

Une représentation logarithmique est réalisée, reliant en abscisse l'IMF et en ordonnée les valeurs de capacité de fixation des anticorps par bille données par le constructeur (Figure II.10)

L'immuno-marquage étant réalisé en conditions saturantes et la fixation du fragment  $F(ab')_2$  étant considérée comme monovalente, chaque site antigénique est théoriquement occupé par un anticorps monoclonal. Il existe alors une équivalence entre le nombre d'anticorps fixés et le nombre de sites antigéniques par cellule (Poncelet et al 1996). Les valeurs d'IMF peuvent alors être transformées en nombre de sites antigéniques. Pour cela, après avoir retiré à l'IMF de l'échantillon choisi, la valeur de l'IMF du contrôle négatif, la valeur du nombre de sites par cellule est extrapolée à partir de la droite étalon. La conversion en densité antigénique est réalisée par un logiciel de calibration et de quantification (TallyCAL pour Windows).



**Figure II.10 : Utilisation de l'étalon. La droite d'étalonnage est construite à partir des billes de calibration. Le nombre de sites antigéniques par cellule est déduit de cette droite.**

### ***II.2.5: Microscopie de fluorescence***

La microscopie de fluorescence permet de compléter les résultats obtenus en cytométrie en flux. En effet, elle permet de visualiser la distribution cellulaire des molécules d'adhérence (ICAM-1, intégrines  $\beta_1$ ). De plus, elle permet de visualiser d'autres constituants cellulaires comme le réseau d'actine qui forme le cytosquelette ou le noyau.

#### **II.2.5.1 : Marquage des échantillons cellulaires**

##### Visualisation des molécules d'adhérences (ICAM-1 et intégrines $\beta_1$ )

Les cellules sont lavées avec du DMEM à 37°C. Ensuite un immuno-marquage indirect (cf paragraphe II.2.5) est réalisé avec l'anticorps primaire dirigé contre ICAM-1 ou les intégrines  $\beta_1$  et l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor® 488 ( $\lambda_{ex}$ : 488 nm,  $\lambda_{em}$ : 519 nm). Les cellules sont ensuite fixées avec une solution de PAF à 1% pendant 10 min.

##### Visualisation du cytosquelette

La phalloïdine couplée à un fluorochrome permet de visualiser le cytosquelette. Il s'agit d'une toxine trouvée dans un champignon (*Amanita phalloïdes*) et qui présente une grande affinité pour la F-actine.

Le marquage des microfilaments de F-actine est réalisé en présence de phalloïdine-Alexa 594 ( $\lambda_{ex}$ : 594 nm,  $\lambda_{em}$ : 617 nm) (Molecular Probes, USA) après avoir fixé et perméabilisé les échantillons. L'incubation dure 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les échantillons sont ensuite rincés dans du tampon PBS.

##### Visualisation du noyau

Le marquage des noyaux est réalisé en présence d'une solution de Hoechst (dilution 1/50). Les échantillons fixés et perméabilisés sont incubés pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, puis ils sont lavés avec du tampon PBS.

### II.2.5.2 : Microscopie à sectionnement optique

Cette technique utilise un microscope à fluorescence conventionnel (Olympus IX-70) associé à un système CELLscan<sup>TM</sup> (Scanalytics, USA) composé d'un module d'acquisition et d'un module de traitement. Le microscope est associé à un dispositif de déplacement axial nanométrique et à de puissants algorithmes de restauration et de reconstruction d'images qui permettent de visualiser des échantillons biologiques en trois dimensions (Dumas et al 2000).

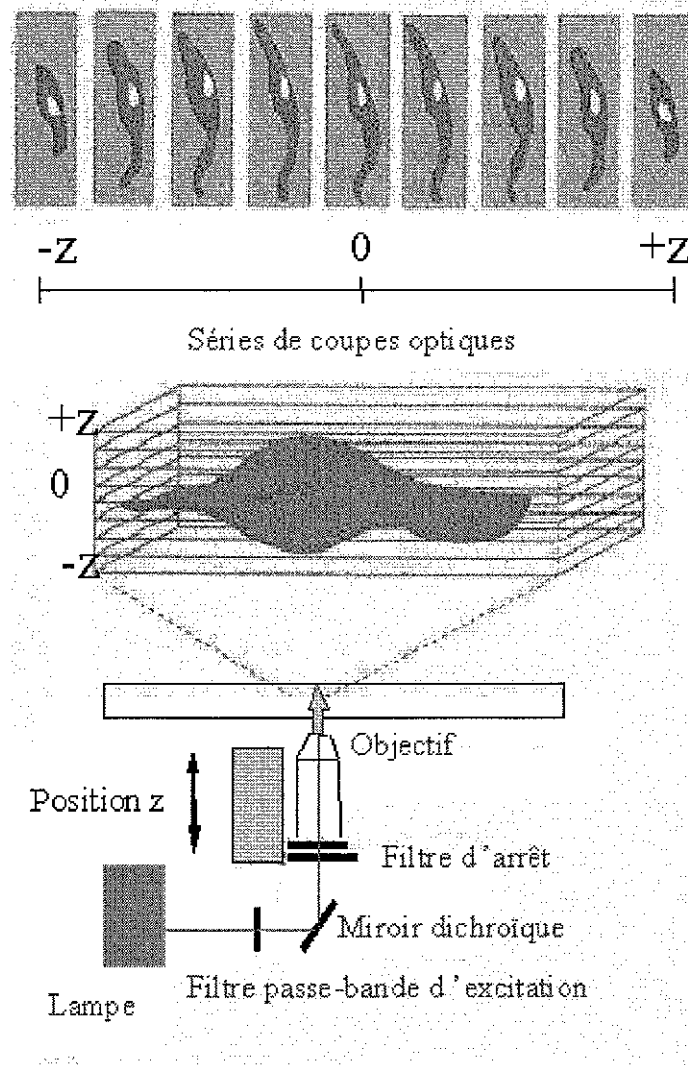
#### Acquisition et traitements des images :

L'observation d'une cellule entière est permise grâce à une succession de coupes horizontales (x, y) selon l'axe optique vertical (z). Le découpage optique consiste à déplacer le plan focal à travers l'objet, grâce à un système de déplacement dans l'axe z (pas de 0,25  $\mu\text{m}$ ) à l'aide d'un quartz-piézo électrique monté sur l'objectif (60x/ON=1,25 ; 100x/ON=1,30 ; 10x/ON=0,30) et contrôlé par ordinateur (Figure II.11). L'acquisition de la série d'images 2D se fait par une caméra CCD refroidie à - 20°C (Slow Scan cooling 12 bits, Princeton Instruments Inc, USA).

En microscopie optique, chaque image 2D contient des informations de son plan de focalisation mais aussi des plans inférieurs et supérieurs au plan de focalisation. Ces informations peuvent être séparées par traitement d'image afin d'estimer la vraie structure 3D de l'objet étudié.

Afin de supprimer les informations hors plan de focalisation, une technique de restauration d'images (déflouage) permet de retrouver la scène originelle (plan net) à partir d'observations dégradées (plans flous). Ces techniques sont orientées vers la modélisation de phénomènes de dégradation d'images (diffraction de la lumière par le système optique) et l'application de procédures inverses (déconvolution numérique) afin d'obtenir une approximation de la scène originelle grâce à la méthode de Carrington (Carrington et al 1995).





**Figure II.11 : Principe de la microscopie par sectionnement optique.**

### II.2.5.3 : Microscopie confocale à balayage laser

La microscopie confocale à balayage laser ou CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope) permet de visualiser des échantillons biologiques en 3D en éliminant la lumière parasite.

Un microscope SP2 Leica dépourvu de filtre dichroïque, d'excitation et d'émission est utilisé afin d'améliorer le taux de transmission du signal d'émission de fluorescence. Cette amélioration passe d'une part par l'utilisation d'un cristal (AOBS) au niveau de l'excitation laser et d'autre part par l'utilisation d'un prisme permettant de décomposer et de sélectionner la longueur d'onde d'émission.

### Principe du balayage laser

Pour constituer l'image, un balayage point par point à l'aide d'une irradiation de type laser est assuré par 2 galvanomètres dans les 2 directions (X et Y, Figure II.12). La fréquence de balayage doit permettre d'acquérir le signal de fluorescence le plus rapidement possible. Un déplacement selon l'axe optique (Z) permet l'acquisition de coupes sériées. Des diaphragmes ont pour but d'exclure physiquement le signal lumineux provenant des plans adjacents au plan focal. Seule la lumière d'émission de fluorescence provenant du plan focal est collectée au niveau du PMT pour constituer l'image. L'ouverture du diaphragme conditionnera en grande partie la qualité optique de l'image (Figure II.12).

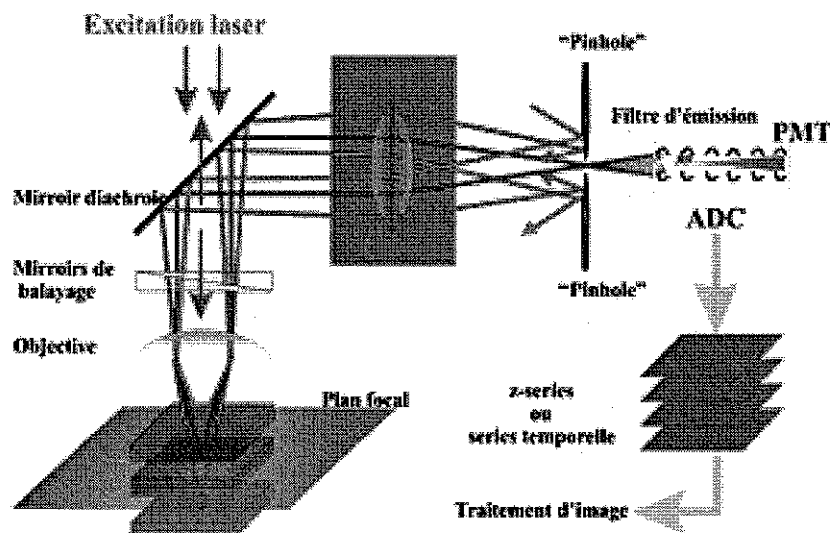


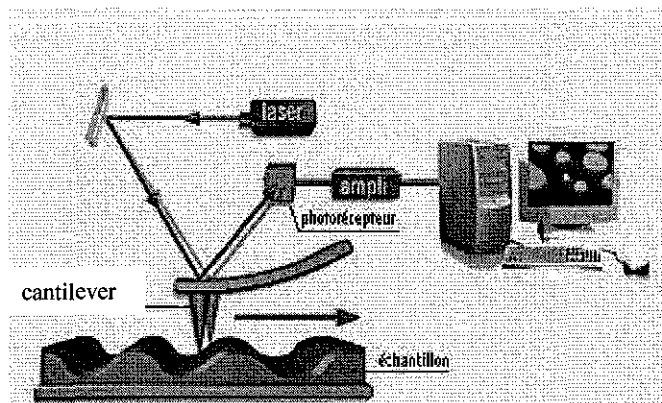
Figure II.12 : Principe de la microscopie confocale à balayage laser.

### II.2.6 Microscopie à force atomique (AFM)

Cette technique nous a permis d'observer non seulement la topographie des films multicouches de polyélectrolytes mais également la topographie précise des cellules lors de l'adhésion initiale des cellules après 3h de contact et 48h de culture sur les différentes surfaces que nous avons étudiées.

#### II.2.6.1 Principe :

La Microscopie à Force Atomique (AFM) est fondée sur la mesure des forces d'interaction entre une pointe atomique (cantilever) et les atomes de surface de l'échantillon. Par balayage de la pointe, des images morphologiques tridimensionnelles à très hautes résolution latérale (x, y) et verticale (z) sont obtenues. La déflexion de la pointe est suivie en positionnant un faisceau laser sur la face supérieure du cantilever, le faisceau est réfléchi sur un miroir puis tombe sur des photorécepteurs qui enregistrent le signal lumineux. Les déplacements x,y,z se font grâce à une céramique piézo-électrique (figure II.13).



**Figure II.13 : Schéma du principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique**

#### II.2.6.2 Préparation des échantillons cellulaires et acquisition des images

Les cellules sontensemencées et cultivées pendant 3h ou 48h au contact des différentes surfaces. Au temps désiré, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS à 37°C, puis fixées avec une solution de glutéraldéhyde à 2,5 % pendant 15 min. Ensuite les cellules sont lavées avec du PBS et déshydratées dans différents bains successifs d'éthanol (50, 75, 90, 100 %) pendant 10 min. Les cellules sont ensuite conservées à 4°C jusqu'à l'acquisition des images.

Les images sont réalisées en mode contact sur un microscope à force atomique Nanoscope IV (Digital Instruments, CA, USA) équipé d'un cantilever en silicone nitrure à une fréquence de 1,97 Hz.

### ***II.2.7 Expression de FAK pY397 par western blotting :***

Afin d'observer l'influence des surfaces sur la transduction du signal d'adhésion intracellulaire, nous avons choisi d'étudier par une technique de western blotting la phosphorylation spécifique du résidu tyrosine 397 de FAK. La phosphorylation de ce résidu tyrosine est impliquée dans les premières étapes de l'activation de FAK dans la cascade de la transduction du signal à travers l'adhésion cellulaire.

#### **II.2.7.1 Principe**

Une quantité de protéines (en fonction de l'expression de la protéine) est séparée par électrophorèse SDS PAGE. Les protéines sont transférées sur une membrane de type nitrocellulose puis incubées avec un anticorps spécifique de la protéine à étudier. La liaison de l'anticorps à l'antigène (la protéine d'intérêt) est visualisée par une technique colorimétrique.

#### **II.2.7.2 Réactifs**

- Tampon de lyse :

1% SDS, 1,0 mM sodium ortho vanadate, 10 mM Tris pH 7,4

- Gel de séparation à 7% (5 mL) :

2,55 mL d'H<sub>2</sub>O déionisée, 1,65 mL de 30% degazé Bis/acrylamide, 1,25 mL de tampon de gel (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8), 0,05 mL 10% w/v SDS.

Ajouter immédiatement 25 µL d'une solution à 10% APS (100 mg ammonium persulfate (APS)/ 1 mL d'H<sub>2</sub>O) et 2,5 µL TEMED

- Gel de concentration à 4% (5 ml) :

3,05 mL d'H<sub>2</sub>O déionisée, 0,65 mL de 30% degazé Bis/acrylamide, 1,25 mL de tampon de gel (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8), 0,05 mL 10% w/v SDS.

Ajouter immédiatement 25 µL de 10% APS APS (100 mg ammonium persulfate/ 1 mL d'H<sub>2</sub>O) et 5 µL TEMED

- Tampon d'électrophorèse

3,03 g/L Tris base, 14,4 g/L Glycine, 1,0 g/L SDS, pH 8,3

- Tampon de charge :

3,55 mL d'H<sub>2</sub>O déionisée, 1,25 mL 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 2,5 mL glycerol, 2 mL 10% SDS, 0,2 mL 0,5 % bleu de bromophénol, 0,5 %  $\beta$ -mercaptoethanol

- Tampon de transfert

25 mM Tris, 190 mM glycine, 20 % MeOH, 0,05 % SDS

- Tampon de blocage

1% BSA, 10 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1 % Tween 20

### II.2.7.3 Protocole

Après 48h de culture sur les différentes surfaces, le milieu de culture est éliminé, puis les échantillons sont lavés avec du PBS à 37°C. Ensuite, 150  $\mu$ l de tampon de lyse bouillant est ajouté sur les cellules. Les cellules sont grattées et transférées dans des microtubes à centrifuger et chauffés pendant 5 min à 100°C. Les tubes sont centrifugés pendant 5 min à 5000 g, et le surnageant est récupéré pour le dosage des protéines totales à l'aide du kit DC Protein assay (Biorad, USA).

Un gel polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) est préparé au préalable, avec les caractéristiques suivantes : un gel de séparation à 7% (3/4 du gel) et un gel de concentration à 4% (1/4 du gel). Par la suite, un volume de lysat cellulaire, correspondant à une quantité identique de protéine pour chaque échantillon, est mélangé à un volume identique de tampon de charge. Le mélange, après avoir été chauffé pendant 5 min à 100°C, est déposé dans le gel. La migration des protéines est réalisée dans le tampon d'électrophorèse à 50 V pendant 30 min, puis à 100 V pendant 75 min. A la fin de l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF pendant 12h à 30V dans le tampon de transfert à 4°C. Après le transfert, les sites aspécifiques sont bloqués avec le tampon de blocage pendant 1h sous légère agitation. L'anticorps anti-FAK pY397 (BD, USA) est ensuite incubé à la dilution 1/1000 pendant 1h à température ambiante sous agitation. Après 3 lavages de 10 min avec le tampon de blocage, l'anticorps secondaire conjugué HRP (Horseradish peroxidase) à la dilution 1/3000 est incubé pendant 1h à température ambiante sous agitation. Après une série de lavages, une détection colorimétrique à l'aide du kit Opti-4CN Substrate (Biorad, USA) est réalisée. Les bandes sont ensuite analysées à l'aide d'un densitomètre (GS-800, Biorad, USA) et du logiciel Quantity One (Biorad, USA).

### ***II.2.8 Analyses Statistiques***

Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  écart moyen pour chaque surface étudiée ( $n = 6$ , excepté pour les expériences sous flux  $n = 3$ ). Une analyse de la variance a été réalisée avec comparaison des échantillons par un test à posteriori PLSD de Fisher (Statview IV®, Abacus Concepts Inc., Berkley, CA, USA). Les valeurs de probabilité ( $p$ ) inférieures à 0,05 % ont été considérées significatives.

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

### III.1. Biocompatibilité des films multicouches de polyélectrolytes.

Les films multicouches de polyélectrolytes permettent d'une manière simple et reproductible de modifier finement les propriétés des surfaces. Ces films multicouches, en changeant les propriétés physico-chimiques des surfaces, pourraient favoriser le développement d'un endothélium sur les biomatériaux vasculaires. Ces substituts vasculaires endothélialisés posséderaient ainsi les propriétés anti-thrombogéniques nécessaires à leur fonctionnalité.

Les films multicouches possèdent des caractéristiques physico-chimiques variables dues entre autre au nombre de couches déposées, aux polyélectrolytes utilisés, à la force ionique et au pH des solutions (Shiratori et al 2000 ; Ladam et al 2000a). Concernant les films que nous avons utilisés, le nombre de couches permet aux films PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL et PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub> d'avoir une épaisseur de 19,7 et 38,1 nanomètres, avec une rugosité de 2,6 et 10 nanomètres (cf. tableau I.9). De plus, les films utilisés sont terminés par les polycations PDL ou PAH permettant aux films d'avoir une charge superficielle positive. Les films multicouches pourraient augmenter les interactions électrostatiques entre les ions chargés négativement des membranes des cellules et la surface de culture. En conséquence, ces paramètres pourraient améliorer l'adhésion des cellules.

Mais en raison du rôle majeur de l'adhésion des cellules sur leur support de culture dans de nombreux phénomènes telles que la viabilité, la prolifération, ou la différenciation cellulaire (Kuzuya et al 1996, Imbert et al 1998, Deroanne et al 2001), nous nous sommes attachés dans la première partie de notre travail à vérifier la biocompatibilité des films multicouches de polyélectrolytes sur les cellules endothéliales.

Pour ce faire, des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) ont été cultivées sur les films multicouches de polyélectrolytes PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL et PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, (notés ~PGA-PDL et ~PSS-PAH par la suite). Nous avons évalué différents paramètres de la biocompatibilité cellulaire telles que la morphologie, l'activité métabolique, l'adhésion initiale et la croissance cellulaire ainsi que l'expression d'un marqueur phénotypique spécifique des cellules endothéliales, le facteur von Willebrand (vWf). Ces paramètres ont été comparés à ceux obtenus pour des cellules cultivées sur les monocouches de polycations PDL et PAH, sur le verre (surface sans traitement) et sur le tcps (tissue culture polystyrene, surface de référence en culture cellulaire).



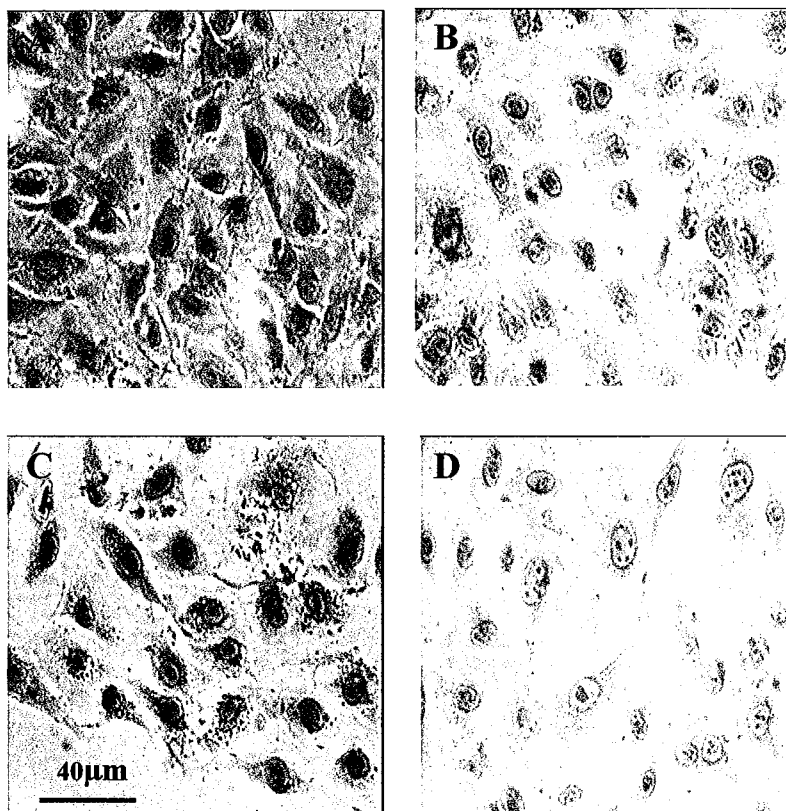
### III.1.1 Résultats

#### III.1.1.1 Morphologie cellulaire

La microscopie à contraste de phase nous permet d'observer l'influence des différentes modifications de surface sur la morphologie des HUVEC après 3 jours de culture (figure III.1).

Les cellules forment, sur les films multicouches, une mosaïque homogène en « pavés de chaussée » caractéristique des cellules endothéliales. Les cellules ont une forme polygonale, elles sont jointives et possèdent un noyau ovalaire contenant 2 ou 3 nucléoles. Cette morphologie, qui correspond tout à fait à celle des cellules endothéliales, est totalement différente de celle des fibroblastes, qui sont plus longs, minces et fusiformes.

De plus, nous pouvons noter que la densité des cellules est plus importante sur les films multicouches que sur les monocouches de polyelectrolytes.



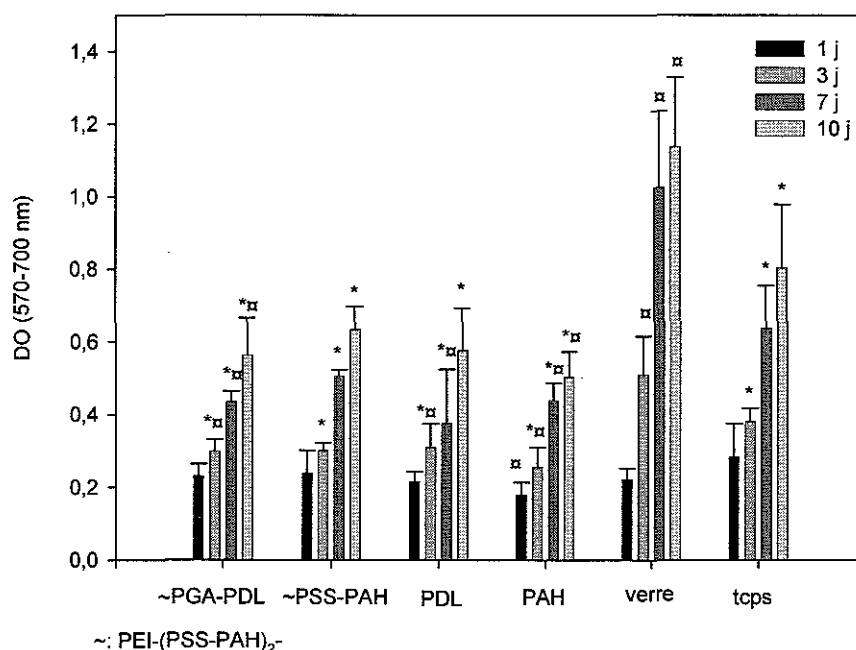
**Figure III.1 : Influence des différentes modifications de surface sur la morphologie des HUVEC après 3 jours de culture. PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL (A), PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub> (B), PDL (C), PAH (D) (x200).**

### III.1.1.2 Cytotoxicité des surfaces (test MTT)

Les cellules vivantes sont capables de convertir le MTT en formazan (cristal violet) grâce aux enzymes mitochondriales. La cytotoxicité des surfaces entraînerait une diminution de la viabilité cellulaire, et donc de l'activité métabolique globale. La mesure spectrophotométrique de l'activité métabolique des cellules, au cours du temps, permet donc de refléter la cytotoxicité des différentes surfaces.

L'influence des modifications de surfaces sur l'activité métabolique des HUVEC, reflétant la cytotoxicité des surfaces au cours du temps, est représentée sur la figure III.2.

Nous avons observé que l'activité métabolique des HUVEC augmente au cours du temps quelque soit la surface étudiée. Cette activité métabolique est cependant significativement plus faible sur la monocouche PAH dès le premier jour de culture en comparaison des valeurs observées sur le tcps. De même, l'activité métabolique est significativement plus faible sur le film ~PGA-PDL après 3, 7 et 10 jours de culture en comparaison de celle observée sur le verre et le tcps. Nous n'avons pas noté, quelque soit le temps de culture, de différence significative entre les cellules sur le film ~PSS-PAH et le tcps. Nous avons observé que l'activité métabolique est significativement plus importante dès 3 jours de culture sur le verre par rapport aux autres surfaces.



**Figure III.2 : Influence des différentes modifications de surfaces sur l'activité métabolique des HUVEC reflétant la cytotoxicité après 1, 3, 7 et 10 jours de culture. Les cellules sont ensemencées à une densité de  $2 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> sur PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL, PAH, verre et tcps. (n = 6, \* p < 0,05 versus verre, □ p < 0,05 versus tcps).**

### III.1.1.3. Adhésion initiale et croissance cellulaire.

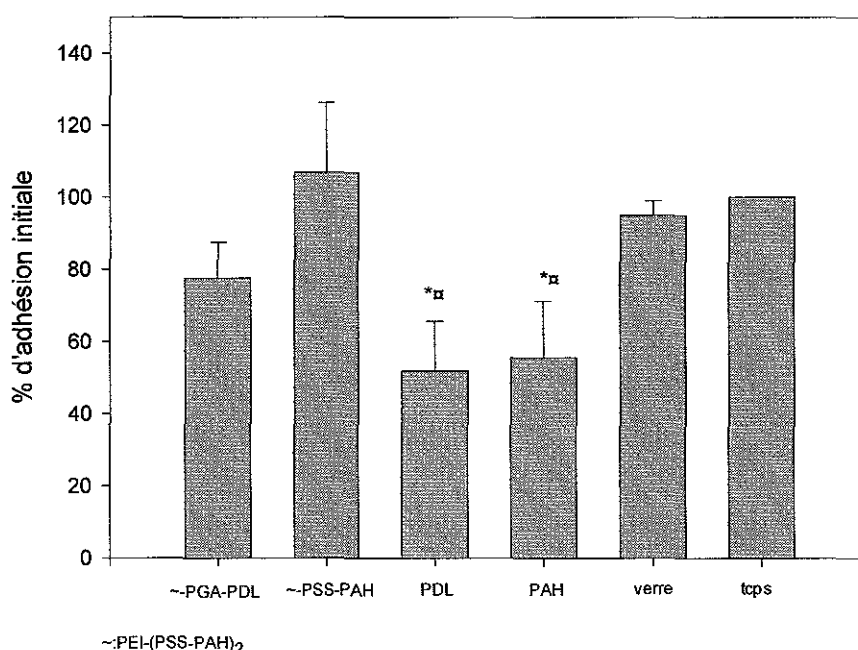
Afin de préciser les résultats obtenus précédemment, nous avons quantifié le nombre de cellules par une mesure spectrofluorométrique de l'incorporation de Hoechst 33342, agent intercalant fluorescent spécifique des bases A-T de l'ADN. Nous nous sommes intéressés à l'adhésion initiale (3h) et aux 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> jours de culture.

#### a) Adhésion initiale

Le pourcentage de cellules attachées après seulement 3h de contact, nous renseigne sur la capacité des surfaces à promouvoir l'adhésion initiale des cellules, un paramètre important à considérer pour la biocompatibilité des surfaces.

L'influence des différentes modifications de surface sur le pourcentage d'adhésion des HUVEC après 3h de culture est représentée sur la figure III.3.

Nous pouvons observer que le nombre de cellules attachées sur le verre (95,0%), le tcps (100%) et le film ~PSS-PAH (106,9%) n'est pas différent de la densité cellulaire initiale après 3h de contact. Le nombre de cellule sur le film ~PGA-PDL (77,5 %) est légèrement plus faible mais non significativement différent de celui observé sur le verre ou le tcps. L'adhésion cellulaire initiale est cependant significativement plus faible sur les monocouches de PDL (51,8 %) et de PAH (55,5 %) par rapport à l'adhésion des cellules sur les surfaces contrôles.



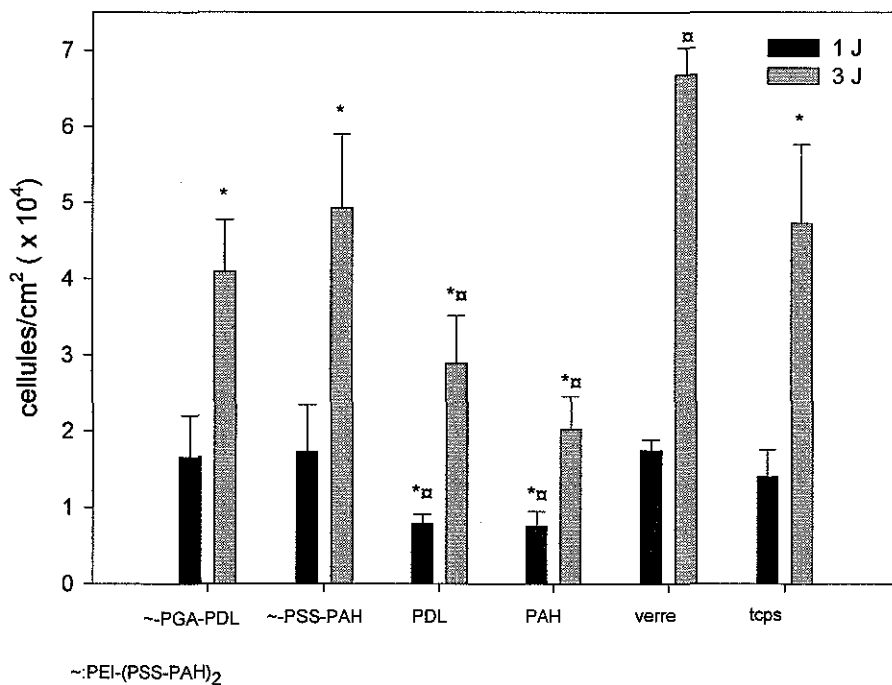
**Figure III.3 : Influence des différentes modifications de surface sur le pourcentage d'adhésion des HUVEC après 3h de culture. Les cellules sontensemencées à une densité de  $3 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> sur PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL, PAH, verre et tcps (n=6, \* p<0,05 versus verre, □ p< 0,05 versus tcps).**

## b) Croissance cellulaire

L'influence des différentes modifications de surface sur le nombre d'HUVEC après 1 et 3 jours de culture est représentée sur la figure III.4.

Après 1 jour de culture, le nombre de cellules sur les films ~PGA-PDL ( $1,65 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>) et ~PSS-PAH ( $1,72 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>) est identique à celui mesuré sur le verre ( $1,75 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>) et sur le tcps ( $1,40 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>). D'autres part, les densités sur les monocouches de PDL ( $0,79 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>) et PAH ( $0,75 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>) sont significativement plus faibles que sur le verre ou le tcps.

Après 3 jours, la densité cellulaire est plus importante sur le verre ( $6,67 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>). Les densités cellulaires sur les films multicouches sont comparables ( $4,08$  et  $4,93 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>, respectivement pour ~PGA-PDL et ~PSS-PAH) à celles mesurées sur le tcps ( $4,73 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>). Le nombre de cellules sur les monocouches PDL et PAH ( $2,89$  et  $2,02 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>, respectivement) est, pour ce temps de culture, encore significativement plus faible que sur le tcps.

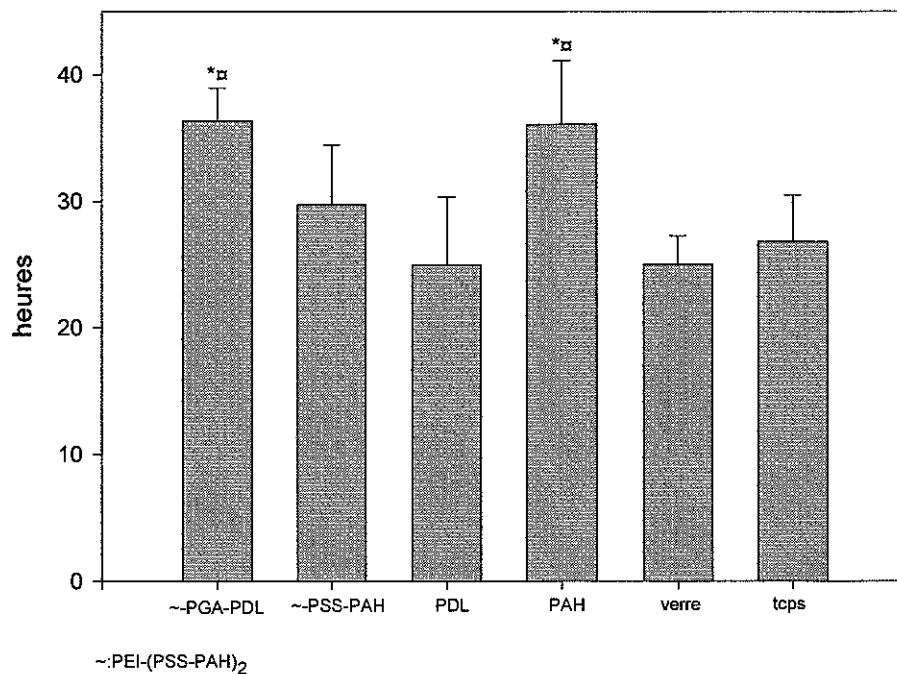


**Figure III.4 : Influence des différentes modifications de surface sur le nombre des HUVEC après 1 et 3 jours de culture. Les cellules sontensemencées à une densité de  $2 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> sur PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL, PAH, verre et tcps (n=6, \* p<0,05 versus verre, α p<0,05 versus tcps).**

Le nombre de cellules nous permet également d'estimer la croissance des cellules sur les différentes surfaces par le calcul du temps de doublement. Le temps de doublement correspond au temps nécessaire à la population cellulaire pour doubler son nombre d'individu. Il est calculé à partir des valeurs des densités cellulaires mesurées après 1 et 3 jours de culture sur les différentes surfaces.

L'influence des différentes modifications de surface sur le temps de doublement des HUVEC est représentée sur la figure III.5.

Le temps de doublement des cellules sur le film ~PGA-PDL (36,4 heures) et sur la monocouche PAH (36,0 heures) est significativement plus élevé que celui observé pour le doublement des cellules sur le verre (25,0 heures) et le tcps (26,7 heures). Au contraire, le temps de doublement des cellules sur le film ~PSS-PAH (29,7 heures) et la monocouche PDL (25,0 heures) est similaire à celui observé pour les surfaces contrôles.



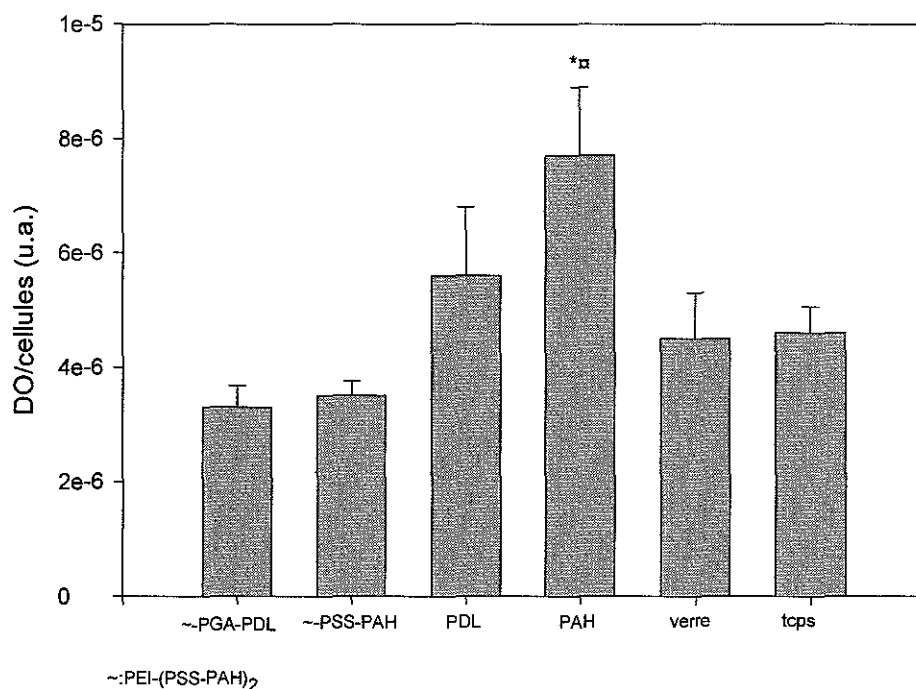
**Figure III.5 : Influence des différentes modifications de surface sur le temps de doublement des HUVEC.** Le temps de doublement est calculé à partir du nombre de cellules mesurées après 1 et 3 jours de culture sur PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL, PAH, verre et tcps (n=6, \* p<0,05 versus verre, □ p<0,05 versus tcps).

### III.1.1.4 Activité métabolique cellulaire

L'activité métabolique globale, mesurée précédemment avec le test MTT pour les populations cellulaires, est dépendante non seulement du nombre de cellules mais également de l'activité métabolique mitochondriale propre de chaque cellule. Par conséquent, nous avons également calculé l'activité métabolique propre de chaque cellule, afin d'évaluer la fonctionnalité mitochondriale des cellules cultivées sur les différentes surfaces. Le calcul est réalisé en rapportant l'activité métabolique globale des cellules sur le nombre de cellules mesuré pour le même temps de culture.

L'influence des modifications de surface sur l'activité métabolique cellulaire est représentée sur la figure III.6.

L'activité métabolique mitochondriale cellulaire n'est pas significativement différente après 3 jours de culture sur les multicouches de polyélectrolytes et sur la monocouche de PDL en comparaison avec l'activité mitochondriale mesurée sur le verre et sur le tcps. Au contraire, les cellules cultivées sur la monocouche de PAH possèdent une activité mitochondriale significativement plus élevée que les cellules sur le verre et le tcps.



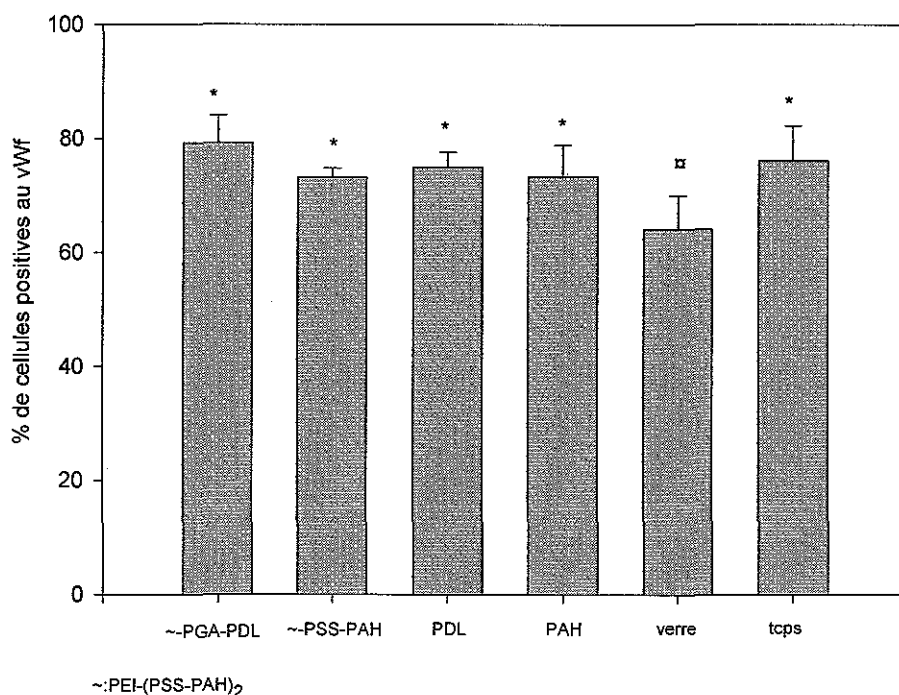
**Figure III.6 : Influence des différentes modifications de surface sur l'activité métabolique mitochondriale cellulaire.** Le calcul est réalisé en rapportant l'activité métabolique globale au nombre de cellules mesurées après 3 jours de culture sur PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL, PAH, verre et tcps (n=6, \* p<0,05 versus verre, □ p<0,05 versus tcps).

### III.1.1.5 Contrôle du phénotype des cellules endothéliales : expression du facteur von Willebrand (vWf).

La persistance du phénotype des cellules endothéliales sur les différentes surfaces est examinée par la détection du vWf, facteur spécifique des cellules endothéliales jouant un rôle dans l'agrégation plaquettaire. Le pourcentage de cellules positives au vWf a été mesuré par une technique de cytométrie en flux.

L'influence des modifications de surface sur le pourcentage de cellules exprimant le facteur von Willebrand est représentée sur la figure III.7.

Environ 75 % de la population cellulaire exprime le facteur vWf après 3 jours de culture sur les films multicouches de polyélectrolytes et sur les monocouches de PDL et PAH. Ce pourcentage est comparable à celui observé pour les cellules cultivées sur le tcps et significativement plus important que pour les cellules cultivées sur le verre (64 %).



**Figure III.7 : Influence des modifications de surface sur le pourcentage de cellules exprimant le facteur von Willebrand par cytométrie en flux. Les cellules sontensemencées à une densité de  $2 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> pendant 3 jours sur PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL, PAH, verre et tcps (n=6, \* p<0,05 versus verre, □ p < 0,05 versus tcps).**

### III.1.2. Discussion

Dans cette première partie de notre travail, nous avons examiné la biocompatibilité des films multicouches de polyélectrolytes, utilisés pour modifier la surface de culture et améliorer ainsi l'adhésion et le développement des cellules endothéliales. Les principaux avantages de ces films multicouches résultent dans le fait que leur construction est relativement simple et reproductible, et leurs propriétés physico-chimiques facilement modulables en changeant simplement les conditions de préparation (Mendelsohn et al 2000). En modifiant les propriétés physico-chimiques des surfaces, les films multicouches permettraient la formation d'un endothélium sur des substituts vasculaires synthétiques. Ces substituts vasculaires possèderaient ainsi des propriétés anti-thrombogéniques nécessaires à leur fonctionnalité.

Nous avons évalué la biocompatibilité de deux films PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL et PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub> dans le but de montrer que ces films ne perturbaient pas le comportement cellulaire et pouvaient améliorer l'adhésion et la croissance des cellules endothéliales.

Il est important de vérifier en premier lieu que les films ne possèdent pas d'éventuels effets indésirables sur le comportement des cellules endothéliales. En effet, il a été montré que les interactions électrostatiques, pour la poly-lysine en particulier, pouvaient entraîner des changements de propriétés électriques des membranes, altérant ainsi certaines fonctions cellulaires telles la viabilité, la croissance, ou la différenciation cellulaire (Santini et al 1997).

La morphologie cellulaire, un paramètre important à considérer, montre que les cellules ont une forme typique en « pavée de chaussée » sur les deux types de films. La forme cellulaire est d'importance particulière, car elle est nécessaire à la formation d'une monocouche de cellules endothéliales lors de la construction des substituts vasculaires.

Avec une densité cellulaire initiale faible ( $2 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>), la surface des films multicouches est intégralement recouverte par les cellules endothéliales après 3 jours de culture. Le nombre des cellules sur le film ~PGA-PDL est similaire à celui mesuré sur le teps, même si une diminution de la croissance est observée sur ce film de polyélectrolytes. Au contraire, pour le même temps de culture, les densités cellulaires sur les monocouches de polyélectrolytes sont beaucoup plus faibles (~ 50 %). Cette diminution de la densité cellulaire résulte essentiellement d'une diminution de l'adhésion initiale. Il ne semble pas que les monocouches de polyélectrolytes induisent un effet cytotoxique après l'adhésion des cellules. Nous avons uniquement pu observer une diminution de la croissance cellulaire sur la monocouche de PAH. Nos résultats montrent également que les films multicouches



n'induisent pas d'effet cytotoxique, même après 10 jours de culture, ce qui suggère que les films de polyélectrolytes ne sont pas dégradés, comme nous avons pu l'observer sur les films terminés par la poly(L-lysine) (résultats non montré).

Chaque nouveau dépôt de polyélectrolyte peut changer certains paramètres tels que la viscoélasticité, la rugosité ou même la porosité de surface (Mendelsohn et al 2000, Fery et al 2001). Plusieurs études (Lampin et al 1997, Gao et al 2001) ont déjà montré l'importance de la rugosité dans l'adhésion cellulaire. Les observations en microscopie de force atomique (AFM) réalisées sur une surface faite d'une monocouche de poly(lysine) (Picart et al 2001a) ont montré que cette surface était recouverte de façon homogène par des dépôts ayant une dimension latérale de 50 nm avec une faible rugosité de surface (0,35 nm). Ces dépôts visibles pourraient correspondre à des molécules individuelles de poly(lysine) et les images ne permettent pas de conclure à l'adsorption de la poly(lysine) sur toute la surface. Au contraire, les images AFM des films finissant par PGA-PDL ou PSS-PAH montrent que la surface est complètement recouverte avec une rugosité de surface de 2,6 et 10 nm. Par conséquent, cette différence de recouvrement des surfaces et les propriétés physicochimiques de chaque film pourraient expliquer les résultats obtenus lors de l'adhésion initiale des cellules sur les films multicouches. Les paramètres physico-chimiques des films multicouches apparaissent donc importants à considérer dans les phénomènes d'adhésion cellulaire.

La charge de surface est un paramètre important dans les phénomènes d'adhésion cellulaire (Lee et al 1997), mais les films et les monocouches, que nous avons évalué, sont chargés positivement, comme le montrent les mesures du potentiel zêta sur les films PGA-PLL et PSS-PAH (Picart et al 2001b, Ladam et al 2001).

Par ailleurs, en plus des propriétés physico-chimiques des films, l'adsorption des protéines du sérum de culture peut influencer l'adhésion initial et ultérieurement l'attachement des cellules sur les films (Van Wachem et al 1987, Jerome et al 1998). La différence d'adhésion cellulaire pourrait donc provenir de l'adsorption de protéines, contenues dans le sérum de culture, sur les films ~PGA-PDL et ~PSS-PAH et pourrait également expliquer les résultats obtenus au niveau de la croissance cellulaire.

De même, il est connu que le substrat peut influencer la fonctionnalité cellulaire. Néanmoins, nos résultats sur l'activité métabolique ont montré que les films de polyélectrolytes ne perturbent pas la fonctionnalité mitochondriale. En effet, les cellules, après 3 jours de contact sur les films multicouches, possèdent une activité mitochondriale cellulaire normale. Les fortes valeurs d'activité métabolique des cellules sur la monocouche

de PAH sont probablement dues à un état actif métaboliquement engendré par la diminution de la croissance cellulaire sur cette surface.

Les cellules endothéliales sur les films multicouches maintiennent leur phénotype endothélial. En effet, nous avons observé que la majorité des cellules expriment le facteur von Willebrand après 3 jours de contact sur les films multicouches. Le facteur von Willebrand est exprimé seulement par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes. Il est souvent utilisé comme marqueur phénotypique endothélial (Risbud et al 2001) et dans certaines conditions de stress, il peut être rapidement sous-exprimé au niveau cellulaire (Arciniegas et al 1992, Romero et al 1997).

En conclusion de cette première partie, il semble que les films multicouches de polyélectrolytes n'induisent pas d'effets cytotoxiques. Néanmoins, le plus intéressant des films multicouches que nous ayons testé semble être le film PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub> comptes tenus des résultats de viabilité, d'adhésion et de croissance cellulaire. Il apparaît que les propriétés physicochimiques de ce film ~PSS-PAH améliorent réellement le comportement des cellules. Cependant, il n'est pas possible de déterminer réellement quel phénomène est responsable du meilleur comportement des cellules endothéliales sur le film ~PSS-PAH par rapport au film ~PGA-PDL.

### **III.2. Implication des films multicouches dans l'activation des cellules endothéliales : étude de la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1).**

La molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) est une molécule d'adhésion exprimée faiblement de manière constitutive par les cellules endothéliales. Sous stimulation biochimique par des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF $\alpha$  ou IL-8, la sur-expression d'ICAM-1 contribue à l'initiation de la réaction inflammatoire. ICAM-1 médie l'adhérence et la diapédèse des leucocytes sur l'endothélium vasculaire vers les tissus endommagés.

De même, les stimulations mécaniques, telles que les contraintes hydrodynamiques trouvées au niveau de la circulation sanguine, entraînent également une augmentation transitoire de l'expression membranaire d'ICAM-1 sur les cellules endothéliales (Tsuboi et al 1995).

Plusieurs études (Imbert et al 2001, Lehle et al 2003) ont montré que la surface sur laquelle étaient ensemencées les cellules endothéliales pouvait être responsable de l'activation de ces cellules. De même, des études récentes sur les films multicouches (Tryoen-Toth et al 2002, Vautier et al 2002), ont montré que les deux films que nous avons utilisés étaient capables d'augmenter la sécrétion d'IL-8 pour d'autres types de cellules.

Par conséquent, la connaissance de l'implication des cellules endothéliales cultivées sur les films multicouches dans le processus inflammatoire est nécessaire pour l'utilisation de ces films multicouches en ingénierie tissulaire.

Pour ce travail, nous avons évalué l'activation des cellules endothéliales sur les films multicouches de polyélectrolytes à travers l'expression d'ICAM-1 sous différentes conditions de stimulation (biochimiques ou mécaniques).

Afin de mimer le phénomène inflammatoire, les cellules ont été stimulées biochimiquement par le TNF $\alpha$ . Par la suite, dans le but de déterminer le rôle de la réorganisation du cytosquelette, qui joue un rôle important sur l'expression d'ICAM-1, nous avons utilisé un agent connu pour inhiber la polymérisation d'actine (la cytochalasine D). Enfin, les cellules ont été soumises à une contrainte de cisaillement de 6 dynes/cm<sup>2</sup> afin d'évaluer l'activation cellulaire sous contrainte mécanique. L'expression d'ICAM-1 obtenue sur les films multicouches a été comparée à l'expression observée pour des cellules cultivées sur les monocouches de PDL et PAH, le verre et le teps.

### **III.2.1. Résultats**

#### **III.2.1.1 Effet de la stimulation par le TNF $\alpha$ sur l'expression d'ICAM-1.**

Le TNF $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire, induit sur l'endothélium vasculaire la production de molécules adhésives (comme ICAM-1) qui favorisent la fixation des leucocytes. Nous avons utilisé le TNF $\alpha$ , médiateur de l'inflammation, pour mimer le phénomène inflammatoire.

L'expression membranaire d'ICAM-1 lors de la stimulation par le TNF $\alpha$  a été évaluée de manière quantitative par cytométrie en flux, mais également de manière qualitative par microscopie de fluorescence (CellScan <sup>TM</sup>) afin d'observer la distribution d'ICAM-1 sur la surface membranaire des cellules.

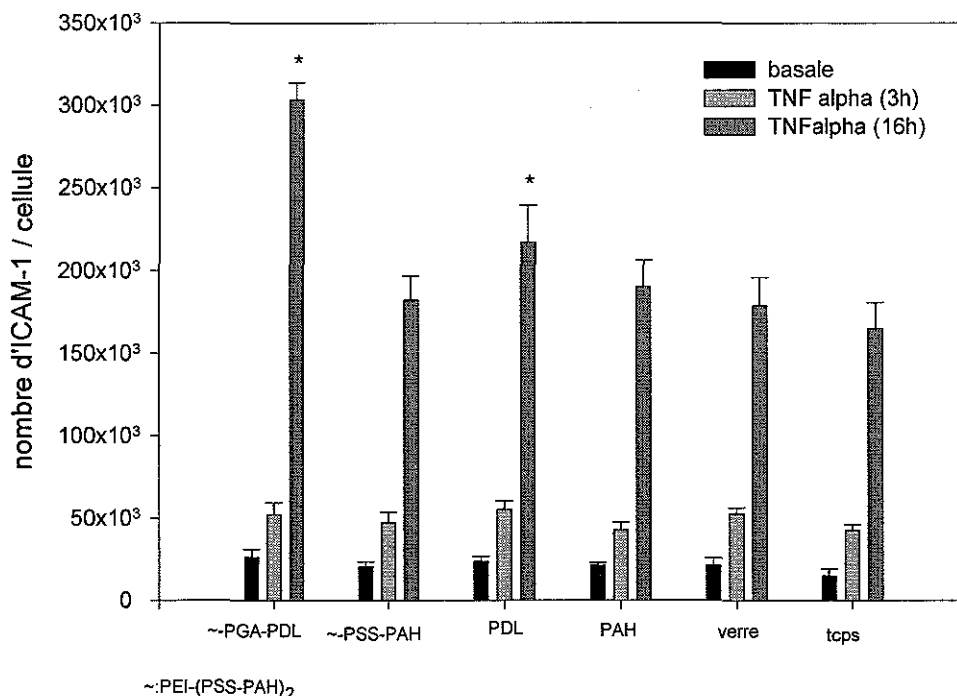
##### **a) Etude quantitative :**

La figure III.8 montre l'influence des différentes modifications de surface sur l'expression membranaire d'ICAM-1 des HUVEC stimulées par le TNF $\alpha$  pendant 3h et 16h.

Les HUVEC sans stimulation montrent un faible niveau d'expression d'ICAM-1 (approximativement  $20 \times 10^3$  ICAM-1/cellule). Aucune différence significative n'est observée entre les différentes surfaces.

Comme attendu, la stimulation par le TNF $\alpha$  pendant 3h induit une augmentation de l'expression d'ICAM-1 sur toutes les surfaces. Cependant, aucune différence significative entre les surfaces n'est observée pour ce temps de stimulation (approximativement  $60 \times 10^3$  ICAM-1/cellule).

Au contraire, la stimulation par le TNF $\alpha$  pendant 16h conduit à une plus forte expression d'ICAM-1 avec des réponses différentes selon les surfaces testées. Pour les cellules sur le film ~PSS-PAH, la monocouche PAH et le teps, l'expression d'ICAM-1 est similaire à celle observée sur le verre. Au contraire, la stimulation des cellules sur monocouche de PDL induit une augmentation significative de l'expression d'ICAM-1 ( $217 \pm 22 \times 10^3$  ICAM-1/cellules) par rapport aux cellules cultivées directement sur le verre ( $181 \pm 19 \times 10^3$  ICAM-1/cellule). De même, les HUVEC sur le film ~PGA-PDL montrent également un niveau d'expression significativement plus important ( $303 \pm 10 \times 10^3$  ICAM-1/cellule) par rapport aux cellules sur le verre.



**Figure III.8 : Influence des différentes modifications de surface sur l'expression membranaire d'ICAM-1 des HUVEC en condition basale ou stimulées par TNF $\alpha$  pendant 3h et 16h. Les résultats sont obtenus par cytométrie en flux (n = 6, \* p < 0,05 versus verre).**

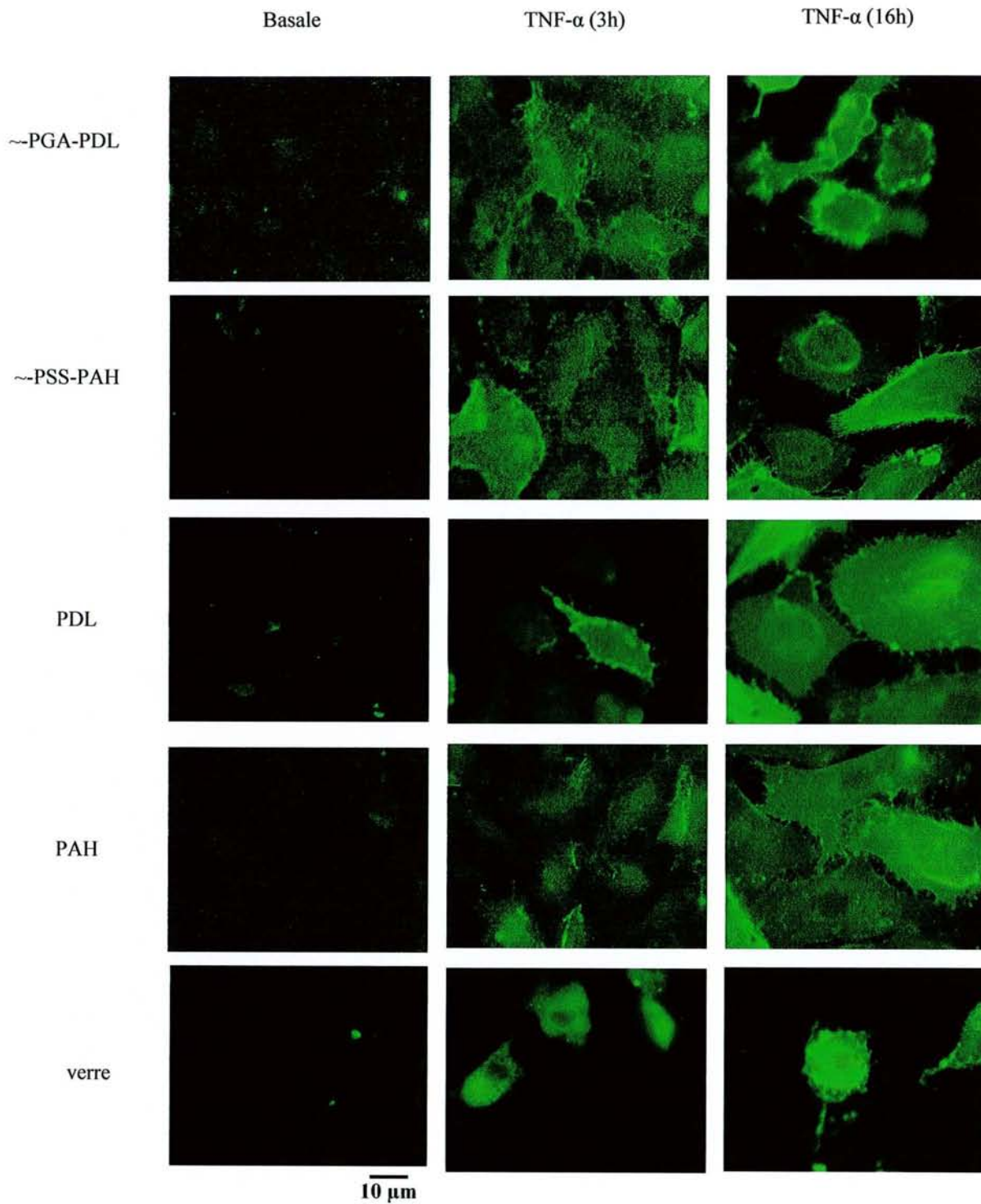
#### **b) Etude qualitative :**

L'influence des différentes modifications de surfaces sur la distribution membranaire d'ICAM-1 pour les HUVEC en condition basale ou stimulées par le TNF $\alpha$  pendant 3h et 16h est représentée à la figure III.9.

L'observation par microscopie de fluorescence montre à l'état basal un niveau d'expression d'ICAM-1 très faible à la surface des cellules et confirme nos résultats de cytométrie en flux.

La stimulation par le TNF $\alpha$  pendant 3h induit une distribution homogène d'ICAM-1 sur la membrane des cellules.

Au contraire, une stimulation plus longue de 16h avec le TNF $\alpha$  entraîne une distribution différente des molécules d'ICAM-1, avec l'apparition de regroupement de molécules d'ICAM-1 (clusters) sur le film ~PGA-PDL. Les cellules, sur les autres surfaces, pour le même temps de stimulation, conservent une distribution d'ICAM-1 relativement homogène.



**Figure III.9 : Influence des différentes modifications de surfaces sur la distribution membranaire d'ICAM-1 pour des HUVEC en condition basale, ou stimulées par le TNF $\alpha$  pendant 3h et 16h. (CellScan <sup>TM</sup>, objectif x60, ON 1,25).**  
 ~ : PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-

### III.2.1.2 Inhibition de la réorganisation du cytosquelette sur l'expression d'ICAM-1.

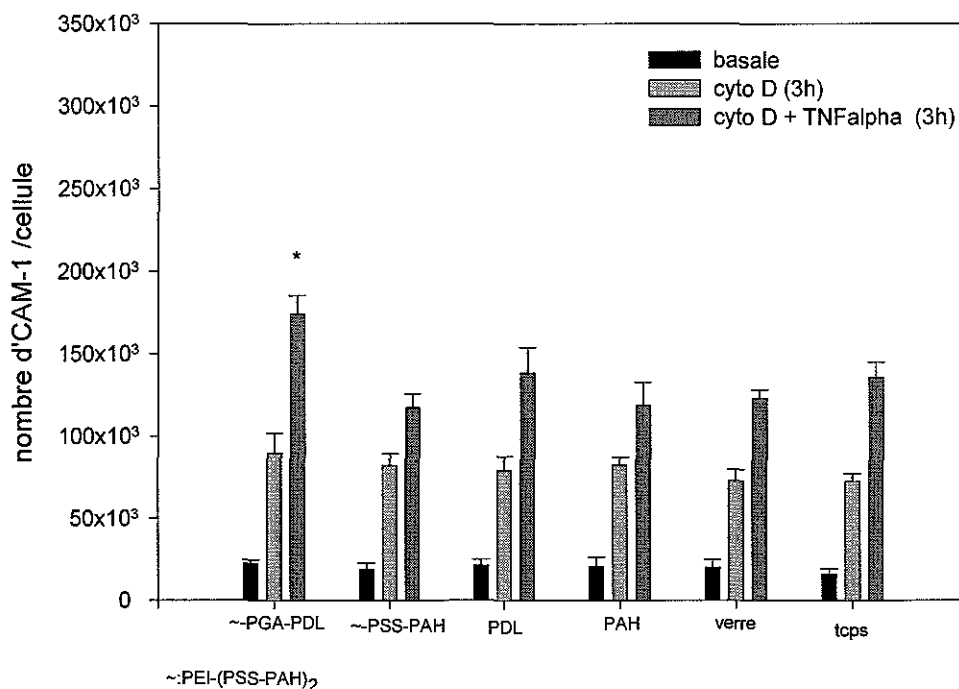
Le cytosquelette jouant un rôle important dans l'expression d'ICAM-1 (Helander et al 1996), nous avons tenté de déterminer l'implication du cytosquelette des cellules cultivées sur les films multicouches dans l'expression d'ICAM-1. Pour cela, nous avons utilisé la cytochalasine D, une toxine fongique perméable, qui se lie à l'extrémité des filaments d'actine, principales structures du cytosquelette. Cette toxine inhibe la polymérisation et la dépolymérisation des filaments d'actine, empêchant les changements de conformation du cytosquelette.

L'expression d'ICAM-1 sur la surface membranaire des HUVEC lors de l'inhibition de la réorganisation du cytosquelette a été quantifiée par cytométrie en flux (étude quantitative), et la distribution membranaire des ICAM-1 a été observée par microscopie de fluorescence (étude qualitative).

#### a) Etude quantitative :

La figure III.10 montre l'expression membranaire d'ICAM-1 lorsque les HUVEC sont traitées par la cytochalasine D et la cytochalasine D + TNF $\alpha$ .

Le traitement avec la cytochalasine D conduit à une augmentation d'expression des molécules d'ICAM-1, atteignant un niveau supérieure ( $\sim 80 \times 10^3$  ICAM-1/cellules) à celui des cellules en condition basale, mais aucune différence significative entre les surfaces n'est observée. De la même façon, le traitement des cellules par la cytochalasine D + TNF $\alpha$  induit une plus forte expression comparée aux cellules traitées uniquement avec TNF $\alpha$  ( $\sim 60 \times 10^3$  ICAM-1/cellule). Nous pouvons observer une plus forte expression d'ICAM-1 pour les cellules cultivées sur le film  $\sim$ PGA-PDL ( $174 \pm 11 \times 10^3$  ICAM-1/cellule) en comparaison avec les cellules cultivées sur le verre ( $123 \pm 5 \times 10^3$  ICAM-1/cellule).



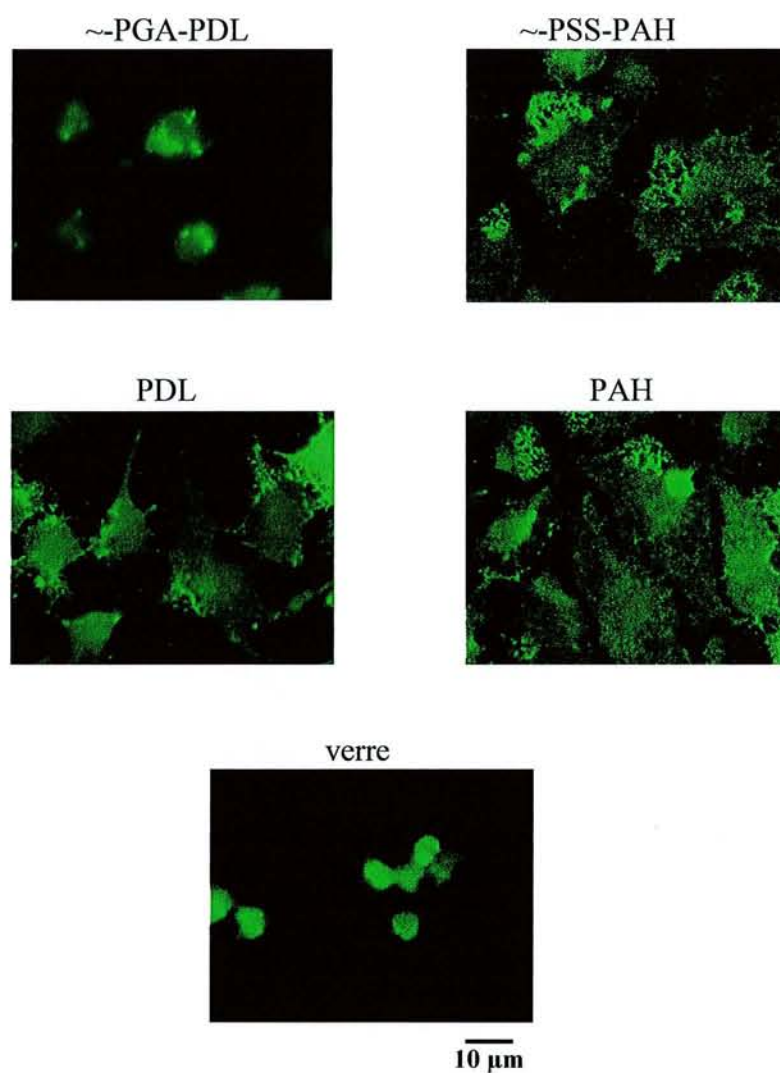
**Figure III.10 : Influence des différentes modifications de surface sur l'expression membranaire d'ICAM-1 d'HUVEC en condition basale, traitées par la cytochalasine D ou la cytochalasine D + TNF $\alpha$  pendant 3h. Les résultats sont obtenus par cytométrie en flux (n = 6, \* p < 0,05 versus verre).**

#### **b) Etude qualitative :**

La distribution membranaire d'ICAM-1, lorsque les HUVEC sont traitées par la cytochalasine D + TNF $\alpha$ , est représentée sur la figure III.11.

L'observation microscopique montre une irrégularité de la distribution d'ICAM-1 sur la membrane cellulaire quelque soit la surface observée. Nous pouvons également observer l'apparition de clusters d'ICAM-1 pour les cellules cultivées sur le film ~PGA-PDL similaires à ceux observés précédemment pour les cellules traitées par le TNF $\alpha$  pendant 16h sur ce type de film. De plus, La surface de contact des cellules sur le verre et le film ~PGA-PDL semble être diminuée.





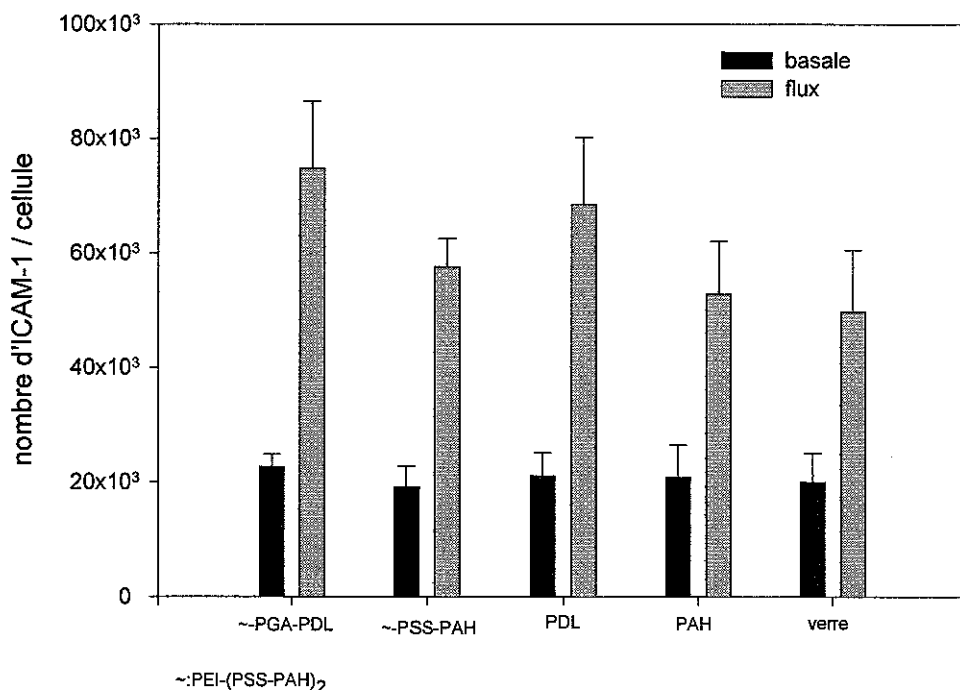
**Figure III.11 : Influence des différentes modifications de surface sur la distribution membranaire de l'expression d'ICAM-1. Les HUVEC sont traitées par la cytochalasine D + TNFα pendant 3h. (CellScan <sup>TM</sup>, objectif x60, ON 1,25).  
~ : PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>**

### III.2.1.3 Effet de la contrainte mécanique sur l'expression d'ICAM-1

Les contraintes mécaniques sont capables de modifier l'organisation du cytosquelette et peuvent également entraîner une augmentation transitoire de l'expression d'ICAM-1 (Tsuboi et al 1995). Par cette expérience, nous avons montré l'influence d'une contrainte mécanique sur l'expression d'ICAM-1 pour les cellules cultivées sur les films multicouches.

La figure III.12 représente l'expression d'ICAM-1 lorsque les HUVEC sont soumises à une contrainte de cisaillement de  $6 \text{ dynes/cm}^2$  pendant 3 heures. Ce temps est suffisant pour atteindre une expression maximale sous cette contrainte de cisaillement (Tsuboi et al 1995).

La stimulation par la contrainte de cisaillement provoque une augmentation de l'expression d'ICAM-1 pour les cellules cultivées sur le verre, le film  $\sim$ PSS-PAH, et PAH ( $\sim 53 \times 10^3$  ICAM-1/cellule). De même, cette stimulation induit une augmentation de l'expression d'ICAM-1 sur le film  $\sim$ PGA-PDL et la monocouche PDL ( $\sim 72 \times 10^3$  ICAM-1/cellule). Cependant compte tenu des écart-types, nous n'avons pas pu montrer de différence significative entre les différentes surfaces étudiées.



**Figure III.12 : Influence des différentes modifications de surface sur l'expression d'ICAM-1 d'HUVEC soumises à une contrainte de cisaillement de  $6 \text{ dynes/cm}^2$  pendant 3h. Les résultats sont obtenus par cytométrie en flux ( $n = 3$ ).**

### III.2.2. Discussion

La première partie de notre travail a montré le bénéfice des films multicouches de polyélectrolytes, utilisés comme modification de surface pour améliorer l'adhésion initiale et le développement des cellules endothéliales. La deuxième partie de notre travail, nous a permis d'évaluer l'activation des cellules endothéliales sous différentes conditions de stress biochimiques ou mécaniques. En effet, l'efficacité d'ensemencement des cellules endothéliales sur des substituts vasculaires est significativement diminuée lorsque les cellules sont impliquées dans un processus inflammatoire (Emerick et al 1989). Par conséquent, il est primordial d'évaluer l'implication des cellules endothéliales cultivées sur les films multicouches dans le processus inflammatoire.

Les résultats que nous avons obtenus indiquent que les cellules endothéliales ne sont pas activées par les films multicouches en condition basale. Les cellules expriment constitutivement un faible niveau d'ICAM-1 ( $\sim 20 \times 10^3$  ICAM-1/cellule) sur les films de polyélectrolytes. Ces valeurs sont similaires à celles observées dans la littérature pour des HUVEC (Mutin et al 1997).

Afin de mimer un phénomène inflammatoire, nous avons stimulé les cellules endothéliales avec le TNF $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire. La stimulation par le TNF $\alpha$  pendant 16h induit une plus forte réponse des cellules cultivées sur le film ~PGA-PDL par rapport aux autres surfaces étudiées. Or, il a été montré que la poly-lysine induisait des changements des propriétés électriques des membranes cellulaires (Santini et al 1997). Il semblerait que les polycations comme la poly(lysine) interagissent avec les protéines contenues dans la membrane cellulaire aux travers des interactions électrostatiques, conduisant à un regroupement et une agrégation des sites anioniques présent à la surface cellulaire (Bashford et al 1988). Les charges des films pourraient être un paramètre important à considérer et pourraient expliquer la surexpression d'ICAM-1 sur le film ~PGA-PDL. Cependant, les monocouches de polyélectrolytes et les films multicouches sont positivement chargés, comme le montre les mesures du potentiel zêta sur les films (PGA/PLL) et (PSS/PAH) (Lavalle et al 2002, Ladam et al 2000a).

La nature chimique des polycations pourrait expliquer la différence obtenue entre les films. Pourtant, le même polycation a des effets différents lorsqu'il est utilisé en monocouche ou dans la construction de films multicouches. Il semble que le film multicouche finissant par la poly(lysine) potentialise l'effet de ce polycation sur l'expression d'ICAM-1, lors de la stimulation par le TNF $\alpha$ . Chaque nouveau dépôt de polyélectrolytes change les propriétés des

surfaces comme la rugosité, la viscoélasticité. De plus, les films utilisés permettent de recouvrir totalement la surface traitée contrairement aux monocouches de polyélectrolytes (Picart et al 2001a). Ces propriétés pourraient être responsables de la sur-expression d'ICAM-1 sur le film ~PGA-PDL par rapport à la monocouche de PDL.

Kato et al (Kato et al 2001) ont récemment démontré le rôle important de la forme des cellules sur l'expression d'ICAM-1 ; la quantité d'ARNm d'ICAM-1 était plus importante pour des cellules endothéliales ayant une forme allongée. En effet, le domaine cytoplasmique d'ICAM-1 est lié directement au cytosquelette par l'intermédiaire de l' $\alpha$ -actinine, une protéine du cytosquelette, qui agit comme une protéine d'ancrage des filaments d'actine à la membrane cellulaire (Carpen et al 1992). Mais, nous n'avons pas observé une forme particulière des cellules sur le film ~PGA-PDL.

Les cellules endothéliales présentent des modifications importantes du cytosquelette lors de leur activation biochimique ou mécanique (Cumassi et al 1991, Spikema et al 2003). Par conséquent, l'implication du cytosquelette dans la réponse d'ICAM-1 aux stimuli biochimiques ou mécaniques n'est pas à négliger.

Nous avons mis en évidence l'implication du cytosquelette dans la réponse des cellules sur les films multicouches, en utilisant la cytochalasine D, une toxine connue pour inhiber la polymérisation de l'actine et ainsi empêcher la réorganisation du cytosquelette.

Nos résultats montrent que l'inhibition de la polymérisation de l'actine lors de la stimulation par le  $\text{TNF}\alpha$  induit une plus forte expression d'ICAM-1 sur le film ~PGA-PDL. Nous avons pu également observer, au niveau des cellules cultivées sur ce film ~PGA-PDL, une apparition de clusters semblable à la stimulation plus longue uniquement avec le  $\text{TNF}\alpha$ . Or, il a été montré que les modifications structurales du cytosquelette jouaient un rôle important dans la distribution topologique d'ICAM-1 à la surface cellulaire (Helander et al 1996). En conséquence, la réorganisation du cytosquelette semble être impliquée en grande partie dans la perturbation de l'expression et de la distribution d'ICAM-1 à la surface des cellules cultivées sur le film ~PGA-PDL.

L'adhésion des cellules sur les films multicouches pourrait provoquer une perturbation fonctionnelle de l'organisation du cytosquelette. En effet, les travaux de Vautier et al (Vautier et al 2002) ont récemment montré que les cellules de chondrosarcome sur les films finissant par la poly(lysine) n'avaient pas la capacité de former des filaments d'actine, ceci pourrait expliquer les résultats sur l'expression d'ICAM-1 obtenus avec les cellules endothéliales sur ce type de film. Il a été également rapporté que la kinase d'adhésion focale (FAK) n'est pas phosphorylée lorsque des cellules sontensemencées sur la poly(lysine) (Ouwens et al 1996).

Or la phosphorylation de la FAK (protéine associée au cytosquelette) est impliquée dans les voies de transduction du signal d'adhésion et serait impliquée dans la régulation des gènes endothéliaux notamment celui contrôlant l'expression d'ICAM-1 (Short et al 1998, Imberti et al 2000). Mais à ce jour, il semble n'y avoir aucune étude sur la transduction de signaux d'adhésion des cellules endothéliales sur les films multicouches de polyélectrolytes.

De la même façon, plusieurs études ont montré que les stimuli mécaniques tels que les contraintes de cisaillement affectaient grandement la forme cellulaire et les fonctions cellulaires (Schnittler et al 2001) et augmentaient ainsi l'expression d'ICAM-1 (Tsuboi et al 1995). Mais, nos résultats sur l'expression d'ICAM-1, sous une contrainte de cisaillement, ne nous ont pas permis de mettre en évidence des différences significatives entre les surfaces. Par conséquent, nous n'avons pas pu confirmer, par cette expérience, la perturbation de la réorganisation du cytosquelette sur le film ~PGA-PDL.

En conclusion, or stimulation, les films multicouches de polyélectrolytes ne conduisent pas les cellules endothéliales dans un processus inflammatoire, confirmant ainsi la biocompatibilité de ces films multicouches. Pourtant, sous stimulation par le  $TNF\alpha$ , le film ~PGA-PDL conduit à une sur-expression d'ICAM-1, du probablement à la perturbation du cytosquelette. Au contraire, le film ~PSS-PAH n'induit pas de perturbations de l'expression d'ICAM-1 rendant ce film plus favorable à de futures applications en ingénierie tissulaire.

Par ailleurs, il semble important d'étudier plus précisément les propriétés d'adhésion des cellules sur les films multicouches car elles semblent jouer un rôle important sur le comportement des cellules endothéliales.

### III.3 Adhésion des cellules sur les films de polyélectrolytes

L'adhésion des cellules endothéliales sur la surface des substituts vasculaires est primordiale car elle permet de garder la cohésion du tissu lorsqu'il est soumis aux forces de la circulation sanguine (Sirois et al 1998).

Cependant, les biomatériaux synthétiques, qui sont fréquemment choisis pour leurs propriétés mécaniques et chimiques, ne possèdent pas actuellement les propriétés interfaciales nécessaires à l'adhésion et au développement des cellules endothéliales (Greisler et al 1996). Par conséquent, de nombreuses recherches sont engagées afin d'améliorer l'adhésion des cellules endothéliales en modifiant, à l'échelle nanoscopique, les propriétés de ces matériaux (Dalby et al 2003, Buttiglieri et al in press).

Il a été montré que la capacité des surfaces à promouvoir la formation de contacts focaux d'adhésion était importante pour le développement cellulaire (Van Kooten et al 1999, Sanborn et al 2002). En effet, les événements de transduction du signal, à travers l'activation de la kinase d'adhésion focale, conduisent à l'étalement des cellules (Mooney et al 1995), mais induisent également la prolifération (Goel et al 2002) et l'expression phénotypique nécessaire pour le développement tissulaire (Hasegawa et al 1995).

Par conséquent, il est primordial d'évaluer l'adhésion des cellules endothéliales sur les films multicouches de polyélectrolytes ainsi que la manière dont ces films multicouches pourraient affecter l'adhésion des cellules.

Pour cela, nous avons observé, dans la dernière partie de notre travail, la morphologie des cellules endothéliales sur les films multicouches par microscopie à force atomique (AFM). Nous avons également évalué les interactions des cellules sur les films multicouches. De plus, nous avons étudié l'expression des intégrines de la famille  $\beta 1$  (principaux récepteurs de l'adhésion cellulaire), ainsi que l'activation de la kinase d'adhésion focale (FAK), marqueur de la transduction du signal d'adhésion.

Les paramètres obtenus pour les films multicouches de polyélectrolytes ont été comparés à ceux obtenus sur les monocouches de PDL et PAH, sur le verre (surface sans modification) et sur le verre recouvert de fibronectine (protéine de la matrice extracellulaire qui est connue pour augmenter l'adhésion spécifique des cellules par le biais des intégrines  $\beta 1$ ).

### **III.3.1 Résultats**

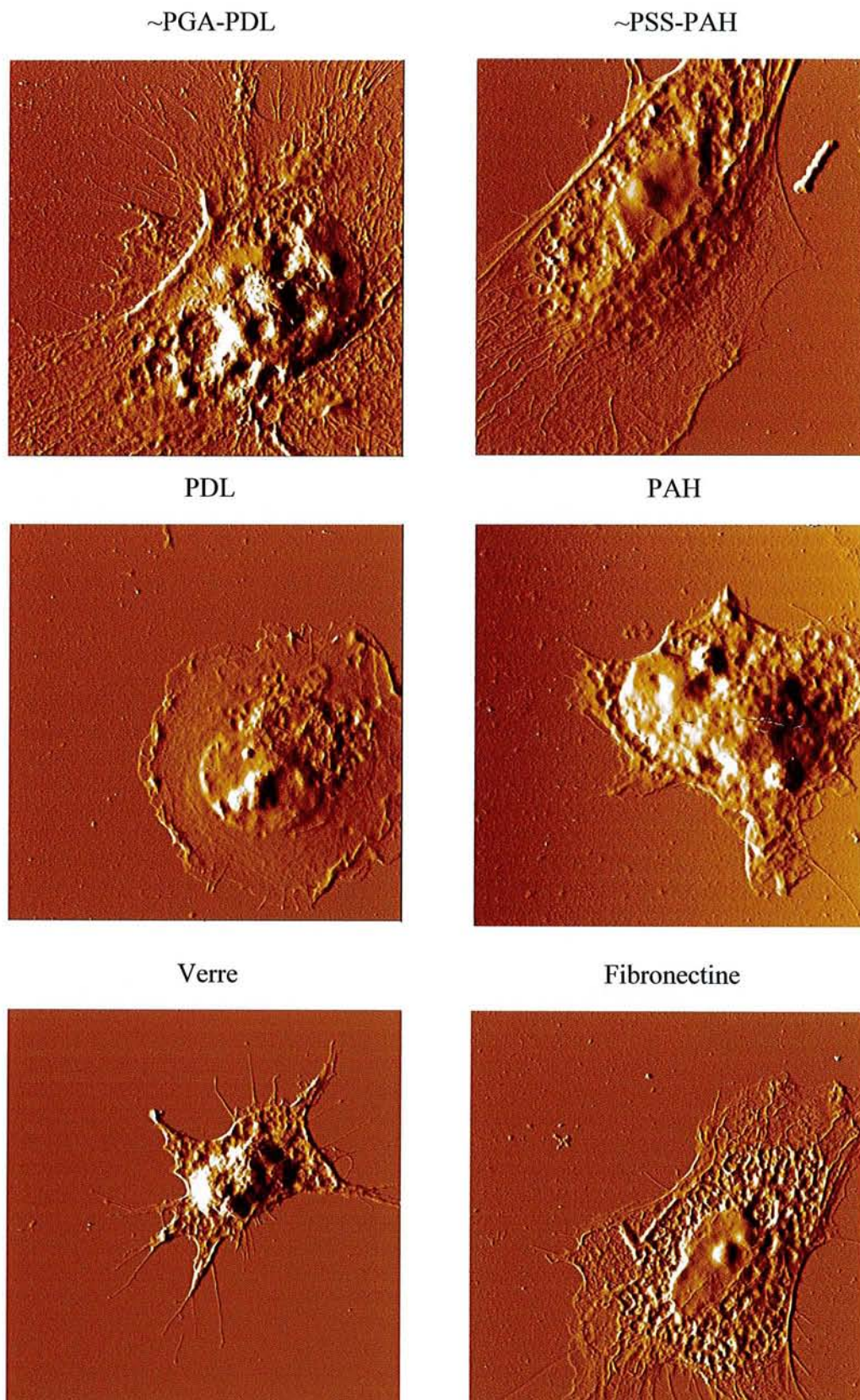
#### **III.3.1.1 Morphologie cellulaire par microscopie à force atomique (AFM)**

Sur les figures III.13 et III.14 sont rassemblées les images obtenues par microscopie à force atomique (AFM). Cette technique nous permet d'obtenir des images très précises de la topographie des cellules et permettant ainsi de nous renseigner sur la qualité de l'adhésion des cellules sur les différentes de surface.

Après 3h de contact (fig.III.13), les images AFM montrent que les cellules sur les films multicouches adhèrent de façon identique aux cellulesensemencées sur la fibronectine. De plus, le noyau est déjà visible et peut être différencié du reste du cytoplasme. Après ce même temps de contact, l'adhésion des cellules semblent cependant moins importante lorsqu'elles sont déposées sur les monocouches de polycations. De même, l'adhésion des cellules sur le verre semble plus faible : on observe la présence de filopodes (extensions membranaires).

Après 48h de culture (fig. III.14), les images AFM montrent que l'adhésion des cellules sur les films ainsi que sur les monocouches de polyélectrolytes est quasiment identique à celle des cellules cultivées sur la fibronectine. Le cytoplasme et le noyau des cellules sont distinctement visibles sur ces surfaces. Au contraire, pour ce temps de culture, l'adhésion des cellules cultivées sur le verre semble moins importante : les cellules sont hautes, le cytoplasme et le noyau ne sont pas distincts. De plus, les cellules présentent encore un certain nombre de filopodes.

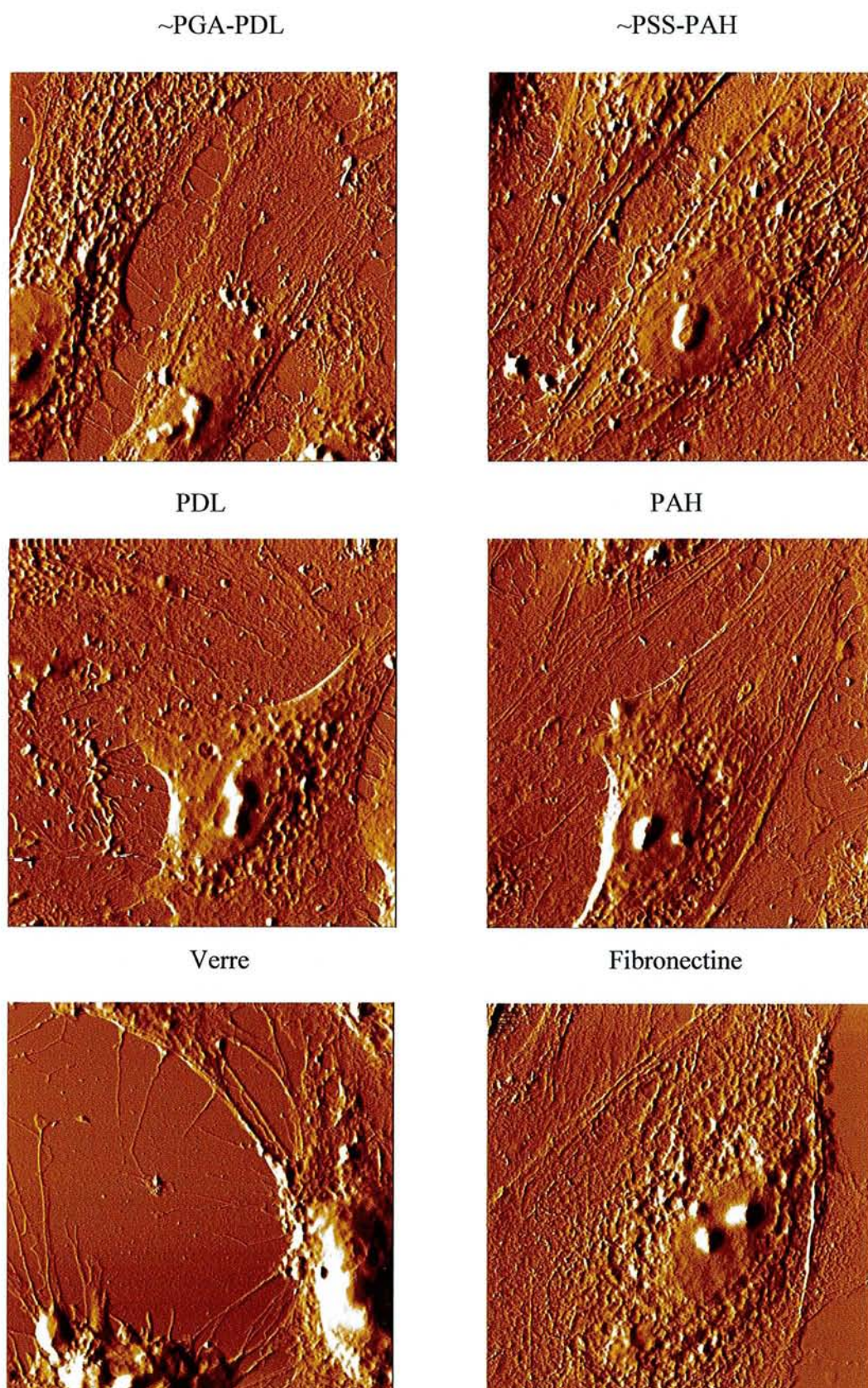




**Figure III.13: Images AFM des HUVEC après 3h de contact sur PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL, PAH, verre et Fibronectine. Les cellules sont fixées et déshydratées. (AFM en mode contact, dimension des images : 50 x 50  $\mu$ m).**

~ : PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-





**Figure III.14: Images AFM des HUVEC après 48h de culture sur PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL, PAH, verre et Fibronectine. Les cellules sont fixées et déshydratées. (AFM en mode contact, dimension des images : 50 x 50  $\mu\text{m}$ ).**

~ : PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-

### III.3.1.2. Evaluation des interactions cellules/surfaces

Nous avons utilisé deux approches permettant d'évaluer indirectement les « forces d'attachement » des cellules sur les surfaces :

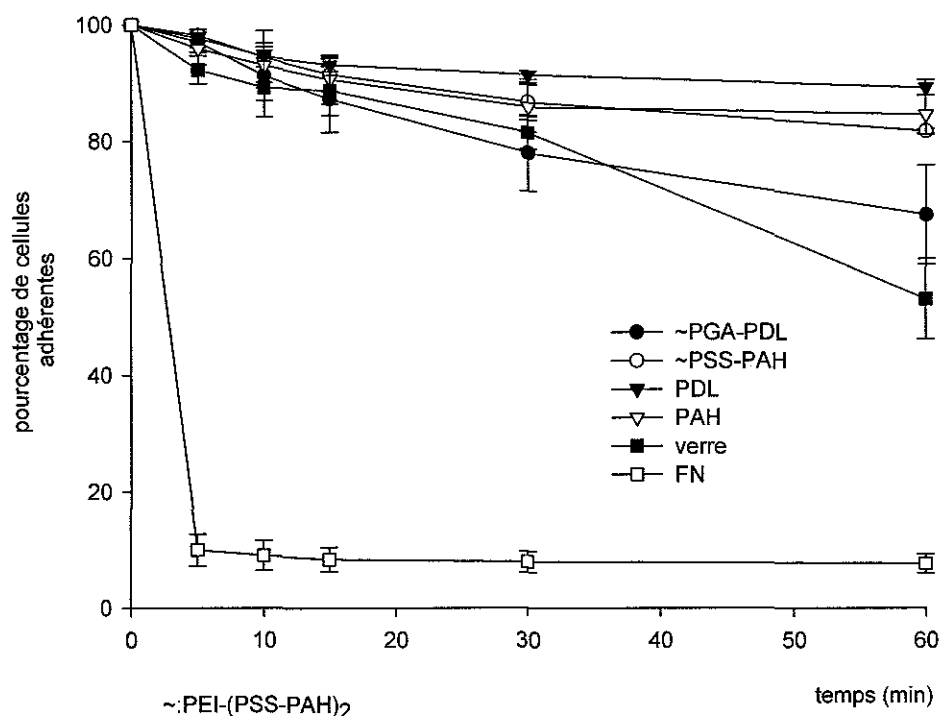
- une approche mécanique qui consiste à appliquer des forces hydrodynamiques sur les cellules (contraintes de cisaillement)
- une approche biochimique qui permet, à l'aide d'une enzyme (la trypsine), de couper les interactions protéiques des cellules avec leur environnement.

#### a) Attachement des cellules soumises à des contraintes de cisaillement

Cette approche permet d'estimer « les forces d'adhésion » des cellules sur une surface, en appliquant une force sur les cellules puis en observant leur détachement. Nous avons appliqué, grâce à une chambre d'écoulement, des contraintes de cisaillement de 6 et 12 dynes/cm<sup>2</sup>, correspondant à des valeurs physiologiques. Le pourcentage de cellules endothéliales adhérentes, soumises à une force donnée, permet d'évaluer les interactions des cellules avec les différentes surfaces.

La figure III.15 représente l'influence d'une contrainte de cisaillement de 6 dynes/cm<sup>2</sup> sur le pourcentage d'attachement des cellules au cours du temps.

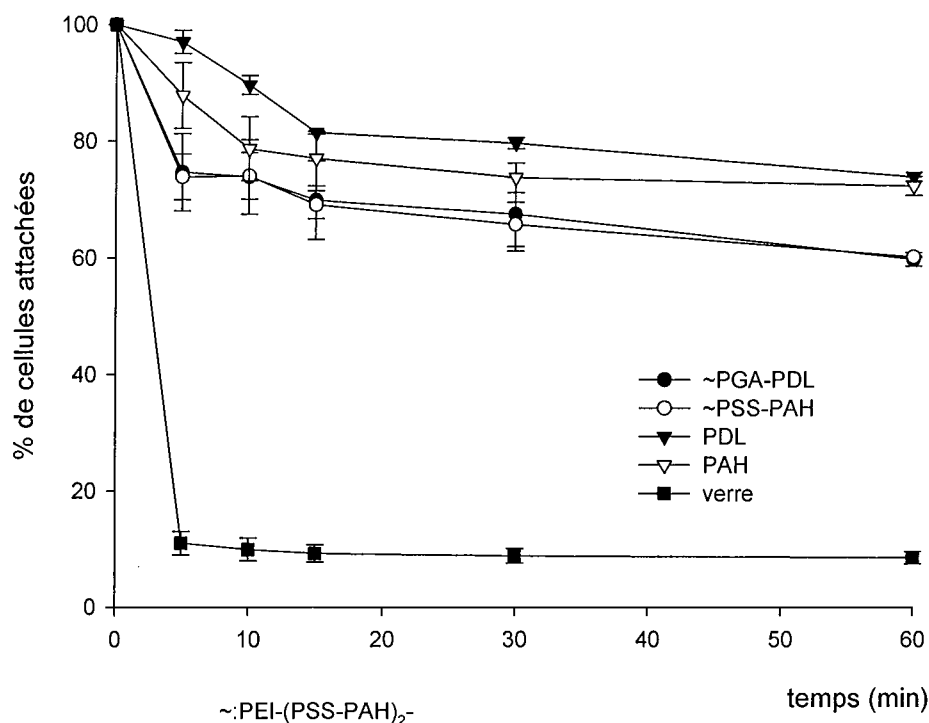
Nous pouvons observer que le pourcentage de cellules adhérentes sur le film ~PSS-PAH, les monocouches de PDL et PAH diminue faiblement au cours du temps. Après 1h d'exposition, le pourcentage de cellules adhérentes sur ces surfaces atteint ~ 85 %. Le pourcentage de cellules restant attachées sur le film ~PGA-PDL diminue également faiblement au cours du temps, et atteint une valeur significativement plus faible après 1h d'exposition (67,4 %). La même observation est faite avec les cellules cultivées sur le verre : seulement 53,1 % de cellules restent attachées à la fin de l'expérience. Nous pouvons observer que les cellules adhérentes sur la fibronectine se détachent rapidement (7,6 %) dès les premières minutes d'exposition.



**Figure III.15 : Influence des modifications de surface sur l'attachement des HUVEC soumises à une contrainte de cisaillement de 6 dynes/cm<sup>2</sup>. Les cellules sont cultivées pendant 48h sur PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL, PAH, verre et fibronectine (FN). (n = 3).**

La figure III.16 représente l'influence d'une contrainte de cisaillement de 12 dynes/cm<sup>2</sup> sur le pourcentage d'attachement des cellules cultivées sur les différentes modifications de surface.

Comme pour les cellules sur la fibronectine à 6 dynes/cm<sup>2</sup>, nous pouvons observer que, dès les premières minutes d'exposition à la contrainte de cisaillement, la majorité des cellulesensemencées sur le verre se détachent. Nous observons également, dans les premières minutes d'exposition, une diminution rapide du pourcentage des cellules attachées sur les monocouches de polyelectrolytes (80 %) et sur les films multicouches (69 %). Puis, le détachement est moins important, et après une heure d'exposition, nous pouvons observer que le pourcentage de cellules adhérentes sur les films multicouches ~PGA-PDL et ~PSS-PAH (60 %) est significativement plus faible par rapport au pourcentage observé sur les monocouches de PDL et PAH (73 %).



**Figure III.16 : Influence des modifications de surface sur l'attachement des HUVEC soumises à une contrainte de cisaillement de 12 dynes/cm<sup>2</sup>. Les cellules sont cultivées pendant 48h sur PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL, PAH, verre. (n = 3).**

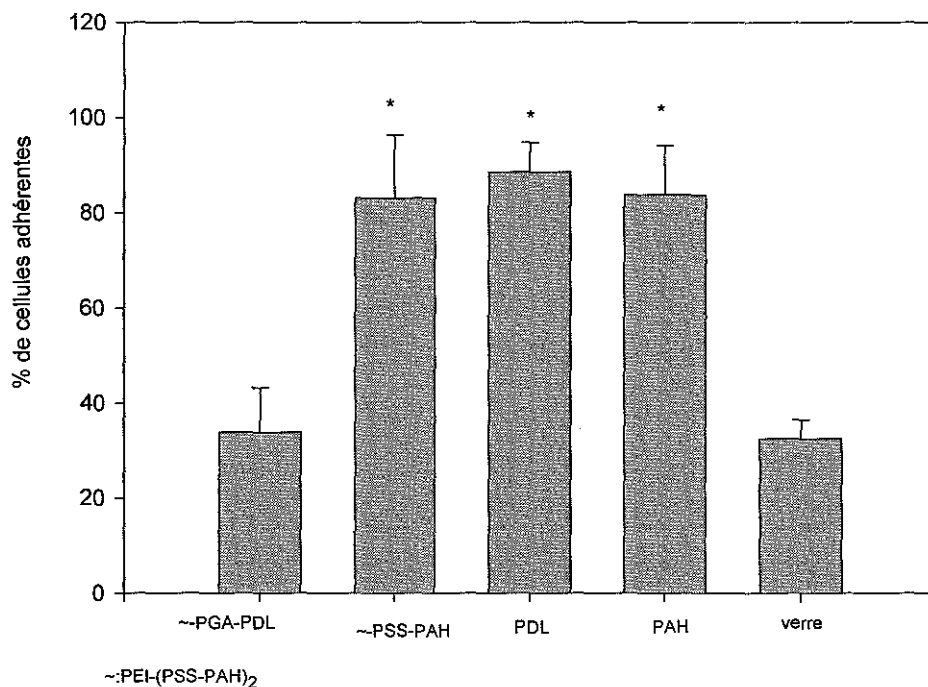
#### **b) Attachement des cellules après traitement à la trypsine**

Nous avons tenté également d'estimer, par une approche biochimique, les interactions protéiques des cellules sur les différentes surfaces. Pour cela, nous avons utilisé la trypsine, une enzyme protéolytique qui hydrolyse les liaisons peptidiques. Cette enzyme est capable de couper les protéines impliquées dans l'adhésion des cellules à leur environnement.

Cependant, les concentrations de trypsine, généralement utilisées en culture cellulaire, provoquent le détachement de l'intégralité des cellules de leur surface de culture. Nous avons donc préalablement déterminé une concentration (0,0025%) et un temps d'incubation (5 min) de l'enzyme permettant un détachement partiel des cellules sur la surface contrôle.

L'influence du traitement par la trypsine sur le pourcentage de cellules adhérentes est représentée sur la figure III.17.

Les résultats montrent que le pourcentage de cellules adhérentes est significativement plus important sur le film ~PSS-PAH (83,1 %), et sur les monocouches de PDL (88,6 %) et PAH (83,8 %) en comparaison avec celui observé sur le verre (32,5 %). Au contraire, le pourcentage de cellules adhérentes sur le film ~PGA-PDL (33,8 %) est similaire à celui observé sur le verre. Les résultats avec cette approche sont en accord avec les résultats obtenus précédemment avec la contrainte de cisaillement de 6 dynes/cm<sup>2</sup>.



**Figure III.17 : Influence du traitement à la trypsine (0,0025 %, 5 min) sur l'attachement des HUVEC sur les différentes modifications de surface. Les cellules sont cultivées pendant 48h sur PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL, PAH, verre. (n=6, \* p < 0,05 versus verre).**



### III.3.1.4 Expression membranaire des intégrines $\beta_1$

L'expression membranaire des intégrines  $\beta_1$ , principaux récepteurs de l'adhésion des cellules sur la surface de culture, est quantifiée par cytométrie en flux (étude quantitative). La distribution de ces récepteurs au niveau de la surface de contact est également observée par microscopie de fluorescence confocale, ainsi que l'organisation du cytosquelette des cellules (étude qualitative).

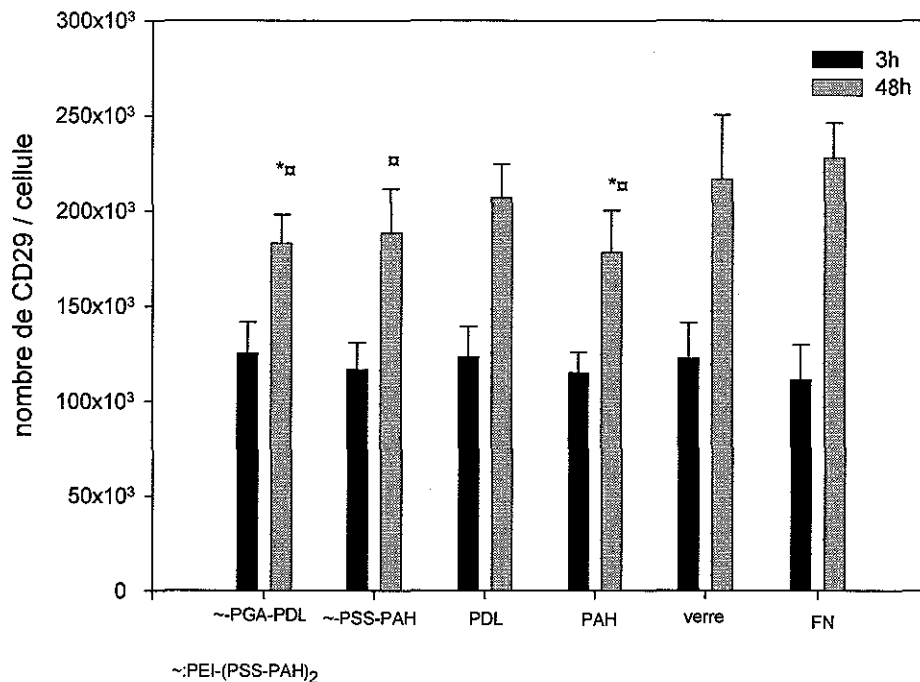
#### a) Etude quantitative :

La figure III.18 représente l'influence des différentes modifications de surface sur l'expression membranaire des intégrines de la famille  $\beta_1$  (CD29) après 3h et 48 h de culture.

Nous n'avons observé aucune différence significative au niveau de l'expression des intégrines après 3h de contact sur les différentes surfaces ( $\sim 120 \times 10^3$  CD29/cellule).

Après 48h de culture, le nombre des intégrines  $\beta_1$  augmente sur toute les surfaces. Cependant, l'expression est significativement plus faible sur le film ~PGA-PDL ( $183,2 \pm 14,8 \times 10^3$  CD29/cellule) et sur la monocouche PAH ( $178,4 \pm 22,0 \times 10^3$  CD29/cellule) en comparaison avec l'expression observée pour les cellules cultivées sur la fibronectine ( $228,0 \pm 18,3 \times 10^3$  CD29/cellule) et sur le verre ( $216,7 \pm 33,7 \times 10^3$  CD29/cellule).

Le nombre d'intégrines  $\beta_1$  pour les cellules sur le film ~PSS-PAH ( $188,8 \pm 22,7 \times 10^3$  CD29/cellule) n'est pas significativement différent de celui observé pour les cellules cultivées sur la fibronectine. Au contraire, sur la monocouche de PDL, l'expression d'intégrines  $\beta_1$  est similaire ( $207,2 \pm 17,5 \times 10^3$  CD29/cellule) à celle observée sur les surfaces contrôles.



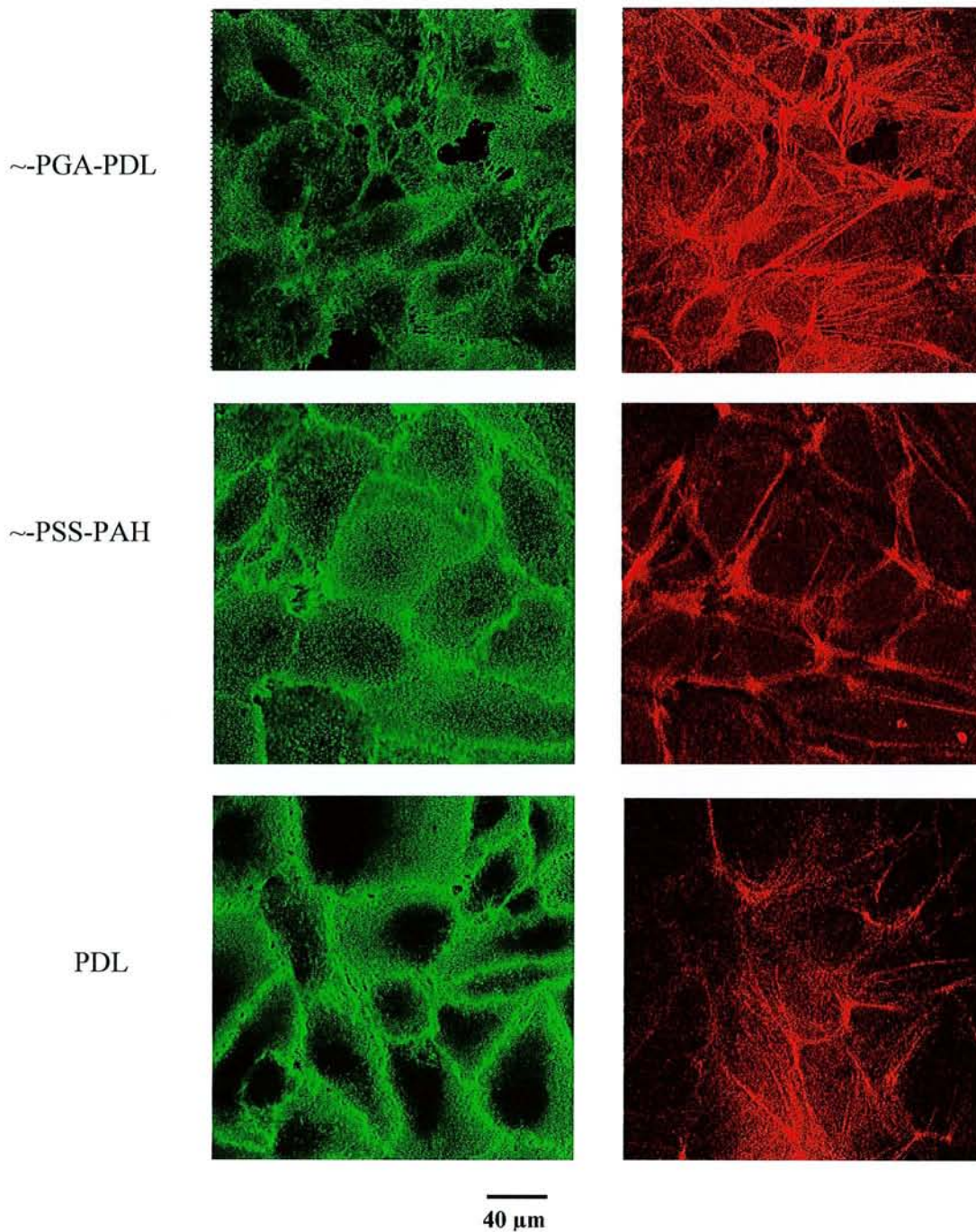
**Figure III.18 : Influence des différentes modifications de surface sur l'expression des intégrines  $\beta 1$  (CD29) après 3h et 48h de culture. Les résultats sont obtenus par cytométrie en flux ( $n = 6$ , \*  $p < 0,05$  versus verre, □  $p < 0,05$  versus fibronectine (FN)).**

#### **b) Etude qualitative :**

L'influence des différentes modifications de surfaces sur la distribution membranaire des intégrines  $\beta 1$  (CD 29) et sur l'organisation du cytosquelette est représentée sur les figures III.19.a et III.19.b.

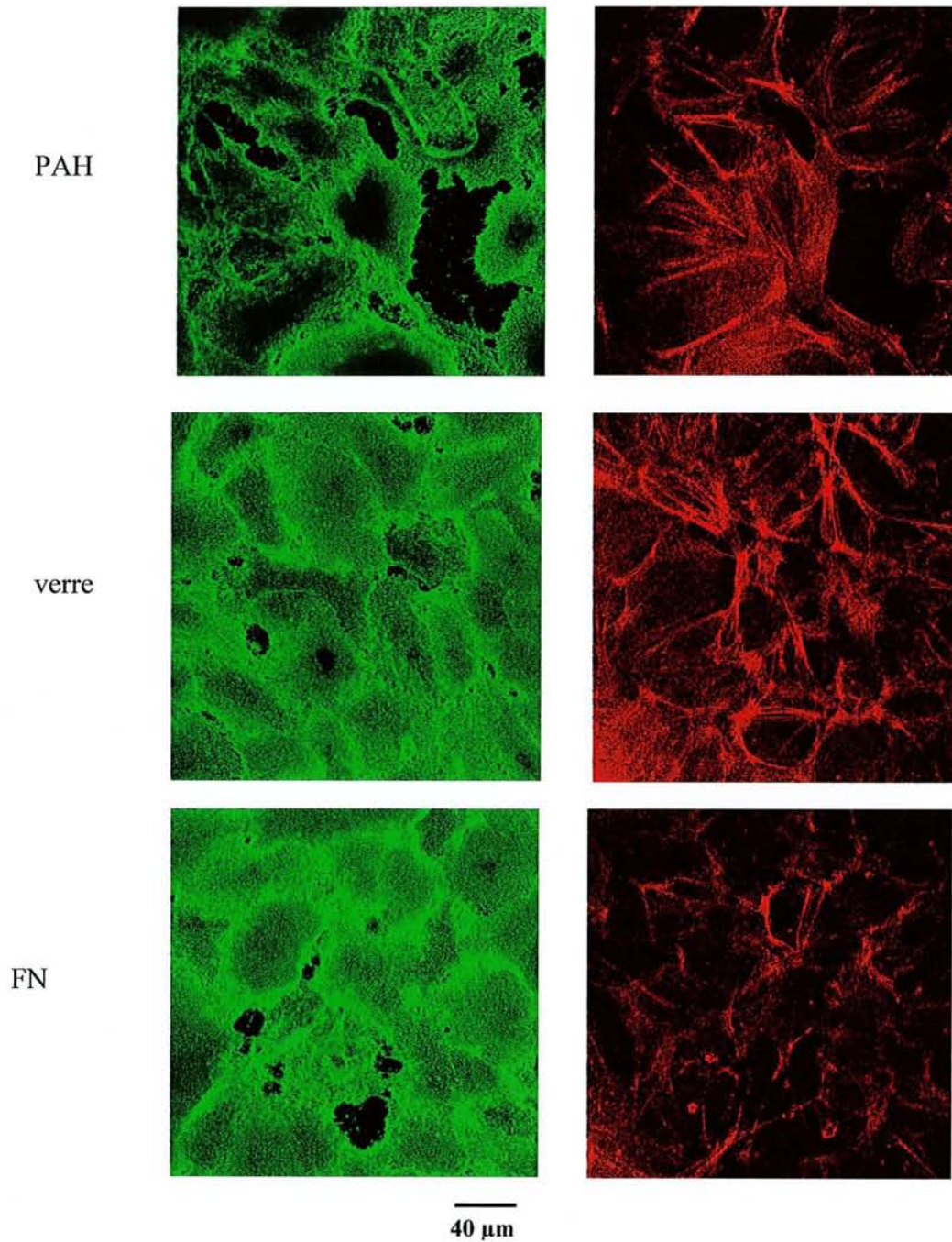
La distribution des intégrines  $\beta 1$  est homogène quelque soit la surface observée. L'expression des intégrines  $\beta 1$  est visiblement plus faible pour les cellules cultivées sur le film ~PGA-PDL et la monocouche PAH par rapport à l'expression observée pour les cellules cultivées sur les autres surfaces, confirmant ainsi nos résultats de cytométrie en flux.

Concernant le cytosquelette, nous pouvons observer que l'organisation des filaments d'actine en fibre de stress est très marquée sur le film ~PGA-PDL. En effet, ces filaments traversent l'intégralité des cellules. Sur les autres surfaces, le cytosquelette des cellules présentent moins de filaments d'actine et ceux-ci se présentent essentiellement à la périphérie des cellules.



**Figure III.19.a :** Expression des intégrines  $\beta 1$  (CD29) (vert) et organisation du cytosquelette (rouge) à la surface de contact des HUVEC après 48h de culture sur PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL. L'observation des cellules est effectuée par microscopie de fluorescence confocale laser (objectif 63x, ON 1,32, Leica TCS SP2). ~ : PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>.





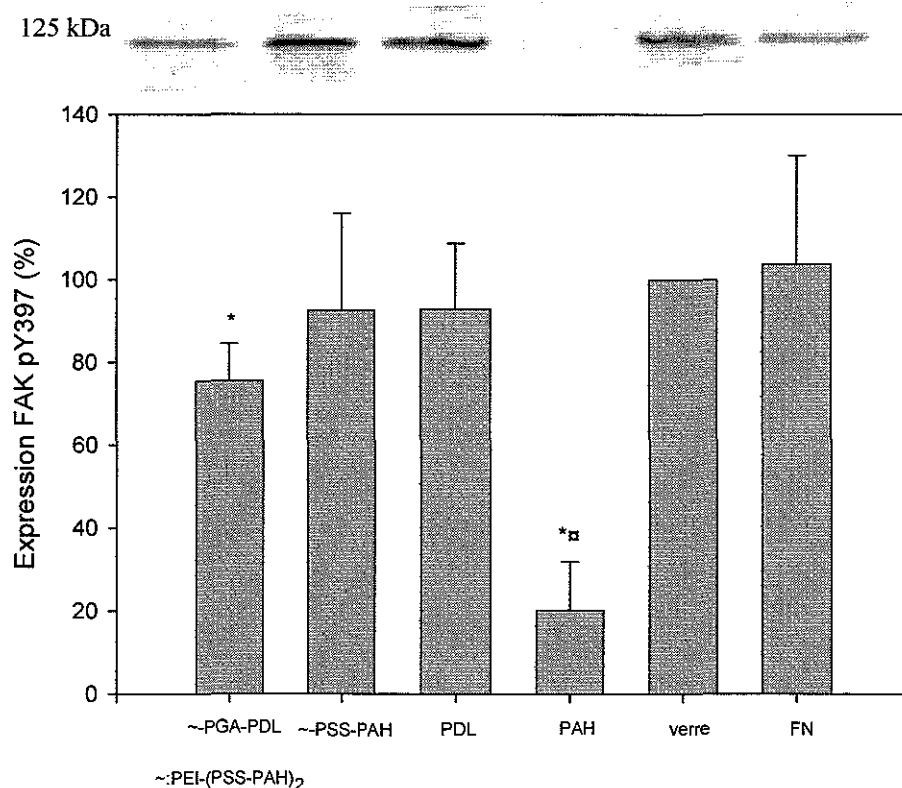
**Figure III.19.b :** Expression des intégrines  $\beta 1$  (CD29) (vert) et organisation du cytosquelette (rouge) à la surface de contact des HUVEC après 48h de culture sur PAH, verre et fibronectine (FN). L'observation des cellules est effectuée par microscopie de fluorescence confocale laser (objectif 63x, ON 1,32, Leica TCS SP2).

### III.3.1.5 Expression de FAK pY397 : transduction du signal d'adhésion

La phosphorylation du résidu tyrosine 397 (pY397) est impliquée dans l'activation de la FAK (focal adhesion kinase) qui induit, dans les cellules, la transduction du signal d'adhésion nécessaire à la survie et au développement cellulaire.

La figure III.20 représente l'expression du résidu tyrosine 397 phosphorylé de la FAK des cellules cultivées sur les différentes modifications de surface. L'expression de FAK a été réalisée par une technique de western blotting, et les résultats sont exprimés en pourcentage d'expression par rapport au verre.

La phosphorylation du résidu tyrosine 397 ne semble pas être diminuée pour les cellules sur le film  $\sim$ PSS-PAH ( $92,6 \pm 23,4$  %) ou la monocouche PDL ( $92,9 \pm 15,8$  %) en comparaison avec les cellules cultivées sur le verre (100 %) ou la fibronectine ( $103,8 \pm 26,2$  %). Cependant, la phosphorylation est significativement plus faible pour les cellules sur le film  $\sim$ PGA-PDL ( $75,5 \pm 8,9$  %) que pour les cellules sur le verre. De même, la phosphorylation de Y397 est significativement plus faible sur la monocouche PAH ( $20,2 \pm 11,7$ %) par rapport au verre et la fibronectine.



**Figure III.20 : Influence des différentes modifications de surface sur l'expression de FAK pY397.** Les HUVEC sont cultivées pendant 48h sur PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL, PAH, verre et Fibronectine (FN). Les résultats sont obtenus par western blotting, n = 6, pourcentage calculé par rapport au verre, \* p < 0,05 versus verre, □ p < 0,05 versus FN.

### **III.3.2 Discussion**

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons donc étudié plus en détail les phénomènes d'adhésion des cellules endothéliales sur les films multicouches de polyélectrolytes en évaluant d'une part les interactions cellules/surfaces et en évaluant d'autre part l'expression des intégrines  $\beta 1$  et la transduction intracellulaire du signal d'adhésion. Nous avons comparé le comportement d'adhésion des cellules sur les films multicouches à celui des cellules cultivées sur la fibronectine. La fibronectine est une protéine de la matrice extracellulaire connue pour augmenter l'adhésion spécifique des cellules par le biais des intégrines  $\beta 1$ .

Les observations en microscopie à force atomique montrent que l'adhésion des cellules sur les films multicouches de polyélectrolytes est similaire à celle des cellules sur la fibronectine après 3h de contact. Néanmoins, les résultats sur les intégrines  $\beta 1$  ne nous permettent pas d'expliquer les différences observées avec l'adhésion initiale dans la première partie de notre travail.

Après 48h de culture, les cellules sur les films multicouches présentent une morphologie qui leur permet d'avoir une surface de contact importante, contrairement aux cellules ensemencées sur le verre. Pour les cellules endothéliales, il est primordial d'augmenter les interactions entre les cellules et la surface. En effet, les contraintes de cisaillement dues à l'écoulement sanguin peuvent conduire, si l'adhésion n'est pas suffisante, au détachement précoce des cellules endothéliales (Salacinski et al 2001, Sirois et al 1998).

Pour cela, nous avons utilisé deux polycations (PDL et PAH) pour la construction de nos films. La poly(D-lysine) (PDL) est déjà fréquemment utilisée en culture cellulaire sous sa forme monocouche, pour augmenter les propriétés adhésives des surfaces (Cohen et al 1977). Le PAH, qui est un polyélectrolyte synthétique, a été récemment utilisé dans la construction de films multicouches de polyélectrolyte (PSS/PAH). Ces films ont montré une augmentation de l'adhésion de cellules provenant de chondrosarcome, d'ostéosarcome et de ligaments (Vautier et al 2002, Tryoen-Toht et al 2002).

Cependant, nos résultats sur les interactions cellules endothéliales/films multicouches semblent montrer des interactions plus importantes sur le film ~PSS/PAH et sur les monocouches de polyélectrolytes.

Les différences d'interaction cellulaire entre les deux films multicouches peuvent avoir différentes origines :

- Les traitements peuvent conduire au détachement d'une partie du film entraînant les cellules si la cohésion du film est plus faible. Ceci semble être le cas pour le film PGA-PDL (Lavalle et al 2002).

- L'adhésion des cellules sur le film PSS-PAH peut être plus importante que sur le film PGA-PDL. Ceci a déjà été démontré par une technique de micromanipulation pour des cellules de chondrosarcome sur ce type de film (Richert et al 2002).

Pourtant, l'expression des intégrines  $\beta 1$ , principaux récepteurs d'adhésion à la matrice extracellulaire, n'est pas différente entre les deux films de polyélectrolytes. Par conséquent, il semble que d'autres interactions que celles engendrées par les intégrines  $\beta 1$  soient impliquées. D'autres récepteurs d'adhésion (Ruegg et Mariotti 2003, Iivanainen et al 2003), ou des interactions non spécifiques de type électrostatique pourraient intervenir dans l'adhésion des cellules sur le film ~PSS-PAH. En effet, les interactions électrostatiques sont impliquées en grande partie dans la construction des films de polyélectrolytes (Decher et al 1997). Ces interactions électrostatiques ont montrés une réelle amélioration de l'attachement des cellules endothéliales sur d'autres surfaces (Bouaziz et al 1997).

Néanmoins, bien que les interactions semblent importantes sur le film ~PSS-PAH, elles ne permettent pas, lorsque les cellules sont exposées à une force plus importante ( $12 \text{ dynes/cm}^2$ ), d'obtenir un attachement cellulaire aussi important que sur les monocouches de polyélectrolytes. Ceci pourrait être du au fait que les cellules sont moins nombreuses sur les monocouches, leurs permettant ainsi d'augmenter la surface de contact et de mieux résister aux contraintes de cisaillement (Barbee et al 1995).

Néanmoins, les adhésions spécifiques au travers des intégrines sont importantes pour la survie et le développement cellulaire (Gilmore et al 1996, Zhao et al 1998). Les intégrines transmettent notamment le signal d'adhésion extracellulaire par phosphorylation de la kinase d'adhésion focale (FAK) qui entraîne une cascade de signalisation intracellulaire régulant ainsi le comportement cellulaire (Vuori 1998).

Pourtant, la diminution de l'expression des intégrines  $\beta 1$  après 48h de culture sur le film ~PSS-PAH ne perturbe pas la transduction du signal d'adhésion. L'activation de la FAK est cependant légèrement réduite sur le film ~PGA-PDL et pourrait expliquer les résultats observés avec ce film dans les deux premières parties de notre travail.

Cette diminution de l'activation de FAK pourrait provenir de la différence de l'expression des intégrines  $\alpha 5/\beta 1$  (récepteur de la fibronectine) et  $\alpha 2/\beta 1$  (récepteur au collagène) qui régulent différemment l'activation de FAK (Aplin et al 1999). Par conséquent, la transduction du signal d'adhésion peut être modifiée par les protéines de la matrice extracellulaire. Cependant, la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire sur les films multicouches n'a pas encore été évaluée.

De même, certaines de ces protéines (fibronectine et vitronectine) sont également contenues dans le sérum de culture et pourraient s'adsorber sur les films multicouches. Même si un grand nombre de protéines sériques à pH 7,4 sont négativement chargés et s'adsorbent sur les films multicouches de polyélectrolytes (Ladam et al 2001, Richert et al 2002), on ignore encore quelle protéine s'adsorberait préférentiellement sur les films multicouches.

L'adhésion spécifique des cellules sur la fibronectine, protéine de la matrice extracellulaire, ne permet pas d'obtenir un attachement important des cellules sous flux. En effet, la fibronectine ne peut s'adsorber fortement au verre ; elle entraîne donc rapidement les cellules lorsqu'une force est appliquée. Le détachement de protéines des films multicouches pourrait également expliquer la différence d'attachement des cellules sur les films et les monocouches de polyélectrolytes.

Les résultats confirment l'importance de l'adhésion spécifique des cellules endothéliales sur leur surface de culture au niveau du comportement cellulaire, notamment au niveau de la croissance cellulaire. Nous pourrions envisager de fonctionnaliser les films multicouches de polyélectrolytes avec des peptides adhésifs du type RGD. Le couplage de peptide adhésif comme RGD avec la poly(lysine) (Quirk et al 2001) ou des polymères synthétiques (Wang et al 2002, Tiwari et al 2003) a déjà été réalisé et a montré une amélioration de l'adhésion des cellules endothéliales. Par ailleurs, la fonctionnalisation des films multicouches a déjà été réalisée avec un autre type de peptide (peptide hormone) et a montré une stabilité de l'activité de ce peptide au cours du temps (Chluba et al 2002).

En conclusion, les interactions cellulaires semblent être plus importantes sur le film ~PSS-PAH et sur les monocouches de polyélectrolytes, faisant intervenir probablement des interactions non spécifiques du type électrostatique. Les interactions cellulaires sur le film ~PSS-PAH ne perturbe pas la transduction du signal d'adhésion nécessaire à la survie et au développement cellulaire. Par conséquent, ce film ~PSS-PAH pourrait favoriser le développement des cellules endothéliales sur des surfaces synthétiques. Mais, des investigations devront être menées pour étudier, d'une part, l'action des protéines de la

matrice extracellulaire synthétisées ou adsorbées au niveau des films multicouches , et d'autre part, la fonctionnalisation des films multicouches par des peptides adhésifs.

## **CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

L'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer l'intérêt des films multicouches de polyélectrolytes utilisés comme modification de surface dans la conception de substituts vasculaires. En effet, les matériaux utilisés actuellement en chirurgie vasculaire sont potentiellement thrombogènes et ne permettent pas une pérennité à long terme du substitut vasculaire. Les recherches actuelles consistent à recouvrir ces matériaux d'une monocouche de cellules endothéliales, leur permettant d'avoir les propriétés anti-thrombogéniques des vaisseaux natifs. Malheureusement, les matériaux synthétiques ne permettent pas une adhésion et un développement optimal des cellules endothéliales. Il est alors nécessaire d'interposer une matrice qui puisse favoriser l'adhésion et le développement des cellules endothéliales. Les films multicouches de polyélectrolytes, qui modifient les propriétés physicochimiques de ces matériaux, pourraient améliorer le comportement des cellules endothéliales sur ces matériaux.

Pour cela, des cellules endothéliales issues de culture primaire de veine ombilicale humaine (HUVEC) ont été utilisées comme modèle de l'endothélium vasculaire. Ces cellules ont été cultivées sur deux films multicouches ayant une architecture commune : PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub> et finissant par PGA-PDL ou PSS-PAH. Ces films multicouches ont déjà été évalués avec d'autres types cellulaires, et ont montré une augmentation de l'adhésion cellulaire. Mais, compte tenu de la réponse spécifique de chaque type cellulaire, il était nécessaire d'étudier le comportement des cellules endothéliales sur ces films multicouches.

Dans un premier temps, en raison de l'effet de la surface de culture sur les cellules endothéliales au niveau de la viabilité, de la croissance ou du phénotype, nous avons vérifié ces paramètres afin de montrer que les films multicouches ne possédaient pas d'effets négatifs sur le comportement cellulaire et pouvaient favoriser rapidement le développement cellulaire. Les films multicouches ont été comparés aux monocouches de polycations (PDL et PAH) terminant les films, au verre et au tcps (tissue culture polystyrene, utilisée couramment en culture cellulaire).

Nos résultats montrent que les films multicouches de polyélectrolytes n'induisent pas d'effet cytotoxique, de même, le phénotype endothélial est conservé ainsi que l'intégrité et la fonctionnalité mitochondriale. De plus, nous avons observé que les films multicouches favorisent l'adhésion initiale ce qui permet d'obtenir, une densité cellulaire après 3 jours de culture supérieure à celle observée sur les monocouches de polycations (~ 50%), même si une diminution de la croissance cellulaire est observée sur le film ~PGA-PDL.



La différence observée entre les films et les monocouches de polyélectrolytes peut s'expliquer par l'efficacité de recouvrement de la surface par les films multicouches. En effet, les monocouches semblent recouvrir partiellement la surface traitée, contrairement aux films multicouches. Par conséquent, les films multicouches peuvent modifier profondément les propriétés physicochimiques des surfaces. Quant aux différences observées au niveau de l'adhésion et de la croissance cellulaire entre les deux films multicouches, elles pourraient non seulement provenir des propriétés physicochimiques des films mais également d'une différence d'adsorption des protéines sériques, jouant ainsi un rôle essentiel dans le développement des cellules endothéliales. Considérant la biocompatibilité des surfaces construites avec des polyélectrolytes, le film ~PSS-PAH semble montrer des propriétés très intéressantes en terme d'adhésion initiale, de viabilité et de croissance des cellules endothéliales.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'implication dans le processus inflammatoire des cellules endothéliales cultivées sur les films multicouches. En effet, les cellules endothéliales, lorsqu'elles sont activées par des cytokines pro-inflammatoires tel que le  $\text{TNF}\alpha$ , expriment des molécules d'adhérence cellulaire comme ICAM-1, impliquées dans l'adhésion des leucocytes. Cette activation limite la durée de vie *in vivo* des substituts vasculaires endothélialisés. Nous avons voulu savoir si les films multicouches modifiaient la réponse inflammatoire des cellules endothéliales à travers l'expression d'ICAM-1. Les cellules endothéliales ont été cultivées pendant 48h sur les films multicouches, puis elles ont été stimulées biochimiquement par le  $\text{TNF}\alpha$  ou mécaniquement par une contrainte de cisaillement. Nous avons également observé l'implication de la réorganisation du cytosquelette dans cette réponse inflammatoire en utilisant la cytochalasine D, agent bloquant de la F-actine, lors de la stimulation avec le  $\text{TNF}\alpha$ .

Nous avons mis en évidence que les films multicouches n'entraînaient pas les cellules endothéliales dans un processus inflammatoire en condition basale, confirmant ainsi la biocompatibilité des films. Cependant, une stimulation prolongée avec le  $\text{TNF}\alpha$  conduit à une expression plus importante d'ICAM-1 pour les cellules endothélialesensemencées sur le film ~PGA-PDL et la monocouche de PDL. Comme le montrent nos expériences avec la cytochalasine D, une perturbation de la réorganisation du cytosquelette pour les cellules sur le film ~PGA-PDL semble être impliquée dans la sur-expression d'ICAM-1. Notre expérience avec des cellules soumises à une contrainte mécanique ne permet pas d'observer de différences significatives dans l'expression d'ICAM-1 et de confirmer ainsi notre hypothèse

sur la perturbation du cytosquelette avec le film ~PGA-PDL. Pourtant, compte tenu des résultats sur l'expression d'ICAM-1, le film ~PGA-PDL semble moins favorable à une utilisation en ingénierie tissulaire. Au contraire, le film ~PSS-PAH permet aux cellules endothéliales de répondre correctement aux stimulations imposées.

Enfin, nous avons évalué l'adhésion des cellules sur les films multicouches de polyélectrolytes. Nous avons tenté de comprendre le rôle des films multicouches dans les phénomènes d'adhésion cellulaire nous permettant ainsi de trouver une explication pour les résultats obtenus au niveau de la croissance et de l'activation cellulaire. Pour cela, nous avons étudié les interactions des cellules endothéliales sur les films multicouches et l'expression des intégrines de la famille  $\beta 1$ , principaux récepteurs d'adhésion à la matrice extracellulaire. Nous avons également étudié l'activation de la kinase d'adhésion focale, qui transmet le signal d'adhésion à l'intérieur des cellules, nécessaire à la survie et au développement cellulaire. En effet, dans la conception des substituts vasculaires recouverts par une monocouche de cellules endothéliales, il est primordial que les interactions cellules/substituts soient maximales afin que les cellules puissent résister aux forces exercées par l'écoulement sanguin.

Nos résultats sur l'expression des intégrines après 3h de contact ne nous ont pas permis de comprendre, de façon précise, la meilleure adhésion des cellules sur les films multicouches par rapport aux monocouches de polyélectrolytes. Après 48h de culture sur les films multicouches, les cellules n'expriment pas une aussi grande quantité d'intégrines  $\beta 1$  notamment sur le film ~PGA-PDL que sur la fibronectine (protéine de la matrice extracellulaire) ou le verre. Par conséquent, les cellules ne semblent pas interagir uniquement avec les films multicouches par l'intermédiaire des récepteurs spécifiques de l'adhésion, des interactions du type électrostatique rentrent probablement en jeu dans les phénomènes d'adhésion sur les surfaces de polyélectrolytes. Les forces d'adhésion des cellules sur le film ~PSS-PAH permettent un attachement important des cellules contrairement aux cellules sur le film ~PGA-PDL lorsque les traitements (mécanique ou biochimique) exercés sont relativement faibles. Néanmoins, lorsqu'une force plus importante est exercée, la différence d'attachement cellulaire n'existe plus entre les films. De même, les forces d'adhésion cellulaire semblent être plus importantes sur les monocouches de polycations. Cette différence pourrait s'expliquer par une densité cellulaire plus importante sur les films de polyélectrolytes. Nous avons également montré que l'adhésion des cellules sur le film ~PSS-PAH ne perturbent pas la transduction du signal d'adhésion. Par contre, cette transduction intracellulaire est légèrement réduite sur le film ~PGA-PDL et elle est fortement diminuée sur

la monocouche PAH, expliquant les résultats de croissance cellulaire. Cette diminution de transduction du signal peut être due à la diminution de l'expression des intégrines engendrée par une adsorption ou une synthèse moins importante des protéines de la matrice extracellulaire sur le film ~PGA-PDL et la monocouche PAH. En conséquence, il semble que le film ~PSS-PAH permette une meilleure adhésion cellulaire par l'intermédiaire d'interactions non spécifiques sans perturber la transduction du signal d'adhésion nécessaire au développement cellulaire.

En conclusion, il semble que le film PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub> favorisent nettement l'adhésion et le développement des cellules endothéliales par l'intermédiaire d'interactions non spécifiques. Les interactions des cellules sur ce film ne perturbent pas les comportements cellulaires (croissance, expression d'ICAM-1). Par conséquent, ce film pourra être utilisé en ingénierie tissulaire pour améliorer l'adhésion des cellules endothéliales sur les matériaux vasculaires.

Néanmoins, de futures investigations concernant l'adsorption ou la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire sur les films multicouches permettraient de confirmer les résultats que nous avons déjà obtenus.

Nous pourrions également envisager de fonctionnaliser les films multicouches par des peptides adhésifs du type RGD ce qui pourrait permettre encore d'améliorer l'attachement cellulaire.

Afin de confirmer les résultats que nous avons obtenus *in vitro*, il sera nécessaire de réaliser des investigations *in vivo* avec des prothèses vasculaires endothélialisées, implantées par exemple chez le lapin. Des études histologiques permettront d'observer le comportement de l'endothélium sur des prothèses vasculaires modifiées avec le film multicouche ~PSS-PAH et d'observer à long terme la fonctionnalité *in vivo* de ces substituts vasculaires. Un projet similaire d'étude consistera à observer, grâce au film multicouche ~PSS-PAH, la ré-endothélialisation de la surface luminale d'allogreffes vasculaires humaines.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Abbott W.M., Callow A., Moore W., Rutherford R., Veith F., Weinberg S. Evaluation and performance standards for arterial prostheses. *J Vasc Surg.* 1993. 17 (4) : 746-56.

Ali M. H., Shumacker P.T. Endothelial responses to mechanical stress : where is the mechanosensor ? *Crit Care Med.* 2002. 30 : S198-S206.

Almeida E.A., Ilic D., Han Q. Matrix survival signaling from fibronectin via focal adhesion kinase to c-jun NH2-terminal kinase. *J Cell Biol.* 2000. 149: 741-754.

Ando J., Tsuboi H., Korenaga R., Takada Y., Toyama-Sorimachi N., Miyasaka M., Kamiya A. Shear stress inhibits adhesion of cultured mouse endothelial cells to lymphocytes by downregulation VCAM-1 expression. *Am J Physiol.* 1994. 267: C679-C687.

Aplin A.E., Short S.M., Juliano R.L. *J Biol Chem.* Anchorage-dependent regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade by growth factors is supported by a variety of integrin alpha chains. *J Biol Chem.* 1999. 274 : 31223-8.

Arciniegas E., Sutton A.B., Allen T.D., Schor A.M. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci.* 1992. 103 (2) : 521-9.

Bacakova L., Mares V., Lisa V., Svorcik V. Molecular mechanisms of improved adhesion and growth of an endothelial cell line cultured on polystyrene implanted with fluorine ions. *Biomaterials.* 2000. 21(11):1173-9.

Barbee K.A. Changes in surface topography in endothelial monolayers with time at confluence:influence on subcellular shear stress distribution due to flow. *Biochem Cell Biol.* 1995. 73 : 501-5.

Bashford C.L., Alder G.M., Graham J.M., Menestrina G., Pasternak C.A. Ion modulation of membrane permeability: effect of cations on intact cells and on cells and phospholipid bilayers treated with pore-forming agents. *J Membr Biol.* 1988. 03 : 79-94.

Berth G., Voigt A., Dautzenberg H., Donath E., Mohwald H. Polyelectrolyte complexes and layer-by-layer capsules from chitosan/chitosan sulfate. *Biomacromolecules.* 2002. 3(3): 579-90.

Bouaziz A., Richert A., Caprani A. Vascular endothelial cell responses to different electrically charged poly(vinylidene fluoride) supports under static and oscillating flow conditions. *Biomaterials.* 1997. 18(2) : 107-12.

Boura C., Menu P., Payan E., Picart C., Voegel J.C., Muller S., Stoltz J.F. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials.* 2003. 24: 3521-30.

Brunstedt M.R., Ziats N.P., Rose-Caprara V., Hiltner P.A., Anderson J.M., Lodoen G.A., Payet C.R. Attachment and proliferation of bovine aortic endothelial cells onto additive modified poly(ether urethane ureas). *J Biomed Mater Res.* 1993. 27: 483-92.

Budd J.S., Bell P.R., James R.F. Attachment of indium-111 labelled endothelial cells to pretreated polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Br J Surg.* 1989. 76 (12) : 1259-61.

Buttiglieri S., Pasqui D., Migliori M., Johnston H., Affrossman S., Sereni L., Wratten M.L., Barbucci R., Tetta C., Camussi G., Endothelialization and adherence of leucocytes to nanostructured surfaces. *Biomaterials.* 2003. In press.

Carrington W.A., Lynch R.M., Moore E.D.W., Isenberg G., Forgaty K.E., Fay S. Superresolution 3-dimensional images of fluorescence in cells with minimal light exposure. *Science.* 1995. 268: 1483-97.

Carpen O., Pallai P., Staunton D.E., Springer T.A. Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and  $\alpha$ -actinin. *J Cell Biol.* 1992. 118: 1223-34.

Carpenter M.K., Rosler E., Rao M.S. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells.* 2003. 5(1):79-88.

Caruso F. Hollow capsule processing through colloidal templating and self-assembly. *Chem Eur J.* 2000. 6(3) : 413-19.

Cenni E., Granchi D., Ciapetti G., Verri E., Cavedagna D., Gamberini S., Cervellati M., Di Leo A., Pizzoferrato A. Expression of adhesion molecules on endothelial cells after contact with knitted Dacron. *Biomaterials.* 1997. 18 : 489-94.

Chappey O., Wautier M.P., Wautier J.L. Structure and functions of the endothelium. *Rev Prat.* 1997. 47(20) : 2223-6

Chen H.C., Appeddu P.A., Parsons J.T., Hildebrand J.D., Schaller M.D., Guan J.L. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem.* 1995. 270 (28) : 16995-9.

Chen K.D., Li Y.S., Kim M., Li S., Yuan S., Chien S., Shyy J.Y. Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J Biol Chem.* 1999. 274 (26) : 18393-400.

Cheng J.J., Wung B.S., Chao Y.J., Wang D.L. Cyclic strain-induced reactive oxygen species involved in ICAM-1 gene induction in endothelial cells. *Hypertension.* 1998. 31 (1) : 125-30.

Chluba J., Voegel J.C., Decher G., Erbacher P., Schaaf P., Ogier J. Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity. *Biomacromolecules.* 2001. 2 (3) : 800-5.

Cohen C.M., Kalish D.I., Jacobson B.S., Branton D. Membrane isolation on polylysine-coated beads. Plasma membrane from HeLa cells. *J Cell Biol.* 1977. 75 (1) : 119-34.

Camussi G., Turello E., Bussolino F., Baglioni C. Tumor necrosis factor alters cytoskeletal organization and barrier function of endothelial cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991. 96 (1) : 84-91.

Dalby M.J., Riehle M.O., Johnstone H., Affrossman S., Curtis A.S. In vitro reaction of endothelial cells to polymer demixed nanotopography. *Biomaterials.* 2002. 23 (14) : 2945-54.

D'Alessio P., Moutet M., Coudrier E., Darquenne S., Chaudiere J. ICAM-1 and VCAM-1 expression induced by TNF $\alpha$  are inhibited by a glutathione peroxylase mimic. *Free Radic Biol Med.* 1998. 24: 979-87.

Decher G., Hong J.D, Schmitt J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin solid Films.* 1992. 831-35

Decher G. Fuzzy nanoassemblies : toward layered polymeric multicomposites. *Science.* 1997. 227 : 1232-37.

Deroanne C.F., Lapiere C.M., Nussgens B.V.. In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton. *Cardiovasc Res.* 2001. 49(3) : 647-58.

Deutsch M., Meinhart J., Fischlein T., Preiss P., Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery.* 1999. 126 (5) : 847-55.



Diamond S.L., Sharefkin J.B., Dieffenbach C., Frasier-Scott K., McIntire L.V., Eskin S.G. Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress. *J Cell Physiol.* 1990. 143: 364-71.

Dubas S. T., Schlenoff J. B.. Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers. *Macromolecules.* 1999, 32 : 8153-60.

Dumas D., Gigant C., Presle N., Cipolletta., Miralles G., Payan E., Jouzeau J.Y., Mainard D., Terlain B., Netter P., Stoltz J.F. The role of 3D-microscopy in the study of chondrocyte-matrix interaction (alginate bead or sponge, rat femoral head cap, human osteoarthritic cartilage) and pharmacological application. *Biorheology.* 2000. 37: 165-76.

Elbert D. L., Herbert C. B., Hubbell J. A.. Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces. *Langmuir.* 1999, 15 : 5355-5362.

Eliceiri B.P. Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ Res.* 2001. 89 (12) : 1104-10.

Emerick S., Herring M.B., Arnold M., Baughman S., Reilly K., Glover J.L Leukocyte depletion enhances cultured endothelial cell retention on vascular prostheses. *J Vasc Surg.* 1989. 5: 342-47.

Feletou M., Vanhoutte P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1988. 93 (3) : 515-24.

Fery A., Schöler B., Cassagneau T., Caruso F. Nanoporous thin films formed by salt-induced structural changes in multilayers of poly(acrylic acid) and poly(allylamine). *Langmuir.* 2001. 17 (13): 3779-83.

Fischbeck J.A., Baier J.M., Akella R., Hern-Anderson D., Schmidt C.E. Genetic modification of alphaGal expression in xenogeneic endothelial cells yields a complex immunological response. *Tissue Eng.* 2001. 7 (6) : 743-56.

Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980. 288 (5789) : 373-6.

Gao C., Li A., Yi X., Shen J. construction of cell-compatible layer and culture of human umbilical vascular endothelial cells on porous polystyrene membranes. *J. Appl. Polym. Sci.* 2001. 81 : 3523-29.

Gilmore A.P., Burridge K. Molecular mechanisms for focal adhesion assembly through regulation of protein-protein interactions. *Structure.* 1996. 4 (6) : 647-51.

Goel H.L., Dey C.S. Focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation is associated with myogenesis and modulated by insulin. *Cell Prolif.* 2002. 35 (3) : 131-42.

Greisler H.P., Gosselin C., Ren D., Kang S.S., Kim D.U. Biointeractive polymers and tissue engineered blood vessels. *Biomaterials.* 1996. 17 (3) : 329-36.

Haegerstrand A., Bengtsson L., Gillis C. Serum proteins provide a matrix for cultured endothelial cells on expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Scand J Thorac Cardiovasc. Surg.* 1993. 27: 21-26.

Hansen C.A., Schroering A.G., Carey D.J., Robishaw J.D. Localization of a heterotrimeric G protein gamma subunit to focal adhesions and associated stress fibers. *J Cell Biol.* 1994. 126(3):811-9.

Harrison D.G. Endothelial function and oxidant stress *Clin Cardiol.* 1997. 20 (11 Suppl 2) : II-11-7.

Hasegawa G., Hunter A.J., Charonis A.S. Matrix nonenzymatic glycosylation leads to altered cellular phenotype and intracellular tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1995. 270 (7) : 3278-83.

Helander T.S., Carpen O., Turunen O., Kovanen P.E., Vaheri A., Timonen T. ICAM-2 redistributed by ezrin as a target for killer cells. *Nature.* 1996. 382 (6588) : 265-8.

Heitz J., Svorcik V., Bacakova L., Rockova K., Ratajova E., Gumpenberger T., Bauerle D., Dvorankova B., Kahr H., Graz I., Romanin C. Cell adhesion on polytetrafluoroethylene modified by UV-irradiation in an ammonia atmosphere. *J Biomed Mater Res.* 2003. 67A(1):130-7.

Herring M., Smith J., Dalsing M., Glover J., Compton R., Etchberger K., Zollinger T. Endothelial seeding of polytetrafluoroethylene femoral popliteal bypasses: the failure of low-density seeding to improve patency. *J Vasc Surg.* 1994. 20 (4) : 650-5.

Hoerstrup S.P., Zünd G., Sodian R., Schnell A.M., Grünenfelder J., Turina M.I. Tissue engineering of small caliber vascular grafts. *Eur. J. Cardio-thorac Surg.* 2001. 20 : 164-169.

Hsieh H.J., Li N.Q., Frangos J.A. Shear-induced platelet-derived growth factor gene expression in human endothelial cells is mediated by protein kinase C. *J Cell Physiol.* 1992. 150 (3) : 552-8.

Huebsch J.B., Fields G.B., Triebes T.G., Mooradian D.L. Photoreactive analog of peptide FN-C/H-V from the carboxy-terminal heparin-binding domains of fibronectin supports endothelial cell adhesion and spreading on biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1996. 31 (4) : 555-67.

Huot J., Houle F., Marceau F., Landry J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res.* 1997. 80(3):383-92.

Hynes R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992. 69 (1) :11-25.

Iivanainen E., Kahari V.M., Heino J., Elenius K. Endothelial cell-matrix interactions. *Microsc Res Tech*. 2003. 60(1):13-22.

Imbert E., Poot A.A., Figdor C.G., Feijen J. Different growth behaviour of human umbilical vein endothelial cells and an endothelial cell line seeded on various polymer surfaces. *Biomaterials*. 1998. 19 (24) : 2285-90.

Imbert E., Poot A.A., Figdor C.G., Feijen J. Expression of leukocyte adhesion molecules by endothelial cells seeded on various polymer surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2001. 56 (3) : 376-81.

Imberti B., Morigi M., Zoja C., Angioletti S., Abbate M., Remuzzi A., Remuzzi G. Shear stress-induced cytoskeleton rearrangement mediates NF-kappaB-dependent endothelial expression of ICAM-1. *Microvasc Res*. 2000. 60 (2) : 182-8.

Jaffe E.A., Nachmn R.L., Becher C.G., Minick C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest*. 1976. 52: 2745-56.

Jalali S., Del Pozo M.A., Chen K. Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction wit specific extracellular matrix (ECM) ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001. 98 : 1042-46.

Jerome W.G., Handt S. Endothelium and matrix interactions. In *Modern visualisation of the endothelium*. Edited by J.M. Polack. 1998 : 93-112.

Johnson-Leger C., Aurrand-Lions M., Imhof B.A. The parting of the endothelium : miracle, or simply a junctionnal affair? *J Cell Sci*. 2000. 113: 921-933.

Karp G. Biologie cellulaire et moléculaire: concepts et expériences. De Boeck Université, Paris, Bruxelles. 1998. p 257, 264, 265, 270.

Kato S., Ando J., Matsuda T. mRNA expression on shape-engineered endothelial cells : adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. J Biomed Mater Res. 2001. 54 : 366-72.

Kotov N.A. Layer-by-layer self-assembly : the contribution of hydrophobic interactions. Nanostructured Materials. 1999. 12 : 789-96.

Kouvroukoglou S., Dee K.C., Bizios R.B., McIntire L.V. Endothelial cell migration on surfaces modified with immobilized adhesive peptides. Biomaterials. 2000. 21 : 1725-33.

Kurotobi K., Kaibara M., Suzuki Y., Iwaki M., Nakajima H., Kaneko S. Ion implantation into collagen-coated surfaces for the development of small diameter artificial grafts. Colloids and surfaces B : Biointerfaces. 2000. 19 : 227-35.

Kuzuya M., Satake S., Miura H., Hayashi T., Iguchi A. Inhibition of endothelial cell differentiation on a glycosylated reconstituted basement membrane comple. Exp. Cell Res. 1996. 226: 336-345.

Ladam G., Schaad P., Voegel J. C., Schaaf P., Decher G., Cuisinier F. In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. Langmuir. 2000a. 16: 1249-1255.

Ladam G., Gergely C., Senger B., Decher G., Voegel J.C., Schaaf P., Cuisinier F. Protein interactions between human serum albumin and polystyrene sulfonate/Polyallylamine multilayers. Biomacromolecules 2000b. 1 :674-687.

Ladam G, Schaaf P., Cuisinier F.J.G., Decher G., Voegel J.C.. Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films. Langmuir. 2001. 17 : 878-882.

Lampin M. Warocquier-clerout R., Legris C., Degrange M. Sigot-luizard M. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. J Biomed Mater Res. 1997. 36 :99-108.

Laube H.R., Duwe J., Rutsch W., Konertz W. Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2000. 120 (1) : 134-41.

Lavalle P., Gergely C., Cuisinier F.J.G., Decher G., Schaaf P., Voegel J.C., Picart C.. Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime : an in situ atomic force microscopy study. *Macromolecules.* 2002. 35 :4458-65.

Lee J.H., Lee J.W., Khang G., Lee H. B. Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces. *Biomaterials.* 1997. 18 : 351-358.

Legrand Y. Le sang et les vaisseaux. Hermann, France. 1987. 3-29.

Lehle K., Buttstaedt J., Birnbaum D.E. Expression of adhesion molecules and cytokines in vitro by endothelial cells seeded on various polymer surfaces coated with titaniumcarboxonitride. *J. Biomed Mater Res.* 2003. 65A(3): 393-401.

Lehoux S., Tedgui A. Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J Biomech.* In press.

Leseche G., Ohan J. Enhanced patency of venous Dacron grafts by endothelial cell seeding. *Ann. Vasc. Surg.* 1995. 9: 325-326.

L'Heureux N., Paquet S., Labbe R., Germain L., Auger F.A. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J.* 1998. 12 (1) : 43-5.

Lindbald B., Wright S.W., Sell R.L., Burkel W.E., Graham L.M., Stanley J.C. Alternative techniques of seeding cultured endothelial cells to ePTFE grafts of different diameter, porosities, and surface. 1987. *J. Biomed. Mater. Res.* 21: 1013-22.

Magnani A., Priamo A., Pasqui D., Barbucci R. Cell behaviour on chemically microstructured surfaces. *Mat. Science Eng.* 2003. 23: 315-28.

Maung K., Easty D.J., Hill S.P., Bennett D.C., Requirement for focal adhesion kinase in tumor cell adhesion. *Oncogene*. 1999. 18: 6824-28.

McAuslan B.R., Johnson G., Hannan G.N., Norris W.D., Exner T. Cell responses to biomaterials. II: Endothelial cell adhesion and growth on perfluorosulfonic acid. *J Biomed Mater Res*. 1988. 22(11):963-76.

Mendelsohn J.D., Barrett C.J., Chan V.V., Pal A.J., Mayes A.M., Rubner M.F. Fabrication of microporous thin films from polyelectrolyte multilayers. *Langmuir*. 2000. 16 : 5017-5023.

Mendelsohn J.D., Yang S.Y., Hiller J., Hochbaum A.I., Rubner M.F. Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films. *Biomacromolecules*. 2003. 4 (1) : 96-106.

Moncada S., Higgs E.A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*. 1991. 21(4) : 361-74.

Mooney D.J., Langer R., Ingber D.E. Cytoskeletal filament assembly and the control of cell spreading and function by extracellular matrix. *J Cell Sci*. 1995. 108 (6):2311-20.

Morita T., Kurihara H., Maemura K., Yoshizumi M., Nagai R., Yazaki Y. Role of  $Ca^{2+}$  and protein kinase C in shear stress-induced actin polymerization and endothelin 1 gene expression. *Circ. Res*. 1994. 75: 630-36.

Müller M., Rieser T., Dubin P., Lunkwitz K. Selective interaction between proteins and the outermost surface of polyelectrolyte multilayers : influence of the polyanion type, pH and salt. *Macromol Rapid Commun*. 2001. 22 : 390-95.

Müller M., Rieser T., Lunkwitz K. , Meier-Haack J. Polyelectrolyte complex layers: a promising concept for antifouling coatings verified by *in situ* ATR-FTIR spectroscopy. *Macromol Rapid Commun*. 1999. 20: 607-11.

Mutin M., Dignat-George F., Sampol J. Immunologic phenotype of cultured endothelial cells : quantitative analysis of cell surface molecules. *Tissue Antigens*. 1997 : 449-458.

Nagel T., Resnick N., Atkinson W.J., Dewey C.F., Gimbrone M.A. Shear stress semectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1994. 94:885-891.

Najman A. Verdy., Potron G., Isnard F. *Hématologie-Tome I*. Ed. (Edition marketing, éditeur des préparations granges écoles médecine 32, rue Bague 75015 Paris) 1994. 233-234.

Nerem R.M., Seliktar D. Vascular tissue engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2001. 3 : 225-243.

Nikolson L.E., Gao J., Abbott W.M., Hirschi K.K., Houser S., Marini R., Langer R. Functional arteries grown in vitro. *Science*. 1999. 284 : 489-493.

O'Toole T.E., Katagiri Y., Faull R.J., Peter K., Tamura R., Quaranta V., Loftus J.C., Shattil S.J., Ginsberg M.H. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J. Cell Biol.* 1994. 124: 1047-1059.

Ohtsuka A., Ando J., Korenaga R., Kamiya A., Toyama-Sorimachi N., Miyasaka M. The effect of flow on the expression of vascular adhesion molecule-1 by cultured mouse endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993. 193(1):303-10.

Ouwens M., Mikkers H.M.M., Van der Zon G.C.M. Stein-Gerlach M., Ullrich A., Maassen A. Insulin-induced tyrosine dephosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase active phosphotyrosine phosphatase 1D. *Biochem J.* 1996. 318: 609-614.

Owen J.D., Ruest P.J., Fry DW, Hanks SK. Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol.* 1999. 19: 4806-4818.



Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987. 327:524-6.

Parsons J.T., Martin K.H., Slack J.K., Taylor J.M., Weed S.A. Focal adhesion kinase : a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene*. 2000. 19: 5606-5613.

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

Picart C., Ladam G., Senger B., Voegel J.C., Schaaf P., Cuisinier F.J.G., Gergely C. Determination of structural parameters characterizing thin films by optical methods : A comparison between scanning angle reflectometry and optical waveguide lightmode spectroscopy. *J. Chem. Phys.* 2001 (b). 115. 1086–1094.

Poncelet P., George F., Papa S., Lanza F. Quantitation of hemopoietic cell antigens in flow cytometry. *Eur. J. Histochem.* 1996. 40 (1): 15-32.

Quirk R., Chan W., Davies M., Tendler S., Shakesheff K. Poly(L-lysine)-GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactid acid). *Biomaterials*. 2001. 22 :865-872.

Ramires P., Mirengi L., Romano A., Palumbo F., Nicolardi G. Plasma-treated PET surfaces improve the biocompatibility of human endothelial cells. *J Biomed Mater Res*. 2000. 51 : 535-539.

Rehman J., Li J., Orschell C.M., March K.L. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003. 107 (8) : 1164-9.

Resnick N.; Gimbrone M.A. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J*. 1995. 9: 874-882.

Richert L., Lavalle P., Vautier D., Senger B., Stoltz J.F., Schaaf P., Voegel J.C., Picart C. Cell interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules*. 2002. 3 : 1170-78.

Risbud M.V., Bhonde M.R., Bhonde R.R. Effect of chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel on proliferation and cytokine expression of endothelial cells : implications in islet immunoisolation. *J. Biomed. Mater Res*. 2001. 57 :300-305.

Romero L.I., Zhang D-N., Herron G.S., Karasek M.A. Interleukin-1 induces major phenotypic changes in human skin microvascular endothelial cells. *J. Cell Physiol*. 1997. 173 : 84-92.

Ruegg C., Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2003. 60 (6) : 1135-57.

Sackin H. Stretch-activated ion channels. *Kidney Int*. 1995. 48 (4) : 1134-47.

Salacinski HJ, Punshon G, Krijgsman B, Hamilton G, Seifalian A. A hybrid compliant vascular graft seeded with microvascular endothelial cells extracted from human omentum. *Artificial Organs*. 2001. 25(12) : 974-982.

Salacinski HJ, Tiwari A, Hamilton G, Seifalian AM. Cellular engineering of vascular bypass grafts : role of chemical coatings for enhancing endothelial cell attachment. *Med Biol Eng Comput*. 2001. 39 : 609-618.

Sampath R., Kukiela G.L., Smith C.W., Eskin S.G., McIntire L.V. Shear stress mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Ann Biomed Eng*. 1995. 23: 247-256.

Sanborn SL, Murugesan G, Marchant RE, Kottke-Marchant K. Endothelial cell formation of focal adhesions on hydrophilic plasma polymers. *Biomaterials*. 2002. 23 :1-8.

Sank A., Rostami K., Weaver F., Ertl D., Yellin., Nimni M., Tuan T.L. New evidence and new hope concerning endothelial seeding of vascular grafts. *Am J Surg.* 1992. 164: 199-204.

Sans E., Delachanal E., Duperray A. Analysis of the role of ICAM-1 in neutrophil transmigration using a reconstituted mamalian cell expression model: implication of ICAM-1 cytoplasmic domain and Rho-dependant signaling pathway. *J. Immunol.* 2001. 166: 544-551.

Santini M.T., Cmetti C., Indovina P.L., Morelli G., Donelli G. Polylysine induces changes in membrane electrical properties of K 562 cells. *J Biomed Mater Res.* 1997. 35 : 165-174.

Schaller M.D., Borgman C.A., Cobb B.S., Vines R.R., Reynolds A.B., Parsons J.T. pp125FAK, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1992. 89: 5192-5196.

Schaller M.D., Hildebrand J.D., Shannon J.D., Fox J.W., Vines R.R., Parsons J.T. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol.* 1994. 14: 1680-1688.

Schmidt S.P., Hunter T.J., Hirko M., Belden T.A., Evancho M.M., Sharp W.V., Donovan D.L. Small-diameter vascular prostheses: two designs of PTFE and endothelial cell-seeded and non seeded Dacron. *J. Vasc. Surg.* 1985. 2: 292-297.

Schmidt S.P., Hunter T.J., Sharp W.V. Malindzak G.S., Evancho M.M. Endothelial cells seeded four millimeter Dacron vascular grafts: effects of blood flow manipulation through the grafts.. *J. Vasc. Surg.* 1984. 1: 434-441.

Schneider A., Melmed R.N., Schwalb H., Karck M., Vlodavsky I., Uretzky G. An improved method for endothelial cell seeding on polytetrafluoroethylene small caliber vascular grafts. 1992. *J. Vasc. Surg.* 15: 649-656.

Schnittler H-J., Schneider S. Raifer H., Luo F., Dietrich P. Just I., Aktories K. Role of actin filaments in endothelial cell-cell adhesion and membrane stability under fluid shear stress. *Eur .J. physiol.* 2001. 442 : 675-687.

Schönhoff M. Self-assembled polyelectrolyte multilayers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 2003. in press.

Schwinté P., Ball V., Szalontai B., Haikel Y., Voegel J-C., Schaaf P. Secondary structure of proteins adsorbed onto or embedded in polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules.* 2002. 3 : 1135-1143.

Shenoy D.B., Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Mohwald H. Layer-by-Layer Engineering of Biocompatible, Decomposable Core-Shell Structures. *Biomacromolecules.* 2003. 4 (2) : 265-72.

Shiratori S.S. Rubner M.F. pH-dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules.* 2000. 33 : 4213-19.

Short S.M., Talbott G.A., Juliano R.L. Integrin-mediated signaling events in human endothelial cells. *Molecular Biology of the cell.* 1998. 9 : 1969-80.

Sirois E., Charara J., Ruel J., Dussault J.C., Gagnon P., Doillon C. J. Endothelial cells exposed to erythrocytes under shear stress : An in vitro study. *Biomaterials.* 1998. 19 : 1925-34.

Stansby G., N. Shukla, B. Fuller, G. Hamilton. Seeding of human microvascular endothelial cells onto polytetrafluoroethylene graft material. *Br. J. Surg.* 1991. 78 :1189-1192.

Stoltz J.F, Boisseau M., Muller S., Wang X., Legrand S., Labrador M.V. Hémorhéologie et cellules endothéliales vasculaires. *Journal des maladies vasculaires (Paris).* 1999. 24(2) : 99-109.

Stoltz J.F., Dumas D., Wang X., Payan E., Mainard D., Paulus F., Maurice G., Netter P., Muller S. Influence of mechanical forces on the cells and tissues. *Biorheology*. 2000. 37: 3-14.

Stoltz J.F., Blondel W., Bensoussan D., Lehalle B., Wang X., Labrador V. New trends in vascular engineering. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2001. 24 : 263-72.

Storck J., Ab Del Razek H., Zimmermann E. R. Effect of polyvinyl chloride plastic on the growth and physiology of human umbilical vein endothelial cells. *Biomaterials*. 1996. 17 : 1791-94.

Takahashi K. Adsorption of basic fibroblast growth factor onto Dacron vascular prosthesis and its biological efficacy. *Artif Organs*. 1997. 21 (9) : 1041-6.

Tanabe Y., Saito M., Ueno A. Mechanical stretch augments PDGF receptor beta expression and protein tyrosine phosphorylation in pulmonary artery tissue and smooth muscle cells. *Mol. Cell Biochem*. 2000. 215: 103-113.

Tedgui A., Bernard C. Cytokines, immuno-inflammatory response and atherosclerosis. *Eur Cytokine Netw*. 1994. 5(3) : 263-70.

Tedgui A., Mallat Z. Mécanismes inflammatoires et anti-inflammatoires dans la paroi vasculaire. *Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux*. Flammarion. 2002. p 396-407.

Tieke B., van Ackern F., Krasemann L., Toutianoush A. Ultrathin self-assembled polyelectrolyte multilayer membranes. *Eur. Phys. J. E*. 2001. 5: 29-39.

Tiwari A., Kidane A., Salacinski H., Punshon G., Hamilton G., Seifalian A.M. Improving endothelial cell retention for single stage seeding of prosthetic grafts: use of polymer sequences of arginine-glycine-aspartate. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003. 25 (4) : 325-9.

Tryoen-Toht P., Vautier D., Haikel Y., Voegel J.C., Shaaf P., Chluba J., Ogier J. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002. 60 : 657-667.

Tsuboi H., Ando J., Korenaga R., Takada Y., Kamiya A. Flow stimulates ICAM-1 expression time and shear stress dependently in cultured human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. 3 : 988-996.

Van Kooten T.G., Klein C.L., Wagner M., Kirkpatrick C.J. Focal adhesions and assessment of cytotoxicity. *J Biomed Mater Res.* 1999. 46 : 33-43.

Van Wachem. Adsorption of fibronectin derived from serum and from human endothelial cells onto tissue culture polystyrene. *J Biomed Mater Res.* 1987, 21 : 1317-1327.

Vautier D., Karsten V., Egles C., Chluba J., Schaaf P., Voegel J.C., and Ogier J. Polyelectrolyte multilayer films modulate cytoskeletal organization in chondrosarcoma cells. *J. Biomater. Sci. Polymer edn.* 2002. 13: 713-32.

Vohra R.K., Thomson G.J., Sharma H., Carr H., Walker M.G. comparaison of different vascular prostheses and matrices in relation to endothelial seeding. 1991. *Br J Surg.* 78 : 417-20.

Vuori K. Integrin signaling : tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *Journal of membrane biology.* 1998. 165 :191-199.

Walluscheck K.P., Steinhoff G., Kelm S., Haverich A. Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides. 1996. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 12: 321-330.

Wang D.A., Ji J., Sun Y.H., Shen J.C., Feng L.X., Elisseeff J.H. In situ immobilization of proteins and RGD peptide on polyurethane surfaces via poly(ethylene oxide) coupling polymers for human endothelial cell growth. *Biomacromolecules.* 2002. 3 (6) : 1286-95.

Weinberg C.B., Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*. 1986. 231(4736) : 397-400.

Williams P.L., Warwick R., Dyson M., Bannister L., Werneck H. Gray's anatomy, thirty-eight edition, Churchill Livingstone, Great Britain. 1995. pp1451-1459, pp36-43.

Wissink M.J.B., Beernink R., Poot A.A., Engers G.H.M., Beugeling T. van Aken W.G., Feijen J. Improved endothelialization of vascular grafts by local release of growth factor from heparinized collagen matrices. *Journal of controlled release*. 2000, 64 : 103-114.

Withfield P. *Le corps humain*. Paris: édition Solar. 1996; pp124-125.

Xu L.H., Owens L.V., Sturge G.C., Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth Differ*. 1996. 7: 413-418.

Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Goto K., Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels. *J Hypertens Suppl*. 1988. 6(4):S188-91.

Yusuf S. The global problem of cardiovascular disease. *Int J Clin Pract Suppl*. 1998. 94:3-6.

Zhang J.C., Wotja J., Binder B.R. growth and fibrinolytic parameters of human umbilical vein endothelial cells seeded onto cardiovascular grafts. 1995. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 109: 1059-1065.

Zhao J.H., Reiske H., Guan J.L. Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase. *J Cell Biol*. 1998. 143(7) : 1997-2008.

## **PUBLICATIONS**



## Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification

C. Boura<sup>a</sup>, P. Menu<sup>b</sup>, E. Payan<sup>c</sup>, C. Picart<sup>d</sup>, J.C. Voegel<sup>d</sup>, S. Muller<sup>a</sup>, J.F. Stoltz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, UMR CNRS-INPL-UHP 7563 et IFR 111, Faculté de Médecine, Bât E, 9 Av de la forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy 54505, France*

<sup>b</sup> *Laboratoire d'hématologie et de Physiologie, Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun, 54001 Nancy, France*

<sup>c</sup> *Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires, UMR CNRS-UHP 7561 et IFR 111, Faculté de Médecine, 9 Av de la forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France*

<sup>d</sup> *INSERM U 595, Faculté de Chirurgie Dentaire, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France*

Received 11 October 2002; accepted 24 March 2003

### Abstract

Endothelial cell seeding constitutes an appreciated method to improve blood compatibility of small-diameter vascular grafts. In this study, we report the development of a simple innovative technique based on multilayered polyelectrolyte films as cell adhesive substrates. Polyelectrolyte multilayered films ending by poly(sodium-4-styrenesulfonate)/poly(allylamine hydrochloride) (PSS/PAH) or poly(L-glutamic acid)/poly(D-lysine) (PGA/PDL) could enhance cell adhesion by modification of the physico-chemical properties of the surface. The biological responses of human umbilical vein endothelial cells seeded on the polyelectrolyte multilayer films, on PDL or PAH monolayers, and on control surfaces, were evaluated in terms of initial attachment, growth, cellular metabolic activity, endothelial phenotype, and adhesion. The results showed that polyelectrolyte multilayers neither induce cytotoxic effects nor alter the phenotype of the endothelial cells. The polyelectrolyte multilayered films enhanced initial cell attachment as compared to the polyelectrolyte monolayer. Cell growth observed on the films was similar to that on TCPS. Among the different coating tested, the film ending by PSS/PAH exhibited an excellent cellular biocompatibility and appeared to be the most interesting surface in terms of cellular adhesion and growth. Such films could be used to cover hydrophobic (cell resistant) substrates in order to promote cell colonization, thereby constituting an excellent material for endothelial cell seeding.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Polyelectrolyte multilayers; HUVEC; Tissue engineering; Cytocompatibility; Cell growth; Cell adhesion

### 1. Introduction

Cardiovascular pathologies are one of the major causes of death in the western societies. Such pathologies require in many situations a vascular surgery. Autologous vessels constitute currently the material of choice to be used for vascular grafts. The sustained function of the natural grafts is attributed to the presence of viable endothelial cells on the luminal surface [1]. Unfortunately, many patients do not have appropriate blood vessels to be used as replacement, either because of diseased blood vessels or previous surgery. Synthetic vascular grafts have been successfully

used in the treatment of the pathology of large arteries (internal diameter >6 mm), but the replacement of the smaller sized arteries (internal diameter <6 mm) was often unsuccessful [2]. Moreover, synthetic vascular grafts with diameter less than 6 mm are known to be highly thrombogenic and need special treatments to improve their patency after implantation. Cell-seeding technology is an appreciated method to create a biomimetic micro-environment for the endothelium and for improvement of the functionality of synthetic vascular grafts [3–6]. However, human endothelial cells show little adhesion and no proliferation on the currently available vascular graft materials [7]. The main requirement for a successful seeding of biomaterial surfaces by a monolayer of endothelial cells is a scaffold that can facilitate sufficient cell adhesion and promote cell proliferation [8]. Tissue engineering offers the

\*Corresponding author. Tel.: +33-3-83-68-34-52; fax: +33-3-83-68-34-59.

E-mail address: [stoltz@hemato.u-nancy.fr](mailto:stoltz@hemato.u-nancy.fr) (J.F. Stoltz).

potential of providing vessels that can be used to replace diseased and damaged blood vessels [9]. It would be interesting to pre-coat these vessels in order to increase their cell adhesive properties. Recently, a new type of surface modification technique has been proposed based on the alternate adsorption of oppositely charged polyelectrolytes [10]. This versatile technique consists in building up thin multilayered polyelectrolyte films. The electrostatic interactions between a charged polyelectrolyte and an oppositely charged surface leads to the polyelectrolyte adsorption from aqueous solution and to the surface charge reversal, enabling a second adsorption of an oppositely charged polyelectrolyte. The buildup can be pursued by further additions of polycation and polyanion layers. This new layer-by-layer deposition method mainly based on electrostatic interactions offers also large possibilities of varying the physico-chemical properties of the film. Among them is the large panel of available polyelectrolytes for the film buildup, pH (mainly for weak polyelectrolytes) [11], ionic strength modifications [12] and the number of deposited layers which may change surface roughness and stiffness. These parameters together with the possibility of functionalizing the films by inserting into the architectures proteins (growth factors, etc.) or peptides [13] covalently bound to the polyelectrolytes (such as RGD, etc.) could allow good cell/biomaterial interactions and also induce specific cellular responses [14]. Different types of multilayered films have already been used for biomaterial applications, such as poly(L-lysine)/alginate as non-adhesive barrier [15] or dextran/chitosan as anticoagulating or procoagulating coating [16].

Recently, the viability, adhesion, and adherence of osteoblast-like cells and of chondrosarcomas cells have been investigated on poly(sodium-4-styrenesulfonate)/poly(allylamine hydrochloride) (PSS/PAH) or poly(L-glutamic acid)/(poly(L-lysine) (PGA/PLL) films [17,18]. The results showed that some polyelectrolyte films constitute a good interfacial micro-environment at the material surface. In this way, these films could be used as a coating for vascular grafts in order to increase cell adherence and to promote cell proliferation. Up to now, there was no study on primary endothelial cells on polyelectrolyte films in order to investigate if these films could enhance cell adhesion and favor cell viability. It has been found that the behavior of various cell types on polymeric materials depends on surface properties like chemistry, roughness, rigidity and wettability [19,20], and can change from one cell type to another. In consequence, it is of prime importance to evaluate the cellular responses of endothelial cells on different polyelectrolyte multilayer films together with the eventual toxicity of these films.

In this study, different polycations, poly(ethylene imine) (PEI), poly(allylamine hydrochloride) (PAH),

and poly(D-lysine) (PDL), and polyanions, poly(sodium-4-styrenesulfonate) (PSS) and poly(L-glutamic acid) (PGA), were used to build up two types of films: PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub> and PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL. Some of these polyelectrolytes (PDL and PGA) are currently employed in biomedical applications (e.g., gene-delivery system), and PDL has widely been used in the monolayer form to enhance the substrate adhesiveness. The buildup of similar polyelectrolyte multilayered films has been already characterized by means of optical techniques [21,22]. Regarding the biocompatibility of these films, previous studies demonstrated that the outermost layer is an important factor [17,18].

The aim of this study was thus to evaluate the benefit of two polyelectrolyte multilayer architectures as biologically compatible substrates. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were used as a model for the endothelium. In order to provide information on cellular responses, cell morphology, growth, metabolic activity, and phenotype were investigated as well as the initial cell attachment and the adhesion of cells on the surfaces.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Polyelectrolyte multilayers

Anionic PSS (MW=70 000), cationic PAH (MW=70 000) and cationic PEI (MW=750 000) were purchased from Aldrich. Anionic PGA (MW=50 000–100 000) and cationic PDL (MW=30 000–70 000) were purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France). The polyelectrolyte multilayers were built from polyelectrolyte solutions at 10 mg/ml (PEI), 5 mg/ml (PSS and PAH), and 1 mg/ml (PGA and PDL) dissolved in 1 M NaCl solution.

Each experiment was preceded by a cleaning step of the cover glasses (14 mm diameter) during 15 min at 100°C with 10<sup>-2</sup> M sodium dodecyl sulfate (SDS). This procedure was followed by an extensive ultrapure water rinse. The cover glasses were then brought in contact during 15 min at 100°C with 10<sup>-1</sup> M HCl and finally extensively rinsed with ultrapure water. The cover glasses were then placed in a 24-well plate and PEI solution was incubated for 30 min. After this period, the cover slides were extensively rinsed with ultrapure water. Then, the polyanions (PSS or PGA) and polycations (PAH or PDL) were alternatively adsorbed (contact time of 20 min). Each polyelectrolyte adsorption was followed by an intensive ultrapure water rinse. Thus, progressively, PEI, PEI-PSS, PEI-(PSS-PAH), etc. films were built up. A precursor film of PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub> was always first adsorbed, according to previous studies [13,17,18]. The process was pursued up to the buildup of PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL or PEI-(PSS-

PAH)<sub>3</sub> films, that will be denoted ~PGA–PDL or ~PSS–PAH terminating films in the subsequent paragraphs.

Film characterization was determined by means of optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) and atomic force microscopy (AFM).

The film buildup process was followed in situ by OWLS. Briefly, OWLS is sensitive to the penetration depth of an evanescent wave through the film near the waveguide surface and gives access to the optical properties of the films [23]. Details of the experimental setup and procedure have been previously described [21]. At the beginning of the experiment, 1 M NaCl solution is flushed through the measurement cell (internal volume of 37  $\mu$ l) at a constant flow rate (10 ml/h) with a syringe-pusher until constant values of the incoupling angles are reached. Then, the buffer flow is stopped and 100  $\mu$ l of PEI solution are manually injected in the cell. When a stable adsorption signal is obtained, the buffer flow is restarted for about 15 min to rinse off the excess material from the cell. In the same way we continued with the alternate adsorption of PSS and PAH (or PGA and PDL) on the waveguide. The raw signals obtained by OWLS, NTE and NTM for the transverse electric and transverse magnetic modes, respectively, were analyzed by using the homogeneous and isotropic monolayer model which allows the refractive index  $n_A$  and the thickness  $d_A$  to be determined [21]. Mass data are calculated according to the De Feijter formula [24] (adsorbed mass =  $(dn/dc)^{-1} \times (n_A - n_C) \times d_A$  with  $dn/dc = 0.197 \text{ cm}^3/\text{g}$  for the polyelectrolyte solutions [25] and  $n_C = 1.3420$  is the refractive index of the 1 M NaCl solution).

Atomic force images of the multilayered films built on the 14 mm glass slides were obtained in contact mode in buffer with Nanoscope IV from Digital Instruments (Santa Barbara, CA, USA). Cantilevers with a spring constant of 0.03 N/m and with silicon nitride tips were used (Model MLCT-AUHW Park Scientific, Sunnyvale, CA, USA). Several scans were always performed over a given surface area. These scans had to produce reproducible images to ascertain that there is no sample damage induced by the tip. Deflection and height mode images are scanned simultaneously at a fixed scan rate (between 2 and 4 Hz) with a resolution of  $512 \times 512$  pixels. The rms (root-mean-square) values of samples surfaces are calculated from images covering an area of  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ . Then a square of  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  is displaced on the image, and rms values at each position are calculated.

## 2.2. Cell culture and seeding

HUVEC were isolated from fresh umbilical cords according to the method of Jaffe et al. [26]. HUVEC were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in 25 cm<sup>2</sup> tissue-

culture-treated flask in complete medium. The medium consisted of an equal mixture of media M199 and RPMI 1640, supplemented with 20% human serum, 2 mM L-glutamin, 20 mM HEPES, 100 IU/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and 2.5  $\mu$ g/ml fungizon®. Before each experiment, the 24-well plates were irradiated by UV during 10 min. The cells were used at the second passage culture and accordingly the experiments seeded at  $2 \times 10^4$  or  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> on ~PGA–PDL or ~PSS–PAH-ending polyelectrolyte multilayers, on PDL or PAH monolayers, and on glass and tissue culture polystyrene (TCPS).

## 2.3. Cell morphology

The cell morphology was evaluated by toluidine blue coloration technique. Endothelial cells seeded on different substrates were observed after 72 h of growth, fixed with cold methanol for 10 min at 4°C and stained with toluidine blue (1% in distilled water) for 2 min at room temperature. Then, images were taken with a phase contrast optical microscope.

## 2.4. Initial cell attachment and cell growth

The initial attachment and growth of HUVEC were measured by fluorescent Hoechst 33342 incorporation into cell DNA according to the procedure of Papadimitriou [27].

For initial attachment, the cells were seeded at a density of  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> on the surfaces, the media was removed after 3 h of incubation. The non-adherent cells were eliminated by washes with PBS and the adherent cells were fixed for 10 min with absolute methanol at –20°C. Then the cells were washed twice with PBS to ensure complete removal of methanol. Stock solution of Hoechst 33342 (Sigma, St Quentin Fallavier, France) at 1 mg/ml was prepared in distilled water. Prior to each assay the dye stock solution was diluted 1/50 in Dulbecco's medium without red phenol and 500  $\mu$ l were added to each well. After 30 min, the dye solution was removed and the cells were washed twice for 2 min with Dulbecco's medium to eliminate any unbound dye. The DNA-bound dye was extracted by adding to each well 1 ml of denatured ethanol. After 5 min of reaction, 1 ml of the mixture was transferred to a fluorescence cuvette which contained 1 ml of denatured ethanol. Fluorescence intensity was measured with a fluorescence spectrophotometer (SLM, Aminco, Urbana, USA) with the excitation and emission wavelengths set at 360 and 460 nm, respectively. Denatured ethanol was used as a blank standard. In order to evaluate the number of cells/cm<sup>2</sup>, standards containing a known number of cells were used. The percentage of cell initial attachment was calculated by using TCPS as reference.

For cell growth experiments, the cells were seeded at  $2 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>. After 24 and 72 h of growth on the different surfaces, the same procedure was used for the measurement of cell number.

### 2.5. Cell adhesion assay

In order to evaluate the cell adhesion on different surfaces, the cells were exposed to an enzymatic treatment. The concentration and incubation time of enzymatic solution were adapted for obtaining a partial detachment of HUVEC on control surfaces. HUVEC were seeded at a density of  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and cultured for 48 h. The cells were previously washed twice with PBS and then exposed for 5 min to 500  $\mu$ l of 0.0025% trypsin-EDTA solution in PBS (Sigma, France). The enzymatic digestion was stopped with complete medium incubation. The control was the same substrate without enzymatic treatment. The number of cells was determined by Hoechst 33342 incorporation as previously described and the percentage of adherent cells was estimated by the following relation: (number of cells adherent in the treated wells/number of cells in the control wells)  $\times$  100.

### 2.6. Metabolic activity

The measured index of metabolic activity was the colorimetric MTT (dimethylthiazol diphenyltetrazolium bromide) assay according to the procedure of Mossmann [28]. HUVEC were seeded at  $2.10^4$  cells/cm<sup>2</sup> on the surfaces for 72 h, then MTT (Sigma, St Quentin Fallavier, France) dissolved in PBS at 2 mg/ml was added to each well (125  $\mu$ l/500  $\mu$ l medium). After a 4 h incubation at 37°C to allow the yellow dye to be transformed into blue formazan crystals by mitochondrial dehydrogenases, 800  $\mu$ l of acidified isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol) was added to each well and thoroughly mixed with a pipettor to dissolve the dark blue crystals. The supernatants were removed, briefly centrifuged, and read within 30 min using a test wavelength of 570 nm and a reference one of 700 nm. The optical density difference  $OD = OD_{570\text{ nm}} - OD_{700\text{ nm}}$  was related to the number of cells in order to estimate the metabolic activity of the cells.

### 2.7. Endothelial cell phenotype

The phenotype of endothelial cells was evaluated by the assessment of the von Willebrand factor (vWf) expression by flow cytometry. After 72 h of culture, endothelial cells were detached with the aid of trypsin/EDTA (0.125%, Sigma, St Quentin Fallavier, France) at 37°C, washed once with complete medium and secondly with PBS containing 0.5% (w/v) BSA. Cells were immediately fixed with 1% paraformaldehyde and

permeabilized in the presence of 0.1% Triton X-100 followed by a 40 min incubation at room temperature with 200  $\mu$ l of 1/50 diluted monoclonal anti-vWf (clone F8/86, Dako, Trappes, France) in PBS/BSA. Subsequently, the cells were washed twice with 500  $\mu$ l PBS/BSA to remove excess of antibody. These cells were incubated for 30 min at room temperature with 200  $\mu$ l of a polyclonal goat-antimouse IgG conjugated with fluorescein isothiocyanate (GAM-FITC; Dako, Trappes, France). The excess fluorescent antibody was removed from the cells by washing twice with 500  $\mu$ l PBS/BSA. For each surface, the non-specific binding of GAM-FITC was evaluated by the incubation of cells only with this antibody (blank sample). Positive cells were distinguished from negative ones by means of a blank sample by using FACscan analyzer (Becton Dickinson). Within the endothelial cell area, as determined by forward and sideward scattering, 10 000 events were collected.

### 2.8. Statistical analysis

The results were expressed as a mean  $\pm$  SEM for each substrate ( $n = 6$ , except glass  $n = 3$ ). One-factor ANOVA with PLSD Fisher correction (Statview IV®, Abacus Concepts Inc., Berkley, CA, USA) was used to analyze the data. *P* values smaller than 0.05 were considered as significant.

## 3. Results

### 3.1. Multilayered film characterization

The in situ buildup of the multilayered films in the presence of 1 M NaCl was followed by OWLS (Fig. 1). Qualitatively, the raw NTM signal increases when a new layer is deposited indicating an adsorption of material on the waveguide surface. The thickness and the adsorbed amounts were determined from the raw NTE and NTM signals using the homogeneous and isotropic monolayer model [21]. Both increase linearly with the number of deposited layers, in accordance with literature data for this type of PSS/PAH films [25] (see inset of Fig. 1). The thickness was of 38.1 nm for the  $\sim$ PSS-PAH-ending film and 19.7 nm for the  $\sim$ PGA-PDL-ending film with a refractive index of 1.48. The corresponding adsorbed masses were 2.80 and 1.62  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, respectively. The uniformity of the deposited film at the cellular scale was also confirmed by in situ AFM (Fig. 2). The outer structure of the films appears to be constituted of regularly distributed small dots for each type of film. For the  $\sim$ PGA-PDL-ending films, small granules were visible whose size is of the order of 50–100 nm. The rms was of 2.6 nm. For the

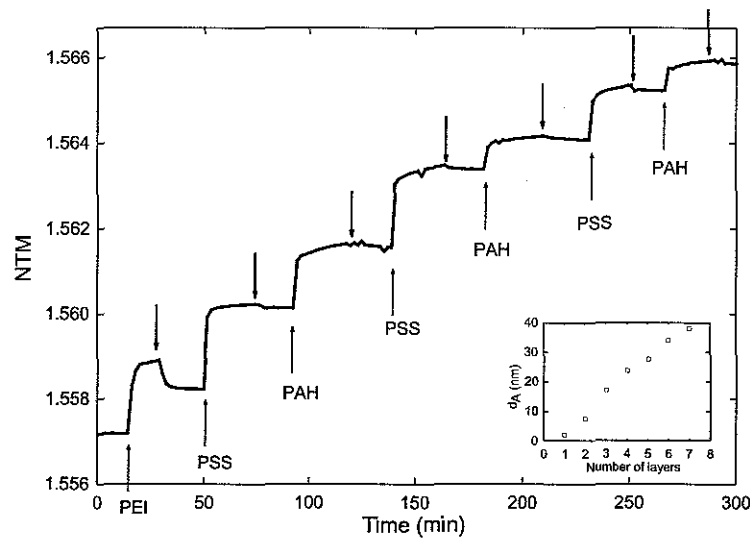


Fig. 1. Raw NTM signal obtained during a PEI-(PSS/PAH)<sub>3</sub> multilayer buildup as measured by the OWLS technique, as a function of time. Thin upward arrows indicate polyelectrolyte injection and thin downward arrows indicate the injection of the solution for rinsing. The inset represents the evolution of the thickness as a function of the number of deposited layers.

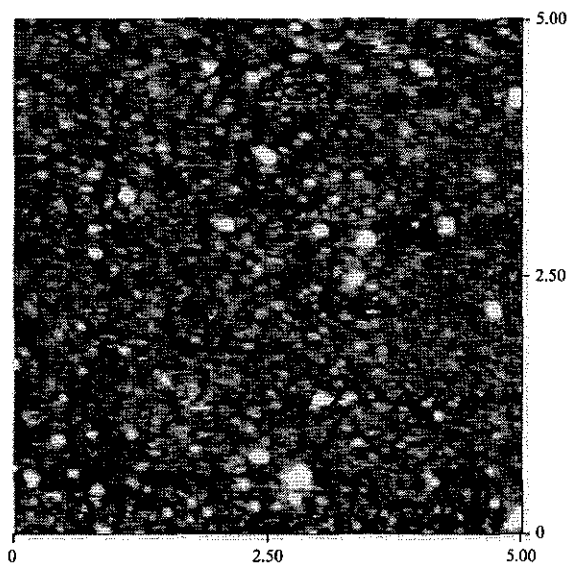


Fig. 2. AFM height mode image in liquid obtained for a PEI-(PSS/PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL film deposited on a glass substrate. Image dimensions are  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , and the Z scale is 15 nm.

~PSS-PAH-ending films, the characteristic sizes of the dots range from 30 to 80 nm.

### 3.2. Cell morphology

The morphology of endothelial cells cultured on polyelectrolyte multilayers exhibit a typical cobblestone pattern as shown in Fig. 3. The morphology of cells was similar to that observed on TCPS or on the glass control

surface (data not shown). A higher cell density on polyelectrolyte multilayers as compared to monolayers was also observed.

### 3.3. Initial cell attachment and cell growth

For initial cell attachment (Table 1), the cell number attached on ~PSS-PAH (106.9%), glass (95.0%) and TCPS (100%) was not different from the initial cell density after 3 h of contact. The cell number on ~PGA-PDL (77.5%) was slightly smaller but not significantly different from glass and TCPS. Cell attachment was however lower for PDL (51.8%) and PAH (55.5%) monolayers.

After a 24 h growth, the number of cells on ~PGA-PDL and ~PSS-PAH films (equal to  $1.65$  and  $1.72 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, respectively) was identical to that on glass ( $1.75 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and TCPS ( $1.40 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>). On the other hand, cell densities on PDL ( $0.79 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and PAH monolayers ( $0.75 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) were lower than on glass or TCPS. After a 72 h growth, the cell density was the highest on glass ( $6.67 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>). But the densities on the multilayered films were comparable to that of TCPS. The cell numbers on PDL and PAH monolayers ( $2.89$  and  $2.02 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, respectively) were again significantly lower than for TCPS for the same incubation time.

### 3.4. Cell adhesion assay

The enzymatic treatment with trypsin (Table 1) evidenced that the number of adherent cells is low on

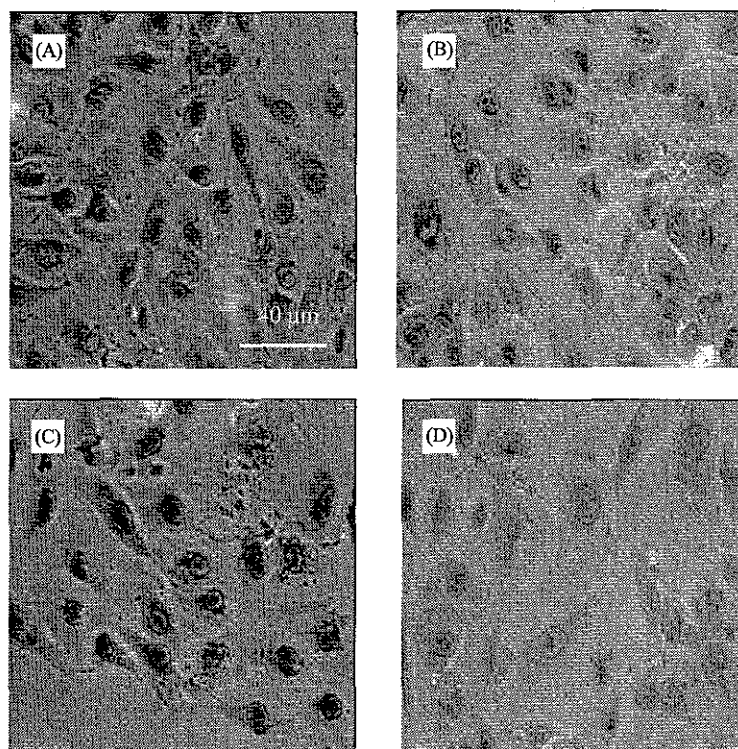


Fig. 3. Morphology of HUVEC seeded on PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL (A), PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub> (B), PDL monolayer (C), PAH monolayer (D) after 72 h of growth (original magnification  $\times 200$ ).

Table 1  
Initial attachment, growth and adhesion after trypsin treatment of HUVEC seeded on the polyelectrolyte multilayers and control surfaces

| Surfaces | % of initial cell attachment | Number of cells at 24 h<br>( $\times 10^4$ cells/cm <sup>2</sup> ) | Number of cells at 72 h<br>( $\times 10^4$ cells/cm <sup>2</sup> ) | % of adherent cells after<br>trypsin treatment |
|----------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| ~PGA-PDL | 77.5 $\pm$ 10.0              | 1.65 $\pm$ 0.54                                                    | 4.08 $\pm$ 0.68†                                                   | 33.8 $\pm$ 9.3*                                |
| ~PSS-PAH | 106.9 $\pm$ 19.3             | 1.72 $\pm$ 0.62                                                    | 4.93 $\pm$ 0.96†                                                   | 83.1 $\pm$ 13.3*†                              |
| PDL      | 51.8 $\pm$ 13.8*†            | 0.79 $\pm$ 0.14*†                                                  | 2.89 $\pm$ 0.62*†                                                  | 88.6 $\pm$ 6.2*†                               |
| PAH      | 55.5 $\pm$ 15.7*†            | 0.75 $\pm$ 0.20*†                                                  | 2.02 $\pm$ 0.43*†                                                  | 83.8 $\pm$ 10.3*†                              |
| Glass    | 95.0 $\pm$ 4.0               | 1.75 $\pm$ 0.14                                                    | 6.67 $\pm$ 0.36*                                                   | 32.5 $\pm$ 4.0*                                |
| TCPS     | 100                          | 1.40 $\pm$ 0.18                                                    | 4.73 $\pm$ 1.03†                                                   | 63.9 $\pm$ 13.2                                |

~: PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>; \* $p < 0.05$  versus TCPS and † $p < 0.05$  versus glass.

glass (32.5%) and on ~PGA-PLL-ending films (33.8%). It is significantly higher for the ~PSS-PAH-ending films, PDL (87.1%) and PAH (83.1%) monolayers than for glass or TCPS (63.8%).

### 3.5. Metabolic activity

The metabolic activity of cells (Fig. 4) measured by tetrazolium salt (MTT) assay was not significantly different after 72 h of growth on polyelectrolyte multilayer films and on a PDL monolayer in comparison to cells growing on glass or TCPS. On the other hand, the cells grown on a PAH monolayer had a significantly

higher metabolic activity than the cells grown on glass or TCPS.

### 3.6. Endothelial cell phenotype

The persistence of endothelial cell differentiation onto different coatings was moreover examined by von Willebrand factor-antigen (vWf) detection on cultured cells. About 80% of cell population expressed vWf after 72 h of contact on the polyelectrolyte multilayered films and on the polyelectrolyte monolayers (Fig. 5). This percentage was comparable to that on TCPS and statistically higher than for the cells cultured on glass.

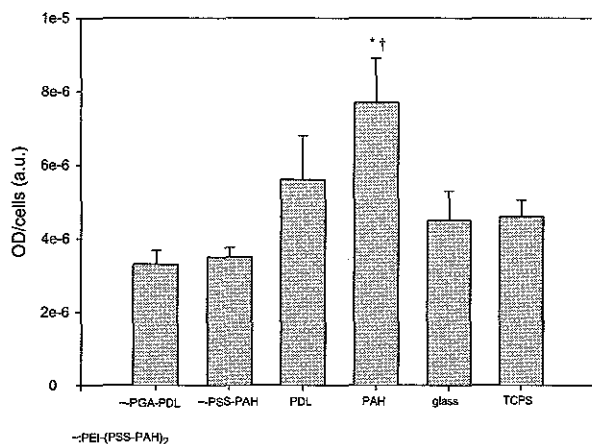


Fig. 4. Metabolic activity of HUVEC seeded on PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL, PAH, glass and TCPS after 72 h of growth. †*p* < 0.05 versus glass and \**p* < 0.05 versus TCPS.

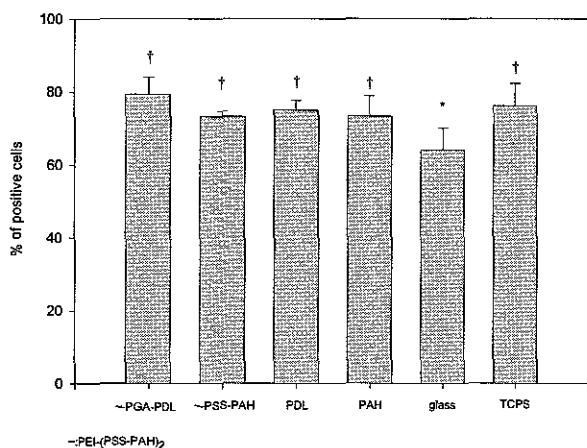


Fig. 5. Expression of von Willebrand factor by HUVEC seeded on PEI-(PSS-PAH)<sub>2</sub>-PGA-PDL, PEI-(PSS-PAH)<sub>3</sub>, PDL, PAH, glass and TCPS after 72 h of growth. †*p* < 0.05 versus glass, \**p* < 0.05 versus TCPS.

#### 4. Discussion

In this study, we explored a new type of surface coating aimed at rendering adherent tissue-engineered surfaces for vascular repair. These coatings consist of thin polyelectrolyte multilayered films onto which endothelial cells are seeded. The main advantages of such multilayered films result from their easy buildup and the potentiality of varying their physico-chemical properties by changing the preparation conditions or the subsequent treatment [29]. We evaluated these films which can be finely tuned by alternated polyanion and polycation adsorptions with the objective of finding a surface that could enhance endothelial cells adhesion and increase their proliferation. This could favor the

development of endothelial cells on a synthetic vascular graft and cell attachment after implantation. As a first test, it was important to examine whether the polyelectrolyte films have an influence on the cell adhesion and growth. Polylysine, in particular, was previously found to lead to changes in membrane electrical properties and could therefore alter the cellular functions [30]. Here, we use the polycation PDL as the outermost layer of one type of film, but we did not observe any peculiar behavior regarding cell viability and proliferation. Also, the use of synthetic polyelectrolytes such as PSS and PAH in the multilayered films led to a very good biocompatibility for endothelial cells as recently observed for osteoblast like cells [17] and for chondrosarcoma cells [18].

The cell morphology is an important parameter to consider. Here, for both types of multilayered films (~PGA-PDL and ~PSS-PAH) and for polyelectrolyte monolayers, the cells exhibited a typical cobble-stone shape. This shape is of particular importance since it is needed for the neo-endothelium formation when endothelial cells are employed in the preparation of vascular hybrid grafts.

In the same way, even if the seeding density was low ( $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>), the growth of cells on polyelectrolyte multilayers was similar to that on TCPS. In contrary, cell growth on the polyelectrolyte monolayers was much lower (~50% after three days of culture) than for the multilayers. The decrease of cellular density resulted essentially from a lack of initial cell attachment onto polyelectrolyte monolayers, but the monolayers did not induce a cytotoxic effect after the adhesion of the cells. One may conjecture that the glass substrate is not fully covered when a polylysine monolayer is adsorbed. AFM observations have been previously performed on a PLL monolayer [31]. The polylysine appears homogeneously distributed and exhibits a low surface roughness (rms 0.35 nm). Visible dots whose lateral dimensions are of the order of 50 nm were visible and may correspond to individual molecules. The images did not allow one to conclude whether polylysine is also adsorbed on the silica surface between the dots or if this corresponds to bare silica. On the contrary, the AFM images for the ~PGA-PDL and ~PSS-PAH-ending films evidenced that the substrate was fully covered with a surface rugosity of about 10 nm. The full coverage of the surface may explain why the initial adhesion is higher in the case of the multilayered films.

Surface charge may be an important parameter with respect to cell adhesion [32], but both multilayered films and monolayers are positively charged, as was shown by zeta potential measurements on PSS/PAH films [33] and on PGA/PLL films [21]. Each new addition of a polyelectrolyte layer can change the surface charge, but also parameters such as surface viscoelasticity, surface roughness, or even surface porosity [29,34].

Several studies [35,36] have already demonstrated the importance of the roughness in the cellular adhesion. As a consequence, the physico-chemical properties of polyelectrolyte multilayers appear important.

It is known that the substrate may influence cellular functionalities. The present data show that the polyelectrolyte multilayers did not induce any change in metabolic activity. The cells expressed a normal level of mitochondrial dehydrogenase activity after 72 h of contact with the polyelectrolyte multilayer films. The values of metabolic activity of cells on the PAH monolayer were due to the decrease of growth, which induced a longer involvement of cells in a metabolically active state. The polyelectrolyte multilayers neither alter the mitochondrial integrity nor their functionality, excluding cytotoxic effects on such thin films. The results show also that cells growing on polyelectrolyte multilayers highly expressed the von Willebrand factor (vWf) which is only expressed in vascular endothelial cells and megakaryocytes and widely used as a phenotype marker of endothelial cells [37]. This means that the cells maintain their endothelial functionality on the polyelectrolyte multilayer films.

For endothelial cells, it is of prime importance to enhance cell–substrate interactions. Shear stress can lead to the detachment of endothelial cells seeded on prostheses after implantation [6,38]. Therefore, we use two polycations: the PDL which is already used in the monolayer form and known to increase adhesive properties. An increasing use of polyaminoacids is observed in the biomaterial field [39,40]. Regarding PAH, although it is a synthetic polyelectrolyte, it was recently used in PSS/PAH polyelectrolyte multilayers films and found to increase early cell adhesion [18] when it is the outermost layer of the film. A lower percentage of cells was however found for the ~PGA–PDL-ending layers. This unexpected results may have different origins: (1) the stiffness of the film may be different for ~PGA–PDL films than for ~PSS–PAH-ending ones. (2) The treatment with trypsin may lead to the detachment of the outer part of the film with the cells when the cohesion of the outermost layers is weaker. This is expected to be the case for the ~PGA–PDL-ending films [22] as compared to ~PSS–PAH-ending ones. (3) Cell adhesion on ~PSS–PAH-ending films may be higher than on ~PGA–PDL-ending ones. This has been already demonstrated for these two types of films by a micro-manipulation technique for chondrosarcoma cells (L. Richert, personal communication). In addition to the physico-chemical properties of the films, serum protein adsorption may influence the initial attachment and the subsequent adhesion of the cells onto the films, as they are known to play an important role for cells attachment onto different substrates [41,42]. Concerning PSS/PAH films, it was recently shown that protein adsorption (for several individual

proteins) is maximum when both protein and multilayer film are oppositely charged [12]. However, protein adsorption was also observed when both were similarly charged. In the case of weak polyelectrolytes, the behavior is more complicated and depends on the pH of protein solution and the type of polyanion/polycation at the outermost layer of the film. No acidic protein was found onto weak polyanions under physiological conditions [43,44]. Regarding the interaction of a mixture of proteins such as serum and a polyelectrolyte multilayered film, the only data available concern PEI–(PGA/PLL)<sub>n</sub> (*n* being the number of pair of layers) [45]. A large uptake of protein was observed at pH=7.4 for all the PLL-ending films, whereas no adsorption could be detected for the PGA-ending ones (by OWLS, quartz crystal micro-balance, and zeta potential measurements). The difference in cell adhesion on ~PGA–PDL films may come from a difference in protein adsorption onto these films as compared to the ~PSS–PAH ones. Thus, it is not possible to establish a single relation between the film architectures and the behavior of cells, particularly with respect to the adhesion phenomena. Indeed, it appears that cells behavior is different on the polyelectrolyte multilayers than on the corresponding monolayers (of the same type as the outermost layer of the film).

In conclusion, the present study indicates that the most interesting tested surface for endothelial cells in terms of adhesion, viability and growth appears to be the polyelectrolyte film made of PEI–(PSS–PAH)<sub>3</sub>. Further investigations are currently undertaken at the molecular and cellular levels. These are aimed at elucidating the mechanism of cell adhesion and probing the resistance of the cells under a physiological shear stress. However, the buildup of thin polyelectrolyte multilayered films can constitute a suitable method for the control of attachment and proliferation of endothelial cells for tissue engineering.

### Acknowledgements

We thank Prof. Boutroi and the staff of obstetric department of Nancy maternity hospital for providing umbilical cords.

### References

- [1] Seifalian AM, Tiwari A, Hamilton G, Salacinski HJ. Improving the clinical patency of prosthetic vascular and coronary bypass grafts: the role of seeding and tissue engineering. *Artif Organs* 2002;26:307–20.
- [2] Abbott WM, Callow A, Moore W, Rutherford R, Veith F, Weinberg S. Evaluation and performance standards for arterial prostheses. *J Vasc Surg* 1993;17:746–56.



- [3] Chu C, Lu A, Liszkowski M, Sipehia R. Enhanced growth of animal and human endothelial cells on biodegradable polymers. *Biochim Biophys Acta* 1999;1472:479–85.
- [4] Wissink MJB, Beernink R, Poot AA, Engers GHM, Beugeling T, Van Aken WG, Feijen J. Improved endothelialization of vascular grafts by local release of growth factor from heparinized collagen matrices. *J Control Release* 2000;64:103–14.
- [5] Ramires P, Mirengi L, Romano A, Palumbo F, Nicolardi G. Plasma-treated PET surfaces improve the biocompatibility of human endothelial cells. *J Biomed Mater Res* 2000;51:535–9.
- [6] Salacinski HJ, Punshon G, Krijgsman B, Hamilton G, Seifalian AM. A hybrid compliant vascular graft seeded with microvascular endothelial cells extracted from human Omentum. *Artif Organs* 2001;25:947–82.
- [7] Greisler H, Gosselin C, Ren D, Kang S, Un Kim D. Biointeractive polymers and tissue engineered blood vessels. *Biomaterials* 1996;17:329–36.
- [8] Goodman SL, Sims PA, Albrecht RM. Three-dimensional extracellular matrix textured biomaterials. *Biomaterials* 1996;17:2087–95.
- [9] Stoltz JF, Blondel W, Bensoussan D, Lehalle B, Wang X, Labrador V. New trends in vascular engineering. *Clin Hemorheol Microcirc* 2001;24:263–72.
- [10] Decher G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science* 1997;227:1232–7.
- [11] Shiratori SS, Rubner MF. pH-dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules* 2000;33:4213–9.
- [12] Ladam G, Gergely C, Senger B, Decher G, Voegel JC, Schaaf P, Cuisinier F. Protein interactions with polyelectrolyte multilayers: interactions between serum albumin and polystyrene sulfonate/polyallylamine multilayers. *Biomacromolecules* 2000;1:674–87.
- [13] Chluba J, Voegel JC, Decher G, Erbacher P, Schaaf P, Ogier J. Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity. *Biomacromolecules* 2001;2:800–5.
- [14] Ito Y, Chen G, Imanishi Y. Micropatterned immobilization of epidermal growth factor to regulate cell function. *Bioconj Chem* 1998;9:277–82.
- [15] Elbert DL, Herbert CB, Hubbell JA. Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces. *Langmuir* 1999;15:5355–62.
- [16] Serizawa T, Yamaguchi M, Akashi M. Alternating bioactivity of polymeric layer-by-layer assemblies: anticoagulation vs pro-coagulation of human blood. *Biomacromolecules* 2002;3:724–31.
- [17] Tryoen-Toth P, Vautier D, Haikel Y, Voegel JC, Schaff P, Chluba J, Ogier J. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *J Biomed Mater Res* 2002;60:657–67.
- [18] Vautier D, Karsten V, Egles C, Chluba J, Schaaf P, Voegel J-C, Ogier J. Polyelectrolyte multilayer films modulate cytoskeletal organization in chondrosarcoma cells. *J Biomater Sci Polym Ed* 2002;13:713–32.
- [19] Imbert E, Poot A, Figdor CG, Feijen J. Different growth behaviour of human umbilical vein endothelial cells and an endothelial cell line seeded on various polymer surfaces. *Biomaterials* 1998;19:2285–90.
- [20] Deroanne C, Lapierre C, Nussgens B. In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix–cytoskeleton. *Cardiovasc Res* 2001;49:647–58.
- [21] Picart C, Ladam G, Senger B, Voegel J-C, Schaaf P, Cuisinier FJG, Gergely C. Determination of structural parameters characterizing thin films by optical methods: a comparison between scanning angle reflectometry and optical waveguide lightmode spectroscopy. *J Chem Phys* 2001;115:1086–94.
- [22] Lavalie P, Gergely C, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, Voegel JC, Picart C. Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: an in situ atomic force microscopy study. *Macromolecules* 2002;35:4458–65.
- [23] Tiefenthaler K, et Lukosz W. Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors. *J Opt Soc Am B* 1989;6:209–20.
- [24] De Feijter JA, Benjamins J, Veer FA. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air–water interface. *Biopolymers* 1978;17:1759–72.
- [25] Ladam G, Schaaf P, Voegel JC, Schaaf P, Decher G, Cuisinier F. In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 2000;16:1249–55.
- [26] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest* 1973;52:2745–56.
- [27] Papadimitriou E, Lelkes P. Measurement of cell numbers in microtiter culture plates using the fluorescent dye Hoechst 33258. *J Immunol Methods* 1993;162:41–5.
- [28] Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
- [29] Mendelsohn JD, Barrett CJ, Chan VV, Pal AJ, Mayes AM, Rubner MF. Fabrication of microporous thin films from polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 2000;16:5017–23.
- [30] Santini MT, Cametti C, Indovina PL, Morelli G, Donelli G. Polylysine induces changes in membrane electrical properties of K562 cells. *J Biomed Mater Res* 1997;35:165–74.
- [31] Picart C, Lavalie PH, Hubert P, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, Voegel J-C. Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface. *Langmuir* 2001;17:7414–24.
- [32] Lee J H, Lee JW, Khang G, Lee HB. Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces. *Biomaterials* 1997;18:351–8.
- [33] Ladam G, Schaaf P, Cuisinier FJG, Decher G, Voegel JC. Protein adsorbed onto auto-assembled polyelectrolyte films. *Langmuir* 2001;17:878–82.
- [34] Fery A, Schöler B, Cassagneau T, Caruso F. Nanoporous thin films formed by salt-induced structural changes in multilayers of poly(acrylic acid) and poly(allylamine). *Langmuir* 2001;17:3779–83.
- [35] Lampin M, Warocquier-clerout R, Legris C, Degrange M, Sigot-luizard M. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J Biomed Mater Res* 1997;36:99–108.
- [36] Gao C, Li A, Shen J. Construction of cell-compatible layer and culture of human umbilical vascular endothelial cells on porous polystyrene membranes. *J Appl Polym Sci* 2001;81:3523–9.
- [37] Risbud MV, Bhone MR, Bhone RR. Effect of chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel on proliferation and cytokine expression of endothelial cells: implications in islet immunoisolation. *J Biomed Mater Res* 2001;57:300–5.
- [38] Sirois E, Charara J, Ruel J, Dussault JC, Gagnon P, Doillon CJ. Endothelial cells exposed to erythrocytes under shear stress: an in vitro study. *Biomaterials* 1998;19:1925–34.
- [39] West JK, Latour R, Hench LL. Molecular modeling study of adsorption of poly L-lysine onto silica glass. *J Biomed Mater Res* 1997;37:585–91.
- [40] Hwang JJ, Stupp SI. Poly(amino acid) bioadhesives for tissue repair. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000;11(10):1023–8.
- [41] Van Wachem. Adsorption of fibronectin derived from serum, from human endothelial cells onto tissue culture polystyrene. *J Biomed Mater Res* 1987;21:1317–27.
- [42] Jerome WG, Handt S. Endothelium and matrix interactions. In: Polak JM, editor. *Modern visualization of the endothelium*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998. p. 93–112.

- [43] Müller M, Rieser T, Lunkwitz K, Meier-Haack J. Polyelectrolyte complex layers: a promising concept for antifouling coatings verified by in situ ATR-FTIR spectroscopy. *Macromol Rapid Commun* 1999;20:607–11.
- [44] Müller M, Rieser T, Dubin P, Lunkwitz K. Selective interaction between proteins and the outermost surface of polyelectrolyte multilayers: influence of the polyanion type, pH and salt. *Macromol Rapid Commun* 2001;22:390–5.
- [45] Richert L, Lavallo P, Vautier D, Senger B, Stoltz JF, Schaaf P, Voegel JC, Picart C. Cell interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules* 2002; 3:1170–8.

## VOLUME EXPANSION WITH MODIFIED HEMOGLOBIN SOLUTION, COLLOIDS, OR CRYSTALLOID AFTER HEMORRHAGIC SHOCK IN RABBITS: EFFECTS IN SKELETAL MUSCLE OXYGEN PRESSURE AND USE VERSUS ARTERIAL BLOOD VELOCITY AND RESISTANCE

Cédric Boura,\* Alexis Caron,\* Dan Longrois,<sup>†,‡</sup> Paul Michel Mertes,<sup>†,‡</sup> Pierre Labrude,\* and Patrick Menu\*

\*Laboratoire d'hématologie et physiologie, Faculté de Pharmacie, and <sup>†</sup>Laboratoire "Lésion-Réparation: Remodelage Cardiaque et Artériel", Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré, Nancy, France; and

<sup>‡</sup>Départements d'Anesthésie Réanimation Chirurgicale, CHU de Brabois, Nancy, France

Received 6 Mar 2002; first review completed 15 May 2002; accepted in final form 24 Jul 2002

**ABSTRACT**—Therapeutic goals for hemorrhagic shock resuscitation are the increase of cardiac output and oxygen delivery. The possibility exists that because of microcirculatory effects, different volume expanders result in different tissue oxygen delivery and oxygen use. In a rabbit model of resuscitation from hemorrhagic shock (50% blood loss), we compared the effects of an hemoglobin-based O<sub>2</sub>-carrying solution (HbOC) with those elicited by albumin, hydroxyethyl starch (HES), or saline on systemic hemodynamics, skeletal muscle O<sub>2</sub> pressure (PtiO<sub>2</sub>), and interstitial concentration of lactate (LACi) through the combined implantation of a microdialysis probe and a sensitive O<sub>2</sub> electrode into the hind limb. Hemorrhagic shock induced a 50% decrease in mean arterial pressure (MAP), femoral artery blood flow (BF), and PtiO<sub>2</sub>. After resuscitation, there were statistically significant differences among the volume expanders. The increase in MAP was faster with HbOC and colloids, and slower with saline, mainly obtained by vasoconstriction for HbOC and by increased BF with albumin and HES. The maximum MAP values were significantly higher for HbOC compared with the other volume expanders. HbOC and colloids induced a faster increase in PtiO<sub>2</sub> as compared with saline, but maximum PtiO<sub>2</sub> values were not different among the volume expanders. Tissue oxygen use as estimated by LACi increased transiently at the beginning of volume expansion with similar maximum values. Animals resuscitated with saline had significantly higher LACi concentrations after the onset of volume expansion as compared with HbOC but not with colloids. Our results demonstrate that there are measurable differences in MAP and BF upon resuscitation with the four different solutions and there is a slower increase in tissue PtiO<sub>2</sub> with saline than with colloids associated with significantly increased LACi consistent with delayed reoxygenation upon resuscitation with saline.

**KEYWORDS**—Hypoxia, resuscitation, plasma expanders, microdialysis, lactate, oxygen sensor

### INTRODUCTION

Shock represents an acute life-threatening syndrome elicited by the development in several target organs of an imbalance between oxygen delivery and oxygen demand, sufficient to cause tissue hypoxia and alterations of cellular and organ function. If shock persists, structural changes and loss of cell integrity occur, leading to cell necrosis and organ failure. A frequent clinical denominator of patients after severe shock, even in case of adequate therapy, is the development of multiple organ failure, which is associated with mortality as high as 50% to 80% (1).

Hemorrhagic shock is, at least in theory, a relatively simple clinical situation in that the cause of shock, i.e., loss of blood volume, can be compensated by volume expansion. In emergent situations or if the loss of red blood cell (RBC) mass is not too important, volume expansion is obtained with asanguineous solutes (i.e., crystalloids and/or colloids). In extreme situations, if the loss of RBC mass is too important, oxygen delivery can be too low, even in the presence of adequate blood volume, a situation characterized as anemic hypoxia (2). In this situation, transfusion of allogenic RBC is required (3).

The production of a RBC substitute that can effectively deliver oxygen and act as a clinically viable alternative to RBC

allogenic transfusion is a much sought-after goal. Hemoglobin-based O<sub>2</sub>-carrying solutions (HbOC) have been developed as RBC substitutes to reduce the viral and immunologic risks associated with allogenic blood transfusion. Several studies indicate that HbOC are not simply oxygen-delivering solutions, but that they also possess significant pharmacological properties (4, 5). It is known that HbOC exert vasopressor effects by scavenging of the endogenous vasodilator nitric oxide (6), interaction with the endogenous vasoconstrictor endothelin (7), and stimulation of the adrenergic system (8). These interactions with the mechanisms of vascular regulation induce an elevation of systemic and pulmonary blood pressure (9). In addition to these widely documented effects on macrohemodynamic parameters, it was recently shown that because of their physical and chemical properties (HbOC are colloids), HbOC can modulate blood rheology and thus exert microcirculatory effects not measurable by their macrohemodynamic effects (10, 11). These less frequently studied effects of HbOC may impair microvascular perfusion and tissue oxygenation. Finally, HbOC could have the additional property of facilitating the diffusion of oxygen available to the cells, as recently reviewed by Sibbald (3) and Creteur (12), and studied by McCarthy et al. (13), thus maintaining tissue oxygen availability at lower hemoglobin concentrations. Therefore, when studying the vascular effects of HbOC, one should always take into consideration the fact that they are colloid-like molecules with different physical and chemical properties for the different

Address reprint requests to Cédric Boura, Laboratoire d'hématologie et physiologie, Faculté de pharmacie, Rue Albert Lebrun, 54000 Nancy, France.  
DOI: 10.1097/01.SHK.0000054749.57685.92

HbOC. The same observations concerning the physical and chemical properties have been made for different colloids solutions. For instance, although fluid gelatins, albumin, and dextran 70 (HES) are globally catalogued as colloids, measurable differences exist among them as compared with crystalloids as far as their effects on plasma and blood rheology are concerned (10, 11).

Given the above-mentioned complex properties of HbOCs, the characterization of their pharmacological effects should be taken into consideration, among other things, the fact that they are colloids. The crystalloid-colloid controversy is flawed by several major problems, elegantly reviewed by Hillman et al. (12). These problems are: the fact that crystalloids result only in expansion of interstitial space (ISS), whereas colloids mainly expand the intravascular space (IVS); the colloids have been assumed to be a homogenous pharmacological class; the cohorts of patients included in the meta-analysis are highly variable (14, 15); indeed, the aim of volume expansion was maintenance of fluid balance at one extreme (resuscitation of hemorrhagic shock at the other; mortality is the main outcome of the meta-analysis; and the therapeutic effects of volume expansion have not been clearly defined. The definition of therapeutic targets should take into consideration the clinical situation (i.e., the maintenance of fluid balance during resuscitation of hemorrhagic shock). For one clinical situation, such as resuscitation from hemorrhagic shock in patients with trauma, the sequence of events between surgical control of blood loss versus resuscitation has been shown to affect outcome (16).

The endpoints used to evaluate the efficiency of resuscitation after hemorrhagic shock need to be defined. Mortality is an important endpoint, but it can be influenced by too many parameters. Additional physiological parameters need to be defined. Such parameters are those that evaluate the IVS (blood pressure and arterial flow), the effects of the changes of ISS (tissue oxygenation), and, finally, a global parameter of the oxygen use by the cells (interstitial lactate concentration). Therefore, a technological approach that permits simultaneous measurements of both tissue oxygen pressure (PtiO<sub>2</sub>) and interstitial metabolite concentration was used in the present study (17). This approach permits to estimate the tissue oxygen pressure and its use by the cells.

In an attempt to refine the endpoints of hemorrhagic shock resuscitation, we compared the macrohemodynamic effects of tissue oxygen delivery and use upon resuscitation with solutions of HbOC, colloids, or crystalloid. For this purpose, we used a combined sensor to measure tissue PtiO<sub>2</sub> and oxygen consumption (as reflected by interstitial lactate concentration) recently characterized by members of our group (17) in a rabbit model of hemorrhagic shock treated with a modified hemoglobin solution (Dextran-benzene-tetracarboxylate-conjugated Hb [Dex-BTC-Hb]), 6% HES, 5% albumin, or saline.

## MATERIALS AND METHODS

### Solutions used for volume expansion

**Dex-BTC-Hb**—The Dex-BTC-Hb solution contained 8.5 g · dL<sup>-1</sup> human Hb prepared from outdated RBC and conjugated to a macromolecular allosteric effector, Dextran-benzene-tetracarboxylate. Dex-BTC-Hb was produced in collaboration

with Pasteur-Mérieux sérums et vaccins (Marcy l'Etoile, France). The solution was suspended in Tyrode's medium (in millimoles: 6.7 glucose, 141.0 Na<sup>+</sup>, 5.0 K<sup>+</sup>, 2.5 Ca<sup>2+</sup>, 1.1 Mg<sup>2+</sup>, 115.8 Cl<sup>-</sup>, 0.8 phosphates, and 30.0 carbonates), pasteurized, and frozen at -20°C without preservatives. The physical characteristics of Dex-BTC-Hb have been previously published (18). The p50 is 23 mmHg; viscosity is 2.15 mPa · s (at 37°C).

**Six percent Hesteril®**—Hesteril® is a 6% pentastarch solution clinically available in Europe and was obtained from Fresenius Kabi (Sèvres, France) and it contains 6 g · dL<sup>-1</sup> of low-molecular weight HES (240 kDa) in saline. Its molar substitution is 0.43 to 0.55.

**Human albumin**—Human albumin (20 g · dL<sup>-1</sup>) was obtained from Pasteur-Mérieux sérums et vaccins and was dissolved in Tyrode's medium to obtain a final solution at a concentration of 5 g · dL<sup>-1</sup>. This concentration was chosen because it is isooncotic with the Dex-BTC-Hb solution.

**Saline solution**—Saline solution was obtained from Cooper (Melun, France) and contained 0.9 g · dL<sup>-1</sup> NaCl.

### Anesthesia and surgical preparation of animals

This study design was approved by the Animal Protection Bureau of the French Ministry for Fishing, Agriculture, and Food, and the experiments were conducted in accordance with the Guiding Principles for Research Involving Animals. Twenty male New Zealand White rabbits (Choné, France) weighing 2.6 ± 0.2 kg were used. On the day of experiments, anesthesia was induced with 50 mg · kg<sup>-1</sup> i.m. ketamine (Panpharma, Fougères, France) and sodium pentobarbital (Sanofi, Libourne, France; 40 mg · kg<sup>-1</sup> i.v. followed by infusion at 5 mg · kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in the right ear marginal vein). The rabbits were placed in the dorsal decubitus position and were warmed to maintain a constant body temperature. The trachea was intubated, and the animal spontaneously breathed room air. The right femoral artery was cannulated with a heparin-filled polyethylene catheter (0.56 ID) for mean arterial pressure (MAP) measurements.

### Hemodynamic monitoring

The femoral catheter was connected to a pressure transducer (P-1000A; Narco Bio-Systems, Houston, TX) to measure the MAP. Because blood was collected through the femoral artery catheter, measurements of arterial pressure were discontinued during the collection. The left femoral artery was exposed and a hard epoxy Doppler blood flow transducer (model HDP-20; Crystal Biotech, Northborough, MA) was placed around. The arterial blood flow transducer was connected to a 20-MHz module (model PD-20; Crystal Biotech) to measure the blood flow velocity (BF) in centimeters per second. Vascular peripheral resistance (PR) was calculated by using the following formula (18):

$$PR \text{ (mmHg} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-1}) = \text{MAP (mmHg)/BF (cm} \cdot \text{s}^{-1})$$

### PtiO<sub>2</sub>

A flexible polarographic microcatheter Clark-type PO<sub>2</sub> probe (diameter 500 μm, length 20 mm, Licor; GMS, Kiel-Mielkendorf, Germany) was connected to a module (Licor; GMS). The probe was inserted into a fine guiding needle, which was then passed through the quadriceps muscle (same site of implantation between different experiments). The characteristics of the probe have been previously described (17).

### Muscular interstitial lactate concentration

Lactate concentration was estimated by microdialysis. A microdialysis probe (membrane outer diameter 340 μm, length 20 mm, molecular weight cut-off: 50 kD; Hospal, Lyon, France) custom-made in our laboratory and previously validated (17) was implanted in the skeletal quadriceps muscle close to the PtiO<sub>2</sub> probe. A Ringer solution (Bieffe Medital, Sabinanigo, Spain) was perfused through the microdialysis probe using a microinjection pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA) at 2 μL · min<sup>-1</sup> flow rate. The functionality of microdialysis probes was evaluated *in vitro* before each experiment. After a 40-min period of stabilization, the microdialysis effluent was collected in plastic Eppendorf microtubes kept on ice during the entire collection period. Lactate concentration in the microdialysis samples was measured using enzymatic kinetic methods (kit 256773; Boehringer Mannheim Diagnostica, Mannheim, Germany). The lower limit of detection was 20 mg · mL<sup>-1</sup>.

### Blood gases and hematologic values

Arterial pH, PO<sub>2</sub>, and PCO<sub>2</sub> were measured with a blood-gas analyzer (model ABL 330; Radiometer, Copenhagen, Denmark) using 100-μL samples of heparinized blood. Hematocrit was measured in duplicate in 75-μL samples of arterial blood by microcentrifugation (Cellokritt 2; Lars Ljungberg, Stockholm, Sweden).

### Hemorrhagic shock

Hemorrhagic shock was induced by drawing blood at a rate of 1.5 mL · min<sup>-1</sup> from the femoral artery over 60 min. This blood volume corresponds approximately

to 50% of total blood volume. Hypovolemia was maintained over 15 min. After this period, animals were resuscitated at a rate of  $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  with the different solutions. The volume infused was identical to the withdrawn volume for all solutions except saline solution (3.5 volumes of saline/1 volume of blood loss). Because saline is rapidly eliminated from the circulation, it was perfused continuously. For the other solutions, the time of infusion was equal to 60 min. Therefore, by design and to mimic a clinical situation where the rate of volume expansion is limited by the maximal flow of intravenous catheters, animals resuscitated with saline had delayed volume expansion.

### Statistical analysis

The animals were randomly allocated to one of the four experimental groups: Dex-BTC-Hb ( $n = 5$ ), HES ( $n = 5$ ), albumin ( $n = 5$ ), and NaCl 0.9% ( $n = 5$ ). Values are means  $\pm$  SE. Statistical comparisons were made at various times at the experiment for each group by one-factor analysis of variance (ANOVA) for repeated measures (Statview I.V.<sup>®</sup>; Abacus Concepts, Berkeley, CA). Comparisons among groups were made for each time by use of one-factor ANOVA for repeated measures with Bonferroni-Dunn correction.  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### Macrohemodynamic parameters

**MAP**—The time course of MAP is shown in Figure 1. Hemorrhagic shock induced a significant (58% average) decrease in MAP at the end of blood withdrawal (time point, 60 min). Volume expansion progressively increased MAP. In the Dex-BTC-Hb-resuscitated animals, MAP increased to  $90.7 \pm 3.9 \text{ mmHg}$  as early as 40 min after the onset of volume expansion. This value was not different from preshock MAP values ( $80.4 \pm 3.9 \text{ mmHg}$ ,  $P = 0.202$ ). In contrast to the

Dex-BTC-Hb group, in the three other groups, MAP never reached the preshock values.

**Mean femoral artery blood flow velocity**—Mean femoral artery blood flow velocity is shown in Figure 2. Hemorrhagic shock (time point, 60 min) induced a significant decrease in mean femoral artery blood flow velocity (45% average). After resuscitation with the colloid solutions, the mean velocity reached preshock values. In the group resuscitated with saline, the velocity remained significantly lower as compared with preshock. In animals resuscitated with albumin, femoral artery blood flow velocity was significantly higher as compared with the other groups.

**Mean femoral artery resistance**—Mean femoral artery resistance is shown in Figure 3. At the end of the blood withdrawal period (time point, 60 min), there was a significant fall in resistance (42% average). After resuscitation with albumin, femoral artery resistance values remained low ( $1.80 \pm 0.30 \text{ mmHg} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$ ;  $P = 0.049$ ) as compared with preshock ( $3.05 \pm 0.73 \text{ mmHg} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) until the end of the experiment. Resuscitation with Dex-BTC-Hb induced an increase of femoral artery resistance ( $3.64 \pm 1.45 \text{ mmHg} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) to values similar ( $P = 0.685$ ) to the preshock level ( $3.21 \pm 0.67 \text{ mmHg} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Taken together, all of these results indicate that maintenance of MAP is obtained through different mechanisms by the different solutions. Albumin, and to a lesser extent HES,

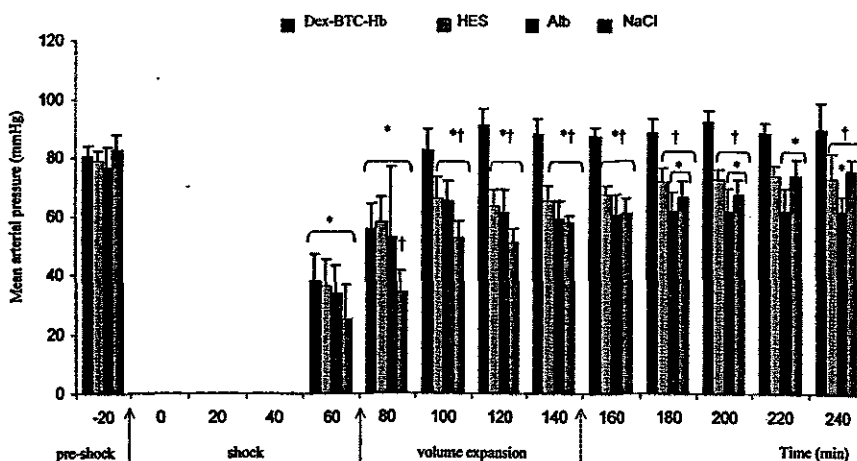


FIG. 1. Time-dependent changes of the MAP in hemorrhagic shock compensated with Dex-BTC-Hb ( $n = 5$ ), HES ( $n = 5$ ), albumin ( $n = 5$ ), and NaCl ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$  vs. preshock; † $P < 0.05$  vs. Dex-BTC-Hb.

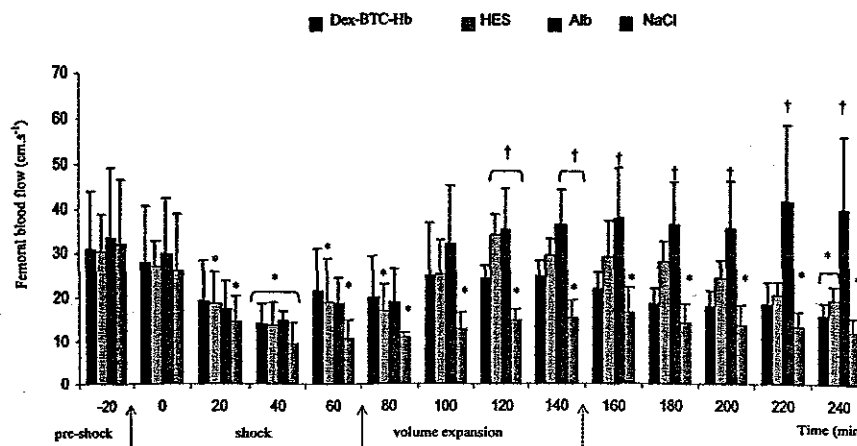


FIG. 2. Time-dependent changes of the mean femoral artery blood flow velocity in hemorrhagic shock compensated with Dex-BTC-Hb ( $n = 5$ ), HES ( $n = 5$ ), albumin ( $n = 5$ ), and NaCl ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$  vs. preshock; † $P < 0.05$  vs. Dex-BTC-Hb.

creased femoral artery flow, whereas Dex-BTC-Hb and line increased femoral vascular resistance. In addition, significant time-dependent differences exist among the different volume expansion solutions.

# *Optimization of skeletal muscle oxygen delivery and use*

**PtiO<sub>2</sub>**—Skeletal muscle oxygen tension is shown in Figure 4. For all groups, PtiO<sub>2</sub> values progressively decreased by an average of 48% as compared with the preshock values. After 5 min of volume expansion (time point, 80 min), PtiO<sub>2</sub> rapidly returned to preshock values (18.22 ± 4.14 and 22.45 ± 4.22 mmHg with Dex-BTC-Hb and albumin, respectively). In sharp contrast, at the same time point, PtiO<sub>2</sub> was at 8.65 ± 1.89 mmHg and 15.52 ± 4.83 mmHg in animals resuscitated with saline and HES, respectively. At the end of the experiment, PtiO<sub>2</sub> values were similar for all groups and were not significantly different from preshock values. Taken together, these results demonstrate that there are time-dependent differences among the four groups. Skeletal muscle reoxygenation is rapid with colloids, but is significantly slower with saline. Nevertheless, the maximum PtiO<sub>2</sub> was not significantly different among the animals resuscitated with the different volume expansion solutions.

**Muscular interstitial lactate concentration**—Muscular interstitial lactate concentration is shown in Figure 5. The muscular interstitial lactate concentration did not change during the

period of blood withdrawal. Immediately after the beginning of volume expansion (time point, 80 min) in rabbits resuscitated with saline, muscular interstitial lactate concentration was significantly higher as compared with the Dex-BTC-Hb group, a result that is consistent with delayed reoxygenation. At the end of resuscitation (time point, 120-min), muscular interstitial lactate concentration increased significantly in all groups except for Dex-BTC-Hb as compared with preshock values.

# *Blood gases and hematologic values*

**Arterial blood pH**—Values of arterial pH are shown in Table 1. At the end of hemorrhagic shock, there was a significant decrease of pH values from 7.33 ± 0.01 to 7.27 ± 0.019 ( $P = 0.024$ ) with HES only. The perfusion of saline induced a decrease in pH values compared with Dex-BTC-Hb group ( $P = 0.039$ ).

**Arterial PO<sub>2</sub> values**—Arterial PO<sub>2</sub> values are also shown in Table 1. Hemorrhagic shock induced a significant increase of PaO<sub>2</sub> (26% average). Upon completion of volume expansion, PaO<sub>2</sub> values were higher than preshock in animals resuscitated with HES and saline. There were no significant differences among the four groups.

**Arterial blood PCO<sub>2</sub> values**—Arterial blood PCO<sub>2</sub> values are also shown in Table 1. Hemorrhagic shock induced a nonsignificant 17% decrease of PaCO<sub>2</sub> (except for the NaCl group;  $P = 0.009$ ). The PaCO<sub>2</sub> values after the resuscitation

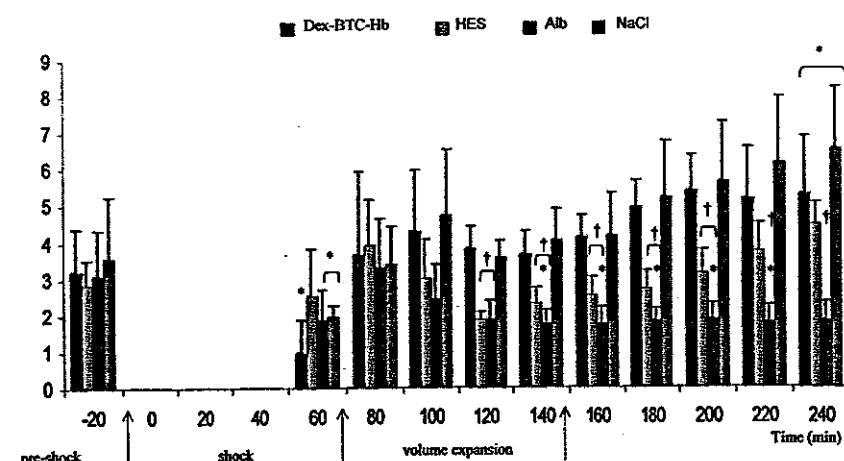


FIG. 3. Time-dependent changes of the mean femoral artery resistance in hemorrhagic shock compensated with Dex-BTC-Hb ( $n = 5$ ), HES ( $n = 5$ ), albumin ( $n = 5$ ), and NaCl ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$  vs. preshock; † $P < 0.05$  vs. Dex-BTC-Hb.

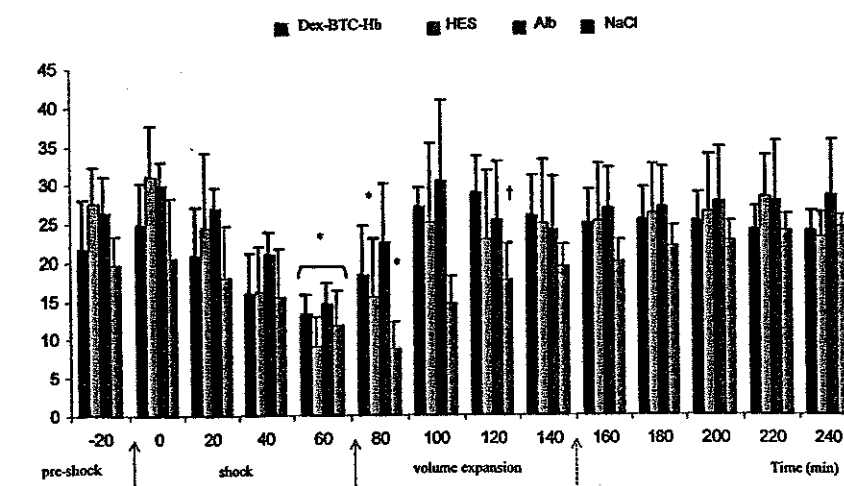


FIG. 4. Time-dependent changes of PtiO<sub>2</sub> in hemorrhagic shock compensated with Dex-BTC-Hb ( $n = 5$ ), HES ( $n = 5$ ), albumin ( $n = 5$ ), and NaCl ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$  vs. preshock; † $P < 0.05$  vs. Dex-BTC-Hb.

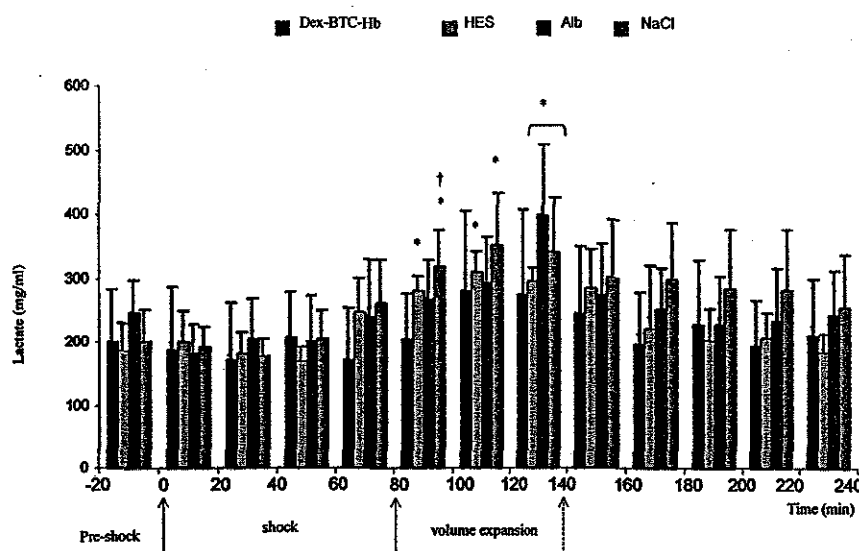


FIG. 5. Time-dependent changes of muscular interstitial lactate concentration in hemorrhagic shock compensated with Dex-BTC-Hb ( $n = 5$ ), HES ( $n = 5$ ), albumin ( $n = 5$ ), and NaCl ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$  vs. preshock; † $P < 0.05$  vs. Dex-BTC-Hb.

TABLE 1. Changes of blood gases and hematologic values

|                          | Preshock    | After shock  | After resuscitation |
|--------------------------|-------------|--------------|---------------------|
| <b>Dex-BTC-Hb</b>        |             |              |                     |
| PaO <sub>2</sub> (mmHg)  | 73.0 ± 6.7  | 93.9 ± 21.2  | 85.0 ± 14.6         |
| PaCO <sub>2</sub> (mmHg) | 40.0 ± 8.5  | 36.0 ± 4.1   | 34.3 ± 4.2          |
| pH                       | 7.36 ± 0.03 | 7.30 ± 0.11  | 7.32 ± 0.05         |
| Hematocrit               | 41.3 ± 3.0  | 35.0 ± 4     | 19.0 ± 0.8          |
| <b>HES</b>               |             |              |                     |
| PaO <sub>2</sub> (mmHg)  | 74.4 ± 5.0  | 92.2 ± 10.8* | 88.4 ± 4.8*         |
| PaCO <sub>2</sub> (mmHg) | 44.9 ± 5.1  | 39.3 ± 9.0   | 42.5 ± 4.2†         |
| pH                       | 7.34 ± 0.03 | 7.28 ± 0.02* | 7.28 ± 0.03*        |
| Hematocrit               | 41.8 ± 1.8  | 34.0 ± 2.8*  | 19.8 ± 1.0*         |
| <b>Albumin</b>           |             |              |                     |
| PaO <sub>2</sub> (mmHg)  | 73.3 ± 3.5  | 92.7 ± 9.2*  | 75.4 ± 16.0         |
| PaCO <sub>2</sub> (mmHg) | 46.1 ± 6.2  | 35.6 ± 0.1   | 33.6 ± 3.8          |
| pH                       | 7.34 ± 0.03 | 7.30 ± 0.07  | 7.34 ± 0.04         |
| Hematocrit               | 38.0 ± 2.4  | 32.0 ± 4.8*  | 17.6 ± 1.3*         |
| <b>Saline</b>            |             |              |                     |
| PaO <sub>2</sub> (mmHg)  | 72.3 ± 8.7  | 93.2 ± 7.4*  | 86.3 ± 6.0*         |
| PaCO <sub>2</sub> (mmHg) | 51.9 ± 5.9† | 39.8 ± 4.6*  | 41.3 ± 2.4*†        |
| pH                       | 7.32 ± 0.04 | 7.23 ± 0.09  | 7.23 ± 0.07†        |
| Hematocrit               | 40.8 ± 1.0  | 33.3 ± 2.7*  | 22.8 ± 1.1*†        |

\* $P < 0.05$  vs. baseline; † $P < 0.05$  vs. Dex-BTC-Hb.

with HES and NaCl solutions were significantly higher as compared with Dex-BTC-Hb.

**Hematocrit**—Hematocrit values are shown in Table 1, as well. Hematocrit values modestly decreased at the end of hemorrhagic shock. As expected, volume expansion resulted in a significant 51% decrease of hematocrit values as compared with preshock. Hematocrit values in animals resuscitated with saline was modestly but significantly increased as compared with animals resuscitated with Dex-BTC-Hb, consistent with delayed volume expansion in the saline group.

## DISCUSSION

The main findings of this article are the following: There are measurable differences in MAP and BF upon resuscitation with the four different solutions. The increase in MAP was faster with HbOC and colloids, and slower with saline, mainly

obtained by vasoconstriction for HbOC and by increased BF with albumin and HES. The maximum MAP values were significantly higher for HbOC compared with the other volume expanders. There was a slower increase in tissue PtO<sub>2</sub> in animals resuscitated with saline as compared with colloids. This is associated with significantly increased interstitial lactate concentration in saline-resuscitated animals as compared with Dex-BTC-Hb, which is consistent with delayed reoxygenation upon resuscitation with saline.

## Methodological discussion

We used a model of hemorrhagic shock in anesthetized rabbits that resulted in a significant decrease of blood pressure, arterial blood velocity, skeletal muscle oxygen pressure, and a moderate increase of interstitial lactate concentration without arterial hypoxemia. The coupled microdialysis catheter-oxygen sensor allows the measurement of tissue oxygen pressure and, by measuring interstitial muscular lactate concentrations, it permits to indirectly estimate the cellular oxygen use. The choice of skeletal muscle as the "target organ" is related to the relative ease of probe implantation as compared with organs such as the heart, liver, or kidney, which are the usual target organs in clinical or experimental investigations. Nevertheless, because the present study was a proof of concept approach, the use of skeletal muscle is valid, although we are convinced that our results should not be extrapolated to other organs. The relationship between muscle hypoxia and interstitial lactate concentrations was validated in human skeletal muscle by others (19, 20, 21) and in porcine myocardium (17).

The increase in blood pressure as a result of volume expansion is obtained by different mechanisms.

Volume expansion with Dex-BTC-Hb increased MAP mainly by increasing vascular resistance. This is consistent with the widely documented effects of HbOC that scavenge nitric oxide (22) and interfere with the biosynthesis of endothelin (7). In addition to these effects, several *ex vivo* studies from our group have convincingly demonstrated that HbOC could increase blood viscosity and RBC aggregation as compared with albumin (10, 11), two factors that could contribute to further decreasing blood flow and oxygen deliv-



to the cells (23). Nevertheless, in the present experimental study, this seems not to be the case because skeletal muscle oxygen pressure, which reflects all of the above factors that could interfere with oxygen delivery to the cells, is not decreased (Fig. 4). This observation is consistent with the suggested improved oxygen extraction capabilities that is attributed to HbOCs (12, 13). Our results demonstrate that despite these effects, and the higher vasoconstriction measured with Dex-BTC-Hb, the tissue  $P_{tO_2}$  was not different between Dex-BTC-Hb and albumin. Therefore, although excessive vasoconstriction, especially in target organs such as the heart (4), is of concern, as recently reviewed by Creteur et al. (12), it does not seem to affect skeletal muscle  $P_{tO_2}$  in the present study. Nevertheless, our results cannot rule out excessive HbOC-related vasoconstriction in other organs. A situation characterized by increased viscosity, RBC rouleaux formation together with decreased oxygen affinity of HbOC could decrease oxygen delivery to tissues. The experimental and clinical studies (3, 12) suggest that this situation is not frequently observed.

In contrast to what was observed with Dex-BTC-Hb, resuscitation with albumin increased MAP mainly by increasing arterial flow. Another colloid, known to increase whole blood viscosity to a higher degree as compared with albumin, i.e., HES (11), had effects on arterial blood velocity and arterial resistance that were intermediate between those of Dex-BTC-Hb and albumin. One can conclude from these observations that despite measurable differences among the colloids (including Dex-BTC-Hb) in terms of blood velocity or vascular resistance, the increase of  $P_{tO_2}$  after the onset of volume expansion is similar (Fig. 4).

The effects of volume expansion with saline on blood velocity and vascular resistance were different from those observed with the colloids. Indeed, as shown in Figure 2, at early time points after volume expansion with saline, the blood velocity is markedly lower and vascular resistance was higher in animals resuscitated with saline as compared with the three colloid solutions. These differences on velocity and resistance are translated in a significantly lower  $P_{tO_2}$  at early (from time points 60–140 min), but not later, time points. There are several possible explanations for these differences. One of them could be that because of the short intravascular residence time of saline, the animals were hypovolemic. Arguments in favor of this hypothesis are that hematocrit was moderately though significantly higher in animals resuscitated with saline (Table 1); and blood velocity was significantly lower and vascular resistance was significantly higher in animals resuscitated with saline as compared with colloids. Another hypothesis could be that resuscitation with saline increased the volume of ISS and this decreased oxygen delivery. Interestingly, at later time points,  $P_{tO_2}$  values were similar among the four groups despite persistent and marked differences in blood velocity.

Interstitial lactate concentrations increased upon initiation of volume expansion, consistent with results obtained in human skeletal muscle upon recovery from exercise (25). Oxygen use in skeletal muscle as estimated by interstitial lactate concentration was initially (time point, 80 min; Fig. 5) significantly

higher in animals resuscitated with saline as compared with Dex-BTC-Hb, but not albumin or HES. This is consistent with delayed reoxygenation in animals resuscitated with saline as compared with Dex-BTC-Hb (Fig. 4). Interestingly, there were no statistically significant differences among the four groups at later time points (after the 160-min time point; Fig. 5) probably because of similar  $P_{tO_2}$  values. One possible explanation for similar concentrations of interstitial lactate at later time points is that the amplitude and the duration of tissue hypoxia were not important enough to result in anaerobic metabolism and, therefore, a significant effect of the different resuscitation solutions could not be observed.

Potential implications of these results

These results indicate that when Dex-BTC-Hb or colloids are used for volume expansion after short periods of hemorrhagic shock, blood velocity and  $P_{tO_2}$  rapidly return to pre-hemorrhagic shock values. This could have both favorable and deleterious effects. A decreased duration of tissue hypoxia could be a possible favorable effect of rapid increase of tissue blood flow or oxygen delivery. Conversely, rapid restoration of blood flow could displace clots and promote hemorrhage, as suggested by one clinical study (16). In addition, restoration of blood flow and especially rapid reoxygenation could worsen cellular dysfunction. Indeed, *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that reoxygenation *per se* and not reperfusion has deleterious consequences on cell function and structure (26–28). In contrast, resuscitation with crystalloids, because of persistent hypovolemia explained by the short intravascular residence time, could result in lower blood flow and delayed and/or more gradual reoxygenation. Whether any of these effects ultimately has beneficial or deleterious consequences on tissue and organ function probably depends on the context. For instance, if the cause of hemorrhage is uncontrolled, aggressive resuscitation with colloids could promote further blood loss by increasing pressure and flow, which could disrupt clots or could result in dilution of coagulation factors. In addition, rapid restoration of flow with high oxygen pressure can cause rapid reoxygenation with possible deleterious effects. Conversely, if the cause of hemorrhage is controlled, resuscitation with colloids, more particularly with HbOC, could result in shorter cumulative periods of tissue hypoxia.

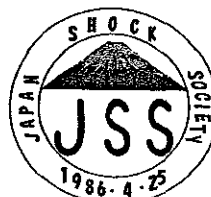
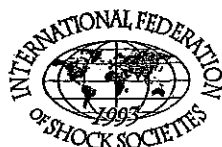
There are no clinical studies with Dex-BTC-Hb for the moment, but the available experimental literature (11) suggests that this hemoglobin solution could have indications that are similar to the HbOCs for which clinical studies exist (12).

REFERENCES

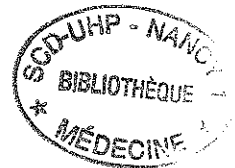
1. Baue AE: The multiple organ or system failure syndrome. In Schlag G, Redl H (eds): *Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure*. Berlin: Springer-Verlag, 1993, pp 1004–1018.
2. Sibbald WJ, Messmer K, Fink MP: Roundtable conference on tissue oxygenation in acute medicine. *Intensive Care Med* 26:780–791, 2000.
3. Stowell C, Levin J, Spiess B, Winslow R: Progress in the development of RBC substitutes. *Transfusion*. 41:287–299, 2001.
4. Ogden JE, Parry ES: The development of hemoglobin solutions as red cell substitutes. *Int Anesthesiol Clin* 33:115–129, 1995.
5. D'agnillo F, Alayash A: Site-specific modifications and toxicity of blood substitutes the case of dapsirin cross-linked hemoglobin. *Adv Drug Deliver Rev* 40:199–212, 2000.



6. Patel RP: Biochemical aspects of the reaction of hemoglobin and NO: implications for Hb-based blood substitutes. *Free Radical Biol Med* 28:1518-1525, 2000.
7. Gulati A, Abhijit B, Sen AP: Pharmacology of hemoglobin therapeutics. *J Lab Clin Med* 133:112-119, 1999.
8. Winslow RM: New transfusion strategies: red cell substitutes. *Annu Rev Med* 50:337-353, 1999.
9. Caron A, Menu P, Faivre-Fiorina B, Labrude P, Alayash AI, Vigneron C: Cardiovascular and hemorheological effects of three chemically-modified human hemoglobin solutions in hemodiluted rabbits. *J Appl Physiol* 86:541-548, 1999.
10. Menu P, Longrois D, Donner M, Faivre B, Labrude P, Stoltz J-F, Vigneron C: Rheological behavior of red blood cells in presence of hemoglobin solutions. *Transfusion Sci* 20:5-16, 1999.
11. Menu P, Longrois D, Bleeker W, Caron A, Faivre-Fiorina B, Labrude P, Stoltz J-F: In vivo effects of hemoglobin solutions on blood viscosity and rheological behaviour of red blood cells: comparison with clinically used volume expanders. *Transfusion* 40:1095-1103, 2000.
12. Creteur J, Sibbald W, Vincent J-L: Hemoglobin solutions: not just red blood cell substitutes. *Crit Care Med* 28:3025-3034, 2000.
13. Mc Carthy MR, Vandegriff KD, Winslow RM: The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobins: implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers. *Biophys Chem* 92:103-117, 2001.
14. Hillman K, Bishop G, Bristow P: The crystalloid versus colloid controversy: present status. In Bramley I (ed): *Baillière's Clinical Anaesthesiology*. Vol. 11. London: Baillière Tindall, 1997, pp 1-13.
15. Schierhout G, Roberts I: Fluid resuscitation with colloid or crystalloid solutions in critically ill patients: a systemic review of randomized trials. *Br Med J* 316:961-964, 1998.
16. Bickell WH, Wall MJ, Pepe PE, Martin RR, Ginger VF, Allen MK, Mattox KL: Immediate versus delayed fluid resuscitation for hypotensive patients with penetrating torso injuries. *N Engl J Med* 331:1105-1109, 1994.
17. Siaghy EM, Devaux Y, Sfakisi N, Carteaux JP, Ungureanu-Longrois D, Zannad F, Villemot JP, Burlet C, Mertes PM: Consequences of inspired oxygen fraction manipulation on myocardial oxygen pressure, adenosine and lactate concentrations: a combined myocardial microdialysis and sensitive oxygen electrode study in pigs. *J Mol Cell Cardiol* 32:493-504, 2000.
18. Caron A, Menu P, Faivre-Fiorina B, Labrude P, Alayash A, Vigneron C: Systemic and renal hemodynamics after moderate hemodilution with HbOCs in anesthetized rabbits. *Am J Physiol* 278:H1974-H1983, 2000.
19. Harris K, Walker PM, Mickle DA, Harding R, Gatley R, Wilson GJ, Kuzon B, McKee N, Romaschin AD: Metabolic response of skeletal muscle to ischemia. *Am J Physiol* 250:H213-H220, 1986.
20. Harris AG, Hecht R, Peer F, Nolte D, Messmer K: Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. *Am J Physiol* 271:H2388-H2398, 1997.
21. Hagström-Toft E, Enoksson S, Morberg E, Bolinder J, Arner P: Absolute concentrations of glycerol and lactate in human skeletal muscle, adipose tissue, and blood. *Am J Physiol* 273:E584-E592, 1997.
22. Palaparthi R, Wang H, Gulati A: Current aspects in pharmacology of modified hemoglobins. *Adv Drug Deliver Rev* 40:185-198, 2000.
23. Nolte D, Steinhauser P, Pickelmann S, Berger S, Härdt R, Messmer K: Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHB™) on local tissue oxygen tension in striated skin muscle: an efficacy study in the hamster. *J Lab Clin Med* 130:328-338, 1997.
24. Kasper SM, Grüne F, Walter M, Arm N, Erasmi H, Bruzello W: The effects of increased doses of bovine hemoglobin on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery. *Anesth Analg* 87:284-291, 1998.
25. Mac Lean D, Imadojemu V, Sinoway L: Interstitial pH, lactate and phosphate determined with MSNA during exercise in humans. *Am J Physiol* 278:R563-R571, 2000.
26. Vallet B: Vascular reactivity and tissue oxygenation. *Intensive Care Med* 24:3-11, 1998.
27. Saetzler RK, Arfors KE, Tuma RF, Vasthare U, Li M, Hsia CJC, Lehr H-A: Polynitroxylated hemoglobin-based oxygen carrier: inhibition of free radical-induced microcirculation dysfunction. *Free Radical Biol Med* 27:1-6, 1999.
28. Rui T, Cepinskas G, Feng Q, Ho YS, Kvietys PR: Cardiac myocytes exposed to anoxia-reoxygenation promote neutrophil transendothelial migration. *Am J Physiol* 281:H440-H447, 2001.



Nom : Mr BOURA  
Prénom : Cédric

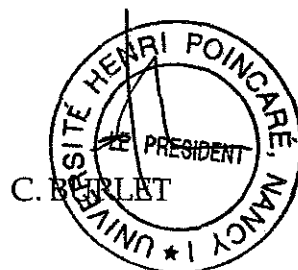


DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1  
en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT  
Spécialité : BIOINGÉNIERIE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°889

Nancy, le 29 décembre 2003

Le Président de l'Université



## RESUME

### Intérêts des films minces multicouches de polyélectrolytes dans la conception de substituts vasculaires.

Une des voies de recherche actuelle en ingénierie tissulaire des vaisseaux consiste à recouvrir la paroi des prothèses synthétiques par une monocouche de cellules endothéliales. Malheureusement, ces surfaces ne permettent pas un développement cellulaire convenable. Il est nécessaire de favoriser les interactions surfaces/cellules en modifiant les propriétés surfaciques de ces matériaux synthétiques. Les films multicouches de polyélectrolytes par leurs propriétés physico-chimiques telles que la rugosité, la charge, permettraient d'améliorer l'adhésion des cellules endothéliales.

Concernant nos résultats sur la biocompatibilité, les films multicouches ne montrent pas d'effet cytotoxique. De plus, le film ~PSS-PAH permet d'améliorer l'adhésion initiale ainsi que la croissance cellulaire. De même, ce film n'induit pas un excès de l'activation des cellules endothéliales à travers l'expression d'ICAM-1, lorsqu'elles sont stimulées par une cytokine (TNF $\alpha$ ) ou une contrainte de cisaillement. Par contre, les cellules sur le film ~PGA-PDL répondent de manière moins favorable à la stimulation par le TNF $\alpha$ , du probablement à une perturbation du cytosquelette. Enfin, nos résultats sur l'adhésion montrent que malgré une plus faible expression des intégrines  $\beta$ 1 des cellules sur les films multicouches, les cellules sur les films adhèrent fortement à la surface. De plus la transduction du signal d'adhésion n'est pas perturbée pour les cellules sur le film ~PSS-PAH, permettant de confirmer la biocompatibilité de ce film.

En conclusion, en terme de biocompatibilité, d'activation et d'adhésion des cellules endothéliales, le film ~PSS-PAH donne des résultats très satisfaisant permettant d'envisager son utilisation dans de futures applications en ingénierie tissulaire des vaisseaux.

**Mots clés :** cellules endothéliales, films multicouches de polyélectrolytes, biocompatibilité, activation cellulaire, adhésion cellulaire, modification de surface, ingénierie tissulaire.

## ABSTRACT

### Polyelectrolyte multilayer thin films used as surface modification in tissue engineering of vascular substitutes.

A way to obtain vascular substitutes consists to recover the luminal surface of vascular prosthesis by a monolayer of endothelial cells. However, the prosthesis surface is not favorable to the adhesion and the growth of the cells. Consequently, it is necessary to improve the interactions between the surface and the cells by surface modification. Polyelectrolyte multilayer films modify the rugosity and charge of the surfaces, and could enhance the cell adhesion.

Our results on biocompatibility show that the multilayer films do not induce a cytotoxic effect. Moreover, ~PSS-PAH film improve the initial adhesion and the growth of endothelial cells. In the same way, this film does not perturb the activation of endothelial through the ICAM-1 expression, contrary to ~PGA-PDL film probably due to a desorganization of cytoskeletal during the stimulation by TNF $\alpha$ . Finally, the evaluation of adhesion shows that despite a lower expression of  $\beta$ 1 integrins, the cells adhere firmly on the multilayers films. Moreover, the signal transduction is not perturbed for the cells on the ~PSS-PAH film, confirming the biocompatibility of this films.

Consequently, in term of biocompatibility, activation and adhesion of endothelial cells, the ~PSS-PAH film show satisfactory results allowing to use this film in future applications in tissue engineering of vascular substitutes.

**Keywords:** endothelial cells, polyelectrolyte multilayer films, cell biocompatibility, cell activation, cell adhesion, surface modification, tissue engineering.

---

Spécialité: Bioingénierie

Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire

Equipe LEMTA-UMR 7563, CNRS/INPL/UHP et IFR 111 Bioingénierie

Faculté de Médecine de Nancy, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex