



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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale Biologie-Santé-Environnement

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY-I

Mention : Ingénierie cellulaire et tissulaire

par **Nicolas BERTHELEMY**

**INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LA
DIFFERENCIATION DE PROGENITEURS VASCULAIRES
EN VUE DE L'OBTENTION D'UN SUBSTITUT VASCULAIRE
AUTOLOGUE**

Soutenue le 23 septembre 2009

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Catherine PICART	PU, CNRS-UMR 5628, Grenoble
	M Didier LETOURNEUR	DR, INSERM U698, Paris
Examineurs :	M Jean-François STOLTZ	PU-PH, UMR 7561 CNRS-UHP, Nancy
	Mme Laurence BORDENAVE	PU-PH, INSERM U577, Université Bordeaux 2
	M Patrick MENU	PU,UMR 7561 CNRS-UHP, Nancy, directeur de thèse
	M Patrick LACOLLEY	DR, INSERM U961, Nancy, co-directeur de thèse
Membre invité:	M Jean Claude VOEGEL	DR, INSERM U977, Strasbourg

Laboratoire de Physiopathologie Pharmacologie et Ingénierie Articulaires

UMR 7561 CNRS-UHP

Faculté de Médecine - 54500 Vandœuvre-lès-Nancy

*À mes parents et à mes frères
Ainsi qu'à toute ma famille pour leur soutien constant et leurs
nombreux encouragements*

*En mémoire de Monsieur Luc MARCHEL, ingénieur d'étude au
laboratoire avec qui j'ai eu de nombreuses discussions scientifiques et de
nombreux fous rires.*

Mes travaux ont été effectués au sein de l'équipe d'ingénierie vasculaire du laboratoire de physiopathologie pharmacologie et ingénierie articulaire UMR CNRS 7561.

Ces trois années m'ont permis de faire la connaissance de nombreuses personnes que je tiens à remercier.

Tout d'abord, je dois avouer que je n'aurais pas fait de thèse si il n'y avait pas eu une si bonne ambiance au laboratoire lors de mon arrivée en Master 2.

Je remercie profondément le Professeur Jean-François Stoltz de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et permis de participer à de nombreux congrès que ce soit en France ou à l'étranger. Sa bonne humeur et ses encouragements m'ont permis de mener au mieux ces travaux.

Patrick Menu, Professeur à la faculté de pharmacie de Nancy a dirigé cette thèse. Son grand humanisme, son écoute envers ses étudiants, sa grande disponibilité et nos nombreuses réunions m'ont permis d'avancer au mieux dans les moments délicats. Je tiens à lui adresser dans ces quelques mots mon entière reconnaissance ainsi que mon profond attachement.

Patrick Lacolley, directeur de recherche de l'unité INSERM 961 a assuré la co-direction de cette thèse. Qu'il soit assuré de mon plus profond respect.

Jean-Claude Voegel, directeur de recherche de l'unité INSERM 977 a joué un rôle particulièrement important au cours de ces trois années. Nos nombreuses réunions m'ont permis de découvrir sa riche expérience dans le domaine de la physico-chimie, ainsi qu'un homme toujours très enthousiaste et disponible à tout moment.

Je suis fier de compter parmi les membres du jury M Didier Letourneur, directeur de recherche de l'unité INSERM 698 et Mme Catherine Picart, Professeur à l'université de Grenoble, qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je tiens à remercier madame Laurence Bordenave, professeur à l'université Bordeaux 2 qui me fait l'honneur de juger ce travail. Qu'elle soit assurée de mon plus profond respect.

La vie d'un laboratoire est rythmée par des arrivées ainsi que des départs d'étudiants et au cours de mes trois années passées au laboratoire, j'ai vu partir de nombreuses personnes et en arriver d'autres.

Je commencerais donc par citer mes amies de bureau et parfois de galère (dans les moments difficile), Halima Kerdjoudj et Caroline Gaucher avec qui j'ai passé mes deux premières années et durant lesquelles nous avons beaucoup travaillé ensemble mais aussi beaucoup ris.

Halima Kerdjoudj, Maître de conférences à la faculté de chirurgie dentaire de Reims, a joué un rôle majeur au cours de ces années. Elle m'a enseigné tout ce que je sais aujourd'hui. Elle représente mon troisième directeur de thèse. En plus du contenu scientifique qu'elle m'a apporté, nos moments de détente m'ont permis de connaître certains mots de sa langue natale, l'arabe. Elle a même été jusqu'à me parler en arabe durant les manips. Cela n'a pas toujours été facile à comprendre...Je tenais ici à la remercier pour tout ce qu'elle a fait et à lui dire que cela a été une véritable joie de travailler avec elle et que j'espère le revoir souvent dans les années à venir. Halima, comme on dit chez toi : Saha !

Caroline Gaucher, post-doc à Rennes, m'a fait partager son expérience, sa bonne humeur constante et son humour. Elle nous manque terriblement dans le bureau. Je lui souhaite évidemment beaucoup de réussite et beaucoup de bonheur ainsi qu'à toute sa jolie petite famille.

Je tiens également à remercier Monique Gentils, assistante ingénieur au laboratoire, avec qui j'ai effectué l'expérimentation animale et qui s'est parfois levée très tôt pour commencer les manips.

Avec Ghislaine Cauchois, se sont deux personnes avec qui j'ai eu de nombreuses discussions tant au niveau professionnel que personnel.

Je remercie également Huguette Louis, assistant ingénieur de l'unité INSERM 961 pour sa bonne humeur et pour sa grande disponibilité à chaque fois que je suis venu la voir pour lui demander conseils.

Les années suivantes, j'ai pu faire la connaissance de nouveaux amis, Estelle Paternotte et Nicolas Salmon, actuellement en troisième année de thèse avec qui j'ai vécu de nombreux moments inoubliables.

Je voudrais remercier toutes les autres personnes du laboratoire (Pierre Labrude, Dominique Dumas, Sébastien Hupont, Karine Lorcin, Brigitte Guerber, Naceur, Nati, Jessica, Leti, Assia, HuaHua, Emilie et Elisabeth) ainsi que toutes les personnes de l'unité INSEM 961 pour tous les agréables moments passés ensemble.

Pour finir, je tiens à remercier tous mes amis les plus proches (Greg, Mike, Mickey, Johanna, Joris, Vaness et tous les autres) ainsi que tous mes stagiaires (Diane, Erwan, Matthieu, Mathieu, Nesrine, Axel) pour tous les moments forts passés ensemble et tous ceux qui restent à vivre ensemble.

Pour conclure, je voudrais dire que lorsque l'on fait une thèse, on pleure deux fois : une fois en arrivant, car les manips ne sont pas toujours ce que l'on espérait mais on pleure aussi une seconde fois en partant parce que les personnes du laboratoire sont devenues au cours de ces trois ans comme votre deuxième famille et qu'il est toujours difficile de quitter sa famille.

Liste des abréviations

µm: micromètre
ATP: adénosine triphosphate
bFGF: beta- fibroblast growth factor
CE : cellules endothéliales
cm² : centimètre carré
CML : cellules musculaires lisses
CSH: cellules souches hématopoïétiques
CSM: cellules souches mésenchymateuses
DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium
EBM-2: endothelial basal medium-2
EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid
eNOS: NO synthase endothéliale
EPC : progéniteurs de cellules endothéliales
E-sélectine : endothelial selectin
G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF: granulocyte monocyte-colony stimulating factor
HBSS: Hank's balanced salt solution
HCl: acide chlorhydrique
HIF : hypoxia inducible factor
IP: iodure de propidium
JVEC: cellules endothéliales de veine jugulaire
kDa : kilodalton
Kg: kilogramme
LDL: low density lipoprotein
MEC : matrice extra-cellulaire
mL: millilitre
mm : millimètre
nm: nanomètre
NO: monoxyde d'azote
OLED: diodes organiques électroluminescentes
PAA: polyacrylic acid
PAF: paraformaldéhyde
PAH : poly(allylamine hydrochloride)
PBS: phosphate buffer saline
PDADMA: chlorure de poly(diallyldiméthylammonium)
PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule -1
PEI: poly(éthylène imine)
PEM: polyelectrolyte multilayer film
PGI₂: prostacycline
PIGF: placental growth factor
PMA: poly(acide méthacrylique)
PPV: poly(*p*-phénylènevinylène)
PSS: poly(styrene 4-sulfonate)
PTFEe: polytétrafluoroéthylène expansé
SDF-1: stromal derived factor-1
SDS: sodium dodécylsulfate
SM22 α: smooth muscle 22 α
SM-MHC: smooth muscle myosin heavy chain

SVF: sérum de veau foetal
t-PA : activateur tissulaire du plasminogène
UI: unité arbitraire
VE-cadhérine : vascular endothelial cadherin
VEGF: vascular endothelial growth factor
VEGF-R2: vascular endothelial growth factor- receptor 2
vWF: von Willebrand Factor
 α -SM-actine : alpha actine du muscle lisse

Table des illustrations

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : genèse du système vasculaire.....	13
<u>Figure 2</u> : structure d'une artère, comprenant les trois tuniques concentriques : l'adventice, la média et l'intima.	15
<u>Figure 3</u> : observation en microscopie à contraste de phase de CML issues d'aorte de lapin...	19
<u>Figure 4</u> : représentation schématique des CML de phénotype différencié et dédifférenciée..	20
<u>Figure 5</u> : observation en microscopie à contraste de phase et coupe transversale d'une cellule endothéliale.	24
<u>Figure 6</u> : aspect macroscopique de substituts vasculaires naturels et synthétiques utilisés pour le remplacement de vaisseaux malades.	28
<u>Figure 7</u> : observation microscopique d'un blastocyste humain.	42
<u>Figure 8</u> : représentation schématique de l'implication des EPC dans la réparation des lésions vasculaires.	44
<u>Figure 9</u> : représentation schématique de la mobilisation des EPC depuis la moelle osseuse vers la circulation sanguine.	45
<u>Figure 10</u> : mobilisation des EPC et incorporation au niveau de sites ischémiques coronariens.....	51
<u>Figure 11</u> : représentation de la structure chimique des différents polyélectrolytes utilisés....	92
<u>Figure 12</u> : principe de la construction d'un film multicouches de polyélectrolytes.....	92
<u>Figure 13</u> : principe de l'immunomarquage direct et indirect.....	99

Figure 14: dépôt de l'alginate recouvert par le film de polyélectrolytes sur une lame de verre, coloration au bleu trypan. Détachement et enroulement autour d'un mandrin en verre..... 140

Figure 15: observation en microscopie à contraste de phase de CMLensemencées sur les différents supports : A) alginate, B) alginate+film (PAH/PSS)₃- PAH, et C) TCPS.....141

Figure 16: observation en microscopie confocale des marqueurs des CML (α -actine et SM-MHC) sur l'alginate+film de polyélectrolytes et sur collagène.....141

Figure 17: diagramme de Jablonski.....170

Figure 18: schéma de principe d'un microscope confocal à balayage laser.171

Figure 19: principe de reconstitution d'images en 3D.172

Figure 20: principe de la cytométrie en flux.....173

Liste de tableaux

Tableau 1: adaptation des territoires vasculaires à leurs fonctions.....16

Tableau 2: expression des marqueurs de différenciation en fonction de l'état des CML.....23

Tableau 3: liste non exhaustive des stimuli exogènes influençant la mobilisation des EPC...48

Tableau 4: liste de troubles pathologiques diminuant le nombre d'EPC dans la circulation sanguine50

Tableau 5: liste non exhaustive des pathologies liées à un faible taux d'EPC dans la circulation sanguine.....50

Tableau 6: composition des tampons sans calcium ni magnésium utilisés au cours de ces travaux.....95

<u>Tableau 7</u> : liste des anticorps primaires utilisés	100
---	-----

<u>Tableau 8</u> : liste des anticorps secondaires utilisés.....	100
--	-----

Liste des figures et tableaux présentés dans les différents articles

Revue parue dans *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2007, 37: 89–98

<u>Figure 1</u> : Main stages of vascular tissue engineering.....	33
---	----

<u>Table 1</u> : Different matrix used in order to improve cell retention on luminal vascular graft...	34
--	----

Revue soumise dans *Soft Matter*, 2009

<u>Figure 1</u> : Arteries structure and endothelium function.	76
---	----

<u>Figure 2</u> : Layer by layer technology.	78
---	----

<u>Figure 3</u> : Patency of PEM treated arteries.	81
---	----

<u>Figure 4</u> : Vascular cells characterization.	82
---	----

<u>Figure 5</u> : Endothelial cells adhesion and retention on the luminal surface of the PEM treated arteries.....	83
--	----

<u>Figure 6</u> : Histological examination of the arterial wall.	85
---	----

<u>Figure 7</u> : Mechanical properties of the arteries.	86
---	----

<u>Figure 8</u> : Vascular tissue engineering: Cell sheet approach.	87
--	----

<u>Table 1</u> : Physical characteristics of synthetic prosthesis.....	88
--	----

<u>Table 2</u> : Clinical results of endothelialized vascular substitutes.....	88
--	----

<u>Table 3</u> : PEM properties with respect to tissue engineering.....	89
---	----

Article paru dans *Advanced Materials* 2008, 20: 2674–2678

Figure 1: Morphological evolution of EPCs seeded on Fn (A–C) and PEMs (D,E) by optical phase contrast microscopy.....106

Figure 2: Cytoskeleton visualization, with absence (A1) or presence of actin polymerization, and cell phenotype characterization vWF, CD31, Dil-Ac-LDL by confocal microscopy after 14 days of culture on Fn, PEMs, and JVECs as a control.....108

Supplementary Figure 1 online: Cytoplasm area for EPC seeded on Fn and PEM coated surfaces after 14 days of culture and comparison with JVEC used as control.....114

Supplementary Figure 2 online: Alamar Blue viability assay test on EPC and JVEC.....115

Supplementary Figure 3 online: Cell phenotype characterization by confocal microscopy observation after 4 days of culture on Fn and PME coated surfaces.....116

Article paru dans PLoS ONE 2009 4: e5514.

Figure 1: Morphological aspect of differentiated cell.126

Figure 2: Vascular cell phenotype characterization.128

Figure 3: Extracellular matrix synthesis.128

Figure 4: Phenotype stability under hypoxia.130

Figure 5: Phenotype stability under normoxia.132

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	8
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
<u>I. Formation des vaisseaux sanguins : genèse</u>	12
I. 1. <u>La vasculogenèse</u>	12
I. 2. <u>L'angiogenèse</u>	12
I. 3. <u>Les vaisseaux sanguins : rappels généraux</u>	14
I. 4. <u>Les cellules musculaires lisses (CML)</u>	17
I. 4. 1. <u>Origine</u>	18
I. 4. 2. <u>Structure</u>	18
I. 4. 3. <u>Caractéristiques des CML</u>	19
<i>A/ Marqueurs de différenciation des CML vasculaires</i>	20
<i>A/1. Les protéines de l'appareil contractile.</i>	20
<i>A/2. Les filaments intermédiaires</i>	22
I. 5. <u>Les cellules endothéliales (CE)</u>	23
I. 5. 1. <u>Origine</u>	23
I. 5. 2. <u>Structure</u>	23
I. 5. 3. <u>Caractérisation des CE</u>	24
<i>A/ Marqueurs spécifiques des cellules endothéliales</i>	24
<i>A/1. Marqueurs membranaires</i>	24
<i>A/2. Marqueurs intracellulaires</i>	25
<i>B/ Fonctions de l'endothélium vasculaire</i>	26
I.6. <u>Cellules endothéliales et cellules musculaires lisses</u>	27
<u>II. Ingénierie tissulaire</u>	27
II.1. <u>Les substituts vasculaires</u>	27
II.2. <u>Les différents axes de l'ingénierie vasculaire</u> (revue <i>Clinical Hemorheology and Microcirculation</i>).....	28

<u>III. Les cellules souches</u>	41
III.1. <u>Les cellules souches embryonnaires</u>	41
III.2. <u>Les cellules souches fœtales</u>	43
III.3. <u>Les cellules souches adultes</u>	43
III.3.1 <u>les cellules souches mésenchymateuses</u>	43
III.3.2 <u>Les cellules souches hématopoïétiques</u>	44
III.3.3 <u>Les progéniteurs endothéliaux (EPC)</u>	45
A/ Le Phénotype des EPC	46
B/ La mobilisation des EPC	48
B/1. <i>Les stimulations exogènes</i>	49
B/2. <i>Les stimulations endogènes</i>	50
C/ EPC et traitement cardiovasculaire	51
C/1. <i>Traitement des sites ischémiques</i>	51
C/2. <i>Les EPC et l'ingénierie vasculaire</i>	52
 <u>IV. Les films multicouches de polyelectrolytes (revue soumise Soft Matter)</u>	53
 <u>V. Objectifs du travail</u>	90
 MATERIELS ET METHODES	91
 <u>I. Préparation des surfaces de culture</u>	92
 <u>II. Expérimentation animale</u>	93
II.1. <u>Anesthésie</u>	93
II.2. <u>Prélèvement de sang</u>	93
II.3. <u>Euthanasie et prélèvement de la veine jugulaire</u>	94
 <u>III. Culture cellulaire</u>	94
III.1. <u>Réactifs et matériels</u>	94
III.2. <u>Culture des cellules endothéliales extraites de la veine jugulaire</u>	96
III.3. <u>Culture des cellules musculaires lisses</u>	96
III.4. <u>Passage en subculture</u>	97
III.5. <u>Cellules souches hématopoïétiques : progéniteurs endothéliaux</u>	97

IV. <u>Méthodes de caractérisation et d'investigation</u>	98
IV.1. <u>Activité métabolique</u>	98
IV.2. <u>Méthodologie</u>	98
IV.3. <u>Suivi du phénotype cellulaire par immunocytologie</u>	98
V. <u>Analyses statistiques</u>	99
 RESULTATS ET DISCUSSION	101
 I. <u>Effets des films multicouches de polyélectrolytes sur la différenciation des progéniteurs endothéliaux</u>	102
I.1. <u>Objectifs</u>	102
I.2. <u>Manuscrit</u>	104
I.3. <u>Résumé des résultats</u>	117
 II. <u>Rôle de la concentration en oxygène dans la différenciation des progéniteurs circulants</u>	119
II.1. <u>Objectifs</u>	119
II.2. <u>Manuscrit</u>	120
II.3. <u>Résumé des résultats</u>	136
 III. <u>Programme interdisciplinaire – CNRS : Vaisseau <i>in situ</i></u>	138
III.1. <u>Objectif du projet et stratégie utilisée</u>	138
III.2. <u>Difficultés du projet et prises de risques</u>	139
III.3. <u>Avantages de notre substitut</u>	139
III.4. <u>Résultats préliminaires</u>	140
III.5. <u>Conclusion et perspectives du projet</u>	142
 CONCLUSION GENERALE	143
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	148

ANNEXES.....	169
<u>I. La microscopie confocale à balayage laser</u>.....	170
I.1. <u>Phénomène de fluorescence</u>	170
I.2. <u>Principe de la microscopie confocale à balayage laser</u>	171
<u>II. La cytométrie en flux</u>.....	172
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....	174

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies cardiovasculaires représentent l'une des principales causes mondiales de mortalité. Parmi ces pathologies, l'athérosclérose conduit à l'obstruction la lumière des vaisseaux sanguins, responsable chaque année d'environ 17 millions de décès (Rapport sanitaire, 2003).

Les stades avancés de cette maladie vont nécessiter le remplacement du vaisseau malade. Pour cela, les chirurgiens vasculaires ont différentes possibilités :

- l'utilisation de prothèses vasculaires synthétiques (de type Dacron ou polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe)) pour remplacer les vaisseaux de gros calibres, mais inadaptées pour ceux de plus faible diamètre. Cela est essentiellement dû à leurs faibles propriétés mécaniques qui posent des problèmes de thrombose après implantation.
- le recours à des substituts naturels autologues tels que la veine saphène ou l'artère mammaire. L'obtention de ces substituts prélevés chez le patient, demande une intervention chirurgicale préalable s'ils sont disponibles, ce qui n'est possible que dans 30 % de cas.

La disponibilité réduite des autogreffes, associée aux risques potentiels d'ordres infectieux et immunologique des allogreffes, et aux limites des prothèses synthétiques ont favorisé la recherche alternative pour obtenir des substituts vasculaires se rapprochant le plus possible des vaisseaux natifs.

Depuis de nombreuses années, des scientifiques se sont rapprochés pour combiner leur savoir-faire dans les domaines de la médecine, de la biologie et des sciences des matériaux afin de permettre le développement *in vitro* de tissus qui pourront être implantés. En ce qui nous concerne, l'ingénierie vasculaire développe des substituts vasculaires de petits calibres. En vue d'assurer ainsi une parfaite biosécurité pour le patient, ces substituts doivent répondre à un cahier des charges qui demande à la fois des propriétés mécaniques comparables à celles d'un vaisseau natif et une surface interne hémocompatible à long terme

Concernant l'hémocompatibilité, les cellules endothéliales (CE) représentent un composant de choix pour tapisser la lumière des substituts vasculaires et sont un facteur indispensable pour éviter toute thrombose. Ces CE matures peuvent être isolées à partir d'artères humaines, mais elles présentent une capacité de prolifération limitée doublée d'une dédifférenciation progressive au cours de la culture *in vitro*, ce qui nécessite la récupération d'un grand nombre de cellules primaires pour des applications à but thérapeutique.

La nécessité de trouver une source non traumatisante de CE capables de proliférer rapidement nous a conduit à nous intéresser aux cellules souches adultes, et parmi elles, les progéniteurs endothéliaux (EPC).

Les EPC, d'origine médullaire, sont libérées dans la circulation sanguine et se différencient en CE. Ils représentent une source de cellules très accessible, par simple prise de sang, mais leur nombre est cependant excessivement faible dans la circulation sanguine ; leur expansion et leur différenciation en CE sont longs. De plus, afin de favoriser leur différenciation, certains paramètres sont importants à prendre en compte tels que : l'utilisation de facteurs de croissance adéquates, les contraintes mécaniques et surtout le type de recouvrement de la surface de culture sur laquelle ils sont cultivés.

C'est précisément ce troisième point qui est au centre de notre travail.

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre des activités du groupe d'ingénierie vasculaire de l'UMR CNRS 7561 dont l'un des objectifs est de développer des substituts vasculaires de petits calibres.

Les films multicouches de polyélectrolytes, développés au début des années 1990, permettent de modifier les propriétés physico-chimiques des surfaces sur lesquelles ils sont déposés. Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont montré l'intérêt de ces films en ingénierie vasculaire (thèse C. Boura, V. Moby et H. Kerdjoudj), en particulier en terme d'adhérence cellulaire, de prolifération et lors d'application *in vivo*. Cependant, la majorité de ces travaux a fait appel à l'utilisation de CE matures, mais aucune étude à ce jour n'a montré quel était le comportement des EPC sur ces films de polyélectrolytes.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons évalué l'effet 1) des films multicouches de polyélectrolytes sur la différenciation des EPC issus de sang périphérique de lapin (modèle animal utilisé au laboratoire), 2) des différentes conditions de culture choisies (normoxie ou hypoxie). La différenciation cellulaire a été vérifiée en étudiant le phénotype de ces cellules a été vérifié au cours du temps et en fonction des conditions environnementales. Les résultats obtenus nous ont conduits à suggérer un mode de développement de substituts vasculaires de petit calibre.

Ce mémoire de thèse se présente en quatre parties :

- la première partie, bibliographique, rappelle les différents travaux menés sur ce sujet, mettant en lumière les connaissances actuelles et les problématiques de recherche de l'ingénierie vasculaire des vaisseaux de faible diamètre.
- la deuxième partie présente les différents matériels et méthodes utilisés au cours de ces travaux. Ces descriptions sont pour la plupart plutôt courtes, car amplement décrites dans les différentes publications jointes.
- la troisième partie rassemble les différents résultats obtenus au cours de cette thèse. Ceux-ci sont brièvement exposés, car déjà présentés dans les publications. Ces travaux sont discutés en mettant en évidence les résultats-clés et les limites, dont la résolution est une charnière pour les études suivantes.
- la quatrième partie concerne la conclusion générale de ces travaux. Elle permettra également de définir les perspectives de cette thématique au sein de l'équipe.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Le développement du système circulatoire est essentiel chez l'embryon, permettant d'une part l'apport d'oxygène et de nutriments mais également l'élimination des déchets, nécessaires au développement et à la survie de tous les organes. Au cours de cette partie, nous détaillerons plus particulièrement le mécanisme de formation des vaisseaux sanguins, leur morphologie, l'ingénierie tissulaire vasculaire et les cellules souches.

I. Formation des vaisseaux sanguins : genèse.

Deux mécanismes interviennent lors de la formation des vaisseaux sanguins : la vasculogénèse et l'angiogénèse. Il est important de faire la distinction entre ces deux termes qui ont la même signification, la genèse de vaisseaux sanguins, mais qui sont cependant deux processus bien distincts. En 1920, Sabin a permis de détailler très précisément le processus de vasculogénèse, le séparant ainsi de l'angiogénèse (Sabin 1920).

I.1. La vasculogénèse

Les premières observations de la formation *in situ* de vaisseaux sanguins chez l'animal vivant datent de la fin du XIX^{ème} siècle, où de nombreuses observations microscopiques *in vivo* ont été effectuées sur des embryons de poulet (HIS 1868, Reagan 1915, Stockard 1915).

Les hémangioblastes sont des cellules mésodermiques présentes dans le sac hyalin extra-embryonnaire et qui donnent naissance aux îlots sanguins. Ces cellules vont proliférer et se différencier en angioblastes, en cellules souches hématopoïétiques et en cellules progénitrices des futures cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Les angioblastes vont alors fusionner entre eux, puis s'allonger pour donner naissance à un plexus vasculaire primitif, à l'origine du système vasculaire présent chez l'adulte (Drake et al 1998, Poole et al, 2001) (Figure 1A).

I.2. L'angiogénèse

Au cours de l'angiogénèse, le plexus vasculaire primitif issu de la vasculogénèse va donner naissance à un système circulatoire comprenant des vaisseaux sanguins de différents calibres afin d'obtenir un système circulatoire mature et fonctionnel. (Flamme et al 1997 ; Risau 1997). L'angiogénèse correspond à la formation de vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux pré-existants. L'une des premières descriptions de ce processus de formation est

due au médecin grec Galien (130-200 après J.C) qui compara le développement embryonnaire à celui d'une plante (Harris 1973).

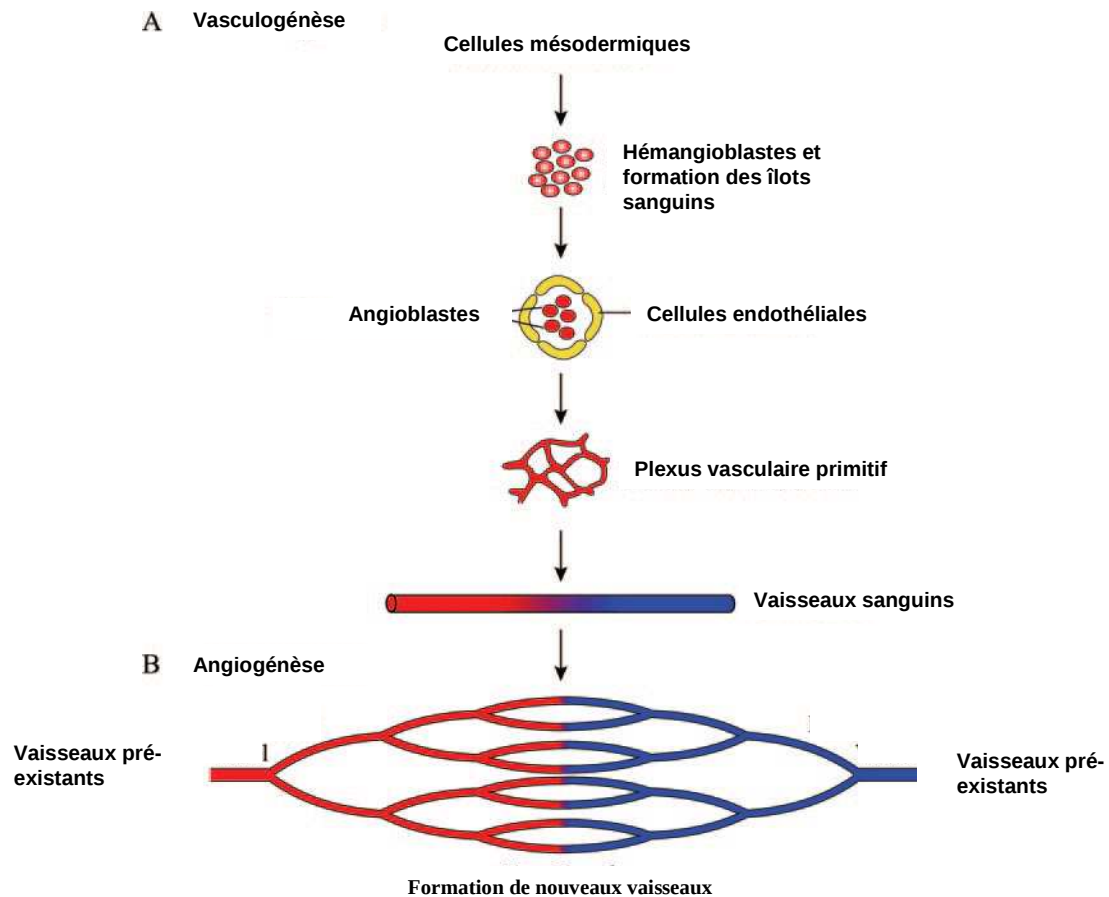


Figure 1: génèse du système vasculaire (d'après lamalice et al 2007)

A) Au cours du développement embryonnaire, la vasculogénèse permet la vascularisation de l'embryon. Les cellules mésodermiques se différencient en hémangioblastes et forment des îlots sanguins primitifs. Les hémangioblastes vont alors se différencier en angioblastes, précurseur des cellules endothéliales. Les îlots sanguins vont ensuite fusionner entre eux et former des structures tubulaires donnant naissance à un plexus vasculaire primitif. Ce plexus vasculaire est à l'origine des vaisseaux de plus gros calibre.

B) L'angiogénèse diffère de la vasculogénèse, car c'est un processus de néovascularisation par lequel les nouveaux vaisseaux se forment à partir de vaisseaux pré-existants.

Ce processus d'angiogénèse se produit à la fois durant la vie embryonnaire mais également chez l'adulte (Peichev et al 2000 ; Watt et al 1995) et se déroule en plusieurs étapes. On observe tout d'abord une vasodilatation accompagnée d'une augmentation de la perméabilité vasculaire de la zone destinée à former le nouveau vaisseau. Les cellules endothéliales vont alors libérer différentes protéases (collagénase, activateur du plasminogène,...) qui vont dégrader la membrane basale. Suite à différents stimuli angiogéniques, les cellules endothéliales vont proliférer et migrer, pour au final, former un tube constitué uniquement de cellules endothéliales. Par la suite, se produit un recrutement et une différenciation de cellules péri-vasculaires afin de former un vaisseau sanguin avec une paroi vasculaire perméable et fonctionnelle (Ausprunk et al 1977, Folkman 1982, Folkman 1985, Folkman 1986) (Figure 1B).

I.3. Les vaisseaux sanguins : rappels généraux

Le système circulatoire forme un réseau branché d'artères, de veines et de capillaires avec des tailles et des propriétés mécaniques et biochimiques différentes. En effet, le vaisseau doit, suivant sa localisation, permettre et contrôler la diffusion des substances depuis le sang vers les tissus et inversement. Ce vaisseau doit de surcroît posséder une élasticité suffisante pour répondre aux déformations imposées par le flux sanguin pulsatile induit par le cœur ; il doit également opposer des forces de tension suffisantes pour résister aux pressions qui s'exercent, surtout dans le système artériel afin de permettre la propagation de l'onde de pouls. L'organisation des vaisseaux varie donc suivant les différents niveaux de l'arbre vasculaire : du cœur émergent les grosses artères élastiques dont le large diamètre diminue peu à peu et sur lesquelles s'embranchent des artères musculaires puis les artérioles, débouchant sur le lit vasculaire périphérique que forme, au niveau de chaque tissu constitutif des organes, le très dense réseau de capillaires. Le retour de la circulation des organes vers le cœur est assuré par des veinules, puis des veines de calibre de plus en plus large, aboutissant aux veines caves, qui assurent le retour vers le cœur.

Chaque territoire de l'arbre vasculaire possède donc une morphologie et une composition adaptées à son environnement et à sa fonction (tableau 1).

Quelque soit le territoire anatomique concerné, l'organisation caractéristique de la paroi vasculaire en trois tuniques est conservée, à l'exception de celle des capillaires qui ne comporte qu'une seule couche ; seules les proportions des constituants des couches varient pour répondre adéquatement aux exigences fonctionnelles du vaisseau en question.

La structure en trois couches de la paroi vasculaire artérielle comprend de l'extérieur vers l'intérieur (Figure 2) :

- L'adventice, constitué d'un tissu conjonctif dense composé de fibroblastes, de fibres de collagène et de quelques fibres élastiques. Dans les grosses artères, il est traversé par des vaisseaux nourriciers, les *vasa vasorum*, des vaisseaux lymphatiques et des fibres nerveuses. Son épaisseur est très variable suivant sa localisation, et sa structure varie avec l'âge. Elle assure l'ancrage du vaisseau aux tissus environnants, la nutrition de la paroi et participe au contrôle du calibre vasculaire.
- La média est la tunique impliquée dans les phénomènes de contraction et de dilatation. Elle est presque exclusivement constituée de cellules musculaires lisses (CML) associées à des constituants extracellulaires : fibres de collagène, fibres élastiques et protéoglycanes dont les proportions relatives varient selon qu'il s'agit d'artères élastiques ou musculaires. Les forces auxquelles sont soumis les vaisseaux conditionnent largement l'épaisseur de la média.

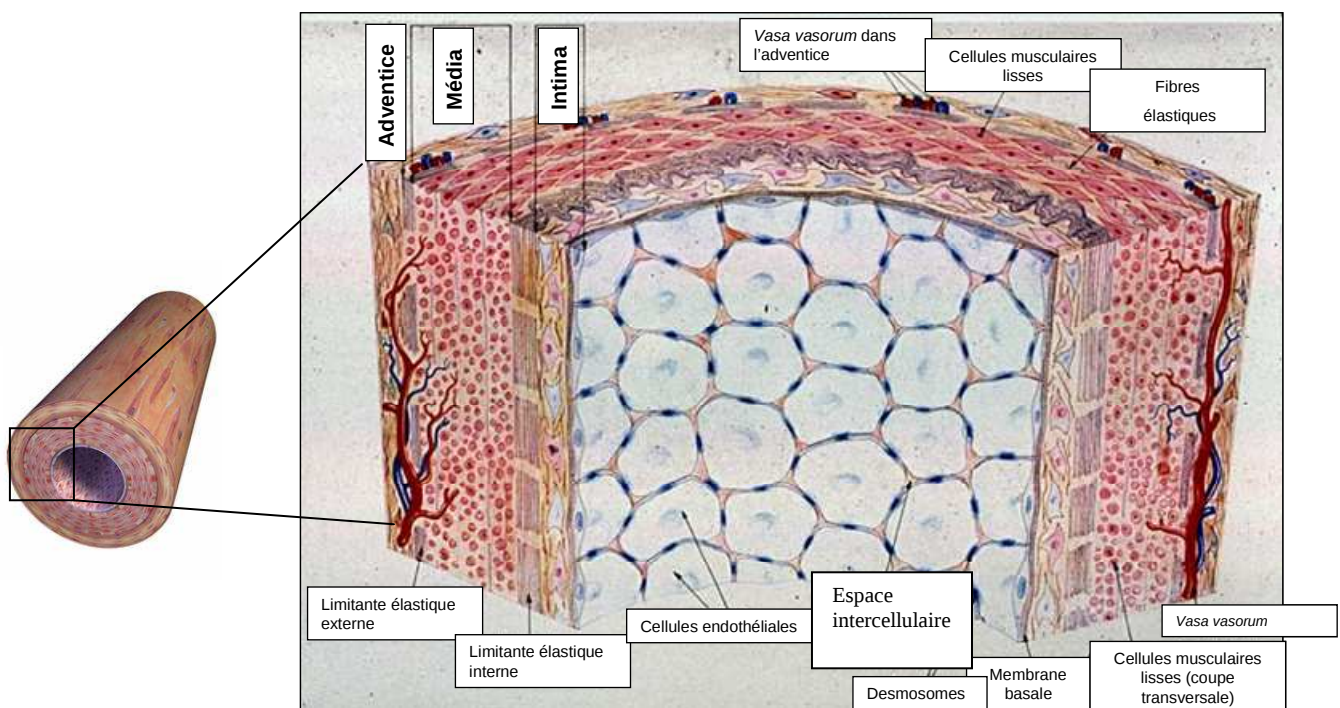


Figure 2: Structure d'une artère, comprenant les trois tuniques concentriques : l'adventice, la média et l'intima

<u>Vaisseau</u>	<u>Diamètre (mm)</u>	<u>Fonction</u>	<u>Structure</u>	<u>Contrainte de cisaillement (dynes/cm²)</u>
Artères	1 à 30 (suivant les artères)	transforment le flux pulsatile issu du cœur (haute pression) en flux discontinu (basse pression)	Composé de trois couches concentriques (intima, média, adventice)	10 à 20
Elastiques	-	élasticité > contractilité (sortie du cœur)	Gros diamètre. Fibres élastiques nombreuses dans la média	-
Musculaires	-	élasticité < contractilité	Limitantes élastiques interne et externe. Média riche en CML	-
Artérioles	0,1 à 0,5	véhiculent un flux régulier basse pression vers le lit capillaire	Lame élastique interne. Média réduite: peu de CML	40 à 70
Capillaires	0,01 à 0,05	assurent les échanges entre le sang et les tissus	Endothélium et membrane basale entourant les péricytes. Jonctions inter-endothéliales et fenestration de l'endothélium	60
Veinules	0,01 à 1	résultent de la jonction de plusieurs capillaires	aspect proche de celui des capillaires	1 à 5
Veines	3 à 15 (suivant les veines)	retour du sang vers le cœur sous pression réduite grâce à des contractions-dilatations	valvules. Lame élastique interne et CML dans les veines plus larges. Adventice prépondérante	6 à 10

Tableau 1 : adaptation des territoires vasculaires à leurs fonctions.

Ainsi les artères des grands mammifères supportent-elles des forces de tension beaucoup plus fortes que celles des petits mammifères et sont proportionnellement plus épaisses, contenant davantage de lames élastiques concentriques : plus de soixante chez l'homme et seulement une vingtaine chez le lapin. A l'inverse, la média est beaucoup moins importante dans les veines que dans les artères de diamètre comparable. Celles-ci renferment quelques groupes de CML séparées par de larges espaces conjonctifs renfermant des fibres de collagène disposées longitudinalement et largement vascularisées. Cette disposition se rapproche de ce que l'on trouve dans l'adventice.

- Entre la média et l'adventice se trouve une membrane élastique encore plus fine appelée limitante élastique externe, et entre l'intima et la média se trouve une mince membrane élastique appelé limitante élastique interne.

L'intima, en contact direct avec le sang, est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) pavimenteuses reposant sur une membrane basale, elle-même en contact étroit avec le sous-endothélium. L'endothélium est recouvert d'une enveloppe cellulaire (glycocalyx) riche en protéoglycanes (héparane sulfate) qui joue un rôle essentiel dans la thromborésistance. De plus les CE ont la particularité d'être polarisées. Le versant supérieur est en contact direct avec le sang (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 CE doivent se retrouver du côté de la lumière du vaisseau pour être sécrétées et exposées du côté apical.

Ce travail de thèse s'est limité à l'étude des CML ainsi que des CE ; c'est pourquoi nous ne détaillerons que ces deux types cellulaires.

I.4. Les cellules musculaires lisses

Les CML sont entourées d'une membrane péricellulaire, qu'elles synthétisent, constituée majoritairement de collagène de type IV, étroitement associé à la membrane de la cellule. La matrice extracellulaire (MEC) de la média est adaptée aux propriétés mécaniques d'un tissu qui, surtout dans les artères élastiques, est doué de contractilité et d'élasticité. Les CML présentes dans la média jouent un double rôle. Elles synthétisent d'une part les composants de la paroi vasculaire, et d'autre part agissent de façon active sur l'élasticité de la paroi grâce à leurs propriétés contractiles.

I.4. 1. Origine

L'origine des CML est encore mal connue. Il a fallu attendre le début des années 1970 pour que leur contribution soit prise en compte lors du développement embryonnaire et au cours de processus pathologiques.

L'identification des présumées CML au cours du développement embryonnaire fût d'abord basée sur leur localisation anatomique à l'intérieur de la paroi vasculaire. Au cours de ces premières études, les caractéristiques cytologiques et ultrastructurales des présumées CML furent décrites. Ces cellules apparaissent dans un premier temps sous forme d'agrégats des cellules mésodermiques adjacentes à l'endothélium. Elles possèdent des organites intracellulaires proéminents pour la synthèse protéique (appareil de Golgi et réticulum endoplasmique), et n'ont pas de cytoplasme filamenteux. Au cours du développement de l'embryon, les présumées CML embryonnaires acquièrent des caractéristiques de CML matures avec une quantité d'organites de synthèse diminuée et la présence de myofilaments permettant la contraction. Ces descriptions effectuées chez le poulet sont similaires à celles faites chez les mammifères au cours de leur développement (Nakamura 1988, nikkari et al 1988, kocher et al 1985).

I.4. 2. Structure

Les CML matures sont des cellules incapables de migrer. Elles sont caractérisées par un taux de prolifération extrêmement faible, ne sécrètent que de faibles quantités de protéines de la MEC et expriment un répertoire unique de protéines contractiles et du cytosquelette, de canaux ioniques, et de molécules de signalisation indispensables à leurs propriétés contractiles. Ce sont des cellules allongées (20-50µm de long et 5µm de diamètre) mononucléées (noyau central et allongé) et entourées d'une lame basale (Figure 3). Elles interagissent avec la MEC par l'intermédiaire de protéines membranaires assurant la jonction cellules/matrice. Des gaps junctions permettent des échanges intercellulaires. La structure de l'organe contractile de la paroi vasculaire est différenciée du muscle strié par l'absence de stries (d'où le terme lisse). Cet organe possède un équipement contractile avec des fibres actines-myosine, des mitochondries. Les fibres d'actine-myosine sont fixées aux corps denses.

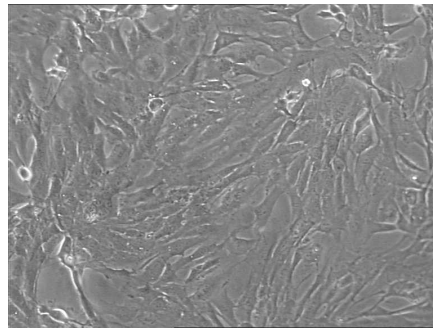


Figure 3 : Observation en microscopie à contraste de phase de CML issues d'aorte de lapin. (Objectif x20).

1.4. 3. Caractéristiques des CML

Dans les vaisseaux sanguins adultes, les CML hautement différenciées présentent un très faible taux de prolifération et sécrètent peu de protéines de la MEC. Au contraire, ces processus sont augmentés lors du développement du système vasculaire ou de son remodelage (Figure 4). Ainsi, cette plasticité des CML est considérée comme une propriété essentielle de leur programme de différenciation, car elle leur confère un avantage évolutif que ne possèdent pas les autres types cellulaires. Une CML donnée peut acquérir un large spectre de phénotypes en réponse à différents stimuli physiologiques ou pathologiques. Par exemple, si une lésion intervient au niveau d'une artère endommagée, quelques CML vont être recrutées pour participer au processus de réparation alors qu'au même moment la fonction contractile du vaisseau doit être maintenue pour assurer une homéostasie cardiovasculaire normale.

L'hétérogénéité est importante parmi les CML, tant dans les conditions physiologiques que lors de situations pathologiques. Dans la paroi de l'artère pulmonaire, Frid et al. (Frid et al 1997) ont identifié au moins quatre types de CML se différenciant les uns des autres par leur potentiel prolifératif, l'expression de gènes, leur morphologie, et leur localisation à l'intérieur de la paroi. Une hétérogénéité a également été observée au niveau de la vitesse de contraction entre différentes CML artérielles, et cette différence serait liée au contenu en protéines contractiles des cellules (Eddinger et Meer, 1997). La modulation du phénotype des CML se produit également dans des situations pathologiques. Une accumulation anormale de CML prolifératives est observée dans l'épaississement néointimal des lésions athéromateuses et lors du processus de resténose suivant une angioplastie par ballon ou une reconstruction vasculaire.

Les divers états phénotypiques des CML ne possèdent pas de marqueurs distincts. En fait, les marqueurs apparaissent de façon progressive grâce à des mécanismes d'induction et

s'organisent de façon à former un appareil contractile efficace. Il est donc important de déterminer les protéines qui caractérisent un stade ou un état donné des CML différenciées (ou matures) *versus* les protéines, qui seules peuvent servir de marqueurs définitifs pour l'identification de lignées de CML, afin d'exclure d'autres types cellulaires. L'identification des CML portent sur plus d'un critère, incluant l'expression de multiples marqueurs dits spécifiques aux CML, leur morphologie et leurs caractéristiques fonctionnelles.

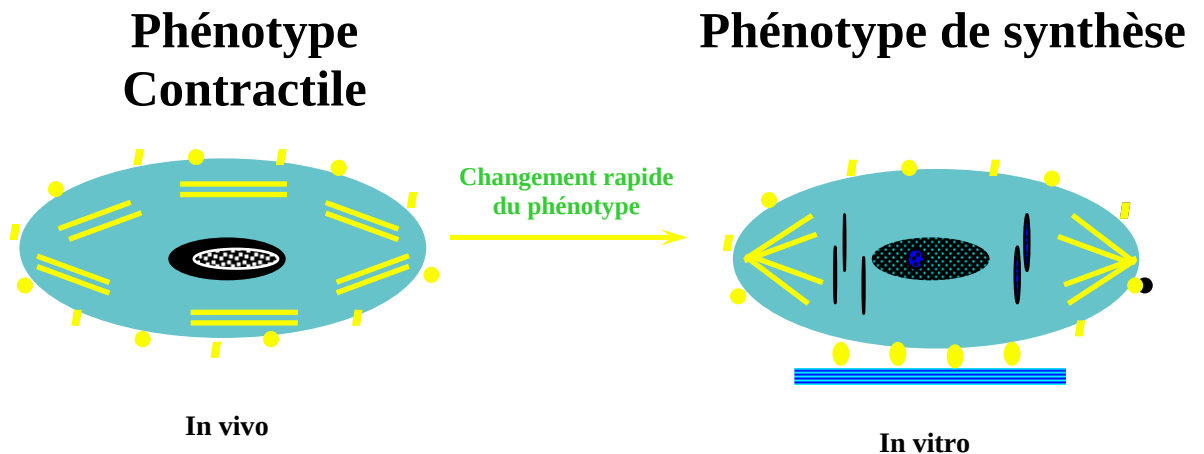


Figure 4 : Représentation de CML de phénotype différencié et dédifférencié. *In vivo*, les CML ont un faible taux de prolifération, sécrètent peu de MEC et expriment fortement les protéines de l'appareil contractile. *In vitro* ou lors de remodelage vasculaire, on observe un changement phénotypique rapide accompagné d'une diminution de l'expression des protéines de contraction, d'un taux de prolifération élevé et d'une synthèse importante de protéines de la MEC.

A/ Marqueurs de différenciation des CML vasculaires

Les CML vasculaires matures expriment une variété de protéines contractiles afin d'accomplir leur fonction première : la contraction (Tableau 2). L'expression de ces protéines de l'appareil contractile permet de suivre l'état de différenciation des cellules.

A/1. Protéines de l'appareil contractile

- **Filaments fins :**

L' **α -actine de muscle lisse**, protéine de 42 kDa (α -SM-Actine), fut le premier marqueur de différenciation identifié. Elle représente l'une de six isoformes de l'actine (isoactine) exprimées dans les cellules des mammifères (Van de kerckhove et weber 1978). Toute les isoactines sont produites à partir de gènes séparés mais partagent une très haute homologie dans leur partie codante. Dans les CML vasculaires différenciées et matures, la forme la plus

abondante est l' α -actine représentant plus de 40% des protéines totales et plus de 70% de l'actine totale. Une haute teneur en α -actine est requise pour générer une grande capacité de contraction. Les CML peu différenciées et prolifératives ont tendance à exprimer davantage la β et la γ -actine (Skalli et al 1987).

La caldesmone existe sous deux isoformes : la h-caldesmone (120-150 kDa), exprimée abondamment dans les CML différenciées, et la l-caldesmone (70-80 kDa) localisée dans des tissus non-musculaires ainsi que dans les CML immatures (Sobue et sellers 1991 Ueki et al 1987). Dans les CML, la caldesmone se lie à l'actine et à la calmoduline.

La calponine, protéine de 28 à 34 kDa interagit avec les filaments d'actine et la tropomyosine de manière Ca^{2+} dépendante. Il a été suggéré que la calponine jouerait un rôle fonctionnel au niveau de la contraction. Le mécanisme de régulation lié à l'actine *via* la calponine n'est pas clair, même si elle joue un rôle dans la phosphorylation ou par sa possible interaction en rapport avec la caldesmone (Winder et al 1992).

La smootheline, protéine de 100 kDa, est exprimée chez tous les vertébrés et apparaît comme un marqueur des stades très tardifs de différenciation des CML (van der Loop et al 1996). C'est une protéine structurale associée aux filaments d'actine et exprimée dans les muscles lisses viscéraux et vasculaires (Christen et al 1999). Son expression est rapidement réprimée par la mise en culture des cellules et par une lésion par ballon (angioplastie), indiquant donc qu'elle est modulée *in vitro* et *in vivo* (Bär et al 2002).

La protéine du « muscle lisse 22 α » (SM22 α), ainsi nommée pour sa masse de 22 kDa, contient des séquences de motifs identiques à la calponine. Dans la chronologie du développement, son expression est contrôlée parallèlement à celle de la calponine (Li et al 1996). Elle est également presque exclusivement exprimée dans les CML, mais aussi dans les fibroblastes (Roelofs et al 1998) et les myofibroblastes (Chiavegato et al 1999). Cette protéine est très peu connue et mal identifiée.

- **Filaments lourds :**

La chaîne légère de la myosine existe sous deux isoformes de 17 kDa qui ont été identifiés dans les CML (Erdori et al 1987, Hasegawa et al 1992, Helper et al 1988, Kamm et al 1985). La phosphorylation des chaînes légères régulatrices (MLC20) provoque un changement de

conformation de la myosine qui passe dans une conformation plus allongée et capable de se lier avec l'actine (myosine activée).

La chaîne lourde de la myosine (SM-MHC) est exprimée sous différentes variantes dans les CML vasculaires : SM-1 (204 kDa) et SM-2 (200 kDa) (Babij et al 1992). La SM-2 est un marqueur de différenciation très avancé des CML. Elle est constituée d'une tête globulaire et d'une queue en hélice α . La MHC a une activité ATP-ase qui permet la contraction musculaire. *In vitro*, les cellules confluentes quiescentes présentent une forte proportion d'isoforme spécifique du muscle lisse (SMHC) tandis que les cellules non confluentes, mitotiques, expriment davantage les isoformes non musculaires (NMHC).

A/2. Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont une famille des constituants cellulaires dont la taille est comprise entre 7 et 22 nm. Cette taille est intermédiaire entre celle de l'actine (7 nm) et celle de la tubuline (22-25 nm) (Osborn 1983). Ce sont des fibres de 10 nm de diamètre réparties dans la cellule selon une distribution similaire à celle des microtubules, c'est-à-dire autour du noyau et irradiant vers la périphérie de la cellule.

A l'inverse des microfilaments d'actine et des microtubules, les filaments intermédiaires ne présentent pas de polarité et n'interviennent pas dans le transport directionnel. Ils interviennent dans le maintien de la morphologie cellulaire, dans la résistance au stress mécanique et dans le maintien de la cohésion entre les cellules via leur ancrage aux desmosomes et plaques d'adhérence.

Les protéines des filaments intermédiaires exprimées par les CML sont la desmine et la vimentine (Mitchell et al 1990, Gabbiani et al 1981). La proportion de la desmine par rapport à la vimentine varie entre les CML d'un même vaisseau ainsi que la proportion de cellules constituant les différents vaisseaux de l'arbre vasculaire. Les CML de l'aorte et des gros vaisseaux contiennent davantage de vimentine que de desmine (Gabbiani et al 1981) alors que les CML présentes dans les artères de petit diamètre, les artérioles et les CML des systèmes gastro-intestinal et urinaire contiennent davantage de desmine (Gabbiani et al 1981, Mitchell et al 1990).

Au cours de ces travaux, nous avons décidé d'utiliser l' α actine, la SM-MHC et la calponine pour caractériser le phénotype différencié des CML.

Marqueurs	Paroi saine (CML différenciées)	Paroi lésée ou CML en culture (CML dédifférenciées)
α actine	↑	↓
Chaîne légère de la myosine	↑	↓
Calponine	↑	↓
SM 22 α	↑	↓
Chaîne lourde de la myosine	↑	↓
Smootheline	↑	↓
Desmine	↑	↓

Tableau 2 : expression des marqueurs de différenciation en fonction de l'état des CML

I.5. Les cellules endothéliales

A l'interface entre le sang et la paroi des vaisseaux ou du cœur, l'endothélium vasculaire joue un rôle primordial dans le développement et le maintien des fonctions vasculaires.

I.5. 1. Origine

Les angioblastes, précurseurs des cellules endothéliales vasculaires, apparaissent dès le 17^e jour de la vie intra-utérine à partir du mésoderme du splanchnopleure, au niveau des îlots sanguins. Ceux-ci fusionnent pour former les vaisseaux embryonnaires (vasculogénèse). Il est important de noter que les vaisseaux sanguins formés au cours de la vasculogénèse ne contiennent que des cellules endothéliales et aucune cellule musculaire lisse.

I.5. 2. Structure

L'endothélium est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) de 25 à 50 μm de long, 15 μm de large et 0,3 à 0,5 μm d'épaisseur (Figure 5). De forme polygonale, leur juxtaposition forme un tapis en mosaïque. Il assure une perméabilité sélective aux molécules circulantes afin d'en contrôler l'accès aux CML et ainsi d'en moduler la fonction (Boneu et Cazenave 1997). L'endothélium doit aussi protéger la paroi des médiateurs moléculaires ou cellulaires responsables de réponses inflammatoires. Les cellules endothéliales exercent de même une fonction antithrombotique, ce qui leur confère des

propriétés particulièrement intéressantes qui sont exploitées dans le cadre de la préparation de prothèses artificielles afin de réduire leur tendance thrombogène.

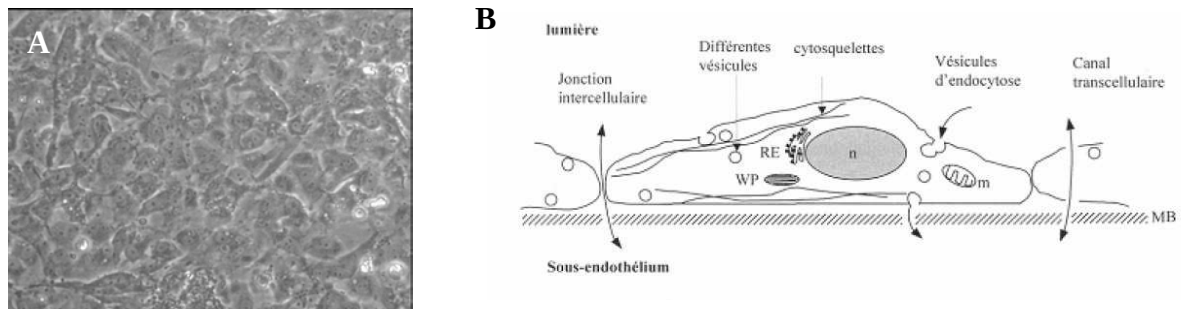


Figure 5: Observation en microscopie à contraste de phase (Objectif x20) (A) et coupe transversale d'une cellule endothéliale (B) (d'après Withfield 1996).

m : mitochondrie, RE : reticulum endoplasmique, MB : membrane basale, n : noyau, WP : corps de Weibelpalade. A : monocouche cultivée en condition statique

L'organisme exige donc une participation de l'endothélium vasculaire pour maintenir constantes les contraintes mécaniques sur la paroi au cours des changements de régimes hémodynamiques ; cela fait de la cellule endothéliale un organe à part entière avec des fonctions qui lui sont propres.

1.5. 3. Caractérisation des CE

A/ Marqueurs spécifiques des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales présentent des marqueurs spécifiques exprimés à leur surface ou localisés dans leur cytoplasme. Dans ce qui suit, une liste non exhaustive de marqueurs spécifiques aux cellules endothéliales est présentée.

A/1. Marqueurs membranaires

Le CD31 (ou PECAM-1= molécule d'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales) est une protéine transmembranaire d'une masse moléculaire d'environ 135 kDa, affiliée à la superfamille des immunoglobulines. Les ligands hétérophiles comprennent les glycosaminoglycanes de sulfate d'héparane, l'héparine et l'intégrine $\alpha v \beta 3$. CD31 joue un rôle dans les interactions adhésives entre cellules endothéliales adjacentes et également entre leucocytes et monocytes et cellules endothéliales (diapédèse/migration). CD31 est exprimé dans tous les endothéliums continus au niveau des jonctions cellulaires, excepté dans l'endothélium discontinu comme celui de la pulpe rouge splénique (Muller et al 1997).

La VE-cadherine (vascular endothelial cadherin ou CD144) est une protéine de 120 kDa appartenant à la famille des cadhérines, qui comporte 5 domaines extracellulaires et qui est reliée dans le cytoplasme à l'actine du cytosquelette. La VE-cadhérine joue un rôle dans les liaisons homophiliques entre les cellules endothéliales et se trouve localisée principalement au niveau des jonctions cellulaires. Elle est exprimée de façon constitutive et joue un rôle dans de nombreuses fonctions endothéliales telles que la migration, la survie cellulaire ou l'inhibition de contact.

Le récepteur 2 au VEGF (VEGF-R2) d'une masse moléculaire comprise entre 210 et 230 kDa, est un récepteur de type tyrosine kinase impliqué dans le développement de l'endothélium vasculaire et exprimé au niveau des CE chez l'adulte, mais également au cours du développement embryonnaire. La fixation du VEGF va entraîner la dimérisation de son récepteur et une autophosphorylation du récepteur est observée, ce qui stimule les voies de transmission du signal. L'interaction du VEGF avec son récepteur nécessite la présence de protéoglycanes et notamment d'héparine. Le VEGFR-2 est inducteur de la réponse proliférative des CE (Shalaby et al 1995, Colavitti et al 2002, Waltenberger et al 1994).

La E-sélectine (ou CD62E) est une protéine de 97 à 115 kDa appartenant à la superfamille des sélectines. La E-sélectine est une molécule d'adhésion exprimée à la surface des CE préalablement stimulées par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) ou l'interleukine 1 α . Elle joue un rôle dans la diapédèse leucocytaire et notamment dans l'interaction des neutrophiles avec les CE.

A.2/ Marqueurs intracellulaires

La e-NOS (*endothelial nitric oxide synthase*) est une enzyme exprimée de façon constitutive, responsable de la synthèse de NO par les CE. D'une masse moléculaire de 140 kDa, cette enzyme contient un domaine oxygénase en position N-terminale et un domaine réductase en C-terminal. Le NO synthétisé a une action vasodilatatrice au niveau de la paroi artérielle.

Le facteur von Willebrand (vWF) est une glycoprotéine importante dont la structure est multimérique et dont la masse moléculaire va de 500 kDa jusqu'à plus de 10000 kDa.

L'expression du gène du vWF est spécifique de certains tissus et reste confinée aux cellules endothéliales et aux mégacaryocytes (Denis 2002, Werner et al 1992). Le vWF est présent dans le plasma, dans les corps denses de Weibel-Pallade des cellules endothéliales, dans les granules alpha des mégacaryocytes et des plaquettes qui en dérivent, ainsi que dans la matrice subendothéliale de la paroi des vaisseaux. Le vWF joue un rôle de médiateur dans l'adhésion plaquettaire et la formation du caillot sur les sites des lésions vasculaires, et il sert de transporteur pour le facteur VIII dans le plasma.

L'incorporation d'acétyl-**LDL** couplé avec une sonde fluorescente (Dil- acetyled Low Density Lipoprotein) permet d'identifier les CE des autres types de cellules vasculaires (CML et fibroblastes) (Gaffney et al 1985).

B/ Fonctions de l'endothélium vasculaire

Situé à l'interface sang/tissus, l'endothélium vasculaire se comporte comme une barrière de perméabilité sélective qui autorise et régule les échanges de molécules de tailles variables, eau, sels, protéines, entre le sang et les tissus. Les modes et mécanismes de transport au travers de la barrière endothéliale varient selon leur localisation artérielle, veineuse ou microcirculatoire.

Une des principales fonctions de l'endothélium vasculaire réside dans son activité antithrombotique. C'est d'ailleurs cette propriété qui en fait une cellule d'intérêt pour les applications cliniques. Le principal mécanisme par lequel les CE exercent leur effet anticoagulant est dû à l'inhibition électrostatique de l'attachement de cellules circulantes à la paroi vasculaire en raison de la forte charge négative (conférée par le glycocalyx) présente à la surface (Legrand et al 1987). De plus, les CE sont capables de synthétiser de puissantes molécules : activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), prostacycline (PGI₂), monoxyde d'azote,... connues pour assurer la fluidité du sang en empêchant l'aggrégation plaquettaire et l'adhésion leucocytaire, principaux composants du thrombus (Mc Guigan et al 2007). Les nombreuses fonctions de l'endothélium comprennent aussi un contrôle strict du tonus vasculaire. Ces cellules sont capables de synthétiser et de sécréter de nombreuses substances vasoactives qui diffusent vers le muscle sous-jacent et provoquent sa contraction ou sa relaxation (Palmer et al 1987, Feletou et al 2003, Harrison 1997, Yanagisawa et al 1988).

I.6. Cellules endothéliales et cellules musculaires lisses

Les CML, du fait d'une certaine plasticité, sont capables de passer d'un état différencié à un état dédifférencié suivant la présence ou l'absence de certains stimuli hormonaux ou mécaniques. Les CML dédifférenciées peuvent devenir majoritaires dans des situations pathologiques telles que la resténose à la suite d'une désendothélialisation spontanée ou au cours de la formation d'une plaque d'athérome (Hao et al 2003). Lors de ces processus, les CML possèdent une capacité migratrice accrue et prolifèrent au niveau du sous-endothélium, ce qui est à l'origine d'un épaissement de la paroi des vaisseaux participant à la formation de sténoses.

Cependant, dans les conditions physiologiques, l'endothélium est capable de contrôler cet équilibre. Le NO synthétisé par les CE va inhiber la prolifération des CML, réprimant également les CML dédifférenciées. Afin d'assurer cette fonction de façon optimale, les CE doivent se trouver dans un environnement adéquat. Les CE exposées à un flux bidirectionnel, typique des régions sensibles au développement d'une plaque d'athérome ou soumises à un stimulus inflammatoire, synthétisent moins de NO et plus d'endothéline-1, amplifiant ainsi le signal de prolifération des CML. Les CE en culture statique exercent une fonction proche de celle retrouvée au niveau des plaques d'athérome. Ceci participe alors à la perte du phénotype différencié des CML. Pour remédier à cela, l'exposition des CE à des forces de cisaillement laminaire unidirectionnel empêche la dédifférenciation des CML.

II. Ingénierie tissulaire vasculaire

La mortalité et la morbidité des patients souffrant de maladies vasculaires étant élevées, l'élaboration de substituts vasculaires de remplacement afin de permettre une meilleure irrigation des tissus en aval des lésions est devenue un enjeu majeur en ingénierie tissulaire.

II.1. Les substituts vasculaires

Les maladies cardiovasculaires restent la principale cause de décès en France devant le cancer et, avec près de 180 000 décès par an, elles représentent 32 % de l'ensemble des décès. La France est cependant moins touchée par les maladies cardiovasculaires que les pays anglo-saxons et du Nord de l'Europe.

L'athérosclérose, principale pathologie vasculaire, conduit progressivement à l'obstruction de la lumière du vaisseau sanguin. Dans le cas extrême (échec des traitements curatifs : médicament ou angioplastie), le remplacement des vaisseaux lésés est nécessaire. Le traitement de choix pour le remplacement du vaisseau lésé reste la greffe autologue utilisant la veine saphène, l'artère mammaire interne ou encore l'artère radiale, qui présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles proches de celles du vaisseau à remplacer (figure 6A). Cependant, ces vaisseaux autologues ne sont disponibles que dans 30% des cas, du fait de leur mauvais état (varices) ou de leur utilisation lors de précédentes interventions. Les prothèses synthétiques (polytétrafluoroéthylène expansé, polyéthylène téréphtalate, polyuréthane) conviennent pour le remplacement de gros vaisseaux dont le diamètre est supérieur à 6 mm, mais, dès que le diamètre est inférieur à 6 mm (remplacement d'une artère coronaire par exemple), leur surface interne très thrombogène ainsi que leurs propriétés mécaniques insuffisantes entraînent une agrégation plaquettaire suivie par la formation d'un thrombus (Abbott et al 1993 ; Nerem et Seliktar 2001) (figure 6B). Tous ces inconvénients doivent être pris en considération pour le développement d'un substitut vasculaire se rapprochant le plus possible d'un vaisseau natif, qui doit être : non immunogène, non thrombogène, bonne résistance à la suture, résistant aux infections, de bonnes propriétés mécaniques, etc.

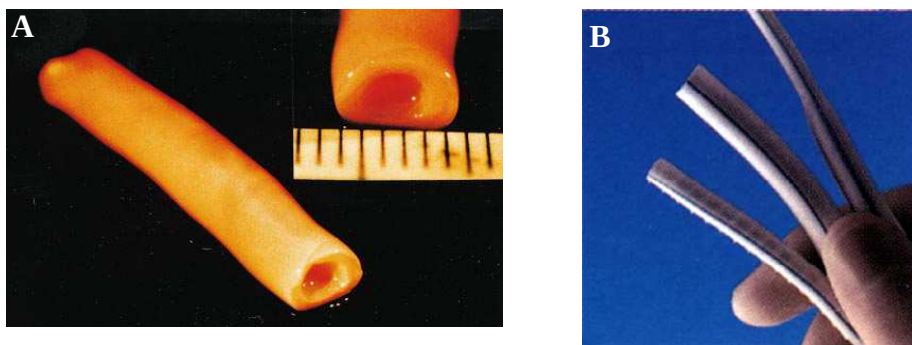


Figure 6 : aspect macroscopique de substituts vasculaires naturels (A) et synthétiques (B) utilisés pour le remplacement de vaisseaux malades (*d'après L'heureux et al 1998 et Chakfé et al 2004*).

II.2. Les différents axes de l'ingénierie vasculaire

Les progrès réalisés au cours des dernières années dans les domaines des sciences du vivant, de la médecine et des sciences de l'ingénieur ont permis l'apparition de nombreuses thérapies chirurgicales faisant appel à l'utilisation de biomatériaux. L'ingénierie

tissulaire vasculaire permettrait ainsi de fournir des substituts vasculaires présentant des propriétés proches de celles des vaisseaux natifs. Dans la littérature différentes stratégies ont alors été développées:

- Construction basées sur l'utilisation de gels de collagène (Weinberg et al 1986, Matsuda et al 1989, L'Heureux et al 1993)
- Méthode utilisant des matrices biodégradables telles que : Acide polyglycoliques, le poly-4-hydroxybutyrate, acide poly L-lactique, polyéthylène glycol, ou polycaprolactone (Niklason et al 1999, Niklason et al 2001, Hoerstrup et al 2001, Kim et al 2006, Roh et al 2007)
- Auto-assemblage de feuillets cellulaires (L'heureux et al 1998, L'heureux et al 2006) ;
- Cellularisation des prothèses préexistantes (Zilla et al, 1987 ; Lamm et al., 2001 ;).

Au laboratoire, l'équipe d'ingénierie vasculaire s'est spécialisée dans le développement des substituts vasculaires endothélialisés. En effet, le succès clinique d'une prothèse vasculaire est fortement tributaire de l'adhérence et de la fonctionnalité des CE au sein du matériau afin d'éviter toute occlusion post-implantatoire. Dans les conditions les plus favorables, l'adhérence cellulaire est un critère fondamental pour permettre la migration, la croissance et la différenciation des cellules. Différents types de modifications de surface ont alors été envisagée afin d'améliorer l'adhésion des cellules. Ces modifications vont permettre d'augmenter les interactions entre la surface interne du substitut vasculaires et les cellules endothéliales, ce qui améliorera la rétention des cellules soumises aux contraintes mécaniques de l'écoulement sanguin. La présente partie résume les différentes approches décrites dans la littérature.

The ideal small arterial substitute: Role of cell seeding and tissue engineering

Halima Kerdjoudj ^{a,*,**}, Vanessa Moby ^{a,*,**}, Nicolas Berthelemy ^a, Monique Gentils ^a,
Cédric Boura ^a, Laurence Bordenave ^b, Jean-François Stoltz ^a and Patrick Menu ^a
^a*Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA-UMR 7563, IFR 111, Faculté de Médecine
Université Henry Poincaré, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*
^b*INSERM U577, Bordeaux, F-33076 France, Université Victor Segalen, Bordeaux 2,
Bordeaux F33076, France*

*Both authors contributed equally to this work.

**Corresponding authors: H. Kerdjoudj and V. Moby, Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Faculté de Médecine Université Henri Poincaré, Nancy 1, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 3 83 68 34 67, Fax: + 33 3 83 68 34 59; E-mail: halima.kerdjoudj@medecine.uhp-nancy.fr, vanessa.moby@medecine.uhp-nancy.fr.
1386-0291/07/\$17.00 © 2007 – IOS Press and the authors. All rights reserved

Abstract.

Although autogenous vessels are useful in surgery, often patients cannot furnish suitable vessels. If there are not available, two possible alternatives for vessel replacements are to use vascular synthetic prostheses such as Dacron® and polytétrafluoroéthylène (PTFE) or cryopreserved allografts. However, their success has been limited to replace small-diameter (<6 mm) arterial vessel because of their high thrombogenicity and compliance mismatch. On account of a clear clinical need for a functional arterial substitute, tissue engineering techniques have been developed. This review encompasses the use of mature endothelial, endothelial progenitor and bone marrow cells combined with natural or synthetic scaffolds whose surface has been modified with multiple origin matrices.

Keywords: Vascular tissue engineering, small-diameter vascular graft, matrix, cryopreserved arteries, endothelial cells, endothelial progenitor cells, bone marrow cells

1. Introduction

One of the most severe forms of heart disease is associated with atherosclerosis, a process that causes narrowing of the arterial section. The usual treatment for replace diseased vessels is cardiac and peripheral bypass surgery using autologous veins (saphenous), or sometimes with autologous arteries (mammary). However, 30% of patients do not have a suitable vessel for use because of vascular disease, amputation, or previous harvest. Moreover, this method requires a second surgical procedure to obtain the vessel [1].

The most usual alternative to autologous grafts is the use of synthetic vascular grafts. The two principal polymeric graft materials, which are used in vascular reconstructions, are expanded polytétrafluoroéthylène (ePTFE) and woven polyethylene terephthalate (PET). These synthetic grafts are used with success in the replacement of high flow vessel with an internal diameter up than 6 mm [2]. However, the performance and the patency rate of small-diameter synthetic grafts are suboptimal [1]. The low patency of such polymeric materials is principally due to the thrombogenicity of their luminal surface and their poor mechanical characteristics in term of compliance [3,4]. In the same way, cryopreserved arterial segments from human tissue banks provide a new option of increasing interest in the search for arterial substitutes that can be used in vascular reconstructive procedures [5,6]. Cryopreservation provides the only prospect for long term preservation of arteries and veins. This approach has been studied extensively in a number of species using both *in vitro* and *in vivo* techniques [8,9]. Unfortunately, a significant number of these studies have limited value, either because they failed to describe the cryopreservation protocol used or because they involve procedures that are now known to be extremely damaging to cells and tissues [9–11].

In order to improve the hemocompatibility and patency of both grafts (synthetic grafts and cryopreservedallografts), the luminal surface needs to be modified into a fully biological surface and then making it completely nonthrombogenic by endothelialization. The specific requirements for an ideal small-diameter arterial substitute have been stated [12]. An alternative and novel approach to arterial substitutes is tissue engineering.

Tissue-engineered is defined as the application of the principles and methods of engineering, materialssciences and the life sciences to the fundamental understanding of the structure–function relationships in normal and pathological mammalian tissues at a fundamental level and to the development of biological substitutes to restore, maintain, or improve the tissue functions. Recent papers have listed these principles and their potential applications [13–15]. This technology has been applied to the repair of chronic wounds [16], burns [17] and cartilage [18]. However, as concerned by our topic, the development of durable and functional blood vessels has posed a huge challenge [19,20]. For vascular tissue engineering three components must be addressed: the scaffold (either synthetic or biological), the matrix (which plays a crucial role in assisting endothelial cell (ECs) attachment, proliferation and maintenance of the correct phenotype) and the source of autologous ECs (Fig. 1 and Table 1).

2. Scaffolds

To have an overview on this particular triad component, the authors recommend the reviews of [21,22].

2.1. Synthetic scaffolds

There are two categories of synthetic scaffolds: biodegradable synthetic polymer scaffold such as polyglycolic acid (PGA), poly-L-lactic acid (PLA) and poly-D, L-lactic-co-glycolic acid or nonbiodegradable such as expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE), polyethylene terephthalate (PET) and polyurethanes (PU).

The biodegradable polymer scaffolds provide mechanical support for the cells until they synthesize the new tissue. Their advantages are that their microstructure (such as porous morphology), mechanical properties and degradation kinetics could be tailored to permit tissue ingrowth. They can be made up into various shapes. Polyglycolic acid has been one of the most widely used polymer for tissue engineering applications [23]. The objective of these scaffolds is to resorb itself slowly and to leave the tissue generated by the cells at its place. Major disadvantages are that three-dimensional structure scaffold has to be built up and need to be modified to allow cell attachment.

The nonbiodegradable synthetic polymers are represented by ePTFE, PET and PU. ePTFE permits vessel ingrowth through its pores and induces little inflammatory [24]. However they exhibit poor compliance, high hydrophobicity that limits an endothelium formation. PU grafts have similar compliance to native arteries and a surface that promotes endothelial cell seeding [25,26]. However, they have variable clinical results with a tendency to degrade leading aneurysm formation and they have inherent thrombogenicity [27]. The synthetic scaffolds have the advantages of industrial-scale replication and biochemical and mechanical qualities determined. The disadvantage is the lack of the cell attachment factors present in natural scaffolds.

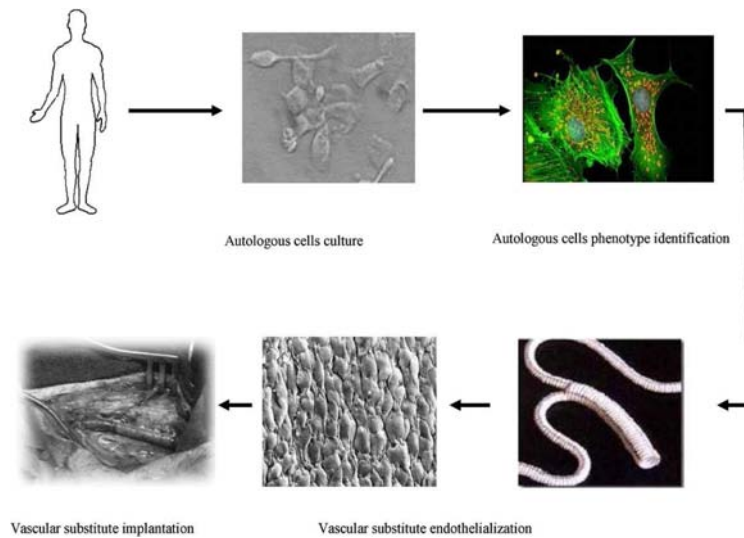


Fig. 1. Main stages of vascular tissue engineering

2.2. Natural scaffolds

The use of enzymatically modified bovine arteries as acellular natural scaffold to enhance graft incorporation was first proposed by Rosenberg and colleagues, only 47% of grafts were patent after 28 months [28], Lantz et al. developed a biological vascular graft material made from small intestinal submucosa and tested it in dog. This material was shown to be usable as an autograft or as an allograft, demonstrating biocompatibility and high patency rates (75%) in the aorta [29]. Decellularized natural scaffold have been proposed in many recent works [30–34]. Schaner et al. demonstrated a well preserved extracellular matrix, basement membrane structure and strength sufficient for grafting of decellularized vein using sodium dodecyl sulphate (SDS) detergent. *In vivo* canine experiments revealed that decellularized vein grafts had operative handling and remained patent after 2 weeks [34]. Furthermore, Martin et al. demonstrated a satisfactory *in vivo* behaviour of decellularized vein allograft compared to fresh allografts [35]. Bader and colleagues used porcine aorta, decellularized by using trypsin, the xenografts were then re-populated with human ECs from saphenous vein biopsies. Unfortunately, a strong rejection infiltration of CD18 positive leukocytes, of ED2 positive monocytes and T-lymphocytes were observed [36]. Conklin and colleagues covalently linked heparin to the luminal surface of decellularized porcine carotid arteries to reduce thrombogenicity. However, the chemical cross-linking of heparin decreased the compliance of vessels (by 60% as compared to fresh vessels) leading to an important wall colonization by vascular smooth muscle cells after 2 months of *in vivo* implantation [33]. Recently we developed a novel decellularized scaffold using a cryopreserved human

umbilical artery [37], with the luminal surface coated by polyelectrolyte multilayer film ended by negative charge providing an anti-thrombogenic surface.

The obvious advantage of a natural scaffold is due to its composition of extra-cellular matrix protein typically found in the human and, when derived from a vessel, its three-dimensional architecture is very similar to that of the vessel appropriate mechanical and physical properties [19]. However, the cryopreserved vessels present some disadvantages: a poor compliance and thrombogenic luminal surface because of an endothelium lacking.

Table 1
Different matrix used in order to improve cell retention on the luminal vascular grafts

References	Scaffold	Matrix	Cells
Kipshidze [58]	Iliac artery	Glue (thrombin+fibrinogen)	Allogenic and autologous EC
Lamm [50]	Cryopreserved allograft vein	Recipient autologous serum	Human autologous vein EC
Kaushal [81]	Iliac arteries decellularized	Fibrin coagulum	EPC
Cho [85]	Abdominal aortas	Fibronectin	BMC
Vohra [38], Feugier [40]	PU, PTFE, Dacron®	Collagen and fibronectin	Vein ECs
Marois [41]	PET, PTFE, polyesterurethane	Albumin, collagen, gelatin	EC
Bisson [39], Sank [45], Massia [48], Larsen [49], Jarrell [70], Williams [71]	PET, PTFE	Gelatin, laminin, fibronectin, collagen, RGD	vein EC, human microvessels EC
Fernandez [43], Kidd [47], Bengtsson [51], Vinard [52]	PTFE	Fibrin glue, fibronectin, collagen, plasma, laminin	Human microvessels EC, vein EC
Bhattacharya [80], Griese [82]	PTFE, PET	Fibrin coagulum, fibronectin	EPC
Matsumura [87]	Copolymer of lactic acid/s caprolacton	Fibronectin	BMC

EPC: endothelial progenitor cells, BMC: bone marrow cells, EC: endothelial cells, PTFE: polytetrafluoroethylene, PET: polyethylene terephthalate, PU: polyurethanes.

3. Surface coating

In order to enhance antithrombogenicity of the natural and synthetic scaffolds, their surfaces need to be modifying by a matrix for enhancing EC attachment. These surface modifications include the immobilization of molecules such as collagen [38–40], gelatin [41], albumin and albumin–heparin conjugates [42], fibrin glue [43], fibronectin [44], laminin [45–47], the immobilization peptides such as RGD and REDV [48,49] or coating of the scaffold with serum [50,51] or plasma [52]. Moreover, the surface can be modify by non-ligand based techniques such as carbon deposition, photochemical modification [53], chemical vapour deposition [54] and plasma discharge technology [55,56] in order to deposit reactive groups

onto polymer surfaces. An other alternative is the deposition of VEGF gene plasmid on the graft [57] which can transfect endothelial cells and promote their growth. For natural scaffold only fibrin glue, fibronectin and serum coating were used [26,50,58].

The most commonly molecule used for improving cellular attachment and retention for both scaffolds is fibronectin. It is an adhesive glycoprotein found in the basement membrane to which ECs attach in native blood vessels [59]. After cells seeding, the surfaces which are not endothelialized become more thrombogenic than the native graft material. Indeed, these biological substances suffer from being hydrolyzed and thus do not seem to exhibit the required properties for clinical applications [26]. Moreover the use of biological materials, especially those of xeno and allogenic origin is associated with the risk of pathogen transfer, immune reactions and formation of thrombi in blood contact devices [60].

Another approach, at the heart of our research, is to modify the luminal surface vascular grafts with a poly(sodium-4-styrene sulfonate)/poly(allylamine hydrochloride) (PSS/PAH) polyelectrolyte multilayer film. Thus, (PAH/PSS)₃-PAH architectures were deposited by alternated incubations of PAH and PSS solutions on glass surfaces. Previous data showed that 3 pairs of layers were sufficient for this film type to totally coat a solid silica surface [61], inducing the deposit of only a small amount of polyelectrolytes. Boura et al. demonstrated that (PSS/PAH) polyelectrolyte multilayer film deposited on glass, and ended by PAH improves initial endothelial cell adhesion, viability [62] and increases significantly the ECs adherence under shear stress [63]. The same polyelectrolyte multilayer film was deposit into synthetic and natural scaffolds. We demonstrated that this surface modification promotes adhesion and growth of endothelial cells on these vascular substitutes (data not published).

4. Source of autologous endothelial cells

The first step towards endothelial cells seeding of the artificial vascular prostheses was made in 1975 [64]. Later, Herring introduced the concept of single-stage technique for seeding prosthetic materials with ECs derived from canine veins [65]. Seeding endothelial cells onto the vascular prostheses has been shown to enhance small vascular graft patency, reducing implant-associated thrombosis, inflammation, and restenosis [66]. However, these seeded cells can be lost after the implantation due to the blood flow exposure [67]. Following the single-stage technique, the alternative two-stage technique was proposed with quite satisfactory results [68]. The endothelium provides structural integrity to the blood vessel by

forming a continuous, selectively permeable, thromboresistant barrier between circulating blood and the arterial wall. It also controls blood flow and vessel tone, platelet activation, adhesion and aggregation, leukocyte adhesion, and smooth muscle cells migration and proliferation. This is the key rationale behind utilizing autologous endothelial cells to make a hemocompatible grafts that will perform the major functions of an intact healthy endothelium that would normally be found in the blood vessel. This will then provide an anticoagulant and thrombogenic surface to the circulating blood constituents [69].

Autologous adult ECs can be obtained from a wide range of sources such as autologous vessels [50,70] and subcutaneous fat [71]. Despite interesting clinical results reported by the Austrian group [72] the *in vitro* endothelialization of synthetic small-diameter vascular grafts before implantation, the procedure has limits: the collection of these cells is associated with an invasive procedure. Furthermore, early experiments employed primary autologous venous cells and reported limited cell yields, as little as 3×10^4 CE per harvested vein segment, and low levels of cell seeding efficiency onto the synthetic grafts. Additionally, this procedure cannot be used in emergency situations because of the cell culture time (2–4 weeks), the ever-increasing probability of the infection within cell culture medium and the inability of the cells to proliferate effectively with time [73,74].

Thus, there is an urgent need for alternative, easy accessible, cell sources for autologous endothelial cells to support pro-angiogenic therapies in tissue engineering and regenerative medicine. Investigators are actively seeking alternative cell sources suitable for vessel engineering because of the technical difficulty in obtaining differentiated autologous endothelial cells from blood vessels. Bone marrow cells (BMCs) and endothelial progenitor cells (EPCs) have been isolated from range of sources [75,76]. Their autologous origin, high proliferative capacity, and potential to differentiate into vascular phenotypes have conjured immense interest. Development of endothelialized vascular grafts using progenitor cells and differentiating these cells into mature ECs lineage is an exciting advance in the field of tissue engineering, as reviewed by recent papers [77–79].

Asahara et al. (1997) reported the presence of EPCs in human peripheral blood [75]. Recent *in vitro* studies using seeded EPCs on vascular grafts have been shown to promote rapid and complete formation of neointima [80]. Kaushal et al. isolated them from peripheral blood of sheep and seeded them on decellularized native porcine iliac vessels. Endothelial progenitor cells seeded grafts remained patent for 130 days in autologous ovine hosts [81]. Gri  se et al. evaluated the ability of EPCs to endothelialize vascular prostheses (ePTFE) and observed 70% of luminal coverage of the seeded grafts [82]. EPCs are currently harvested

from bone marrow, peripheral blood and cord blood [83] discriminated with CD34 or CD133 markers [84]. Bone marrow cells (BMC) were induced to differentiate into ECs and SMCs and were seeded onto decellularized tissue scaffolds and implanted in the inferior vena cava of dogs to generate vascular tissue and improve patency in tissue engineered small diameter vascular grafts. Three weeks after implantation, the tissue- engineered vascular graft showed vascular regeneration [85].

BMC has also been used by [86] to develop an experimental model of small-diameter expanded polytétrafluoroéthylène vascular prosthesis, in which the luminal surface is covered with BMC genetically modified, which produce beta-galactosidase (a product of lacZ transgene) recombinant proteins. The recombinant bioactive protein is produced in this model, other genes that have therapeutic potential can be subsequently applied. This may be a preliminary model to autocrine functioning vascular prostheses. Matsumura et al. has shown that the use of BMCs onto a biodegradable scaffold enable the construct of tissue-engineered vascular autograft [87]. The seeded BMCs differentiate in the scaffold to construct components of a new vessel wall.

The use of EPCs and BMC seems to be an interesting autologous source of endothelial cells. However their utilisation is limited because of their low rate in the blood circulation [88,89] and the necessity to use many growth factors (VEGF, FGF, etc.) in order to allow their rapid *in vitro* differentiation.

5. Conclusion

Prosthetic materials have been used for many years as alternative to natural vessels in bypass surgery.

However, clinical applications of small diameter (internal diameter below 6 mm) synthetic prostheses and cryopreserved allografts have limited success due to thrombus formation in the short term and intimal hyperplasia in the long term. The challenge of tissue engineering vessels is to build-up blood/substitute interface near native vessels. In order to improve endothelial cells monolayer, it is necessary to pre-coat the intra-luminal grafts. However, the search for the ideal matrix favouring a good cell adhesion and retention remained unachievable.

Acknowledgements

This work was partly supported by region of Lorraine (France).

References

- [1] P.L. Faries, F.W. Lo Gerfo, S. Arora, S. Hook, M.C. Pulling, C.M. Akbari, D.R. Campbell and F.B. Pomposelli, A comparative study of alternative conduits for lower extremity revascularization: all-autogenous conduit versus prosthetic grafts, *J. Vasc. Surg.* **32** (2000), 1080–1090.
- [2] C.O. Esquivel and F.W. Blaisdell, Why small caliber vascular grafts fail: a review of clinical and experimental experience and the significance of the interaction of blood at the interface, *J. Surg. Res.* **41** (1986), 1–15.
- [3] W.M. Abbott, J. Megerman, J.E. Hasson, G. L'Italien and D.F. Warnock, Effect of compliance mismatch on vascular graft patency, *J. Vasc. Surg.* **5** (1987), 376–382.
- [4] N.R. Tai, H.J. Salacinski, A. Edwards, G. Hamilton and A.M. Seifalian, Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction, *Br. J. Surg.* **87** (2000), 1516–1524.
- [5] M.C. Wusteman, D.E. Pegg and R.M. Warwick, The banking of arterial allografts in the United Kingdom. A technical and clinical review, *Cell Tissue Bank* **1** (2000), 295–301.
- [6] Y.C. Song, B.S. Khirabadi, F. Lightfoot, K.G. Brockbank and M.J. Taylor, Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts, *Nat. Biotechnol.* **18** (2000), 296–299.
- [7] P. Lamm, G. Juchem, P. Weyrich, S. Nees and B. Reichart, New alternative coronary bypass graft: first clinical experience with an autologous endothelialized cryopreserved allograft, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **117** (1999), 1217–1219.
- [8] Y. Marois, E. Wagner, E. Pâris, R. Roy, Y. Douville and R. Guidoin, Comparison of healing in fresh and preserved arterial allografts in the dog, *Ann. Vasc. Surg.* **13** (1999), 130–140.
- [9] M. Adham, J.P. Gournier, J.P. Favre, E. De La Roche, C. Ducerf, J. Baulieux, X. Barral and M. Pouyet, Mechanical characteristics of fresh and frozen human descending thoracic aorta, *J. Surg. Res.* **64** (1996), 32–34.
- [10] F. Stanke, D. Riebel, S. Carmine, J.L. Cracowski, F. Caron, J.L. Magne, H. Egelhoffer, G. Bessard and P. Devillier, Functional assessment of human femoral arteries after cryopreservation, *J. Vasc. Surg.* **28** (1998), 273–283.
- [11] R.T. Venkatasubramanian, E.D. Grassl, V.H. Baroca, D. Lafontaine and J.C. Bischof, Effects of freezing and cryopreservation on the mechanical properties of arteries, *Ann. Biomed. Eng.* **34** (2006), 823–832.
- [12] A.C. Thomas, G.R. Campbell and J.H. Campbell, Advances in vascular tissue engineering, *Cardiovasc. Pathol.* **12** (2003), 271–276.
- [13] E. Rabkin and F.J. Schoen, Cardiovascular tissue engineering, *Cardiovasc. Pathol.* **11** (2002), 305–317.
- [14] K.H. Yow, J. Ingram, S.A. Korossis, E. Ingham and S. Homer-Vanniasinkam, Tissue engineering of vascular conduits, *Br. J. Surg.* **93** (2006), 652–661.
- [15] D.S. Vara, H.J. Salacinski, R.Y. Kannan, L. Bordenave, G. Hamilton and A.M. Seifalian, Cardiovascular tissue engineering: state of the art, *Pathol. Biol. (Paris)* **53** (2005), 599–612.
- [16] G. Naughton, J. Mansbridge and G. Gentzkow, A metabolically active human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers, *Artif. Organs* **21** (1997), 1203–1210.
- [17] F.M. Wood, M.L. Kolybaba and P. Allen, The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: a critical review of the literature, *Burns* **32** (2006), 395–401.
- [18] R.E. Schreiber, B.M. Ilten-Kirby, N.S. Dunkelman, K.T. Symons, L.M. Reketts, J. Willoughby and A. Ratcliffe, Repair of osteochondral defects with allogeneic tissue engineered cartilage implants, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **367** (1999), 382–395.
- [19] N. L'Heureux, S. Paquet, R. Labbe, L. Germain and F.A. Auger, A completely biological tissue-engineered human blood vessel, *FASEB J.* **12** (1998), 47–56.
- [20] N. L'Heureux, N. Dusserre, G. Konig, B. Victor, P. Keire, T.N. Wight, N.A.F. Chronos, A.E. Kyles, C.R. Gregory, G. Hoyt, R.C. Robbins and T.N. McAllister, Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization, *Nat. Med.* **12** (2006), 361–365.
- [21] L. Xue and H.P. Greisler, Biomaterials in the development and future of vascular grafts, *J. Vasc. Surg.* **37** (2003), 472–480.
- [22] M.P. Lutolf and J.A. Hubbell, Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, *Nat. Biotechnol.* **23** (2005), 47–55.
- [23] L.E. Niklason, Techview: medical technology. Replacement arteries made to order, *Science* **286** (1999), 1493–1494.
- [24] A.W. Clowes, T.R. Kirkman and M.A. Reidy, Mechanisms of arterial graft healing. Rapid transmural capillary ingrowth provides a source of intimal endothelium and smooth muscle in porous PTFE prostheses, *Am. J. Pathol.* **123** (1986), 220–230.
- [25] H.J. Salacinski, G. Punshon, B. Krijgsman, G. Hamilton and A.M. Seifalian, A hybrid compliant vascular graft seeded with microvascular endothelial cells extracted from human omentum, *Artif. Organs* **25** (2001), 974–982.
- [26] A. Tiwari, H.J. Salacinski, G. Punshon, G. Hamilton and A.M. Seifalian, Development of a hybrid cardiovascular graft using a tissue engineering approach, *FASEB J.* **16** (2002), 791–796.
- [27] M. Szycher, V. Poirier, C. Franzblau, B. Faris, R. Snider, P. Toselli, C.C. Haudenschild and W.F. Bernhard, Biochemical, histological, and ultrastructural assessments of pseudointimal linings derived from fibroblast-seeded integrally textured polymeric surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* **15** (1981), 247–265.
- [28] N. Rosenberg, A. Martinez, P.N. Sawyer, S.A. Wesolowski, R.W. Postlethwait and M.L. Dillon Jr., Tanned collagen arterial prosthesis of bovine carotid origin in man. Preliminary studies of enzyme-treated heterograft, *Ann. Surg.* **164** (1996), 247–256.
- [29] G.C. Lantz, S.F. Badylak, M.C. Hiles, A.C. Coffrey, L.A. Geddes, K. Kokini, G.E. Sandusky and R.J. Morff, Small intestinal submucosa as a vascular grafts: a review, *J. Invest. Surg.* **6** (1993), 297–310.
- [30] G.J. Wilson, D.W. Courtman, P. Klement, J.M. Lee and H. Yeger, Acellular matrix: A biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement, *Ann. Thorac. Surg.* **60** (1995), S353–S358.

- [31] A. Bader, G. Steinhoff, K. Strobl, T. Schilling, G. Brandes, H. Mertsching, D. Tsikas, J. Froelich and A. Haverich, Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix, *Transplantation* **70** (2000), 7–14.
- [32] E. Uchimura, Y. Sawa, S. Taketani, Y. Yamanaka, M. Hara, H. Matsuda and J. Miyake, Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with poly(ethylene glycol), *J. Biomed. Mater. Res. A* **67** (2003), 834–837.
- [33] B.S. Conklin, E.R. Richter, K.L. Kreutziger, D.S. Zhong and C. Chen, Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft, *Med. Eng. Phys.* **24** (2002), 173–183.
- [34] P.J. Schaner, N.D. Martin, T.N. Tulenko, I.M. Shapiro, N.A. Tarola, R.F. Leichter, A. Carabasi and P.J. DiMuzio, Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering, *J. Vasc. Surg.* **40** (2004), 146–153.
- [35] N.D. Martin, P.J. Schaner, T.N. Tulenko, I.M. Shapiro, C.A. DiMatteo, T.K. Wilimas, E.S. Hager and P.J. DiMuzio, *In vivo* behaviour of decellularized vein allograft, *J. Surg. Res.* **129** (2005), 17–23.
- [36] A. Bader, G. Steinhoff, K. Strobl, T. Schilling, G. Brandes, H. Mertsching, D. Tsikas, J. Froelich and A. Haverich, Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix, *Transplantation* **70** (2000), 7–14.
- [37] H. Kerdjoudj, C. Boura, L. Marchal, D. Dumas, P. Schaff, J.C. Voegel, J.F. Stoltz and P. Menu, Decellularized umbilical artery treated with thin polyelectrolyte multilayer films: potential use in vascular engineering, *Biomed. Mater. Eng.* **16** (2006), S123–129.
- [38] R. Vohra, G.J. Thomson, H.M. Carr, H. Sharma and M.G. Walker, Comparison of different vascular prostheses and matrices in relation to endothelial seeding, *Br. J. Surg.* **78** (1991), 417–420.
- [39] I. Bisson, M. Kosinski, S. Ruault, B. Gupta, J. Hilborn, F. Wurm and P. Frey, Acrylic acid grafting and collagen immobilization on poly(ethylene terephthalate) surface for adherence and growth of human bladder smooth muscle cells, *Biomaterials* **23** (2002), 3149–3158.
- [40] P. Feugier, R.A. Black, J.A. Hunt and T.V. How, Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress, *Biomaterials* **26** (2005), 1457–1466.
- [41] Y. Marois, M.F. Sigot-Luizard and R. Guidoin, Endothelial cell behaviour on vascular prosthetic grafts: effect of polymer chemistry, surface structure, and surface treatment, *ASAIO J.* **45** (1999), 272–280.
- [42] G.W. Bos, N.M. Scharenborg, A.A. Poot, G.H. Engbers, T. Beugeling, W.G. Van Aken and J. Feijen, Endothelialization of crosslinked albumin–heparin gels, *Thromb. Haemost.* **82** (1999), 1757–1763.
- [43] P. Fernandez, A. Dequette, L. Pothuaud, G. Belleannee and P. Coste, Quality control assessment of ePTFE precoating procedure for *in vitro* cell seeding, *Biomaterials* **26** (2005), 5042–5047.
- [44] T. Shimada, T. Nishibe, H. Miura, K. Hamaza, H. Kato, F. Kudo, T. Murashita and Y. Okuda, Improved healing of small caliber.
- Long-fibril expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts by covalent bonding of fibronectin, *Surg. Today* **34** (2004), 1025–1030.
- [45] A. Sank, K. Rostami, F. Weaver, D. Ertl, A. Yellin, M. Nimni and T.L. Tuan, New evidence and new hope concerning endothelial seeding of vascular grafts, *Am. J. Surg.* **164** (1992), 199–204.
- [46] R. McMillan, B. Meeks, F. Bensebaa, Y. Deslandes and H. Sheardown, Cell adhesion peptide modification of gold-coated polyurethanes for vascular endothelial cell adhesion, *J. Biomed. Mater. Res.* **54** (2001), 272–283.
- [47] K.R. Kidd, D. Dal Ponte, A.L. Stone, J.B. Hoying, R.B. Nagle and S.K. Williams, Stimulated endothelial cell adhesion and angiogenesis with laminin-5 modification of expanded polytetrafluoroethylene, *Tissue Eng.* **11** (2005), 1379–1391.
- H. Kerdjoudj et al. / *The ideal small arterial substitute* 97
- [48] S.P. Massia and J.A. Hubbell, Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials, *J. Biomed. Mater. Res.* **25** (1991), 223–242.
- [49] C.C. Larsen, F. Kligman, K. Kottke-Marchant and R.E. Marchant, The effect of RGD fluorosurfactant polymer modification of ePTFE on endothelial cell adhesion, growth, and function, *Biomaterials* **28** (2006), 4846–4855.
- [50] P. Lamm, G. Juchem, S. Milz, M. Schuffenhauer and B. Reichart, Autologous endothelialized vein allograft: a solution in the search for small-caliber grafts in coronary artery bypass graft operations, *Circulation* **104** (2001), I108–I114.
- [51] L. Bengtsson, K. Radegran and A. Haegerstrand, A new and simple technique to achieve a confluent and flow resistant endothelium on vascular ePTFE-grafts using human serum, *Eur. J. Vasc. Surg.* **8** (1994), 182–187.
- [52] E. Vinard, G. Leseche, B. Andreassian and D. Costagliola, *In vitro* endothelialization of PTFE vascular grafts: A comparison of various substrates, cell densities, and incubation times, *Ann. Vasc. Surg.* **13** (1999), 141–150.
- [53] T. Gumpenberger, J. Heitz, D. Bauerle, H. Kahr, I. Graz, C. Romanin, V. Svorcik and F. Leisch, Adhesion and proliferation of human endothelial cells on photochemically modified polytetrafluoroethylene, *Biomaterials* **24** (2003), 5139–5144.
- [54] K. Lehle, J. Buttstaedt and D.E. Birnbaum, Expression of adhesion molecules and cytokines *in vitro* by endothelial cells seeded on various polymer surfaces coated with titanium carboxonitride, *J. Biomed. Mater. Res. A* **65** (2003), 393–401.
- [55] T. Chandy, G.S. Das, R.F. Wilson and G.H. Rao, Use of plasma glow for surface-engineering biomolecules to enhance blood compatibility of Dacron® and PTFE vascular prosthesis, *Biomaterials* **21** (2000), 699–712.
- [56] R. Sipehia, G. Martucci and J. Lipscombe, Transplantation of human endothelial cell monolayer on artificial vascular prosthesis: the effect of growth-support surface chemistry, cell seeding density, ECM protein coating, and growth factors, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **24** (1996), 51–63.
- [57] S.F. Tao, L. Chen, Y.X. Zheng, Y. Xu, J. Chen and H. Yu, Proliferation of endothelial cell on polytetrafluoroethylene vascular graft materials carried VEGF gene plasmid, *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **7** (2006), 421–428.
- [58] N. Kipshidze, J.J. Ferguson, M.H. Keelan, H. Sahota, R. Komorowski, L.R. Shankar, P.S. Chawla, C.C. Haudenschild, V. Nikolavchik and J.W. Moses, Endoluminal reconstruction of the arterial wall with endothelial cell/glue matrix reduces restenosis in an atherosclerotic rabbit, *J. Am. Coll. Cardiol.* **36** (2000), 1396–1403.
- [59] R.O. Hynes and K.M. Yamada, Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins, *J. Cell Biol.* **95** (1982), 369–377.
- [60] L. Bacakova, V. Mares, V. Lisa, M.G. Bottone, C. Pellicciari and V. Svorcik, Fluorine ion-implanted polystyrene improves growth and viability of vascular smooth muscle cells in culture, *J. Biomed. Mater. Res.* **49** (2000), 369–379.

- [61] P. Lavalle, C. Gergely, F.J.G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J.C. Voegel and C. Picart, Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: an in situ atomic force microscopy study, *Macromolecules* **33** (2002), 4458–4465.
- [62] C. Boura, P. Menu, E. Payan, C. Picart, J.C. Voegel, S. Muller and J.F. Stoltz, Endothelial cells growth on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification, *Biomaterials* **24** (2003), 3521–3530.
- [63] C. Boura, S. Muller, D. Dumas, D. Vautier, P. Schaaf, J.C. Voegel, J.F. Stoltz and P. Menu, Endothelial cell-interactions with polyelectrolyte multilayer films, *Biomaterials* **26** (2005), 4568–4575.
- [64] P.B. Mansfield, A.R. Wechezak and L.R. Sauvage, Preventing thrombus on artificial vascular surfaces: true endothelial cell linings, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **21** (1975), 264–272.
- [65] M. Herring, A. Gardner and J. Glover, A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium, *Surgery* **84** (1978), 498–504.
- [66] O.E. Teebken, A.M. Pichlmaier and A. Haverich, Cell seeded decellularized allogenic matrix grafts and biodegradable polydioxanone-prostheses compared with arterial autografts in a porcine model, *Eur. J. Endovasc. Surg.* **22** (2001), 139–145.
- [67] J.C. Park, Y.S. Hwang and H. Suh, Viability evaluation of engineered tissues, *Yonsei Med. J.* **41** (2000), 836–844.
- [68] L. Bordenave, M. Remy-Zolghadri, P. Fernandez, R. Bareille and D. Midy, Clinical performance of vascular grafts lined with endothelial cells, *Endothelium* **6** (1999), 267–275.
- [69] H.M. Nugent and E.R. Edelman, Endothelial implants provide long-term control of vascular repair in a porcine model of arterial injury, *J. Surg. Res.* **99** (2001), 228–234.
- [70] B.E. Jarrell, S.K. Williams, L. Solomon, L. Speicher, E. Koolpe, J. Radomski, R.A. Carabasi, D. Greener and F.E. Rosato, Use of an endothelial monolayer on a vascular graft prior to implantation. Temporal dynamics and compatibility with the operating room, *Ann. Surg.* **203** (1986), 671–678.
- [71] S.K. Williams, T.F. Wang, R. Castrillo and B.E. Jarrell, Liposuction-derived human fat used for vascular graft sodding contains endothelial cells and not mesothelial cells as the major cell type, *J. Vasc. Surg.* **19** (1994), 916–923.
- [72] J.G. Meinhart, M. Deutsch, T. Fischlein, N. Howanietz, A. Froschl and P. Zilla, Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts, *Ann. Thorac. Surg.* **71** (2001), S327–S331.
- [73] M. Herring, A. Gardner, P. Peigh, D. Madison, S. Baughman, J. Brown and J. Glover, Patency in canine inferior vena cava grafting: effects of graft material, size, and endothelial cell seeding, *J. Vasc. Surg.* **1** (1984), 877–887.
- [74] P. Zilla, R. Fasol, M. Deutsch, T. Fischlein, E. Minar, A. Hammerle, O. Krupicka and M. Kadletz, Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report, *J. Vasc. Surg.* **6** (1987), 535–541.
- 98 H. Kerdjoudj et al. / *The ideal small arterial substitute*
- [75] T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman and J.M. Isner, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis, *Science* **275** (1997), 964–967.
- [76] A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhjan and K.S. Lalykina, The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells, *Cell Tissue Kinet.* **3** (1970), 393–403.
- [77] S. Levenberg, Engineering blood vessels from stem cells: recent advances and applications, *Curr. Opin. Biotechnol.* **16** (2005), 516–523.
- [78] K.M. Sales, H.J. Salacinski, N. Alobaid, M. Mikhail, V. Balakrishnan and A.M. Seifalian, Advancing vascular tissue engineering: the role of stem cell technology, *Trends Biotechnol.* **23** (2005), 461–467.
- [79] G.M. Riha, P.H. Lin, A.B. Lumsden, Q. Yao and C. Chen, Review: application of stem cells for vascular tissue engineering, *Tissue Eng.* **11** (2005), 1535–1552.
- [80] V. Bhattacharya, P.A. McSweeney, Q. Shi, B. Bruno, A. Ishida, R. Nash, R.F. Storb, L. R. Sauvage, W.P. Hammond and M.H. Wu, Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34(+) bone marrow cells, *Blood* **95** (2000), 581–585.
- [81] S. Kaushal, G.E. Amiel, K.J. Guleserian, O.M. Shapira, T. Perry, F.W. Sutherland, E. Rabkin, A.M. Moran, F.J. Schoen, A. Atala, S. Soker, J. Bischoff and J.E. Mayer Jr., Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded *ex vivo*, *Nat. Med.* **7** (2001), 1035–1040.
- [82] D.P. Griese, A. Ehsan, L.G. Melo, D. Kong, L. Zhang, M.J. Mann, R.E. Pratt, R.C. Mulligan and V.J. Dzau, Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy, *Circulation* **108** (2003), 2710–2715.
- [83] A. Kawamoto, T. Asahara and D.W. Losordo, Transplantation of endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization, *Cardiovasc. Radiat. Med.* **3** (2002), 221–225.
- [84] N. Quirici, D. Soligo, L. Caneva, F. Servida, P. Bossolasco and G.L. Delilieri, Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133 (+) cells, *Br. J. Haematol.* **115** (2001), 186–194.
- [85] S.W. Cho, S.H. Lim, I.K. Kim, Y.S. Hong, S.S. Kim, K.J. Yoo, H.Y. Park, Y. Jang, B.C. Chang, C.Y. Choi, K.C. Hwang and B.S. Kim, Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells, *Ann. Surg.* **241** (2005), 506–515.
- [86] S. Kanki-Horimoto, H. Horimoto, S. Mieno, K. Kishida, F. Watanabe, E. Furuya and T. Katsumata, Synthetic vascular prosthesis impregnated with genetically modified bone marrow cells produced recombinant proteins, *Artif. Organs* **29** (2005), 815–819.
- [87] G. Matsumura, S. Miyagawa-Tomita, T. Shin’oka, Y. Ikada and H. Kurosawa, First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts *in vivo*, *Circulation* **108** (2003), 1729–1734.
- [88] S.S. Khan, M.A. Solomon and J.P. McCoy Jr., Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry, *Cytometry B Clin. Cytom.* **64** (2005), 1–8.
- [89] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig and D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* **284** (1999), 143–144

III. Les cellules souches

Certaines de nos cellules sont dites "souches", parce qu'elles sont à l'origine de toutes les autres. Capables de se reproduire à vie sans se modifier ni se différencier en d'autres types cellulaires distincts, elles constituent une révolution biomédicale particulièrement prometteuse pour la médecine régénératrice de demain. Les cellules souches peuvent être issues de l'embryon, du fœtus ou de l'adulte. Il en existe quatre types, classés selon leurs potentiels :

- les cellules souches totipotentes : présentes dans les quatre premiers jours de l'embryon, elles peuvent à elles seules permettre le développement d'un organisme entier ;
- les cellules souches pluripotentes : présentes du 5^{ème} au 7^{ème} jours suivant la fécondation, elles peuvent donner naissance à plus de 200 types de tissus différents ;
- les cellules souches multipotentes : présentes dans les tissus fœtaux ou adultes, elles peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules différenciées ;
- les cellules souches unipotentes : elles n'engendrent qu'un seul type de cellules différenciées mais conservent comme les hépatocytes certaines capacités d'autorenouvellement et de prolifération.

III.1. Les cellules souches embryonnaires

Observées pour la première fois en 1920 chez le poulet, ce n'est pourtant qu'en 1981 que les cellules souches embryonnaires humaines ont pu être isolées. Depuis, elles sont considérées comme un réservoir potentiel de cellules pour la thérapie cellulaire, stratégie thérapeutique qui consiste à remplacer des cellules anormales ou mortes par des cellules prolifératives saines dotées des mêmes caractéristiques. Ces cellules sont obtenues à partir d'un embryon à un stade très précoce du développement (la masse interne du blastocyste) (Figure 7) d'embryons surnuméraires congelés, à l'issue d'une fécondation *in vitro*, ou par clonage (transfert du noyau d'une cellule dans un ovule préalablement privé du sien). Au stade blastocyste, chacune des cellules est pluripotente, voire même totipotente, car elles peuvent produire les trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme), les tissus qui en dérivent ainsi que les cellules germinales. Une fois le blastocyste formé, les cellules embryonnaires perdent la possibilité de développer un organisme entier, mais gardent cependant à l'infini leur caractère pluripotent, leur génome intact et peuvent être cultivées en laboratoire. Il est donc possible d'obtenir des millions de cellules souches embryonnaires pluripotentes à partir d'un petit nombre de cellules issues du blastocyste.



Figure 7 : Observation microscopique d'un blastocyste humain

D'après www.gfmer.ch/Livres/FIV_atlas/ICSI.htm

En culture, les cellules souches embryonnaires sont capables de se différencier en plus de 200 types cellulaires : neurones, cellules sanguines, musculaires, endothéliales, etc., en réponse à différents facteurs de croissance (Bain et al 1995, Kramer et al 2000, Rohwedel et al 1994, Vittet et al 1996, Brivanlou et al 2003). Les résultats des recherches menées sur ces cellules ne sont actuellement pas très fournis, principalement pour des raisons éthiques. Par ailleurs, la recherche liée aux cellules souches embryonnaires humaines est fortement controversée du fait de la destruction d'un embryon, considéré d'ores et déjà par certains comme un « être humain à part entière ».

Afin de limiter les problèmes éthiques liés à l'utilisation des cellules souches embryonnaires, plusieurs groupes se sont intéressés à l'utilisation de cellules souches pluripotentes obtenues après induction appelé iPS (induced pluripotent stem cells). Ces cellules sont obtenues à partir de cellules déjà différenciées grâce à l'expression d'un certain nombre de facteurs de transcription spécifiques aux cellules souches pluripotentes. Parmi ces facteurs de transcription Oct 3/4, Sox-2, c-Myc, et Nanog jouent un rôle important dans le maintien de la pluripotentialité de cellules souches. En 2007, l'équipe de Takahashi a montré avec succès qu'il est possible de reprogrammer des cellules somatiques (fibroblastes de souris) en cellules souches embryonnaires. Ces cellules ont été obtenues après transfection par un retrovirus exprimant les facteurs de transcription nécessaire au maintien de la pluripotentialité. Ces cellules présentent une morphologie, une prolifération identique à celle des cellules souches embryonnaires (Takahashi et al 2007). Les iPS ont également été capables de se différencier en différents types cellulaires tels que les neurones, les cardiomyocytes et les cellules hématopoïétiques (Hanna et al 2007, Wernig et al 2008, Dimos et al 2008). Cependant l'utilisation de rétrovirus, comme vecteur de l'expression des facteurs de transcription

permettant la reprogrammation cellulaire, peut engendrer des risques de mutagenèse incontrôlée, ce qui représente un réel problème pour de applications en médecine régénératrice.

III.2. Les cellules souches fœtales

D'un point de vue recherche et thérapeutique, les cellules souches fœtales peuvent être prélevées sur des fœtus issus d'une interruption volontaire de grossesse. Les cellules souches fœtales sont des cellules unipotentes parce qu'elles ont la particularité d'être déjà orientées vers un type cellulaire particulier. Deux de ces types cellulaires sont particulièrement importants dans une perspective thérapeutique (Reyftmann et al 2004) :

(i) les cellules souches des zones germinatives du système nerveux central, sont utilisées dans le traitement de certaines pathologies neurodégénératives (maladie de Parkinson ou chorée de Huntington). Cependant, les cellules implantées doivent être différenciées en neurones, mais ne doivent pas encore avoir établi leur connections neuronales.

(ii) les hépatocytes fœtaux font également l'objet d'une recherche active en vue de la transplantation du foie.

III.3. Les cellules souches adultes

III.3.1. Les Cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont été isolées pour la première fois à la fin des années 1990 lors de travaux qui ont permis l'identification de cellules présentant les propriétés de cellules souches (capables de se reproduire indéfiniment et de se différencier en plusieurs types cellulaires) (Prockop 1997, Pittenger et al 1999). Les CSM sont généralement isolées à partir d'une ponction de moelle osseuse de la crête iliaque supérieure (Pittenger et al 1999, Digirolamo et al 1999) mais elles peuvent également l'être à partir de moelle osseuse de tibia ou de fémur (Murphy et al 2002) ainsi que de la colonne vertébrale au niveau des corps vertébraux lombaires et thoraciques (D'ippolito et al 1999). Le nombre de CSM collectées suite à ces ponctions de moelle est très faible et varie de 0,01 à 0,0001% des cellules nucléées (Roberts 2004). D'ailleurs, dans la circulation sanguine leur quantité est encore plus faible. Cette faible proportion nécessite donc leur expansion *in vitro* avant utilisation. On considère que 10 à 20 mL de moelle osseuse (Haynesworth et al 1992 ,Simmons et al 1991 , Bruder et al 1997, Jones et al 2002) permettent d'amplifier, *in vitro*, des

millions de CSM en cellules matures. Les CSM prolifèrent rapidement en culture, cependant leur potentiel d'expansion est variable en fonction notamment de l'âge du donneur, de sa condition physique et des techniques de prélèvement (Digirolamo et al 1999, Bruder et al 1997, Colter et al 2000). La caractérisation *in vitro* des CSM se fait à travers l'expression des marqueurs spécifiques : CD90⁺, CD105⁺, CD34⁺, CD45⁺ et CD14⁺, (Noel et al 2002).

Grâce à leur caractère multipotent, ces cellules ont démontré qu'elles étaient capables de se différencier en plusieurs types cellulaires et notamment l'os (Jaiswal et al 1997 ; Long et al 2001 ; Aslan et al 2006), le cartilage (Yoo et al 1998 ; Johnstone et al 1998), le tendon (young et al 1998) le ligament (young et al 1998), les cardiomyocytes et les cellules endothéliales (Pittenger et al 1999, Oswald et al 2004).

Ces CSM représentent donc une source prometteuse pour la médecine régénératrice.

III.3.2. Les cellules souches hématopoïétiques

Les connaissances sur les cellules souches se sont accumulées ces quarante dernières années. On distingue des cellules très précoces capables de générer les cellules hématopoïétiques et lymphoïdes. Ces cellules se différencient progressivement en plusieurs semaines en cellules souches de plus en plus engagées vers une lignée hématopoïétique donnée (par exemple érythroïde ou granulopoïde).

La CSH très précoce n'a été isolée qu'en 1995 chez la souris, 33 ans après la mise en évidence des premiers précurseurs hématopoïétiques, retard dû à leur très faible quantité : < 1 cellule pour 10⁵ cellules mononucléées, responsable d'une identification difficile. En culture, cette cellule souche n'est pas capable de prolifération illimitée à la différence des cellules souches embryonnaires. En 1960, Till et MacCulloch ont pour la première fois démontrée l'existence d'une CSH capable de générer les différentes lignées érythroïdes, monocytaires et granulocytaires (McCulloch and Till 1960). Des études sur des CSH humaines ou murines ont montré leur capacité à se différencier en trois types principaux de cellules cérébrales (neurones, oligodendrocytes et astrocytes), en cellules musculaires squelettiques (Ferrari et al 1998), cardiaques (Orlic et al 2001) et hépatiques (alison et al 2000 ; theise et al 2000).

Au fil des années, de nombreuses combinaisons de marqueurs de surface ont été utilisées pour identifier, isoler et purifier les CSH provenant de la moelle osseuse et du sang. Les CSH représentent un « pool » de cellules exprimant les différents marqueurs : c-kit⁺, CD34⁺, CD45⁺ et CD14⁺. Ces cellules manquent généralement de marqueurs de la lignée Lin, ou ne sont présents qu'à de très faibles niveaux (Lin⁻/low). Pour la transplantation, les cellules

exprimant ces différents marqueurs sont les plus susceptibles de permettre la réussite de la greffe.

L'utilisation des CSH en thérapeutique humaine est plutôt rare du fait de la difficulté d'accroître le nombre des cellules sans perdre leur potentiel de différenciation. *In vitro*, leur prolifération à l'état non différencié est impossible, ce qui les distingue radicalement des cellules souches mésenchymateuses (Coulombel et al 2003). Cette caractéristique est un obstacle à leur utilisation dans des greffes autologues et à la création de banques de CSH disponibles à la demande.

III.3.3 Les progéniteurs endothéliaux (EPC)

La découverte de précurseurs circulants des cellules endothéliales (EPC) chez l'homme adulte a révolutionné le concept d'angiogénèse post-natale (Asahara et al 1997). Les EPC représentent la population de cellules issues de la moelle osseuse capables de se différencier en cellules matures. Les EPC sont susceptibles d'internaliser les lipoprotéines de faible densité (LDL) et expriment des marqueurs de différenciation spécifiques aux CE matures (Asahara et al 1997, Kalka et al 2000, Aoki et al 2004). Ces différents marqueurs peuvent être utilisés pour isoler les EPC à partir d'une fraction de cellules mononucléées ; de plus les EPC présents dans la fraction de cellules mononucléées sont capables de se développer en culture sous l'effet d'un milieu de culture approprié enrichi notamment en facteurs de croissance favorisant la différenciation en CE matures. Les EPC jouent un rôle essentiel dans la formation des structures vasculaires et sont par conséquent fortement impliqués dans le phénomène de cicatrisation (Asai et al, 2006) et dans le traitement des infarctus du myocarde (Losordo et al 1998). Ils jouent également un rôle important lors de processus biologiques pathologiques comme la croissance tumorale. Chez l'adulte, la formation de vaisseaux sanguins, dans des conditions physiologiques ou pathologiques (tumeurs), s'effectue grâce à la néovascularisation. Au cours de ces processus, la libération des EPC dans la circulation sanguine va permettre le développement du réseau vasculaire (Figure 8).

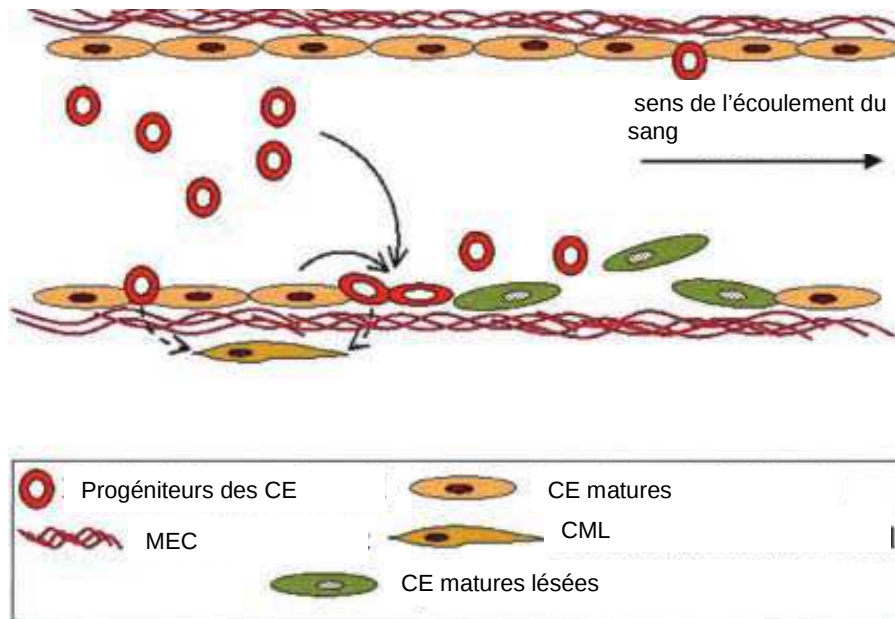


Figure 8: représentation schématique de l'implication des EPC dans la réparation des lésions vasculaires.

Les EPC sont capables de s'intégrer à la monocouche de CE et se différencier pour restaurer la structure vasculaire. Les mécanismes de signalisation intercellulaire entre les EPC et les CE ne sont cependant pas élucidés à ce jour.

A/ Le phénotype des EPC

Depuis la mise en évidence des EPC dans la circulation sanguine (Asahara et al 1997, Ehling et al 2000), de nombreuses études se sont intéressées à identifier et à isoler cette population cellulaire (Peichev et al 2000, Shi et al 1998, Murohara et al 2000, Kalka et al 2000). Cependant le phénotype de ces cellules n'est encore pas clairement défini à ce jour.

Au niveau de la moelle osseuse, les EPC sont caractérisés par l'expression de CD34 et du VEGFR-2, partagés également par les CSH et les CE matures. Par ailleurs, les EPC expriment le CD133, autre marqueur hématopoïétique (ou AC133) qui n'est plus exprimé après différenciation (Yin et al 1997 ; Walter et al 2002). Grâce à ces trois marqueurs (CD34, CD133 et VEGFR-2) Peichev et al. ont réussi à isoler une population de cellules capables de se différencier en CE matures. Les EPC, une fois libérés dans la circulation sanguine, expriment de plus en plus les marqueurs des CE matures tels que le CD31, le facteur von Willebrand (vWF), la VE-cadhérine, ... alors que l'expression des marqueurs des cellules souches tels que le CD133, diminue. Enfin il est important de préciser que dans la circulation sanguine, il existe deux populations d'EPC : les EPC précoces et les EPC tardifs (Figure 9).

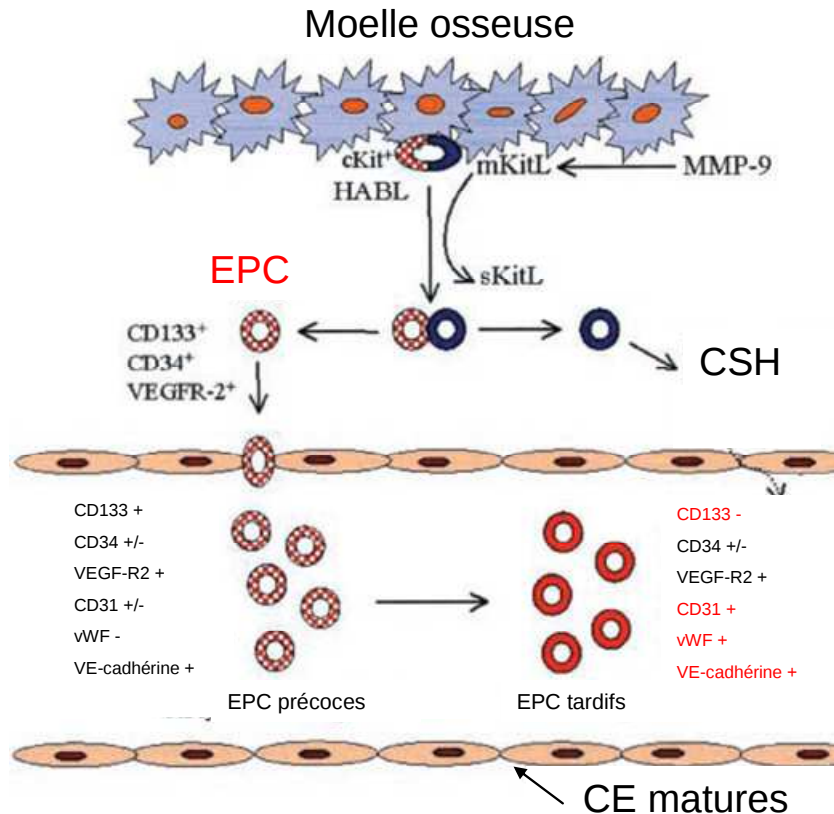


Figure 9: représentation schématique de la mobilisation des EPC depuis la moelle osseuse vers la circulation sanguine

La première phase de ce processus est l'activation de la métalloprotéase matricielle-9 (MMP-9) qui va provoquer la transformation du ligand membranaire Kit (mKitL) en une forme soluble (sKitL). Les cellules kit positives, comprenant les CSH et les cellules progénitrices, vont alors être libérées dans la circulation sanguine et passent d'un état quiescent à un état prolifératif. Les EPC précoces sont CD133⁺, CD34⁺, VEGF-R2⁺... Au cours de leur différenciation, ces cellules perdent le marqueur CD133 et deviennent CD31⁺, VE-cadhérine⁺ et vWF⁺.

- Les EPC précoces présentent une capacité de prolifération limitée et ne peuvent être maintenus en culture que très peu de temps (2 à 3 semaines). Ces cellules expriment des marqueurs tels que CD133, CD34, CD14, CD45, VE-cadhérine et VEGFR-2 (Sharpe et al 2006, Gulati et al 2003). Après 30 jours de culture, ces cellules vont perdre ces marqueurs hématopoïétiques pour exprimer les marqueurs spécifiques aux cellules endothéliales matures (Sharpe et al 2006). *In vivo*, à la suite d'injection systémique, ces cellules vont être capables de se diriger et de s'intégrer au niveau de sites ischémiques des membres inférieurs, mais aussi des sites tumoraux pour favoriser la néovascularisation (Harraz et al 2001, Li et al 2006, Tepper et al 2005).

Cytokines
Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (G-CSF)
Molécule pharmacologique
AMD3100 (antagoniste de SDF1- α)
Statine
antagoniste du récepteur de l'angiotensine 2
Hormones
Erythropoïétine
Œstrogène
Facteurs de croissance
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)
bFGF (basic Fibroblast growth Factor)
PlGF (Placenta Growth Factor)

Tableau 3 : liste non exhaustive des stimuli exogènes influençant la mobilisation des EPC (d'après Roncalli et al 2008).

- Les EPC tardifs ne sont visibles en culture qu'à partir des 2^{ème} – 3^{ème} semaines. Elles se développent rapidement en culture et les populations cellulaires sont capables de se diviser plus de 100 fois avant d'entrer en sénescence (Gulati et al 2003, Ingram et al 2004, Hur et al 2004). Ces EPC tardifs seraient tout simplement des EPC précoces ayant un stade de différenciation plus avancé. Tout comme pour les EPC précoces, l'administration d'EPC tardifs favorise l'angiogénèse au niveau de sites ischémiques (Schattelman et al 2000, Grant et al 2002, Urbich et al 2004, Kawamoto et al 2001, Gehling et al 2000, Murohara et al 2000).

B/ La mobilisation des EPC

Des stimulations endogènes et exogènes permettent la mobilisation des EPC de la moelle osseuse vers la circulation sanguine.

B/ 1. Les stimulations exogènes

Les patients ayant des risques cardiovasculaires élevés (diabète, tabac, sédentarité) ou souffrant d'ischémie, présentent un faible taux d'EPC dans la circulation sanguin. Afin d'améliorer leur mobilisation dans circulation, différents agents exogènes (VEGF, statines...) peuvent alors être administrés (Tableau 3) :

Les facteurs les plus utilisés en cliniques sont :

Le G-CSF est la cytokine la plus utilisée en clinique pour la mobilisation de CSH à partir de la moelle osseuse (Aicher et al 2003). Les études menées chez l'animal ont montré que les injections de G-CSF améliorent la fonction cardiaque en permettant le remodelage du ventricule gauche et diminuent le taux de mortalité après un infarctus du myocarde (Orlic et al, 2001, Minatoguchi et al 2004). La mobilisation de cellules CD34⁺ après injection de G-CSF réduit les complications dues à la neutropénie consécutive à la chimiothérapie (Crawford et al 1991). Cependant, l'utilisation de cette cytokine a montré qu'elle joue un rôle important dans la croissance tumorale (Natori et al 2002) et augmente les risques de leucémies myéloïdes aigues et de syndrome myélodysplasique chez les femmes ayant subi une chimiothérapie suite à un cancer du sein (Herscman et al 2007).

L'AMD3100 est un antagoniste du récepteur CXCR-4 (stromal cell-derived factor 1 α : ligand du récepteur CXCR4). La liaison entre SDF-1 α et CXCR4 joue un rôle majeur dans la mobilisation et l'incorporation des EPC au niveau des sites de néovascularisation. En effet, l'interaction du SDF-1 α à son récepteur confine les EPC dans la moelle osseuse. AMD3100 administré en sous cutané permet de rompre la liaison entre SDF-1 α et CXCR4, ce qui permet la mobilisation des EPC de la moelle osseuse vers la circulation sanguine (Liles et al, 2003, Aiuti et al 1997).

En 2003, Heeschen et al ont montré que certaines hormones comme l'**érythropoïétine** étaient capables de stimuler la néovascularisation postnatale, notamment en permettant la mobilisation des EPC à partir de la moelle osseuse (Heeschen et al 2003). En clinique, la mesure du niveau d'érythropoïétine dans le sérum permet de détecter les patients dont la capacité de mobilisation des EPC est diminuée. Des études réalisées, chez des animaux souffrant d'infarctus du myocarde, ont montré qu'une simple injection d'érythropoïétine permettait d'améliorer la fonction cardiaque (Prunier et al 2007). Néanmoins, de nombreuses

cellules cancéreuses utilisent l'érythropoïétine comme facteur favorisant la croissance et l'angiogénèse tumorale (Yasuda et al 2003, Leyland jones et al 2003).

B/ 2. Les stimulations endogènes

Des stimuli tels que l'ischémie, la cicatrisation ou encore la croissance tumorale, conduisent à la mobilisation des EPC. Des études ont montré que des patients souffrant d'infarctus du myocarde avait un nombre d'EPC circulant beaucoup plus important que des patients sains (Gill et al 2001 ; Shintani et al 2001). Cette augmentation a été mise en relation avec la concentration importante de VEGF présente dans le plasma de ces malades (Shintani et al 2001). En effet, plusieurs auteurs ont montré que le VEGF était capable d'induire la mobilisation des EPC depuis la moelle osseuse et de favoriser leur incorporation au niveau des sites de néovascularisation (Asahara et al 1999, Kalka et al 2000, hattori et al 2001) (tableau 5). Au cours des cinq dernières années, les nombreuses publications sur les EPC ont suggéré leur valeur comme marqueur diagnostique et pronostique des maladies cardiovasculaires (Hill et al 2003). Le nombre d'EPC semble également dépendant de facteurs tels que l'âge, le diabète, l'activité physique et le tabagisme (Van Craenenbroeck et al 2008; Tepper et al 2002 ; Laufs et al 2004 ; Kondo et al 2004) (Tableau 4).

Facteurs diminuant le nombre d'EPC
le diabète
l'hypertension
le tabagisme
l'age
Un taux élevé de cholestérol

Tableau 4 : liste de troubles pathologiques diminuant le nombre d'EPC dans la circulation sanguine (d'après Roncalli et al 2008).

Maladies et troubles corrélée avec un faible taux d'EPC
Maladie coronarienne
Restenose suite à la pose d'un stent
Vasculopathie chez des transplanté cardiaques

Tableau 5 : liste non exhaustive des pathologies liées à un faible taux d'EPC dans la circulation sanguine (d'après Szmitko et al 2003)

C/ EPC et traitement cardiovasculaire

Les EPC jouent un rôle très important dans la ré-endothélialisation des vaisseaux malades ainsi que dans le traitement de maladies vasculaires et notamment dans la néovascularisation de sites ischémiques.

C/1. Traitement des sites ischémiques

L'ischémie est la diminution de l'apport sanguin à un organe, responsable d'une baisse de l'oxygénation des tissus (hypoxie), d'où la perturbation, voire l'arrêt de sa fonction. L'obstruction progressive des vaisseaux sanguins (cas d'une ischémie symptomatique) permet le développement d'un réseau collatéral qui représente un élément déterminant de la réponse de l'organisme et conditionne largement sa capacité à éviter ou limiter les complications ischémiques.

La néovascularisation post-ischémique ne dépend pas uniquement du processus angiogénique et artériogénique mais implique également les progéniteurs circulants de cellules vasculaires provenant de la moelle osseuse (Figure 10). En réponse à une ischémie tissulaire, les précurseurs des cellules endothéliales sont mobilisés de la moelle osseuse vers la circulation périphérique, migrent vers le tissu ischémique et s'incorporent dans le site de néovascularisation où la différenciation en cellules endothéliales se termine (Figure 10) (Shintani et al 2001, Asahara et al 1999, Takahashi et al 1999). L'injection d'EPC (obtenus à partir du sang périphérique ou isolés à partir du sang du cordon ombilical) au niveau des sites ischémiques (zone infarctée du cœur ou des membres inférieurs) a permis d'améliorer de façon significative la densité capillaire et de restaurer une circulation sanguine convenable chez des modèles animaux souffrant d'ischémie des membres inférieurs (Kalka et al 2000, Kawamoto et al 2001, Kocher et al 2001, Murohara et al 2000; Taguchi et al 2004).

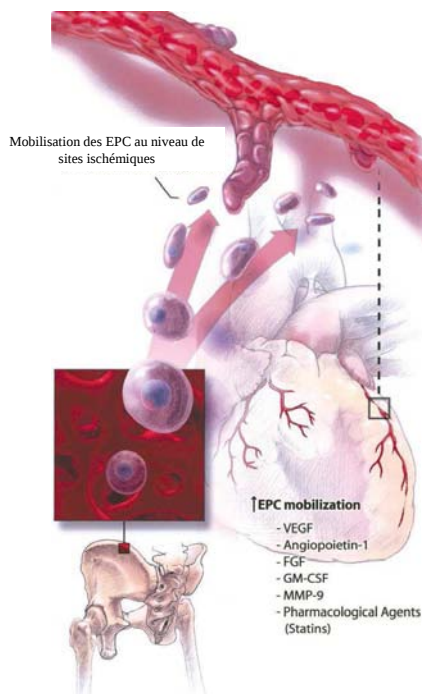


Figure 10 : mobilisation et incorporation des EPC au niveau de sites ischémiques coronariens (d'après Szmitko et al 2003).

Cette incorporation va permettre l'angiogénèse et restaure ainsi un apport en oxygène et en nutriments correcte.

C/2. Les EPC et l'ingénierie vasculaire

L'ensemencement de cellules endothéliales dans la lumière des substituts vasculaires dont la surface luminale est hautement thrombogène (artères issues des banques vasculaires, substituts synthétiques,...) est un challenge pour l'ingénierie vasculaire (cf. Figure 1 revue *Clinical Hemorheology*). Cela implique la disponibilité d'une source de CE **autologues**. En effet, les CE allogéniques ou xénogéniques ne présentent que peu d'intérêt car elles nécessitent une protection vis-à-vis du système immunitaire. Les difficultés inhérentes à l'obtention de cellules autologues constituent un facteur limitant pour leur utilisation en ingénierie vasculaire. Deux catégories de cellules endothéliales peuvent être utilisées: les cellules matures et les cellules souches. Les CE matures issues de culture primaire (matures) sont recueillies d'une veine prélevée directement chez le patient, ou des micro-vaisseaux provenant de tissu adipeux (*omentum* ou graisses sous-cutanées). (Graham et al 1980, Varma et al 2007, Williams et al 1989, Jarrell et al 1986). L'utilisation de ces cellules présente des inconvénients majeurs tels que leur faible disponibilité, la difficulté de recueil et la qualité fonctionnelle moindre des cellules après expansion *in vitro*. En effet, l'amplification des cellules endothéliales matures se traduit par une diminution de l'expression des marqueurs endothéliaux, signe d'une dédifférenciation cellulaire. La deuxième catégorie cellulaire potentielle est constituée par les cellules souches. Les progrès réalisés ces dernières années dans le domaine de l'expansion et de la différenciation de cellules dérivées des cellules souches ont permis d'envisager l'utilisation des EPC dans l'ingénierie vasculaire. En effet, des études récentes ont montré qu'il était possible de reconstituer *in vitro* un néo-endothélium sur des substituts vasculaires synthétiques et biologiques (Aper et al 2007, He et al 2003, Griese et al 2003, Kaushal et al 2001). Kaushal et ses collaborateurs (Kaushal et al 2001) ont ensemencé des cellules endothéliales issues de la différenciation *in vitro* de progéniteurs circulants sur des matrices décellularisées d'artères iliaques de porc. Ces matrices endothélialisées ont été implantées en remplacement d'artère carotide. Ces auteurs ont observé une perméabilité totale à 130 jours après implantation et une contractilité identique à celle d'un vaisseau natif. Plus récemment des essais cliniques ont été entrepris avec des substituts vasculaires réendothélialisés avec des EPC. Pour cela, des stents ont été recouverts d'anticorps anti-CD34⁺ préalablement à leur implantation. Une fois en place, les anticorps CD34⁺ sont capables de lier les EPC circulants (qui sont CD34⁺), ce qui favoriserait la réendothélialisation du stents et éviteraient également resténose ou thrombose. La première phase de ces essais comprenait 16 patients atteints de maladies coronaires, qui ont été traités à

l'aide de ces stents coatés avec ces anticorps anti-CD34⁺. Les résultats des protocoles de sécurité et de faisabilité ont été satisfaisants au cours de la phase I de ces essais. (Aoki et al 2005). Les résultats obtenus ont démontré une diminution significative de la sténose pour les patients traités avec le stents coaté avec des anticorps CD34⁺ par rapport aux patients traités avec un stent non coaté ($15.49 \pm 4.54\%$ vs. $23.96 \pm 7.70\%$, $p= 0.01$).

La différenciation *in vitro* des progéniteurs endothéliaux en CE matures et fonctionnelles nécessite une modification préalable du support de culture. Les méthodes actuellement décrites dans la littérature font, pour la plupart, appel à des recouvrements par des constituants de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine,...) ou par des greffages des séquences peptidiques (RGD). La différenciation et la maturation des EPC en EC sur ces supports nécessitent un long temps de maturation ainsi que l'utilisation et l'ajout permanent et régulier, dans le milieu de culture, de nombreux facteurs de croissance (dont la durée de vie d'environ 6 heures). Ces inconvénients limitent, dans les situations d'urgence, leur utilisation en clinique.

IV. Les Films Multicouches de Polyélectrolytes

Les films multicouches de polyélectrolytes (PEM) constituent un moyen original, simple et efficace de fonctionnaliser rapidement les surfaces des biomatériaux afin de les cellulariser. Le développement actuel des biomatériaux s'oriente vers la réalisation de surfaces bioactives qui assurent l'adhésion et le développement des cellules. Les méthodes utilisées à ce jour (adsorption de protéines, greffage chimique de polymères) sont souvent difficiles à mettre en œuvre et ne s'adaptent pas à toutes les surfaces, ce qui limite leur utilisation. Une voie originale de fonctionnalisation des biomatériaux, basée sur le dépôt couche par couche de polyélectrolytes (alternativement un polycation et un polyanion) a été développée dans les années 90 par Géro Décher (Decher et al 1992, Decher 1997). La disponibilité variée de polyélectrolytes autorise l'élaboration de films multicouche de polyélectrolytes (PEM) dont les propriétés physicochimiques et les possibilités multiples et modulables de fonctionnalisation permettent l'obtention de matériaux spécifiques à l'application désirée. Un des avantages des multicouches de polyélectrolytes est la manière dont on peut modifier leurs propriétés en ajustant certains paramètres comme la nature des polyélectrolytes, la force ionique, le pH ou encore la température, ou en modulant l'épaisseur, la rugosité, la perméabilité, les propriétés mécaniques ou encore la charge de surface. La facilité de construction et la simplicité de mise en œuvre des PEM a généré une évolution rapide des

connaissances dans ce domaine ainsi que le développement d'une grande diversité de systèmes fonctionnels. Ces assemblages supramoléculaires permettent aujourd'hui d'envisager de nombreuses applications potentielles balayant un champ technologique très large allant des matériaux électroniques aux nanobiotechnologies. Des exemples d'applications très diverses peuvent être relatées comme par exemple :

- *Le traitement anti-reflets* de verres optiques par des films hydrochlorure de poly(allylamine) (PAH)/ acide polyacrylique (PAA) pour limiter les phénomènes de réflexion lumineuse sur les lunettes, les écrans d'ordinateurs ou encore pour augmenter le rendement des cellules photovoltaïques (Hiller et al 2002);
- *De nouvelles diodes organiques électroluminescentes (OLED)* à base de films poly(*p*-phénylènevinylène/ poly(acide méthacrylique) (PPV/PMA) avec des propriétés électro-optiques (caractéristiques courant-tension et luminescence-tension) modulées par la position d'une couche de montmorillonite dans l'édifice (Eckle and Decher 2001);
- *De nouveaux matériaux composites à haute résistance mécanique*, constitués de films PDADMA/montmorillonite où des briques d'argile (montmorillonite) de taille nanométrique ("nanobriques") sont reliées entre elles par des chaînes de PDADMA jouant le rôle de ciment entre les plaquettes minérales (Tang et al 2003) ;
- *Des procédés de séparation et de nanofiltration* avec le développement de nouvelles membranes sélectives aux ions à base de films multicouches de polyélectrolytes (Kotov et al. 1998; Liu and Bruening 2004; Miller and Bruening 2004);
- *Des films minces alimentaires protecteurs* déposés au fond des bacs à légumes pour piéger les traces d'éthylène gazeux libérés par des fruits et légumes en voie de décomposition. Ces films ont déjà été commercialisés au Japon sous le nom "Yasa Sheets".

En ce qui nous concerne, les films multicouches présentent de nombreuses applications potentielles dans le domaine des biomatériaux. En effet, le revêtement à base de polyélectrolytes biocompatibles de la surface d'un implant peut conduire à une meilleure intégration de celui-ci dans les tissus environnants. Dans la perspective d'application biomédicale des films multicouches de polyélectrolytes, de nombreuses études ont porté ces dernières années sur le comportement des cellules adhérentes. La revue présentée à la suite, soumise à *Soft Matter*, décrit les différentes implications des MPE dans le domaine de l'ingénierie tissulaire vasculaire.

Multilayered polyelectrolyte films: a tool for arteries and vessel repair.

Halima Kerdjoudj, Nicolas Berthelemy...

Abstract:

Circulatory vascular diseases, especially those arising from atherosclerosis, are the predominant cause of mortality and morbidity in the developed world. Current therapies include the use of autologous vessels or synthetic materials as vessel replacements. The limited availability of healthy vessels for use as bypass grafts and the failure of purely synthetic materials in small-diameter sites necessitate the development of a biological substitute. Langer and vacanti, proposed the concept of tissue engineering for the development of structures that can treat or replace damaged or disease organs and tissues. The layer-by-layer self-assembly technique has emerged as a simple and versatile method for coating biological and non-biological templates for various biomedical applications. This review discusses the development of bypass grafts, focusing on the various implications of layer-by-layer surface technology for the development of suitable grafts.

Introduction: Current state of blood vessels replacement

Cardiovascular diseases are defined as diseases and injuries of the cardiovascular system: the heart, the blood vessels of the heart, and more generally **the whole system of blood vessels** (mainly arteries) throughout the body. According to the World Health Organization estimates, about 16.7 million people around the world die yearly consequently to cardiovascular diseases. This represents about one-third of all deaths (Mackay et al., 2004). Historically, several strategies have been explored for arterial reconstruction. Some approaches are based on the substitution of arteries by synthetic prostheses or vessels of biological origin.

Substitutes of biological origin

Arterial damages result typically from atherosclerotic plaques that restrict the lumen of the blood vessels and subsequently damage the endothelial lining of the arteries. These pathologies lead ultimately to thrombus formation and obstruction of blood flow. Currently, occluded vessels with internal diameters < 6 mm are bypassed with autologous native blood vessels using typically the saphenous vein as substitute. Autologous saphenous veins were

first employed by Kunklin Goyanes (Arnulf 1987). Since this time, venous grafts retained the largest long term patency, although limitation such as deterioration due to exposure to increased flow and pressure still remain a major problem. The internal mammary artery from chest showed also to be a superior conduit compared to saphenous vein with higher long term patency. These native vessels generally display 50 - 70% graft patency over 10 years (Loop et al., 1986). The better patency of native vessels is attributed to their compliant natural tissue characteristics and to their anti-thrombogenic luminal endothelial lining. Unfortunately, 60% of patients who need vascular bypass surgery do not have the suitable vessels for grafting, either due to earlier procedures or advanced peripheral vascular diseases.

Cryopreserved arteries, provided from vascular banks, have also been used in clinic as coronary artery bypass conduits. They do not require anticoagulation treatment, do not infect easily, are not susceptible to thromboembolisms and have a weak predisposition to graft dilatation and subsequently aneurysm formation (Brown et al., 2009; Teebken et al., 2000; Giglia et al., 2002). The cryopreserved allografts were introduced the first time by Gross and Co (Harisson et al., 1976). Low rate patency (31% of success after 1 year of implantation) due to a decrease of the mechanical and anti-thrombogenic properties after a cryopreservation procedure have also been reported (Oschner et al., 1984, Gelbfish et al., 1986; Gabriel et al., 2006).

Substitutes of synthetic origin

The synthetic vascular prostheses were introduced in the 1950s by Voorhees (Voorhees et al., 1952). The most widely employed materials include Dacron® (polyethylene terephthalate), Gore-Tex™ (expanded polytetrafluoroethylene: ePTFE) and compliant polyurethanes (Table 1). These materials are readily available, relatively inexpensive, and have been employed with success in clinical applications for vessel diameters larger than 6 mm. Unfortunately, synthetic grafts with a small diameter (< 6 mm like coronary arteries) exhibit unsatisfactory long term patency due to high luminal grafts thrombogenicity and neointima formation (Tai et al., 2000).

The urgent need to develop suitable small arterial calibre replacements has motivated researchers to explore the field of tissue engineering. Vascular tissue engineering applies the principles of engineering and life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function. Vascular tissue engineering is a major field within tissue engineering which attempts to design a physiologically interactive replacement for diseased or injured vascular tissue. The developed blood vessels should ideally

becomposed of viable tissue, be compliant (contract in response to hemodynamics forces), and secrete normal blood vessel metabolites.

Vascular tissue engineering .

Most tissue engineering strategies attempts to create small calibre vascular grafts by closely mimicking the structure, function and physiologic environment of native arteries. Normal arteries possess three distinct layers: intima, media and adventitia (Figure 1A). The endothelium, constituting an intima tunica, is constituted by a thin endothelial cell (ECs) layer that coats fully the inner surface of blood vessels, separating the circulating blood from the whole cells. It has the property of producing, independently, both agonist and antagonist substances that help to keep homeostasis by controlling the production of pro-thrombotic and anti-thrombotic components of the coagulation system. It modulates vascular smooth muscle cells (SMCs) relaxation or contraction, and therefore vasodilatation or vasoconstriction.

Furthermore, the endothelium plays a role in cell proliferation and migration, as well as in leukocyte adhesion and activation and in immunological and inflammatory processes (Figure 1B). Thus, the major issue in providing non thrombogenic vascular substitutes is that they should possess an endothelium which is adherent, confluent and resistant after the restoration of blood circuits after surgery. It is known for more than four decades that, at the difference of animals for which the cellular ingrowth is very rapid, in human, trans-anastomotic endothelial cells ingrowth does not exceed more than 1–2 cm (Berger et al., 1972) even after years of implantation. Moreover, the time of course of *in vivo* ECs regeneration depends on different factors (age, grafts length, anastomosis type....) (Zilla et al., 2007). Herring and co-workers introduced in 1978 the concept of artificial vessel endothelialisation, which is one of the most promising methods to improve the patency of the small diameter vascular grafts (Herring et al., 1978). The vascular ECs harvested from living animals were employed for the vessel endothelialisation. However, human endothelial cells show few initial adherence and poor resistance to blood shear stress. In fact, when the graft is exposed to pulsatile flow, a large proportion of cells are washed off from the grafts lumen. Maximum cell loss occurs few minutes after exposure to pulsatile flow, with up to 70% of cells lost (Rosenman et al., 1985). The results of early animal studies were quite promising. Historical perspectives of ECs seeding research including early animal and clinical studies were published (Pawlowski et al., 2004, Kerdjoudj et al., 2007, Deutsch et al., 2009). More recently, the early optimism was tempered by clinical data that were often disappointing. It appears that modifications of the

traditional methodologies (Table 2) to promote endothelium development via ECs seeding are needed to render this approach technically successful and to significantly improve patency rates (improve cell adhesion and retention) of current vascular grafts.

Since about 10 years a very simple and versatile surface modification method based on layer-by-layer (LbL) deposition of polyelectrolytes (alternately polyanions and polycations) in order to improve the anti-thrombogenicity and patency of vascular grafts is investigated. The main purpose of this review is to summarize the recent works performed in the vascular tissue engineering using this approach. We excluded approaches that use other surface modification for creating anti-thrombogenic vascular grafts. Several reviews in the broader field of vascular tissue engineering have been published in recent years (L'heureux et al., 2007, Stegemann et al., 2007, Rivron et al., 2008, Shaikh et al., 2008, Mironov et al., 2008, Bordenave et al., 2008) and the reader interested in other approaches is referred to these papers.

Polyelectrolyte multilayer films: General aspects

Polyelectrolytes are macromolecules that bear a large number of positive or negative charges or groups (carboxylic or other acids or amines) that can be ionized once dissolved in water by varying pH. Numerous polyelectrolytes have been employed in the tissue engineering fields. Typically synthetic polyelectrolytes as poly(styrene sulfonate) (PSS), poly(allylamine hydrochloride) (PAH), poly(acrylic acid) (PAA) but also polypeptides as poly-lysine (PLL) poly-glutamic acid (PGA), poly-aspartic acid (PAsp) or even polysaccharides: hyaluronic acid (HA), Chitosan (CHI) have been used. These polyelectrolytes are commercially available and the build-up and physico-chemical film characterization of various polyelectrolyte couples has been investigated deeply (Ladam et al., 2000; Shiratori and Rubner, 2000; Porcel et al., 2007). In addition proteins (growth factors), enzymes, peptides, AND, SiRNA ... can be adsorbed or embedded in the film build-ups (Benkirane-Jessel et al., 2004; Etienne et al., 2004; Dimitrova et al., 2007). Polyelectrolytes behave as strong or weak polyacids or polybases depending upon the functional groups born by the polyionic chains (de Vasconcelos et al., 2005). Two oppositely charged polyelectrolytes interact through electrostatic interactions leading to polyelectrolyte complex formation. Based on such electrostatic interactions polyelectrolyte multilayer films (PEM) can be built through the layer-by-layer technique (Decher et al., 1997, 1992). The stability of the film results from the interaction of the intrinsic fixed charges born by the polyelectrolytes but also to extrinsic charge compensation (presence of ionic salts in solution). The LbL buildup or self assembly is very

simple; it begins on a charged surface (any kind of surface including blood vessels substitutes, native arteries surfaces ...) which is exposed to an oppositely charged polyelectrolyte solution (generally polycations). The electrostatic interaction leads to the uptake of the oppositely charged polyelectrolyte from the solution to the surface to form a very thin layer on the substrate which becomes oppositely charged (Ladam et al....). After a pure buffer rinse an oppositely charged polyelectrolyte is adsorbed leading thus to the deposition of a bilayer. The process is then pursued until the buildup of a film constituted by a defined number of layer pairs. The procedure can also easily be adapted to coat the interior of tubings or even blood vessels. (Figure 2A).

On account of numerous properties which are gathered in Table 3 these architectures constitute a rapidly expanding field with large potential applications possibilities in tissue engineering field.

The present review concerns also largely PSS/PAH multilayered films (Figure 2B) that exhibit excellent properties for vascular tissue engineering. More large applications of LbL films in the biomedical field have been reviewed in several other papers (Fendler et al., 1996; Hammond et al., 2004; Ai et al., 2003; Campas et al., 2003; Tang et al., 2006).

The PAH/PSS film exhibits a linear growth of both mass and film thickness (Figure 2C) with the number of deposited layers (Decher et al., 1992, Caruzo et al., 1997, Ruths et al., 2000, Ladam et al., 2000). The increase in thickness per layer is largely dependent on the ionic strength and the thickest films are got for the highest ionic strength. PSS/PAH films present a stratified structure, each polyelectrolyte layer interpenetrating only the neighbouring ones (Losche et al., 1998). After a deposition of 3 PAH/PSS layer pairs the underneath adsorbent surface appears to be fully coated and the incoming cells for example cannot further interact with the substrate. It was also shown that $(\text{PAH/PSS})_n$ films are brittle and have glassy state (Kulcsar et al., 2005, Mertz et al., 2007). The stiffness of the material favouring largely cell interaction and proliferation (Thompson et al., 2005; Picart 2008).

PEMs: anti-thrombogenic properties.

The exposure of current materials used in vascular therapy (stents and vascular graft substitutes) to flowing blood can rapidly lead to thrombus formation and SMCs proliferation with the major consequence of the therapy failure. To avoid these negative consequence, aggressive anticoagulant treatments were used, which can however give rise to bleeding complications. Various alternatives were employed to confer antithrombotic properties to the

clinical used materials such as heparin (Heyligers et al., 2008; Mureebe et al., 2007; Thierry et al., 2003; Patel et al., 2006). It is commonly believed that electrostatic interactions play a major role in the adsorption process. Platelets, leukocytes together with fibrin, are the major components of the thrombi that occlude arteries. Several studies demonstrated the antithrombogenicity properties of PEMs ended by negatively charged polyelectrolytes and built on different surfaces (Serizawa et al., 2002; Thierry et al., 2003, Hwang et al. 2005, Yu et al., 2006). Tan and Co coated the endovascular materials by polyethylenimine/heparin multilayer films (Tan et al., 2003). The authors showed, *in vitro*, a strong resistance of this architecture for platelet adhesion. The low stability of heparin (Gallus et al., 2002), and cytotoxicity of polyethylenimine (Brunot et al., 2007) limit however their use in real clinical situations. As the arterial wall is composed of negatively charged collagen, PEMs ended by negatively charged polyanions were used to reduce or even inhibit cell adhesion. The initially weak interactions of negatively charged cells with the negatively ended films submitted to the shear stress of the flowing blood probably do not permit strong enough cellular adherence and lead to cell detachment. Thierry et al. demonstrated, *in vitro*, that denuded porcine arteries and stents coated by PEMs made of cationic CHI and anionic HA and ended by HA reduced platelet adhesion (by 38% after one hour exposure to platelet rich plasma) and prevented from blood thrombi formation (Thierry et al., 2003, 2005). Recent works demonstrated however the enzymatic degradation by (hyaluronidase, lysozyme and alpha amylase, which are present in plasma) of these films reducing their long term stability *in vivo* (Etienne et al., 2005; Schneider et al., 2007). The *in vivo* behaviour of natural vascular grafts coated by films made of 3 PAH/PSS layer pairs and thus ended by PSS was recently been checked (Kerdjoudj et al., 2008). The Doppler ultrasound evaluation, performed *in vivo*, showed that all PEM treated grafts remained patent over the full period (12 weeks) of study whereas after only 1 week, no blood circulation was detected in untreated arteries (Figure 3). Histological grafts examination showed pervasive thrombus formation on the luminal surface of untreated arteries after 1 week and clean luminal surface for treated arteries at least up to 12 weeks. These observations demonstrated that PAH/PSS multilayer films deposited in the luminal surface avoids the early thrombus formation. The PAH/PSS surface coating renders the specific interactions of the blood cells with the underneath collagen of the arterial walls impossible.

Adhesion properties of PEMs and their use in vascular tissue engineering.

Cell adhesion and proliferation constitute important parameters in tissue engineering because cell adhesion provides the required links for a cell to interact with a substrate. It is well known that cell attachment/behaviour is generally subsequent to protein adsorption on the culture support. The protein adsorption is driven by the net influence of various interdependent interactions between surface and proteins. Possible protein-surface interactions can be due to van der Waals, dipolar or hydrogen, electrostatic, and hydrophobic interactions. Upon adsorption, the hydrophobic parts of the protein stick to the surface in order to minimize the contact with water. Cells do not interact with the substrate directly but with the substrate *via* the extracellular matrix proteins (ECM) that have adhered directly to the substrate. On the cell surface cell receptors bind to the ECM which affects also promotion of cellular spreading and motility. These receptors are called integrins (Hynes et al., 1992; Bhadriraju et al., 2002; Geiger et al., 2009).

In PEMs, several factors have been found to modulate protein and subsequently cell adhesion. These factors include the multilayer surface charges, film thickness, film stiffness which is related to the water content (Mendelsohn et al., 2003; Thompson et al., 2005; Picart 2008).

However, it is also commonly believed that electrostatic interactions play a major role in the adhesion process. Surfaces bearing opposite charges of the cell membrane lead to the highest cell uptake. However, surfaces that are similarly charged as the cell membrane have not shown a total resistance to the cell adhesion, at least once not submitted to shear stress because cells might adhere to the surface through forces different from electrostatic interactions (Salloum et al., 2005). Numerous investigations concerned the adhesion properties of different kind of cells (Forry et al., 2006; Kidamdi et al., 2004; Tryoen-Toth et al., 2002; Vautier et al., 2002) on different PEMs architectures. Similar investigations demonstrated also the importance of the film stiffness (Schneider et al., 2006) and the surface functionalization on the cellular interactions with the surface (Picart et al., 2005).

A good adhesion and behaviour of mature vascular cells (ECs and SMCs) on PEMs coated glasses was reported (Figure 4) (Boura et al., 2003, Salloum et al., 2005; Thamposon et al., 2005; Richert et al., 2005; Li et al., 2005). Boura et al. evaluated the adhesion of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) on various PEMs combinations (Boura et al., 2003). These authors found that cells spread more on positively charged polycationterminated films than on negatively charged polyanion-terminated films without disturbing the adhesion mechanism (Boura et al., 2005). Among the different PEMs coatings evaluated, the film

ending by PAH for the PSS/PAH films preserved the cell shape, attachment, cytoskeleton arrangement and exhibited an excellent cellular biocompatibility. The same authors demonstrated that the expression of the intracellular cell adhesion molecules-1 (ICAM-1) after chemical stimulation with tumor necrosis factor (TNF)-alpha depend on the film architecture employed. The PSS/PAH films did not disturb the ICAM-1 expression of ECs and might thus enhance the seeding of ECs in vascular engineering (Boura et al., 2006). In order to improve the patency of the current use of vascular substitutes, various strategies of coatings were developed. The improvement of vascular endothelial cells adhesion on synthetic grafts such as: ePTFE (Moby et al., 2007), Dacron® (Liu et al., 2005; Chen et al., 1997) and natural cryopreserved grafts (Kerdjoudj et al., 2007) coated with PEMs were described. The luminal surfaces of the vascular grafts treated grafts showed a formation of an endothelial cell monolayer with great ECs adhesion, spreading and retention once submitted to shear stresses compared to untreated arteries (Figure 5).

Mechanical properties of arteries: compliance restoration by PEMs

The mechanical characteristics of a native vessel are basically provided by the extracellular matrix, mainly composed by collagen (especially collagens type I and III) and elastin, which are produced by the smooth muscle cells in the medial layer of a blood vessel. In native vessels, collagen provides rigidity, while elastin provides elasticity. Collagen in blood vessels is well organized, and with the elastic fibers in the media, it constitutes a circumferential network parallel to the orientation of smooth muscle cells in the intima. Its organization is longitudinal in the adventitia. This natural organization provides muscular tonus and avoids distension of arteries under pressure. Thus, the use of natural arteries as scaffold allowed the preservation of the arterial wall characteristics (Zilla et al., 2001, Pascual et al., 2002, Ketchedjian et al., 2005). Over the last few years, the cryopreserved blood vessels are being increasingly used as scaffold for vascular tissue engineering field. Indeed the cryopreservation techniques have permitted the preparation, storage, and sterilization of human arterial and venous segments from brain-dead donors for future use in live patients without risk of a host immune response or donor-to-recipient infection. Despite numerous efforts that have been realized to improve the vascular allograft cryopreservation, a poor patency is observed due especially to a change of the mechanical properties of the tissue (Blondel et al., 2001 Venkatasubramanian et al., 2006; Masson et al., 2009). In order to prevent abnormal smooth muscle cells proliferation at the anastomotic junction, similar mechanical properties

(compliance) between implanted graft and recipient vessels is important. The cryopreservation procedure led to an alteration of collagen/elastin network (Figure 6A) which modifies the mechanical properties of the arteries. It has recently demonstrated that the after 3.5 pairs of PAH/PSS improve the compliance of cryopreserved arteries (Figure 6B) (Kerdjoudj et al., 2007). Moreover no SMCs proliferation at the anastomotic junction after rabbit carotid bypass was observed (Kerdjoudj et al., 2008). All these results showed the beneficial effect of PEMs on vascular tissue engineering.

Polyelectrolyte multilayer films and stem cells behaviour.

In vitro endothelialisation procedures with mature ECs are labor intensive. They require an invasive procedure (biopsy) and a considerable amount of time and expertise to extract and culture the cells, rendering the process costly and limited to specialized centers. The fully mature ECs can be isolated from patient's tissues but they have a slow expansion rate and limited proliferation capabilities, requiring that a large number of ECs have to be harvested for therapeutic uses. Tissue specific phenotype expression in ECs varies tremendously from one tissue type (veins and arteries) to another, and the differences might interfere with the appropriate function of ECs. Therefore another source of rapidly proliferating and ready-touse ECs with no tissue-specific phenotypic expression could constitute a major priority.

Human stem and progenitor cells have been isolated from a range of sources including bone marrow, muscle, adipose and umbilical cord. Noishiki and colleagues (Noishiki et al., 1996) improved patency of vascular grafts by transplanting bone marrow cells in an ePTFE tube to induce endothelialization of the graft. Although crude bone marrow cells have been shown to contribute to vasculogenesis, they are highly heterogeneous. More recent studies tried to isolate mobilized progenitor cells from whole bone marrow or peripheral blood. The discovery of circulating endothelial progenitor cells (EPCs) opened large hopes in the fields of cellular therapies and regenerative medicine (Asahara et al., 1997, Prater et al., 2007).

EPCs are functionally and phenotypically distinct from mature endothelial cells, but have the potential to differentiate into mature ECs and have been successfully used in the repair of injured vessels, neovascularisation or regeneration of ischemic tissue (Tepper et al., 2005) as well as coating for synthetic vascular grafts (Kaushal et al., 2001; He et al., 2003; Griese et al., 2003; Aper et al., 2007). In 2001 Kaushal et al., used EPCs to seed a decellularized porcine scaffold with promising results. When implanted as a xenogenic interposition graft in a sheep common carotid artery model the engineered vessels had a 100% patency rate during

130 days after implantation whereas unseeded grafts thrombosed (Kaushal et al., 2001). Despite these encouraging observations the time needed for the preparation of the EPCs endothelialized grafts represent a strong limitation. In fact the harvested EPCs need to be differentiated into mature endothelial cells before their seeding into vascular grafts. Various differentiation techniques have been explored to induce ECs differentiation (Yamamoto et al., 2003; Walenta et al., 2005 deMel et al., 2008; Yamahara et al., 2009). The *in vitro* EPCs differentiation is generally obtained *via* stimulation often by the combination of differentiation stimuli, including cytokines, ECM coating and mechanical stimulations. Studies on cell differentiation in contact with PEMs films have only begun to emerge due to the versatile properties of PEMs and in particular, to the possibility to embed in the films growth factors affecting cell fate (Ren et al., 2008; Nadiri et al., 2007, Dierich et al., 2007). Current protocols for isolation and differentiation, on the conventional support such as collagen, fibronectin, laminine, gelatin....(Sreerekha et al., 2006, Griesse et al., 2003, He et al., 2002, 2004, Cho et al., 2003.....) of EPCs from peripheral blood requires at least 1 month to observe an endothelium-like morphology and about 2 months for confluent ECs monolayer. Berthelemy et al., investigated, for the first time, the effect of PSS/PAH films on vascular progenitor cells differentiation. The obtained data demonstrated the speeding up of the differentiation of the circulating progenitor cells cultivated on PEMs treated glasses and with confluent monolayer development after only 14 days of culture. The morphological appearance and mature phenotype markers expression and repartition of the monolayer cells are close to mature ECs (Berthelemy et al., 2008). The same authors demonstrated the possibility to obtain mature SMCs from vascular progenitor cells after decrease of the oxygen content in the incubator and keeping the same ECs differentiation conditions (Berthelemy et al., 2009). Moreover after amplification, the differentiated vascular cells did not reverse and keep their functional phenotype (antithrombogenic for ECs and contractile for SMCs) signature of phenotype stability.

Functionalized PEMs in vascular tissue engineering.

Rapid vessel re-endothelialization constitutes an attractive strategy to inhibit thrombus formation and SMCs proliferation. Both, host endogenous circulating endothelial cells (ECs) and endothelial progenitor cells (EPCs) are actively recruited to the diseased site for reendothelialization (Melo et al., 2004, Kong et al., 2004). Thus, graft engineering through surface coatings loaded with angiogenic growth factors to enhance the process of migration

and proliferation of ECs, in order to induce “spontaneous” endothelialization in vivo, appears to be an attractive concept for clinical use. Modification of vascular scaffolds with bioactive compounds is frequently used to enhance and/or regulate cellular functions (differentiation, adhesion, proliferation...) and metabolism during culture. The advantages of such biofunctionalized surfaces are to promote initial adhesion of seeded cells and to facilitate cell growth/differentiation on the modified surfaces. It has been shown that growth factors, immobilized on a substrate, retain their activity and effect on cell functions (Ito et al., 1998). Vascular growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF), known as important pro-angiogenic molecules were deposited on modified decellularized scaffolds (Conklin et al., 2004, Zhou et al., 2009) or on PTFE (Randone et al., 2005, Walpoth et al., 2007). The results showed significant increased ECs proliferation. However, an undesired higher smooth muscle cells density and neointimal hyperplasia formation were related probably due to poor mechanical properties of the developed grafts. PEMs approach allows also the incorporation of various molecules such as bioactive drugs (Thierry et al., 2005; Berg et al., 2006) specific nucleic acids (Jewell and Lynn, 2008) peptides/proteins and growth factors (Kong et al., 1994; Lvov et al., 1994; Lvov et al., 1995; Caruso et al., 1997; Ladam et al., 2001; Jessel et al., 2003; Nadiri et al., 2007, Huang et al., 2008) which will be chemically bound, adsorbed, or embedded in polyelectrolyte films, providing controlled drug delivery systems, without loss of their biological activities (Chluba et al., 2001; Jessel et al., 2003; Schwinté et al., 2001; Vodouhe et al., 2004). Muller et al., (2007) designed VEGF functionalized PAH/PSS films on porous titanium implants in order to promote neovascularisation around the implant (Müller et al., 2008). These authors showed a rapid adsorption of VEGF on PEMs ending by a polyanion layer which maintain its bioactivity and enhance the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway proliferation of HUVECs. Huang and Yang combined the effect of heparin (prevent blood clotting) and Sirolimus (Known as an inhibitor of SMCs proliferation). For that the authors built on the stents chondroitin 6-sulfate and heparin PEMs loaded with sirolimus. The data showed that five-layer coating, sirolimus can be released continuously for more than 20 days with a suppression of SMCs growth which avoid restenosis (Huang et al. 2008). Other approaches to overcome the intimal hyperplasia problem are the development of biomaterials that mimic the endothelium and therefore continuously release nitric oxide (NO) locally at the vessel’s inner wall/blood interface. Given the role of NO in maintaining a normal vascular environment, several investigators have recently used NO-releasing molecules to modify prosthetic bypass

grafts (Varu et al., 2008; Wu et al., 2007; Miller et al., 2007). Oppositely charged polymers and drugs can be sequentially adsorbed to achieve surface coatings. Thus Thierry et al. (2003) incorporated sodium nitroprusside (SNP), NO-donor, in the membrane coated stent through ionic interaction, between the anionic SNP drug and CHI. The data showed that release of drugs prevents the platelet adhesion and smooth muscle cells proliferation (Thierry et al., 2003). Recently, Yan et al. grafted organoselenium onto cationic PEI and built PEMs with sodium alginate as the counter polyanion and demonstrated an improvement of the thromboresistance of modified polyurethane grafts (Yan et al., 2008).

Cell sheet approach for blood vessels reconstruction.

A new tissue engineering technique involving the buildup of sheets made of cells (cell sheets) was reported to be successful for some tissues such as cartilage, ligament, myocardial tissue, heart... (Zhang et al., 2009; Flores et al., 2008, Sekine et al., 2008; Wu et al., 2008). This technique allows the detachment of cell tissue culture with preservation of cell surface proteins such as ion channels, growth factor receptors and also cell-cell junction protein remain intact. Thus, the cell layer can be noninvasively harvested as intact sheets together with their deposited extracellular matrix.

L'Heureux et al. introduced in 1998 the cell sheet concept in the buildup of a tissue engineering vascular graft using biological materials, essentially using cells to generate the scaffold for the blood vessel constructs (L'Heureux et al., 1998). ECs and SMCs provided by human umbilical cord and human skin fibroblasts were cultured for 5 weeks to form sheets containing superconfluent cells and cell-synthesized extracellular matrix. These cell sheets were sequentially rolled around a mandrel to form the media and adventitial layers. The construct was cultivated, for 8 weeks, in a bioreactor designed to provide perfusion of the culture medium and mechanical support. Following culture, the mandrel was removed, and the lumen was seeded with endothelial cells. The tissue engineered graft had good burst strength (superior to vein characteristics) and demonstrated good handling and suturability characteristics. When implanted *in vivo*, these vascular substitutes had a 50% patency rate one week after implantation due to intramural blood infiltration between the vessels layers (L'Heureux et al., 1998). In the recent paper the same authors developed a Lifeline™ vascular graft constructed with fibroblasts and ECs sheets, and showed 86% patency rate 8 months after implantation in monkey models (L'Heureux et al., 2006). However, this approach is labor intensive and time of culture has a long duration and it exceeds 3 months. The

spontaneous cell sheet detachment requires both a weak adhesion of the cells to the substrate and a strong cell to cell cohesion. On the other hand, the cell-substrate interactions have to be sufficient to support cell growth. However, a strong cell adhesion to support culture coated with PAH/PSS multilayer film was related (Boura et al., 2003, Berthelemy et al., 2008, Richert et al., 2002, Richert et al., 2004).

In order to obtain a vascular construct based on cell sheet technology, several strategies were developed (Chong et al., 2009; Iwasaki et al., 2008; Sakai et al., 2008; Yang et al., 2005). The cell sheet desorption after cell culture on PEMs was induced by temperature change (poly(N-isopropylacrylamide) (Okano et al., 1993, Yang et al., 2005), by enzymatic destruction of the substrate (Nagai et al., 2004, Itabashi et al., 2005), magnetic force-based cell sheet engineering, where the adhesion of cells labelled with magnetite nanoparticles is tuned by magnetic force (Ito et al., 2005), electrochemical polarization by applying a positive potential (Guillaume-Gentil et al., 2008). No satisfactory endothelial cell monolayer harvesting by these technologies was related. In fact, the low cell to cell cohesion in the HUVECs monolayer endothelial involves individual cell or small groups detachment.

Future perspectives

Recently research on vascular tissue engineering has been accelerated to develop further therapies for replacement of diseased blood vessels. It has been reported that in the reconstruction of cell-dense tissues such as blood vessels and heart, the use of biodegradable scaffolds (Niklason et al., 1999, Tranquillo et al., 2002; Hoerstrup et al., 2001; . Kim et al., 2006; Chaouat et al., 2006; Roh et al., 2007). In spite of the encouraging results, insufficient cell migration into scaffolds and inflammatory reaction due to scaffold biodegradation remain problems to be solved. Moreover, almost of the obtained tissues possess inner necrotic areas resulting from a lack of nutritive support due to diffusion limits (Sakai et al., 2001; Shimizu 2006; Leor et al., 2000; Zimmermann et al., 2002). With the use desorption surface technologies, confluent cultured cells can be detached and stratified to create cell-dense tissue architectures (Yang et al., 2005; Shimizu et al., 2003). On the other hand recent studies demonstrated that PEMs accelerated the differentiation of vascular progenitor cells harvested from peripheral blood and cultivated on PEMs into mature and functional smooth muscle cells and endothelial cells (Berthelemy et al., 2008; 2009). Combining both of these approaches (substrate desorption and differentiation on PEMs) could constitute a basis for vascular tissue engineering and clinical application strategies for *in vitro* arteries reconstruction. Then

starting from an unique peripheral blood sample cultivated on PEM and with the same culture media either mature ECs sheet or contractile SMCs sheet can be obtained in less than one month (Figure 8).

References:

- [1] J. Mackay and G. Mensah. Geneva: World Health Organization; 2004: pp. 112.
- [2] G. Arnulf. *Chirurgie* 1987, 113, 751-752.
- [3] F. D. Loop, B. W. Lytle, D. M. Cosgrove, R. W. Stewart, M. Goormastic, G. W. Williams, L. A. Golding, C. C. Gill, P. C. Taylor and W. C. Sheldon. *N. Engl. J. Med.* 1986, 314, 1-6.
- [4] K. E. Brown, K. Heyer, H. Rodriguez, M. K. Eskandari, W. H. Pearce and M. D. Morasch. *J Vasc Surg.* 2009, 49, 660-666.
- [5] O. E. Teebken, A. Bader, G. Steinhoff and A. Haverich. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000, 19, 381-386.
- [6] J. S. Giglia, J. D. Ollerenshaw, P. E. Dawson, K. S. Black and W. M. Abbott. *Ann Vasc Surg* 2002, 16, 762-767.
- [7] L. H. Jr. Harrison. *Ann. Surg.* 1976, 183, 101-106.
- [8] J. L. Ochsner, J. D. Lawson, S. J. Eskin, N. L. Mills and P. T. DeCamp. *J. Vasc. Surg.* 1984, 1, 306-313.
- [8] J. Gelbfish, I. J. Jacobowitz, D. M. Rose, M. W. Connolly, A. J. Acinapura, Z. Zisbrod, K. H. Lim, P. Cappabianca and J. N. Jr. Cunningham. *Ann. Thorac. Surg.* 1986, 42, 70-73.
- [10] M. Gabriel, K. Wachal, L. Dzieciuchowicz, K. Pawlaczyk, Z. Krasinski and G. Oszkinis. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*
- [11] B. Jr. Voorhees, A 3rd Jaretzki and A. H. Blakemore. *Ann. Surg.* 1952, 135, 332-336.
- [12] N. R. Tai, H. Salacinski, A. Edwards, G. Hamilton and A. M. Seifalian. *Br J Surg* 2000, 87, 1480-148.
- [13] K. Berger, L. Sauvage, A. Rao and S. Wood. *Ann Surg* 1972, 175, 118-127.
- [14] P. Zilla, D. Bezuidenhout and P. Human. *Biomaterials.* 2007, 28, 5009-5027.
- [15] M. Herring, A. Gardner and J. Glover. *Surgery* 1987, 84, 498-504.
- 20
- [16] J. E. Rosenman, R. F. Kempczinski, W. H. Pearce and E. B. Silberstein. *J. Vasc. Surg.* 1985, 2, 778-784.
- [17] K. J. Pawlowski, S. E. Rittgers, S. P. Schmidt and G. L. Bowlin. *Front Biosci.* 2004, 1, 1412-1421.
- [18] H. Kerdjoudj, V. Moby, N. Berthelemy, M. Gentils, C. Boura, L. Bordenave, J. F. Stoltz and P. Menu. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2007, 37, 89-98.
- [19] M. Deutsch, J. Meinhart, P. Zilla, N. Howanietz, M. Gorlitzer, A. Froeschl, A. Stuempflen, D. Bezuidenhout and M. Grabenwoeger. *J. Vasc. Surg.* 2009, 49, 352-362.
- [20] P. Lamm, G. Juchem, S. Milz, M. Schuffenhauer and B. Reichart. *Circulation* 2001, 104, I108-I114.
- [21] H. R. Laube, J. Duwe, W. Rutsch and W. Konertz. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2000, 120, 134-141.
- [22] M. Deutsch, J. Meinhart, T. Fischlein, P. Preiss and P. Zilla. *Surgery* 1999, 126, 847-855.
- [23] G. Leseche, J. Ohan, S. Bouttier, T. Palombi, P. Bertrand and B. Andreassian. *Ann. Vasc. Surg.* 1995, 19, S15-S23.
- [24] P. Zilla, R. Fasol, M. Deutsch, T. Fischlein, E. Minar, A. Hammerle, O. Krupicka and M. Kadletz. *J. Vasc. Surg.* 1987, 6, 535-541.
- [25] N. L'Heureux, N. Dusserre, A. Marini, S. Garrido, L. de la Fuente and T. McAllister. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2007, 4, 389-395.
- [26] J. P. Stegeman, S. N. Kaszuba and S. L. Rowe. *Tissue Eng.* 2007, 13, 2601-2613.
- [27] N. C. Rivron, J. J. Liu, J. Rouwkema, J. de Boer and C. A. van Blitterswijk. *Eur. Cell. Mater.* 2008, 21, 27-40.
- [28] F. M. Shaikh, A. Callanan, E. G. Kavanagh, P. E. Burke, P. A. Grace and T. M. McGloughlin. *Cells Tissues Organs.* 2008, 188, 333-346.

- [29] V. Mironov, V. Kasyanov and R. R. Markwald. *Trends Biotechnol.* 2008, 26, 338-344.
- [30] L. Bordenave, P. Menu and C. Baquey. *Expert Rev Med Devices.* 2008, 5, 337-347.
- [31] G. Ladam, P. Schaad, J. C. Voegel, P. Schaaf, G. Decher and F. Cuisinier. *Langmuir* 2000, 16, 1249-1255.
- [32] S. S. Shiratori and M. F. Rubner. *Macromolecules* 2000, 33, 4213-4219.
- [33] C. Porcel, P. Lavalley, G. Decher, B. Senger, J. C. Voegel and P. Schaaf. *Langmuir.* 2007, 23, 1894-1804.
- [34] N. Benkirane-Jessel, P. Schwinté, P. Falvey, R. Darcy, Y. Haikel, P. Schaaf, J. C. Voegel and J. Ogier. *Adv. Funct. Mat.* 2004, 14, 174-182.
- [35] O. Etienne, A. Schneider, C. Taddei, L. Richert, P. Schaaf, J. C. Voegel, C. Egles and C. Picart. *Biomacromolecules.* 2005, 6, 726-733.
- [36] M. Dimitrova, Y. Arntz, P. Lavalley, F. Meyer, H. Wolf, C. Schuster, Y. Haikel, J. C. Voegel and J. Ogier. *Adv. Funct. Mater.* 2007, 17, 232-245.
- [37] C. L. de Vasconcelos, M. R. Pereira and J. L. C. Fonseca. *Journal of Dispersion Science and Technology* 2005, 26, 59-70.
- [38] G. Decher, J. D. Hong and J. Schmitt. *Thin Solid Films* 1992, 210/211, 831-835.
- [39] G. Decher. *Science* 1997, 227, 1232-1237.
- [40] J. H. Fendler. *Chem. Mater.* 1996, 8, 1616-1624.
- [41] P. T. Hammond. *Adv. Mater.* 2004, 16, 1271-1293.
- [42] H. Ai, S. A. Jones and Y. M. Lvov. *Cell Biochem Biophys.* 2003, 39, 23-43.
- [43] M. Campas and C. O'Sullivan. *Anal. Lett.* 2003, 36, 2551.
- [44] Z. Tang, Y. Wang, P. Podsiadlo and N. A. Kotov. *Adv. Mater.* 2006, 18, 3203-3224.
- [45] F. Caruso, K. Niikura, D. N. Furlong and Y. Okahata. *Langmuir*, 1997, 13, 3422-3426.
- [46] J. Ruths, F. Essler, G. Decher and H. Riegler. *Langmuir* 2000, 16, 8871-8878.
- [47] M. Losche, J. Schmitt, G. Decher, W. G. Bouwman and K. Kjaer. *Macromolecules*, 1998, 31, 8893-8906.
- [48] A. Kulcsar, J. C. Voegel, P. Schaaf and P. Kekicheff. *Langmuir*, 2005, 21, 1166-1170.
- [49] D. Mertz, J. Hemmerlé, F. Boulmedais, J. C. Voegel, P. Lavalley and P. Schaaf. *Soft Matter*, 2007, 3, 1-9.
- [50] M. T. Thompson, M. C. Berg, I. S. Tobias, M. F. Rubner and K. J. Van Vliet. *Biomaterials.* 2005, 26, 6836-6845.
- [51] C. Picart. *Current medicinal Chemistry.* 2008, 15; 685-697.
- [52] J. M. Heyligers, T. Lisman, J. H. Verhagen, C. Weeterings, P. G. de Groot and F. L. Moll. *J. Vasc. Surg.* 2008, 47, 324-329.
- [53] L. Mureebe, J. A. Graham, R. L. Bush and D. Silver. *Ann. Vasc. Surg.* 2007, 21, 719-722.
- [54] B. Thierry and M. Tabrizian. *J. Endovasc. Thor.* 2003, 10, 807-824.
- [55] H. J. Patel, S. H. Su, C. Patterson and K. T. Nguyen. *Biotechnol. Prog.* 2006, 22, 38-44.
- [56] T. Serizawa, M. Yamaguchi and M. Akashi. *Biomacromolecules.* 2002, 3, 724-731.
- [57] B. Thierry, F. M. Winnik, Y. Merhi and M. Tabrizian. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 7494-7495.
- [58] J. J. Hwang, S. Jelacic, N. T. Samuel, R. V. Maier, C. T. Campbell, D. G. Castner, A. S. Hoffman and [59] P. S. Stayton. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2005, 16, 237-251.
- [60] D. G. Yu, W. C. Lin, C. H., Lin and M. C. Yang. *Macromol. Biosci.* 2006, 23, 348-357.
- [61] Q. Tan, J. Ji, M. A. Barbosa, C. Fonsec and J. Shen. *Biomaterials*, 2003, 24, 4699-4705.
- [62] A. S. Gallus and D. W. Coghlan. *Curr. Opin. Hematol.* 2002, 9, 422-429.
- [63] C. Brunot, L. Ponsonnet, C. Lagneau, P. Farge, C. Picart and B. Grosgeat. *Biomaterials* 2007, 28, 632-640.
- [64] B. Thierry, Y. Merhi, J. Silver and M. Tabrizian. *J Biomed Mater Res* 2005; 75, 556 – 566.

- [65] A. Schneider, L. Richert, G. Francius, J. C. Voegel and C. Picart. *Biomed Mater.* 2007, 2, S45-51.
- [66] H. Kerdjoudj, N. Berthelemy, S. Rinckenbach, A. Kearney-Schwartz, K. Montagne, P. Schaaf, P. Lacolley, J. F. Stoltz, J. C. Voegel and P. Menu. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008, 52, 1589-1597.
- [67] R. O. Hynes. *Cell* 1992, 69, 11-25.
- [68] K. Bhadriraju and K. L. Hansen. *Exp. Cell Res.* 2002, 278, 92-100.
- [69] B. Geiger, J. P. Spatz and A. D. Bershadsky. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2009, 10, 21-33.
- [70] J. D. Mendelsohn, S. Y. Yang, J. Ann Hiller, A. I. Hochbaum and M. F. Rubner. *Biomacromolecules*, 2003, 4, 96-106.
- [71] D. S. Salloum, S. G. Olenych, T. C. Keller and J. B. Schlenoff. *Biomacromolecules*. 2005, 6, 161-167.
- [72] S. P. Forry, D. R. Reyes, M. Gaitan and L. E. Locascio. *Langmuir* 2006, 22, 5770-5775.
- [73] S. Kidambi, I. Lee and C. Chan. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 16286-16287.
- [74] P. Tryoen-Toth, D. Vautier, Y. Haikel, J. C. Voegel, P. Schaff, J. Chluba and J. Ogier. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 60, 657-667.
- [75] D. Vautier, V. Karsten, C. Egles, J. Chluba, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. Ogier. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2002, 13, 713-732.
- [76] A. Schneider, G. Francius, R. Obeid, P. Schwinté, J. Hemmerlé, B. Frisch, P. Schaaf, J. C. Voegel and B. Senger. *Langmuir* 2006, 22, 1193-2000.
- [77] C. Picart, R. Elkaim, L. Richert, T. Audouin, Y. Arntz, M. D. Cardoso, P. Schaaf, J. C. Voegel and B. Frisch. *Adv. Funct. Mat.* 2005, 15, 83-94.
- [78] C. Boura, P. Menu, E. Payan, C. Picart, J. C. Voegel, S. Muller and J. F. Stoltz. *Biomaterials* 2003, 24, 3521-3523.
- [79] L. Richert, A. J. Engler, E. Dennis, E. Discher, and C. Picart. *Biomacromolecules* 2004, 5, 1908-1916.
- [80] M. Li, D. K. Mills, T. Cui and M. J. Mcshane. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2005, 4, 170-179.
- [81] C. Boura, S. Muller, D. Vautier, D. Dumas, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. F. Stoltz and P. Menu. *Biomaterials*, 2005, 26, 4568-4575.
- [82] C. Boura, S. Muller, J. C. Voegel, P. Schaaf, J. F. Stoltz and P. Menu. *Cell Biochem Biophys.* 2006, 44, 223-31.
- [83] V. Moby, C. Boura, H. Kerdjoudj, J. C. Voegel, L. Marchal, D. Dumas, P. Schaaf, J. F. Stoltz and P. Menu. *Biomacromolecules* 2007, 8, 2156-60.
- [84] Y. Liu, T. He and C. Gao. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005, 46, 117-126.
- [85] W. Chen and T. J. McCarthy. *Macromolecules*, 1997, 30, 78-86.
- [86] H. Kerdjoudj, C. Boura, V. Moby, K. Montagne, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. F. Stoltz and P. Menu. *Adv. Funct. Mater.* 2007, 17, 2667-2673.
- [87] G. Pascual, F. Jurado, M. Rodríguez, C. Corrales, P. López-Hervás, J. M. Bellón and J. Buján. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002, 24, 23-30.
- [88] A. Ketchedjian, A. L. Jones, P. Krueger, E. Robinson, K. Crouch, L. Jr. Wolfenbarger and R. Hopkins. *Ann. Thorac. Surg.* 2005, 79, 888-896.
- [89] W. C. Blondel, J. Didelon, G. Maurice, J. P. Carteaux, X. Wang and J. F. Stoltz. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2001, 48, 442-451.
- [90] R. T. Venkatasubramanian, E. D. Grassl, V. H. Barocas, D. Lafontaine and J. C. Bischof. *Ann Biomed Eng.* 2006, 34, 823-832.
- [91] I Masson, A. Fialaire-Legendre, C. Godin, P. Boutouyrie, P. Bierling, M. Zidi. *Med. Eng. Phys.* 2009, Online
- [92] Y. Noishiki, Y. Tomizawa, Y. Yamane and A. Matsumoto. *Nat Med* 1996, 2, 90-103.

- [93] T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Wittenbichler, G. Schatteman and J. M. Isner. *Science* 1997, 275, 964-967.
- [94] D. N. Prater, J. Case, D. A. Ingram, and M. C. Yoder. *Leukemia* 2007, 21, 1141.
- [95] O. M. Tepper, J. M. Capla, R. D. Galiano, D. J. Ceradini, M. J. Callaghan, M. E. Kleinman and G. C. Gurtner. *Blood* 2005, 105, 1068-1077.
- [96] S. Kaushal, G. E. Amiel, K. J. Guleserian, O. M. Shapira, T. Perry, F. W. Sutherland, E. Rabkin, A. M. Moran, F. J. Schoen, A. Atala, S. Soker, J. Bischoff and J. E. Jr. Mayer. *Nat. Med.* 2001, 7, 1035- 1040.
- [97] H. He, T. Shirota, H. Yasui and T. Matsuda. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 126 (2003), 455-464.
- [98] D. P. Griesse, A. Ehsan, L. G. Melo, D. Kong, L. Zhang, M. J. Mann, R. E. Pratt, R. C. Mulligan and V. J. Dzau. *Circulation* 2003, 108, 2710-2715.
- [99] T. Aper, A. Schmidt, M. Duchrow and H. P. Bruch. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 33 (2007), 33-39.
- [100] K. Yamamoto, T. Takahashi, T. Asahara, N. Ohura, T. Sokabe, A. Kamiya and J. Ando. *J. Appl. Physiol.* 2003, 95, 2081-2088.
- [101] K. Walenta, E. B. Friedrich, F. Sehnert, N. Werner and G. Nickenig. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 333, 476-82,
- [102] A. de Mel, G. Jell, M. M. Stevens and A. M. Seifalian. *Biomacromolecules* 2008, 9, 2969-2979.
- [103] K. Yamahara and H. Itoh. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2009, 3, 17-27.
- [104] K. Ren, T. Crouzier, C. Roy, and C. Picart. *Adv Funct Mater.* 2008, 18, 1378-1389.
- [105] A. Nadiri, S. Kuchler-Bopp, H. Mjahed, B. Hu, Y. Haikel, P. Schaaf, J. C. Voegel and N. Benkirane-Jessel. *Small.* 2007, 3, 1577-1583.
- [106] A. Dierich, E. Le Guen, N. Messaddeq, J. F. Stoltz, P. Netter, P. Schaaf, J. C. Voegel and N. Benkirane-Jessel. *Adv Mater.* 2007, 19, 693-697.
- [107] P. R. Sreerekha, P. Divya and L. K. Krishnan. *Cell Prolif.* 2006, 39, 301-312.
- [108] H. J. Cho, H. S. Kim, M. M. Lee, D. H. Kim, H. J. Yang, J. Hur, K. K. Hwang, S. Oh, Y. J. Choi, I. H. Chae, B. H. Oh, Y. S. Choi, K. Walsh and Y. B. Park. *Circulation* 2003, 108, 2918-2925.
- [109] N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, C. Gaucher, P. Schaaf, J. F. Stoltz, P. Lacolley, J. C. Voegel and P. Menu. *Adv. Mater.* 2008, 20, 2674–2678.
- [110] N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, P. Schaaf, C. Prin-Mathieu, P. Lacolley, J. F. Stoltz, J. C. Voegel and P. Menu. *PLoS ONE.* 2009, 4, 1-9.
- [111] L. G. Melo, M. Gneccchi, A. S. Pachori, D. Kong, K. Wang, X. Liu, R. E. Pratt and V. Dzau. *J. Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 2004, 24, 1761-1774.
- [112] D. Kong, L. G. Melo, A. A. Mangi, L. Zhang, M. Lopez-Illasaca, M. A. Perrella, C. C. Liew, R. E. Pratt and V. Dzau. *Circulation* 2004, 109, 1769-1775.
- [113] Y. Ito. *Mater. Sci. Eng. C* 1998, 6, 267–274
- [114] B. S. Conklin, H. Wu, P. H. Lin, A. B. Lumsden and C. Chen. *Artif Organs* 2004, 28, 668–675.
- [115] M. Zhou, Z. Liu, Z. Wei, C. Liu, T. Qiao, F. Ran, Y. Bai, X. Jiang and Y. Ding. *Artif Organs.* 2009, 33, 230-239.
- [116] B. Randone, G. Cavallaro, A. Polistena, A. Cucina, P. Coluccia, P. Graziano, A. Cavallaro. *J Surg Res* 2005, 127, 70–79.
- [117] B. H. Walpoth, P. Zammaretti, M. Cikirikcioglu, E. Khabiri, M. K. Djebaili, J. C. Pache, J. C. Tille, Y. Aggoun, D. Morel, A. Kalangos, J. A. Hubbell and A. H. Zisch. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2007, 133, 1163–1170.
- [118] B. Thierry, P. Kujawa, C. Tkaczyk, F. M. Winnik, L. Bilodeau and M. Tabrizian. *J.*

- Am. Chem. Soc. 2005, 127, 1626-1627.
- [119] M C. Berg, L. Zhai, R. E. Cohen, and F. M. Rubner. *Biomacromolecules*, 2006, 7, 357-364.
- [120] C. M. Jewell and D. M. Lynn. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2008, 60, 979-999.
- [121] W. Kong, L. P. Wang, M. L. Gao, H. Zhou, X. Zhang, W. Li and J. C. Shen. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994, 11, 1297-1298,
- [122] Y. Lvov, H. Haas, G. Decher, H. Mohwald, A. Mikhailov, B. Mtchedlishvily, E. Morgunova and B. Vainstein. *Langmuir* 1994, 10, 4232-4236.
- [123] Y. Lvov, K. Ariga, I. Ichinose and T. Kunitake. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 6117-6123.
- [124] F. Caruso, K. Niikura, D. N. Furlong and Y. Okahata. *Langmuir* 1997, 13, 3427-3433,
- [125] G. Ladam, P. Schaaf, F. J. G. Cuisinier, G. and J. C. Voegel. *Langmuir* 2001, 17, 878-882.
- [126] N. Jessel, F. Atalar, P. Lavalley, J. Mutterer, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel and J. Ogier. *Adv. Mater.* 2003, 15, 692-695.
- [127] L. Y. Huang and M. C. Yang. *Colloids and surface B: Biointerfaces* 2008, 61, 43-52.
- [128] J. Chluba, J. C. Voegel, G. Decher, P. Erbacher, P. Schaaf and J. Ogier. *Biomacromolecules*, 2001, 2, 800-805.
- [129] P. Schwinté, J. C. Voegel, C. Picart, Y. Haikel, P. Schaaf and B. Szalontai. *J. Phys. Chem. B* 2001, 105, 11906-11916,
- [130] C. Vodouhe, M. Schmittbuhl, F. Boulmedais, D. Bagnard, D. Vautier, P. Schaaf, C. Egles, J. C. Voegel and J. Ogier. *Biomaterials* 2006, 26, 545-554.
- [131] S. Müller, G. Koenig, A. Charpiot, C. Debry, J. C. Voegel, P. Lavalley and D. Vautier. *Adv. Funct. Mater.* 2008, 18, 1767-1775.
- [132] V. N. Varu, N. D. Tsihlis and M. R. Kibbe. *Vasc. Endovascular. Surg.* 2009, 43, 121-131.
- [133] B. Wu, B. Gerlitz, B. W. Grinnell and M. E. Meyerhoff. *Biomaterials*. 2007, 28, 4047-55.
- [134] M. R. Miller and I. L. Megson. *Br. J. Pharmacol.* 2007, 151, 305-321.
- [135] J. Yang, J. L. Welby and M. E. Meyerhoff. *Langmuir* 2008, 24, 10265-10272.
- [136] J. Zhang, L. Liu, Z. Gao, L. Li, X. Feng, W. Wu, Q. Ma, X. Cheng, F. Chen and T. Mao. *J. Oral Maxillofac Surg.* 2009, 67, 257-264.
- [137] M. G. Flores, M. Hasegawa, M. Yamato, R. Takagi, T. Okano and I. Ishikawa. *J. Periodontal. Res.* 2008, 43, 364-371.
- [138] H. Sekine, T. Shimizu, K. Hobo, S. Sekiya, J. Yang, M. Yamato, H. Kurosawa, E. Kobayashi and T. Okano. *Circulation* 2008, 30, S145- S152.
- [139] K. H. Wu, X. M. Mo and Y. L. Liu. *Med. Hypotheses*. 2008, 71, 700-702.
- [140] N. L'Heureux, S. Pâquet, R. Labbé, L. Germain and F. A. Auger. *FASEB J.* 1998, 12, 47-56.
- [141] N. L'Heureux, N. Dusserre, G. Konig, B. Victor, P. Keire, T. N. Wight, N. A. Chronos, A. E. Kyles, C. R. Gregory, G. Hoyt, R. C. Robbins and T. N. McAllister. *Nat Med.* 2006, 12, 361-365.
- [142] L Richert, P. Lavalley, D. Vautier, B. Senger, J. F. Stoltz, P. Schaaf, J. C. Voegel and C. Picart. *Biomacromolecules* 2002, 3, 1170-1178.
- [143] L. Richert, Y. Arntz, P. Schaaf, J. C. Voegel and C. Picart. *Surf. Sci.* 2004, 570, 13-29.
- [144] M. S. Chong, J. Chan, M. Choolani, C. N. Lee and S. H. Teoh. *Biomaterials* 2009, 30, 2241-2251.
- [145] K. Iwasaki, K. Kojima, S. Kodama, A. C. Paz, M. Chambers, M. Umezu and C. A. Vacanti. *Circulation* 2008, 30, S52- S57.
- [146] S. Sakai, Y. Ogushi and K. Kawakami. *Acta Biomater.* 2009, 5, 554-559.

- [147] J. Yang, M. Yamato, C. Kohno, A. Nishimoto, H. Sekine, F. Fukai and T. Okano. *Biomaterial*, 2005, 26, 6415-6422.
- [148] T. Okano, K. Suzuki, N. Yui, Y. Sakurai and S. Nakahama. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993, 27, 1519-1525.
- [149] N. Nagai, S. Yunoki, Y. Satoh, K. Tajima and M. Munekata. *J. Biosci. Bioeng.* 2004, 98, 493-496.
- [150] Y. Itabashi, S. Miyoshi, H. Kawaguchi, S. Yuasa, K. Tanimoto, A. Furuta, T. Shimizu, T. Okano, K. Fukuda and S. Ogawa, *Artif. Org.* 2005, 29, 95-103.
- [151] A. Ito, T. Ino, H. Kobayashi and H. Honda. *Biomaterials* 2005, 26, 6185-6193.
- [152] O. Guillaume-Gentil, Y. Akiyama, M. Schuler, C. Tang, M. Textor, M. Yamato, T. Okano and J. Vörös. *Adv. Mater.* 2008, 20, 560-565.
- [153] L. E. Niklason, J. Gao, W. M. Abbott, K. K. Hirschi, S. Houser, R. Marini and R. Langer. *Science* 1999, 284, 489-493.
- [154] S. P. Hoerstrup, G. Zund, R. Sodian, A. M. Schnell, J. Grunenfelder and M. I. Turina. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2001, 20, 164-169.
- [155] S. H. Kim, J. H. Kwon, M. S. Chung, E. Chung, Y. Jung, S. H. Kim and Y. H. Kim. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2006, 17, 1359-1374.
- [156] J. D. Roh, M. P. Brennan, R. I. Lopez-Soler, P. M. Fong, A. Goyal, A. Dardik and C. K. Breuer. *J. Pediatr. Surg.* 2007, 42, 198-202.
- [157] R. T. Tranquillo. *Ann N Y Acad Sci.* 2002, 961, 251-254.
- [158] M. Chaouat, C. Le Visage, A. Autissier, F. Chaubet and D. Letourneur. *Biomaterials* 2006, 27, 5546-5553.
- [159] T. Shimizu, H. Sekine, J. Yang, Y. Isoi, M. Yamato, A. Kikuchi, E. Kobayashi and T. Okano. *FASEB J.* 2006, 20, 708-710.
- [160] T. Sakai, R. K. Li, R. D. Weisel, D. A. Mickle, E. T. Kim, Z. Q. Jia, and T. M. Yau. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2001, 121, 932-942.
- [161] J. Leor, S. Aboulafia-Etzion, A. Dar, L. Shapiro, I. M. Barbash, A. Battler, Y. Granot, and S. Cohen. *Circulation* 2000, 102, III56-III61.
- [162] W. H. Zimmermann, M. Didie, G. H. Wasmeier, U. Nixdorff, A. Hess, I. Melnychenko, O. Boy, W. L. Neuhuber, M. Weyand, and T. Eschenhagen. *Circulation*, 2002, 106, I151-I157.
- [163] T. Shimizu, H. Sekine, J. Yang, Y. Isoi, M. Yamato, A. Kikuchi, E. Kobayashi and T. Okano. *FASEB J.* 2006, 20, 708-710.

Figure legends

Figure 1: Arteries structure (A) and endothelium function (B).

The endothelial cell monolayer constitutes a barrier between the blood and the arterial wall which maintain blood fluidity and vascular wall homeostasis.

Figure 2: Layer by layer technology.

A: principle of polyelectrolyte deposition on the luminal surface of the vascular blood substitute. B: Chemical formula of the polyallylamine hydrochloride used as polycation and polystyrene sulfonate used as polyanion. C: Thickness measured by Optical Waveguide Lightmode Microscopy (OWLS) of PEI-(PSS/PAH)₆ as a function of deposited layer.

Figure 3: Patency of PEM treated arteries.

Ultrasound and histological results of untreated and PEM treated arteries bypassed carotid arteries after 12 weeks of implantation. The results showed an increase of arteries patency after PEM luminal treatment. Yellow arrow indicates blood flow in PEM treated arteries

Figure 4: Vascular cells characterization.

Images were obtained by inversed optique and confocal microscopy observation at cell confluence on PEM coated surfaces. The mature endothelial cell were characterized by the expression of specific markers: CD31, von Willebrand Factor (vWF) and the mature smooth muscle cells by the expression of contractile markers: α - Smooth Muscle Actin (α -SMA), Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SMMHC). The vascular cell adhesion was characterized by cytoskeleton arrangement

Figure 5: Endothelial cells adhesion and retention on the luminal surface of the PEM treated arteries.

Flow circuit system (A), Endothelial cell retention (B). Images were obtained by confocal microscopy observation of CD31 labelled endothelial cells seeded of the luminal surfaces of untreated and PEM treated arteries before and after shear stress. The results showed the maintien of endothelial cell monolayer of the luminal surface of PEM treated arteries shear stressed at 1 Pa.

Figure 6: Histological examination of the arterial wall.

5 μ m transversal sections of fresh, cryopreserved and PEM treated arteries were performed. The general aspect of the arteries was investigated after hematoxylin-eosin-safran staining, elastin by Weighert staining and collagen IV was visualized by immunohistochemistry. Black arrow indicates the destruction of the endothelium after cryopreservation. The results showed a strong destruction of elastin after cryopreservation.

Figure 7: Mechanical properties of the arteries. The compliance of the arteries was lost after cryopreservation. The PEM treated arteries seems to restore this compliance. The obtained values were close to the fresh arteries.

Figure 8: Vascular tissue engineering: Cell sheet approach.

Figure 1A:

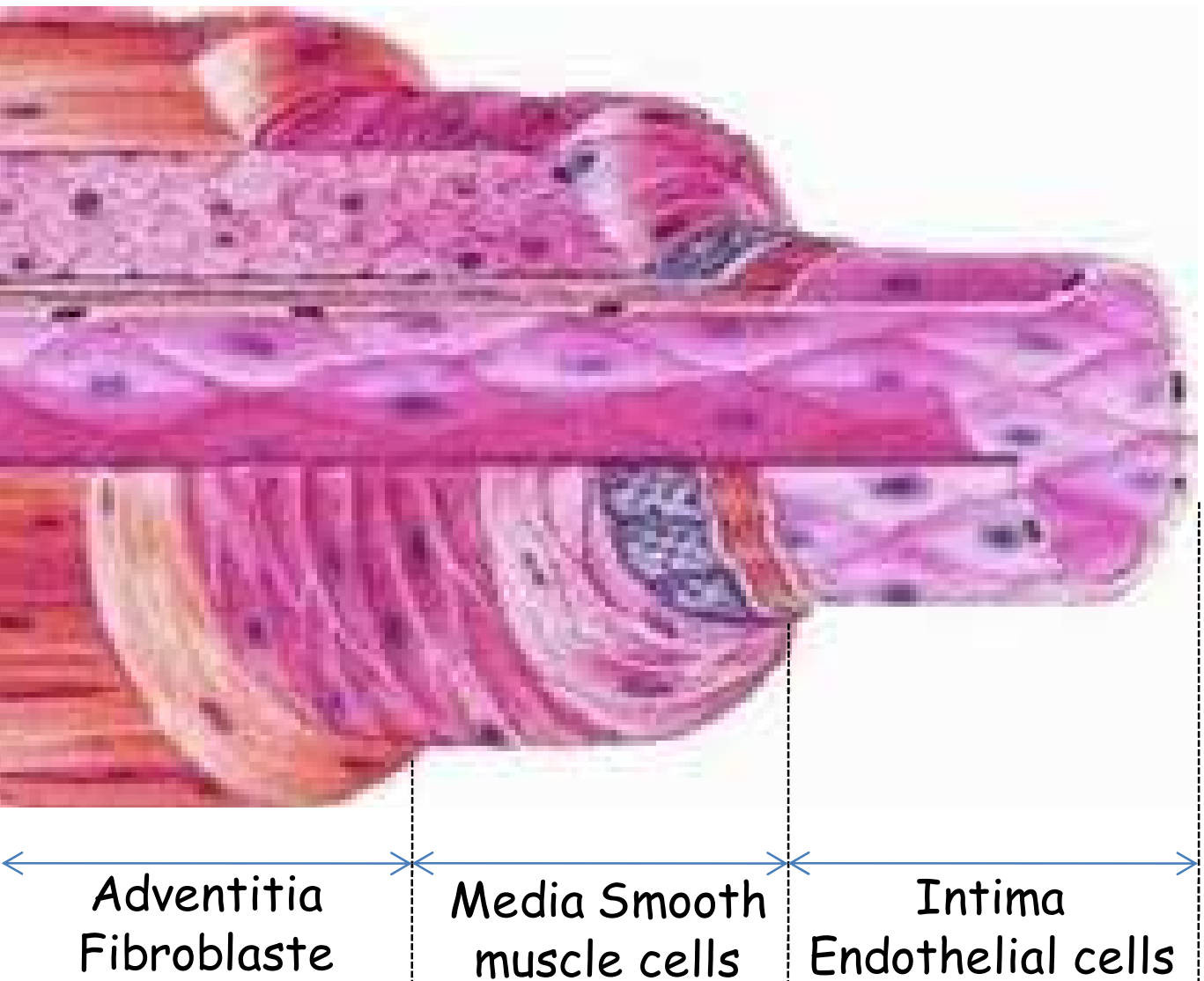


Figure 1B

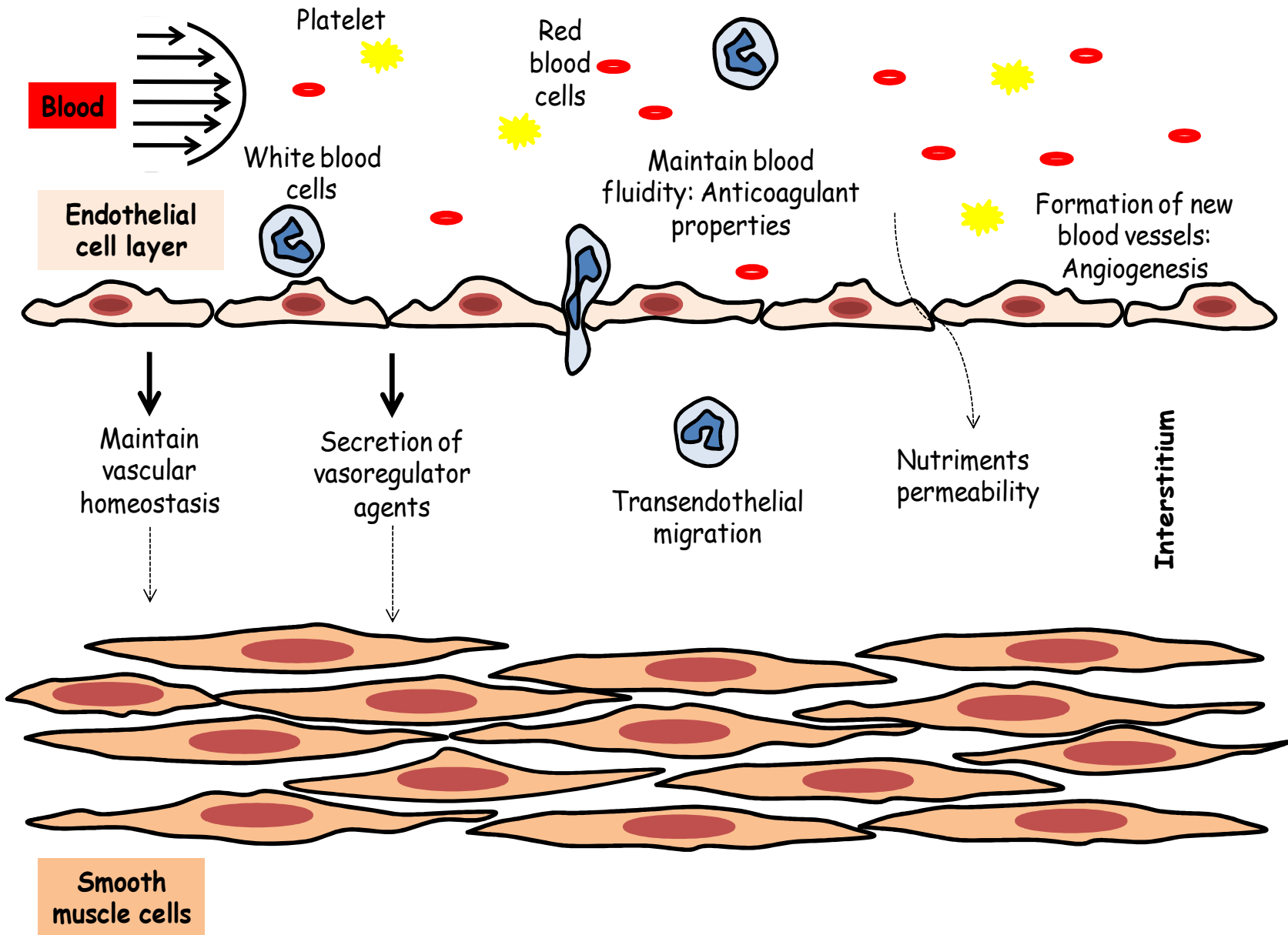


Figure 2A

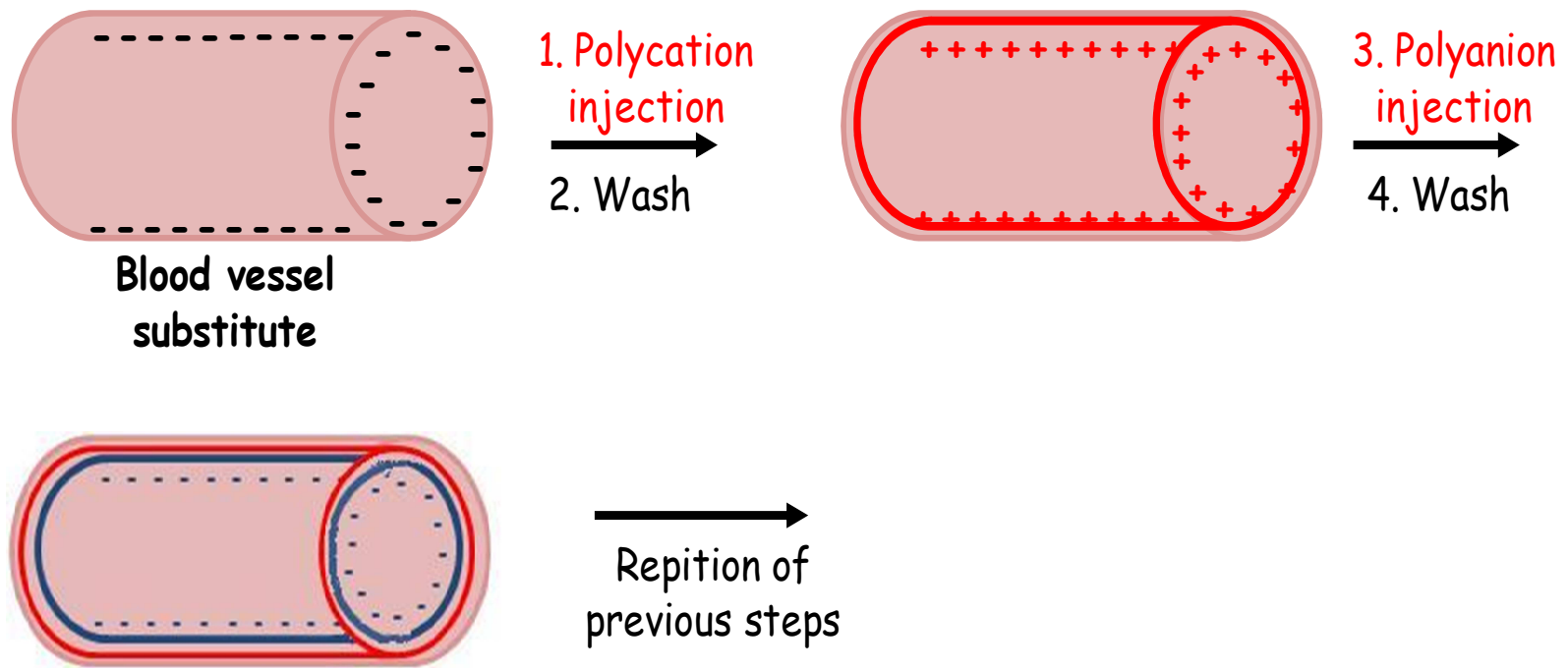
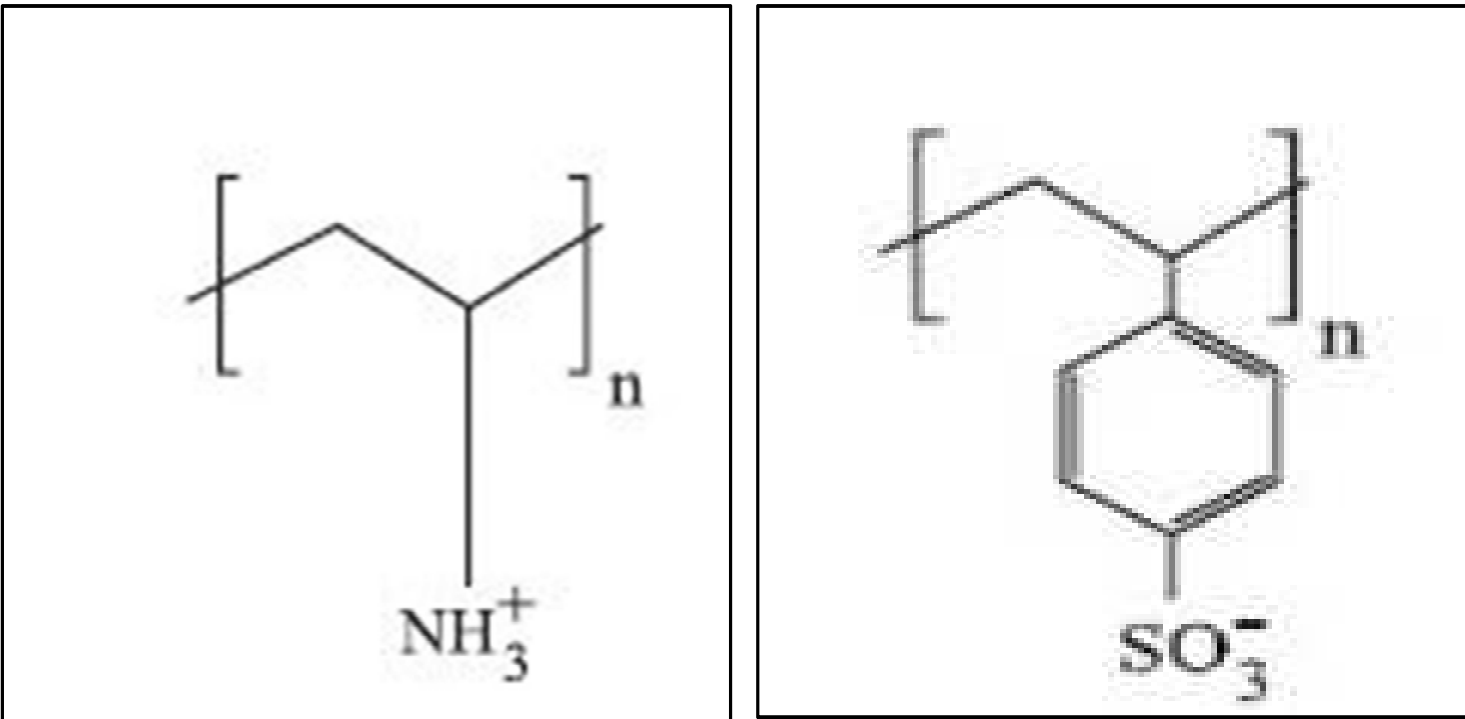


Figure 2B



Polyallylamine
hydrochloride

Polystyrene
sulfonate

Figure 2C:

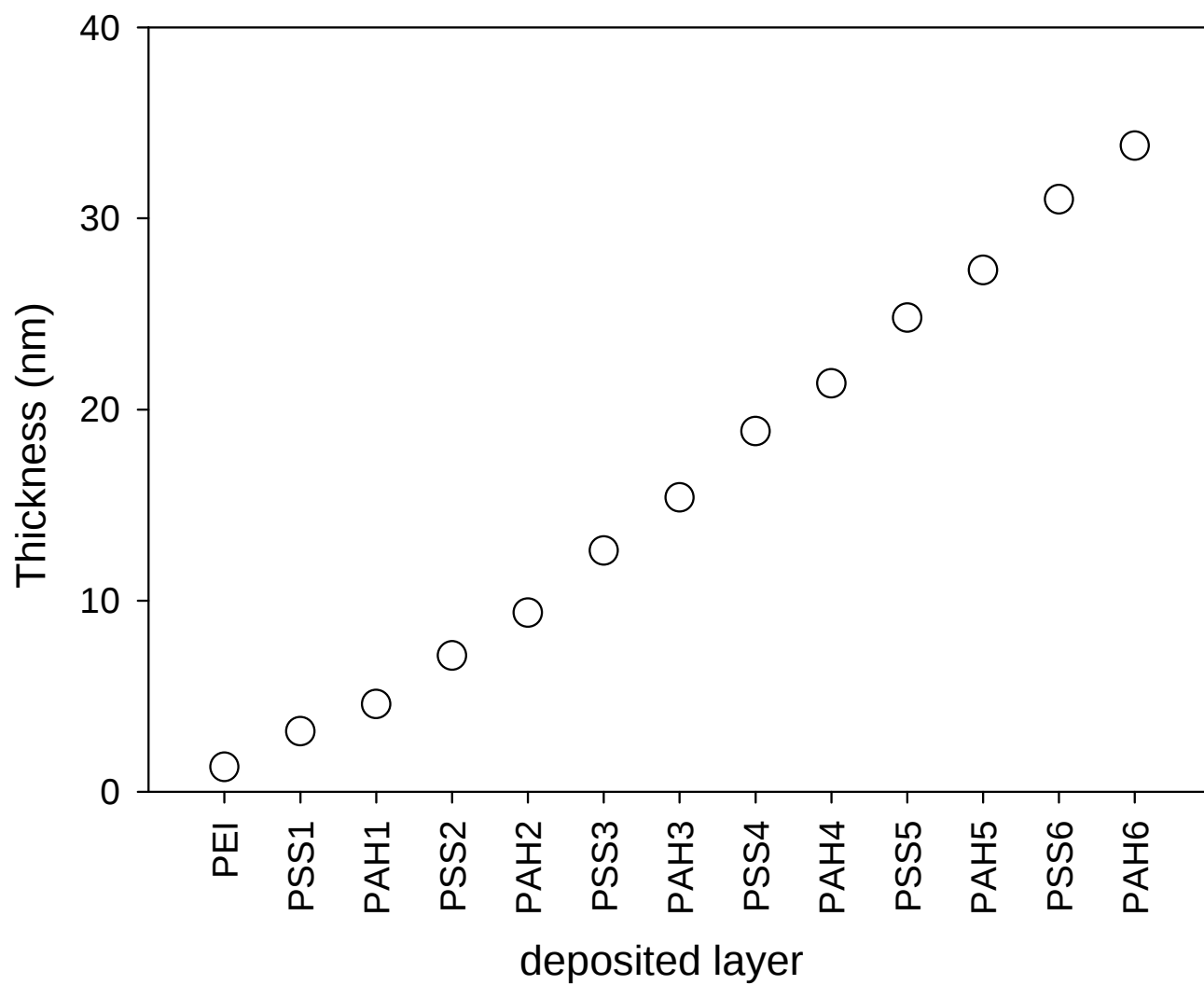


Figure 3:

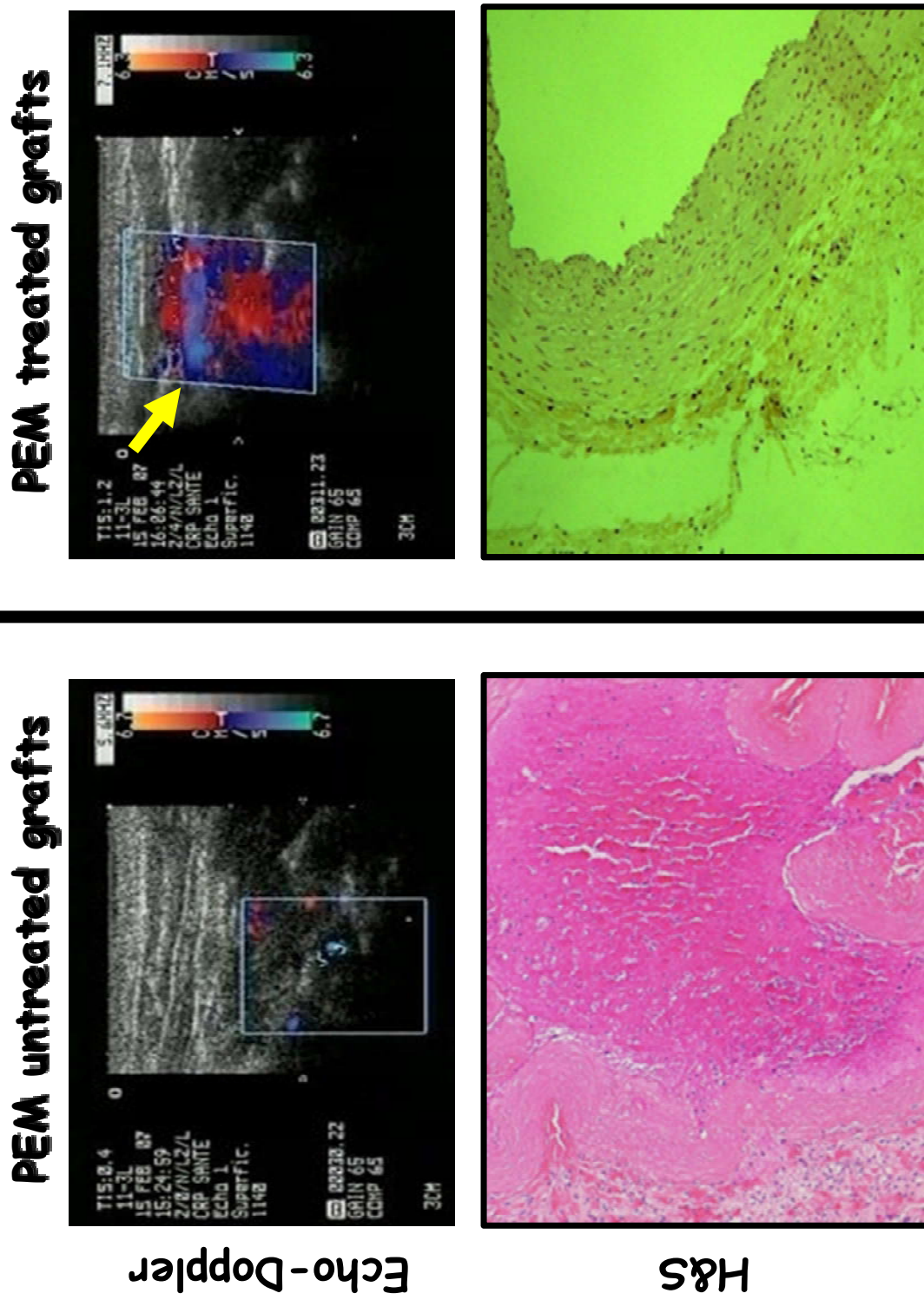


Figure 4:

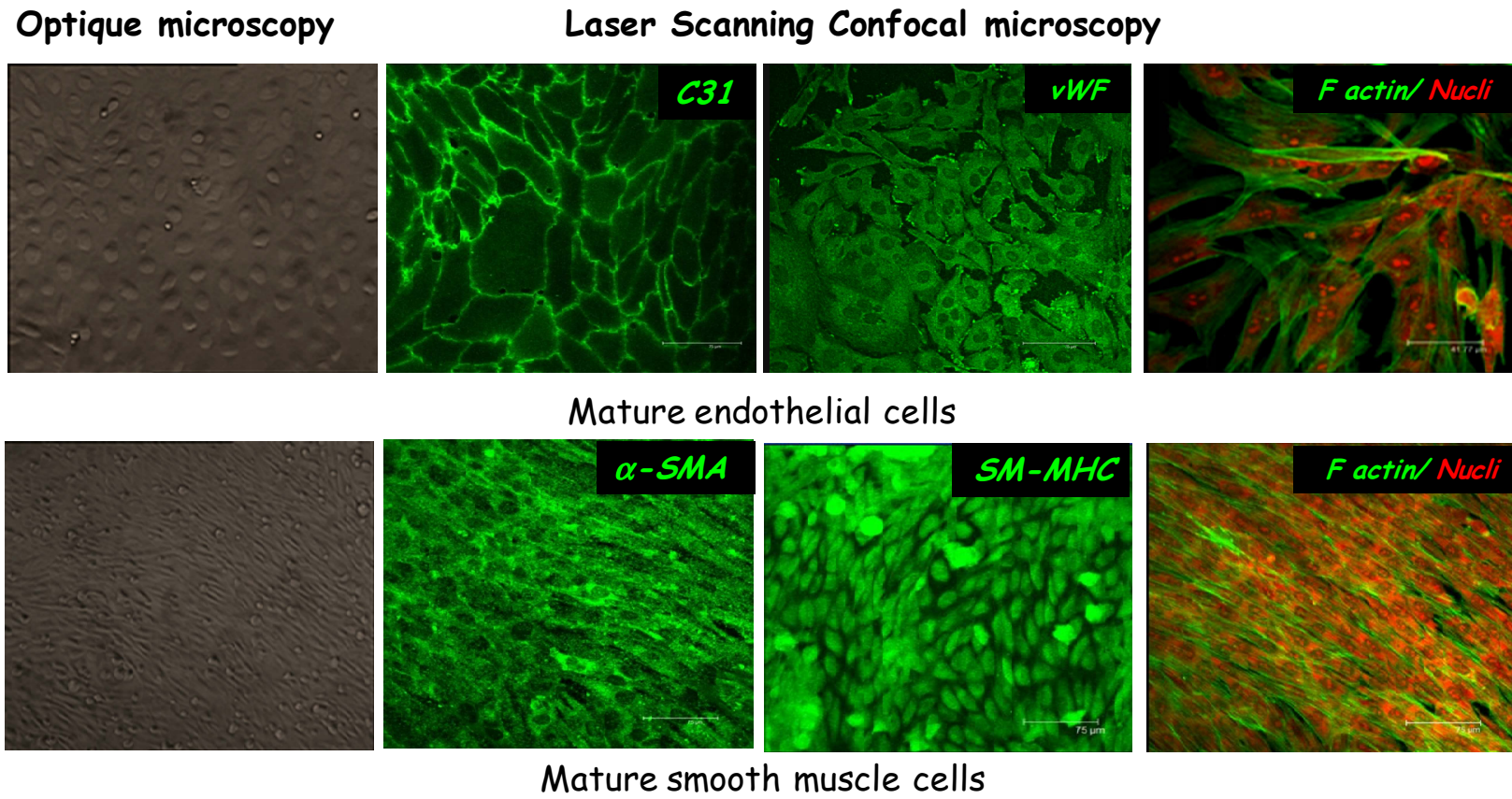


Figure 5A:

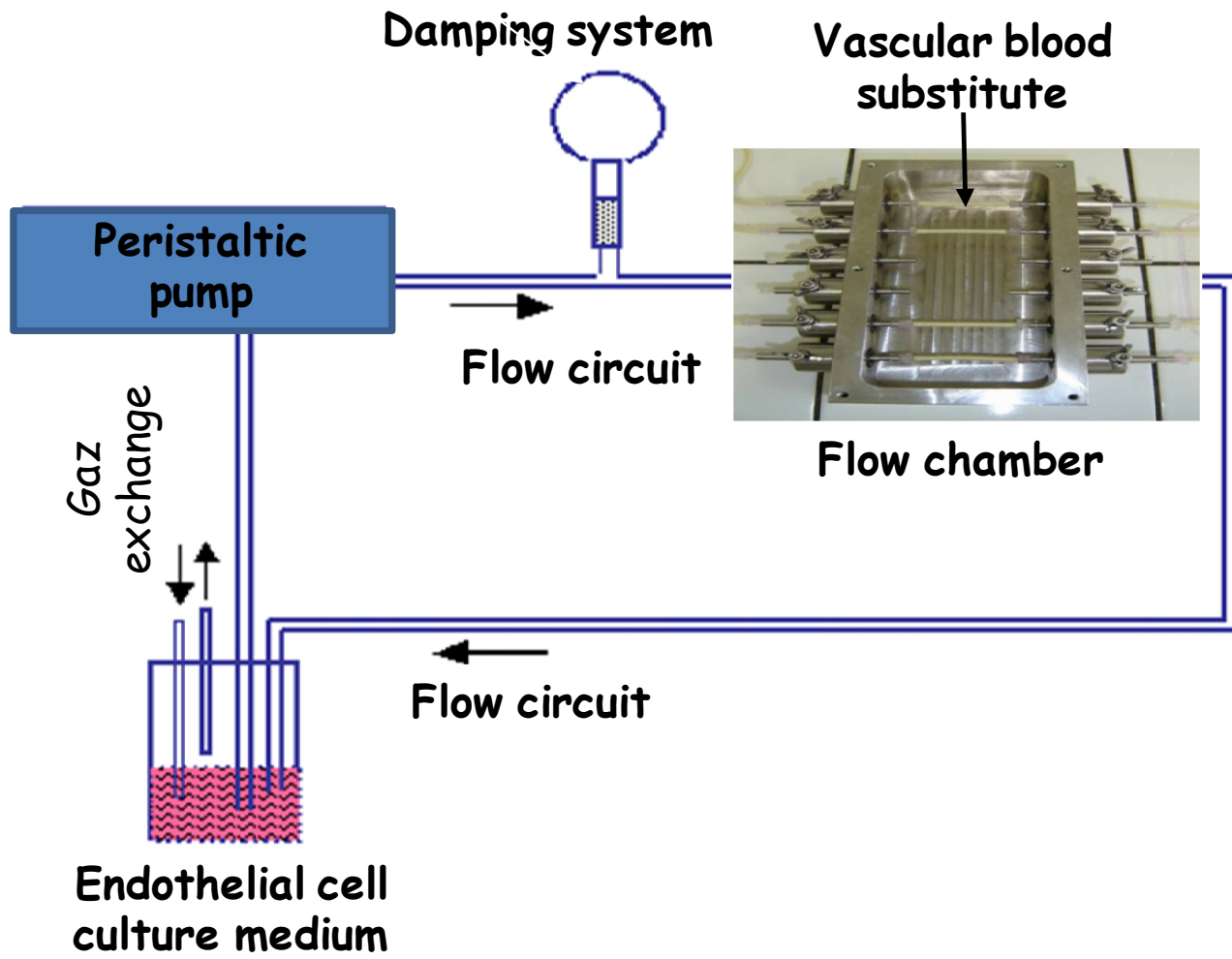
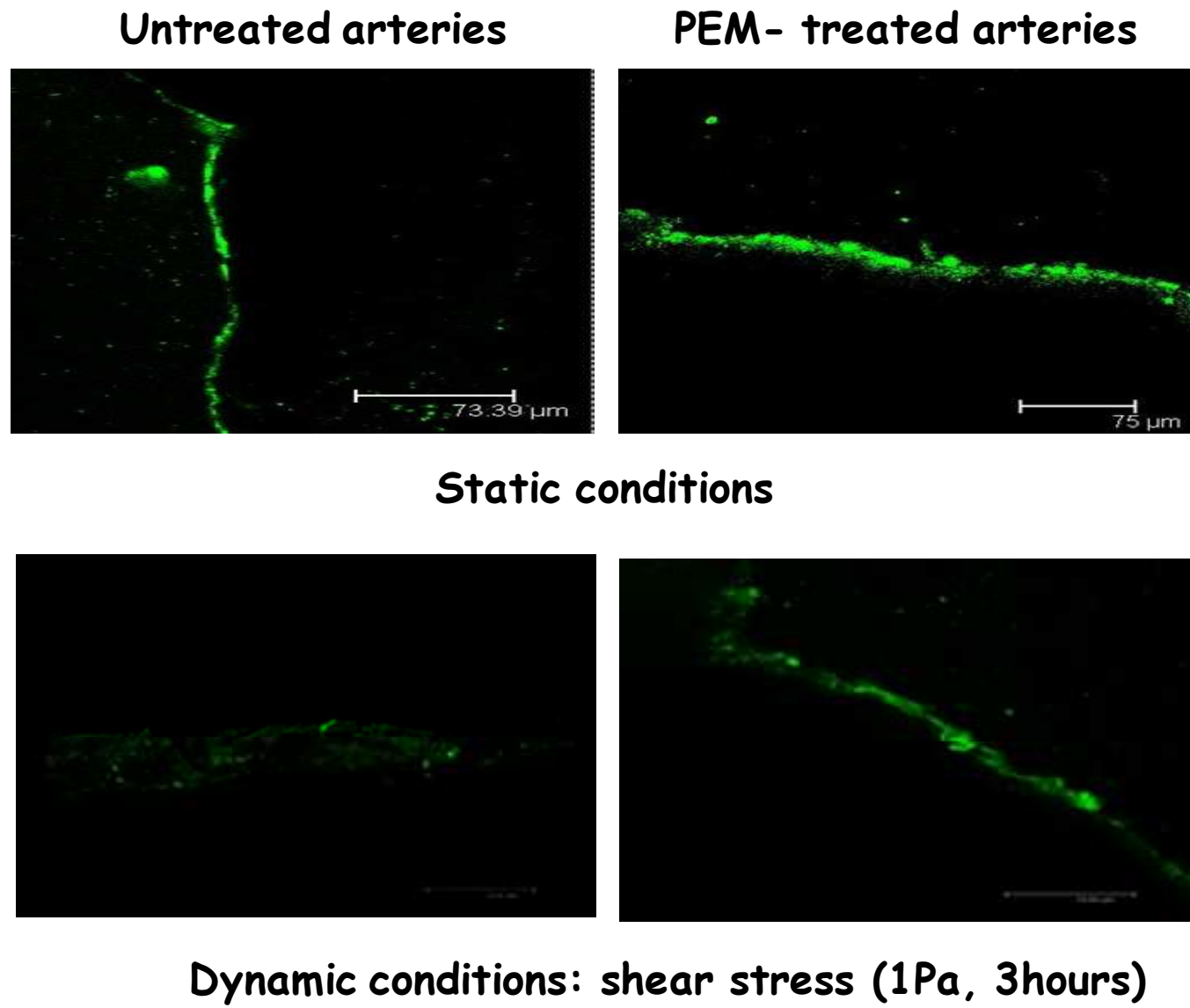


Figure 5B:



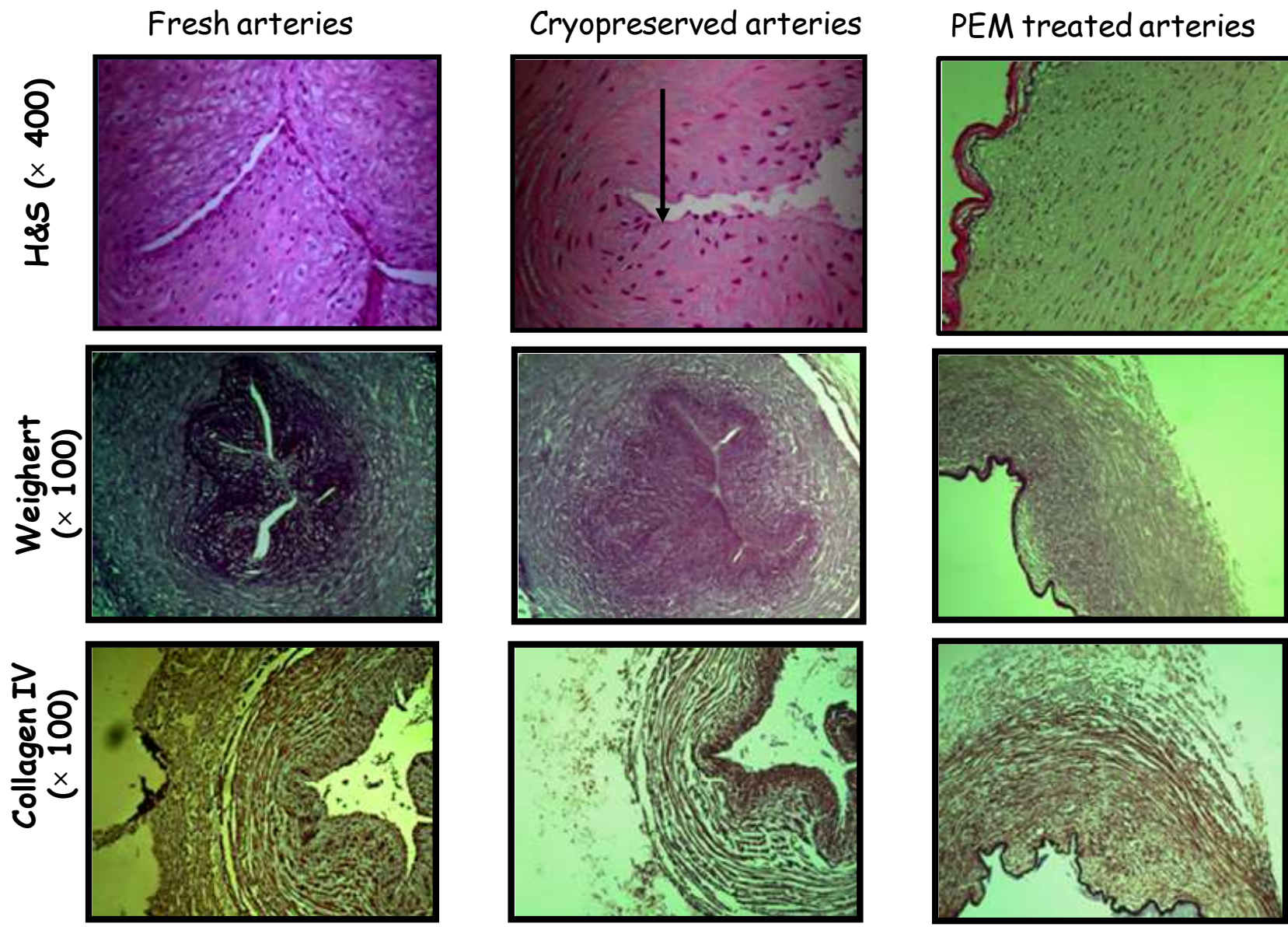


Figure 6

Figure 7:

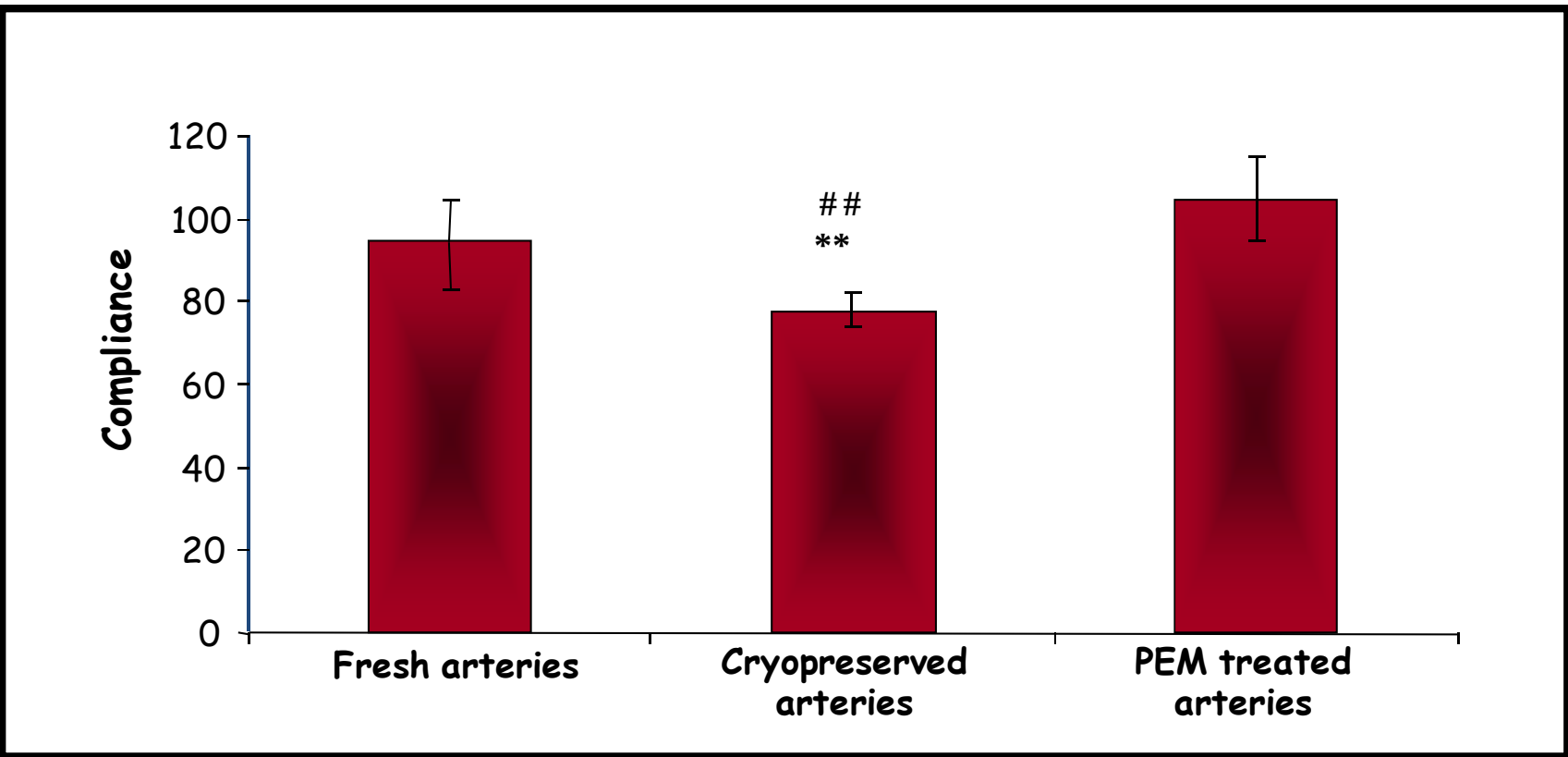
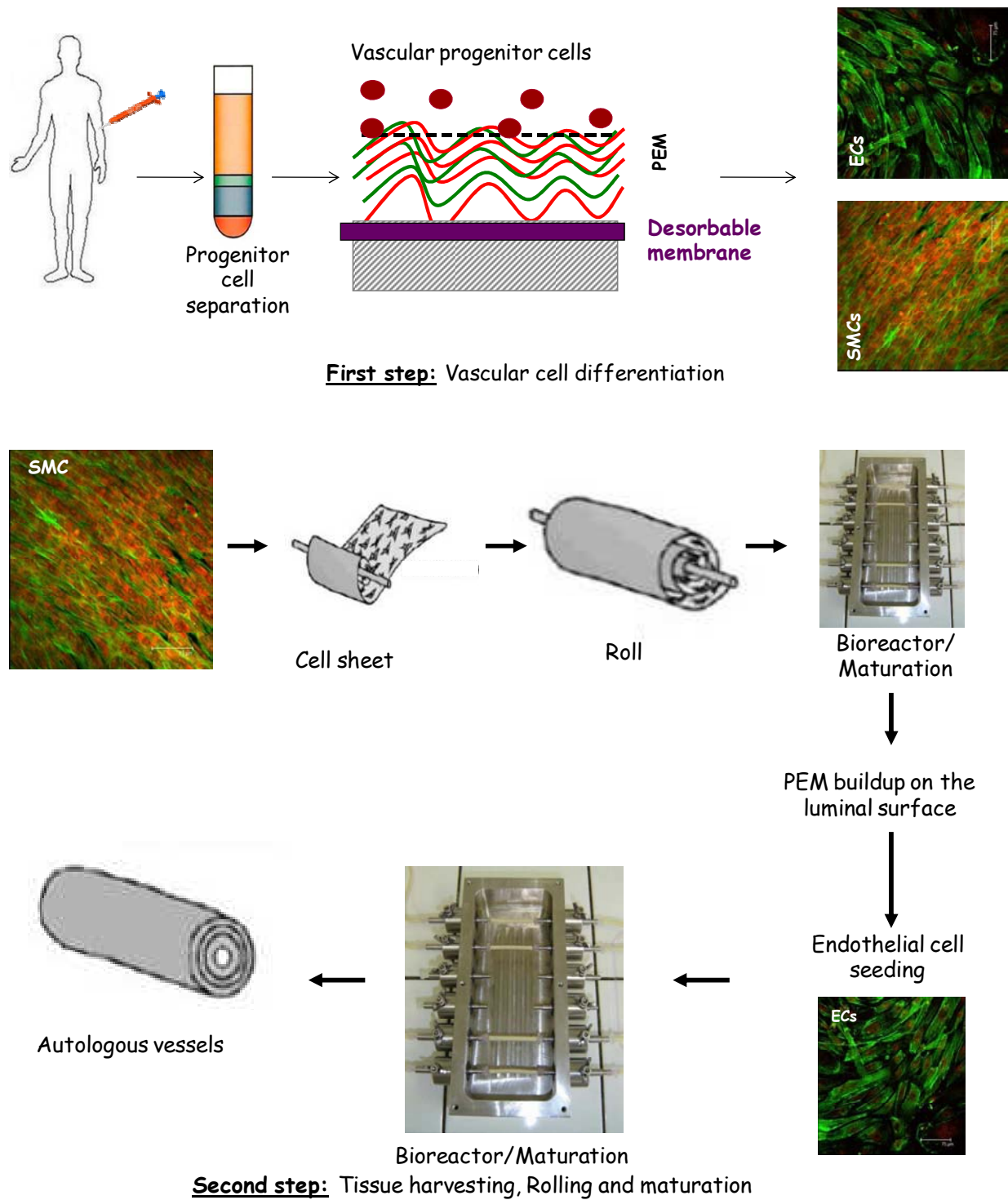


Figure 8:



Vascular substitutes	Number of patients	Grafts patency	Reference
Cryopreserved	15	85% after 3 years of implantation	Lamm et al., 2001
veins	14	91% after 2.5 years of implantation	Laube et al., 2000
PTFE	113	65% à 9 years of implantation	Deutsch et al., 1999
PTFEe	21	67± 37% after 6.3 years of implantation	Leseche et al., 1995
Dacron®	66	38% ± 9% after 2.5 years of implantation	Herring et al., 1978
PTFE	9	100% after 14 weeks of implantation	Zilla et al., 1987
PTFE			

Table 1: Physical characteristics of synthetic prosthesis

Synthetic prostheses	Chemical formula	Resistance	Elasticity modulus
Expanded polytetrafluoroethylene	$[-(\text{CF}_2-\text{CF}_2)-]_n$	14 MPa	0.5 GPa
polyethylene terephthalate	$[O-C(=O)-C_6H_4-O-C(=O)-CH_2CH_2]_n$	170-180 MPa	14 GPa
polyurethanes	$[NH-O-C(=O)-O-R-]_n$	20-90 MPa	5-1150 MPa

Tableau 2: Clinical results of endothelialized vascular substitutes

Table 3: PEM properties with respect to tissue engineering

General advantage
- Numerous material types suitable for PEM build-ups, - Facile and rapid PEM build-ups realized within few minutes, - Architecture which can be designed with nanometer precision in thickness, - Deposition on surfaces of almost any kind or shape (nonbiological surface such as stent and contact lenses, colloids such as nanoparticles, and biological surface: blood vessel walls and cells such as red blood cells and viruses, - Ease of the procedure without need for initiator or energy supply(self assembly), - Possibility to use water-soluble biocompatible polymers and avoid other chemical reagents, - Numerous variables for deposition tuning (pH, concentration, adsorption time, ionic strength, temperature, - bioactive macromolecules, such as proteins : growth factors, enzymes, peptides can be incorporated into PEMs films, offering high interests for biomedical applications, - Possibility to tune architecture with specific properties (mechanical properties film), - Low-cost of the production process.

Objectifs du travail de thèse

La découverte des progéniteurs endothéliaux représente un atout majeur en ingénierie vasculaire. L'objectif de ce travail de thèse est de vérifier l'effet des films multicouches de polyélectrolytes sur la différenciation des EPC dans différentes conditions environnementales.

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'effet de ces films sur la différenciation d'EPC de sang périphérique de lapin, cultivés en normoxie (21%O₂). La différenciation cellulaire en CE au cours du temps a été vérifiée par microscopie confocale.

Dans un second temps, nous avons voulu vérifier l'effet de l'hypoxie sur la différenciation des EPC. Des analyses en cytométrie en flux et des observations en microscopie confocale ont permis de suivre le phénotype au cours du temps et en fonction des conditions environnementales.

Dans un troisième temps, nous avons cherché à développer une matrice à base d'alginate et de film multicouches de polyélectrolytes qui permettrait au final la reconstruction *in vitro* de substituts vasculaires à partir de cellules souches autologues. Cette étude venant de débiter seuls les résultats préliminaires vont seront présentés.

Matériels et Méthodes

I.Préparation des surfaces de culture:

Les cellules ont été cultivées sur des lames de verre recouvertes de :

- Supports témoins : 20µg/mL de fibronectine d'origine bovine (Sigma ,France) ou de 1% (p/v) de collagène de type I d'origine murine (BD Biosciences).
- Supports d'intérêt : Film multicouche de polyélectrolytes constitué de trois bicouches et demie de polycation : chlorhydrate de polyallylamine et de polyanion : poly (4-styrène sulfonate de sodium). L'architecture est notée (PAH-PSS)₃-PAH.

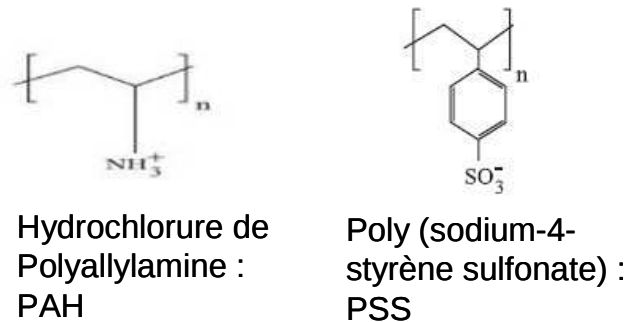


Figure 11 : Représentation de la structure chimique des différents polyélectrolytes utilisés. PAH: poly (allylamine –hydrochloride); PSS : poly (sodium 4-styrène sulfonate)

La procédure utilisée pour la construction du film est décrite dans la section matériels et méthodes des articles suivants : Berthelemy et al, *Adv Mater*, 2008 & Berthelemy et al, *PLoS One*, 2009.

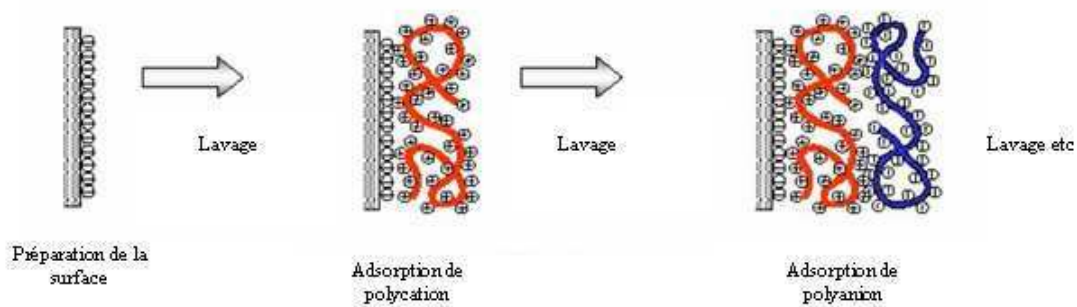


Figure 12 : Principe de la construction d'un film multicouche de polyélectrolytes.

- Préparation de la solution d'alginate : solution à 1% d'alginate préparée dans de l'eau ultrapure et déposée par pulvérisation sur les supports de culture (lames de verre). Ce dépôt est suivi par l'adsorption de polyélectrolytes PAH et PSS à 1mg/mL préparés dans une solution de CaCl₂ (0,15M)

II. Expérimentation animale

Toutes les expérimentations effectuées ont été réalisées sur le lapin en respectant les règles éthiques en vigueur en Europe (décret n° 2001-131 du 6 février 2001, liées à la directive européenne 86-609-CEE de 1986). Ainsi les animaux (lapins blancs Néo-Zélandais mâles, pesant $4 \pm 0,5$ kg) d'origine contrôlée (CEGAV, France), ont été hébergés dans une animalerie (Faculté de médecine, UHP-Nancy I) agréée par le ministère de l'Agriculture et de la Pêche sous couvert de la Direction départementale des services vétérinaires. Toutes les précautions nécessaires ont été prises pour éviter la souffrance de l'animal lors des expérimentations.

II.1. Anesthésie

L'induction de l'anesthésie est réalisée, *via* la veine marginale externe de l'oreille, au moyen d'un cathéter intraveineux (Nécessaire épicroténien, Salva, cooper, France), par l'injection lente d'une dose de 40 mg/kg de pentobarbital sodique (Ceva Santé Animale, France), dilué au quart dans du sérum physiologique (NaCl 0,9% Cooper, Rhône-Poulenc, France). L'efficacité de l'anesthésie est vérifiée avant le début de tout acte chirurgical par pincement interdigital de la patte arrière du lapin. L'anesthésie est entretenue par injection intraveineuse itérative de pentobarbital dilué au $\frac{1}{4}$ dans du sérum physiologique.

II.2. Prélèvement de sang

L'animal anesthésié est placé en décubitus dorsal sur une table chauffante permettant de maintenir la température corporelle constante à 37°C. Les zones d'intervention chirurgicale sont rasées puis désinfectées à la polyvidone iodée (Bétadine dermique 10%, Laboratoire Sarget, France). Après application d'un anesthésique local (Xylocaïne, Astra Zenaca, France), une incision d'environ 4 cm est pratiquée au niveau du cou, le long de la trachée afin de dégager la carotide droite. Une administration intraveineuse de 300 U/mL d'héparinate de sodium (Sanofi Synthelabo, France) est effectuée par la veine marginale juste avant la mise en place des clamps vasculaires (niveaux proximal et distal). Après avoir clampé la carotide, une artériotomie proximale (0,5 cm) est pratiquée à une distance d'environ 1 cm du clamp, et un cathéter hépariné est introduit du côté proximal à une distance d'environ 4 cm. 60 à 80 mL de

sang sont alors prélevés dans des seringues de 20 mL préalablement héparinées, et ensuite conservés à 4°C avant son utilisation.

II.3. Euthanasie et prélèvement de la veine jugulaire

Après le prélèvement sanguin, les animaux sont euthanasiés par injection d'une dose létale de pentobarbital sodique, conformément aux recommandations publiées par la Commission européenne (décret n° 2001-131 du 6 février 2001, lié à la Directive européenne 86-609-CEE de 1986). La mort de l'animal est constatée après arrêts respiratoire et cardiaque.

Les veines jugulaires sont alors prélevées et placées dans du tampon HBSS (cf. section matériels et méthodes chapitre III.2 intitulée cellules endothéliales extraites de la veine jugulaire de lapin) supplémenté d'antibiotiques (100 UI/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 2,5 µg/mL de Fungizone[®]). Les cadavres sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à incinération.

III. Culture cellulaire

Au cours de ces travaux, plusieurs types de cellules de lapin ont été utilisés :

- des cellules endothéliales issues de la veine jugulaire (JVEC),
- des cellules musculaires lisses issues de l'aorte (Lignée U8A4),
- des cellules mononucléées extraites du sang périphérique,

III.1. Réactifs et matériel

➤ Tampons sans Calcium ni Magnésium

Deux types de tampons isotoniques sont utilisés dans la plupart des étapes de culture cellulaire (lavages, dilutions....). Leur composition est donnée dans le tableau 6.

Tampon	Constituants	Fournisseur
Hank's balanced salt solution (HBSS)	KCl 0,4 g/L, NaCl 8 g/L, KH ₂ PO ₄ 0,06 g/L, Na ₂ HPO ₄ 0,047 g/L, D-glucose 1 g/L, rouge de phénol 0,011 g/L, pH 7,2-7,4.	Sous forme de poudre (Sigma, France)

Phosphate Buffer Saline (PBS)	NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na ₂ HPO ₄ 10 mM, KH ₂ PO ₄ 1,4 mM., pH 7,2-7,4	Préparé au laboratoire dans de l'eau distillée

Tableau 6 : composition des tampons sans Calcium ni magnésium utilisés au cours de ces travaux

Remarques:

1. La poudre d'HBSS est dissoute dans un litre d'eau distillée. Le pH de l'HBSS est ajusté à 7,2.
2. Les tampons HBSS et PBS sont filtrés sur une membrane de porosité 0,22 µm (Millipore, France), puis conservés à 4°C.

- Gradient de densité : Histopaque 1077 (Sigma, France) est une solution de polysucrose et de diatrizoate de sodium ajustée à une densité de 1,077g/mL. Cette solution va permettre, après centrifugation du sang, de séparer les cellules mononucléées des autres constituants qui se retrouvent sous forme d'un anneau cellulaire situé à l'interface entre l'Histopaque en bas et le plasma en haut.

- Solution de digestion (Enzymes) :

Le détachement des cellules est réalisé selon les cas à l'aide :

- Collagénase de type 2 (Gibco, France) à une concentration de 1 mg/mL dans du tampon HBSS. Elle a été utilisée pour récupérer les CE issues des veines jugulaires de lapin.
- Mélange trypsine-EDTA à 0,25% (Sigma, France), soit 2,5 g de trypsine porcine et 0,2 g d'EDTA tétrasodique dans 100 mL de tampon HBSS, utilisée pour trypsiner les cellules au cours de différents passages.

- Milieux de culture :

- Milieu de différenciation cellulaire : Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2 : Lonza, Belgique) supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal (SVF) et différentes cytokines, facteurs de croissance et autres suppléments: VEGF (Vascular endothelial growth factor), FGF (fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor), IGF (Insulin like growth factor), acide ascorbique, héparine, hydrocortisone et gentamycine, 100 UI/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 2,5 µg/mL de Fungizone® (SingleQuots, Lonza, Belgique).

- Milieu d'expansion des cellules musculaires lisses : Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM F-12 (Gibco, France) supplémenté avec 5% de SVF, 100 UI/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 2,5 µg/mL de Fungizone® (Gibco, France).

III.2. Culture de cellules endothéliales extraites de la veine jugulaire de lapin

Les cellules endothéliales sont isolées immédiatement après prélèvement des veines jugulaires.

Les veines sont déposées dans une boîte de Pétri et nettoyées avec de l'HBSS afin d'éliminer le reste de sang et le tissu environnant. Elles sont ensuite ouvertes longitudinalement et découpées en petits morceaux. Ces morceaux sont alors déposés dans un tube contenant la solution de collagénase et placés à 37°C pendant 20 min. La suspension cellulaire issue de la digestion, est centrifugée à 250 *g* pendant 10 min à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot contenant les cellules est remis en suspension dans 2 mL de milieu EBM-2 et les cellules sontensemencées sur des plaques 6 puits (*Tissue culture plate surface*) qui sont placées dans un incubateur à 37°C (5% CO₂ et 95% d'humidité).

Après quelques jours, l'examen au microscope à contraste de phase (Olympus, Japon) montre que les cellules ont adhéré sur la lame de culture. Les cellules sont lavées deux fois avec de l'HBSS et sont remises dans l'incubateur avec 2 mL de milieu EBM-2. A confluence, les cellules forment une mosaïque homogène en pavé de chaussée, caractéristique de CE. Les cellules sont jointives et polygonales et leur croissance s'arrête par inhibition de contact.

III.3. Culture de cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses utilisées nous ont aimablement été fournies par le Dr. Huguette Louis de l'Unité Inserm U961 dirigée par le Dr. P. LACOLLEY.

Ces cellules ont été cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² (Nunc, Deutcher France) en présence de milieu DMEM-F12 complet et placées dans un incubateur à 37°C (5% CO₂, 95% d'air). L'observation au microscope à contraste de phase montre qu'elles sont en forme de fuseau avec des collines et des vallées (*Hill and Valley*), caractéristique des CML. Les cellules sont alors lavées deux fois avec du tampon HBSS afin d'éliminer les débris

cellulaires et sont replacées dans l'incubateur avec 10 mL de milieu complet. Elles sont amplifiées et utilisées au cinquième passage.

III.4. Passage en subculture

Après quelques jours, les cellules arrivent à confluence. Le milieu de culture est alors éliminé et les cellules sont lavées deux fois avec 5 mL de tampon HBSS. Ces lavages vont permettre d'éliminer le reste de sérum (qui inhiberait l'activité de la trypsine) et permettent également de libérer des ions Ca^{2+} qui vont faciliter le détachement des cellules. On ajoute alors 5 mL de trypsine (0,125 %) afin de détacher les cellules. Le détachement du tapis cellulaire est contrôlé par observation au microscope optique à contraste de phase. Une fois le tapis totalement détaché, on ajoute 5 mL de milieu complet afin de stopper l'action enzymatique de la trypsine. Les cellules en suspension sont placées dans un tube stérile de 50 mL et centrifugées à 1400 tours pendant 10 minutes. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 5 mL de milieu complet. Cela permettra d'ensemencer ces cellules à différentes concentrations dans des boîtes de culture préparées pour de futures expériences.

III.5. Cellules souches hématopoïétiques : progéniteurs endothéliaux

Après prélèvement du sang, un gradient de densité est effectué afin de séparer les différents constituants du sang (plaquettes, cellules mononucléées et globules rouges). Le sang dilué (10 mL de sang dans 16 mL de PBS) est ajouté doucement à 10 mL d'Histopaque® 1077 dans un tube de 50 mL, puis centrifugé à 400 g pendant 30 min. L'anneau de leucocytes ainsi séparé est aspiré avec une pipette pasteur stérile et transféré dans un tube de 50 mL contenant 10 mL de MCDB 131 (Gibco, France) supplémenté de 5 U/mL d'héparinate de sodium. Le tube est ensuite centrifugé à 250 g pendant 10 min, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 10 mL de MCDB 131 hépariné. Cette dernière opération est répétée trois fois.

Le culot est alors resuspendu dans du milieu de culture EBM-2 et les cellules sont ensemencées au nombre de 1×10^6 cellules/cm² dans des plaques 6 ou 24 puits.

Au bout de 3 jours de culture, deux lavages sont réalisés avec du MCDB131 afin de éliminer les cellules non adhérentes et les globules rouges résiduels. On rajoute ensuite du milieu EBM-2 complet et les cellules sont différenciées selon deux procédures décrites plus précisément dans l'article de PLoS ONE paru en 2009.

- En normoxie (5% CO₂, 21% O₂ et 95% d'humidité)
- En hypoxie (5% CO₂, 5% O₂ et 95% d'humidité)

Quelque soit la condition de culture, le milieu est changé tous les deux jours.

IV.Méthodes de caractérisation et d'investigation

IV 1. Activité métabolique

La mesure de l'activité métabolique des cellules a été réalisée par le test Alamar Blue[®] (Serotec, France). Ce test a été conçu pour mesurer quantitativement la prolifération cellulaire ainsi que la cytotoxicité induite par les conditions de culture. Ce composé contient un indicateur redox qui change de couleur en fonction de la réduction chimique du milieu de culture (indicateur colorimétrique). Contrairement aux cellules mortes, les cellules saines et/ou en prolifération produisent des composés réducteurs tels que FADH₂, NADH, NADPH dont l'activité cytochromique contribue à réduire l'Alamar Blue[®].

La mesure de l'activité cellulaire basée sur le taux d'oxydo-réduction de l'Alamar Blue[®] est déterminée par la mesure densitométrique à 570 nm (absorbance du composé réduit) et à 630 nm (absorbance du composé oxydé). Le protocole d'utilisation de l'Alamar Blue est décrit dans la section matériels et méthodes de l'article Berthelemy et al; *Adv. Mater.* 2008.

IV.2. Méthodologie

Les cellules ont étéensemencées a une densité de 1x10⁶ cellules/cm² sur les différentes surfaces (Film muticouche de polyélectrolytes et Fibronectine). Un test Alamar Blue a alors été réalisé après 4 et 14 jours de culture. Au temps fixé, le milieu de culture contenant du rouge de phénol a été retiré et remplacé par 500µL de DMEM sans rouge de phénol préalablement chauffé à 37°C. Cela va permettre d'éliminer l'interférence due au rouge de phénol lors de la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre. Puis 0,5 mL de la solution d'Almar Blue à 10% sont ajoutées dans chaque puits, y compris trois puits sans cellules, qui sont utilisés comme blanc. Après 4h d'incubation à 37°C (5% CO₂, 95% d'air), l'Alamar Blue contenu dans chaque puits est enlevé et les absorbances à 570 et 630 nm sont mesurées au spectrophotomètre.

IV.3. Suivi du phénotype cellulaire par immunocytologie

- Immunomarquage direct : la molécule d'intérêt (récepteurs membranaires ou composés intracellulaires) est reconnue spécifiquement par un anticorps couplé directement à un fluorochrome (Figure 13).
- Immunomarquage indirect : la molécule d'intérêt (récepteurs membranaires ou composés intracellulaires) est reconnue spécifiquement par un anticorps primaire. Afin de mettre en évidence la formation du complexe récepteur-anticorps primaire, un deuxième anticorps (anticorps secondaire) est utilisé (tableau 8). Ce dernier est couplé à un fluorochrome qui est dirigé spécifiquement contre la partie Fc (fragment commun) de l'anticorps primaire (Figure 13).

Les cellules immunomarquées ont été analysées qualitativement par microscopie confocale à balayage laser (cf. Annexe 1) et quantitativement par cytométrie en flux (cf. Annexe 2).

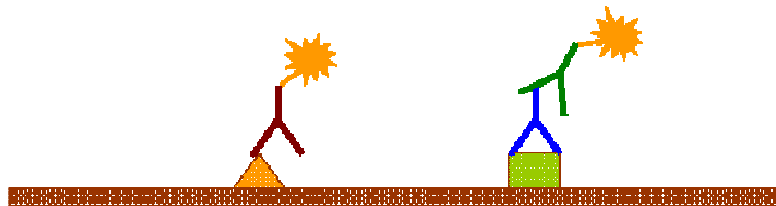


Figure 13 : Principe de l'immunomarquage directe et indirecte

Le CD34 et le CD133 ont été choisis afin d'identifier les EPC issus de la fraction de cellules mononucléées. Le suivi du phénotype endothélial a été réalisé à travers l'expression de marqueurs spécifiques CD31, vWF et Dil-ac-LDL ; le phénotype du muscle lisse, quant à lui, est déterminé par l'expression de marqueurs fortement exprimés par les cellules différenciées α -actine, SM-MHC et calponine. Les caractéristiques de ces anticorps sont résumées dans le tableau 7.

V. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés par la moyenne $\pm$ écart type pour chaque surface étudiée. Chaque expérience a été réalisée trois fois en triplicate ($n=3$). Les valeurs moyennes ont été comparées par un test- t non apparié (Statview IV, Abacus Concepts Inc, Berkeley, CA, USA). Toutes les valeurs de probabilités (p) inférieures à 0,05% ont été considérées comme significatives.

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Clone	Fournisseur
CD34	Humain			Immunotech, France
CD133 conjugué à la phycoérythrine (PE)	Humain		AC141	Miltenyi Biotec
PECAM-1	Humain	Souris IgG1	JC70A	Dako, France
Facteur Von Willebrand (vWF)	Humain	Souris IgG1	F8/86	Dako, France
Dil-ac-Low density Lipoprotein (Dil-ac-LDL)	-	-	-	Tebu Bio, France
A- Smooth Muscle actine (α-SMA)	Humain	Souris IgG1	1A4	Dako, France
Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SM-MHC)	Humain	Souris IgG1	SMMS-1	Dako, France
Calponine	Humain	Souris IgG1	CALP	Dako, France
Collagène de type IV	Humain	Brebis	-	SouthernBiotec
Laminine	Humain	Souris	LAM-89	Abcam

Tableau 7 : liste des anticorps primaires utilisés

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Fournisseur
Alexa Fluor 488	Souris	Brebis	Molecular probes, USA
Alexa Fluor 488	Brebis	Poulet	Molecular probes, USA

Tableau 8 : liste des anticorps secondaires utilisés

Le protocole de marquage utilisé au cours de ces travaux est détaillé dans la section matériels et méthodes des articles suivants : Berthelemy et al., *Adv Mater*, 2008 & Berthelemy et al., *PLoS One*, 2009.

RESULTATS ET DISCUSSION

Ces travaux ont fait l'objet d'un dépôt de deux brevets :

- 1)- Procédé de prolifération de cellules sur des multicouches de polyélectrolytes et son application notamment à la préparation de biomatériaux cellularisés. Numéro : PCT/FR2008/000832
- 2) - Cellular Differential Process and its Use for Blood Vessel Build-up. Numéro: 08290599.3

I. Effets des films multicouches de polyélectrolytes sur la différenciation des progéniteurs endothéliaux

I.1. Objectifs

Au cours des années 1990, Gero Decher développa une nouvelle technique permettant la construction de films de polymères hydrophiles polyélectrolytes, appelés « films multicouches de polyélectrolytes » (Decher 1997). Ces films constituent un nouveau moyen de fonctionnaliser simplement les surfaces de différents matériaux. La technique de construction de ces films est basée sur le dépôt alterné et successif de polycations et polyanions. Ces films de polyélectrolytes présentent de nombreux avantages : simplicité d'utilisation, application quelque soit la nature et la géométrie du support et utilisation en solutions aqueuses.

Des travaux antérieurs menés au laboratoire ont permis de montrer l'intérêt de films de polyélectrolytes constitués de trois bicouches et demie de polystyrène sulfonate et de chlorhydrate de poly-allylamine (PSS-PAH)₃-PAH en terme de biocompatibilité, d'adhésion et de rétention de CE matures face à une contrainte de cisaillement (Boura et al 2003 et 2005). De plus, nous avons observé que le dépôt de ce type de film sur la surface luminale de substituts vasculaires naturels ou synthétiques favorisait la formation d'un néo-endothélium comparable à celui retrouvé *in vivo* (Kerdjoudj et al 2007 et 2008, Moby et al 2007). Par ailleurs, l'implantation de substituts naturels fonctionnalisés par ce type de film a montré une bonne perméabilité et une bonne structure après trois mois chez le lapin (Kerdjoudj et al 2008). Malgré ces avancées, la source des CE utilisées reste toujours une limite majeure dans le développement de substituts vasculaires non thrombogènes.

L'utilisation d'EPC a alors été envisagée afin de reconstituer un néo-endothélium sur des substituts vasculaires. Les nombreux travaux réalisés au cours de ces dernières années ont permis de montrer que ces cellules issues de la moelle osseuse et mobilisées dans la

circulation sanguine, étaient capables de se différencier en CE matures et fonctionnelles grâce à la fois à une bonne adhésion cellulaire, permise par un recouvrement préalable des supports de culture par des protéines de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, laminine), ainsi qu'à une supplémentation du milieu de culture en facteurs de croissance angiogéniques comme le VEGF... Demeure cependant un inconvénient majeur qui est leur trop faible concentration dans le sang, qui limite leur utilisation thérapeutique.

Au vue des résultats très encourageants obtenus au sein de l'équipe, nous avons décidé de tester l'effet des multicouches de polyélectrolytes sur la différenciation des EPC afin d'obtenir une source de CE autologues, fonctionnelles et facilement disponibles.

Les premiers travaux réalisés au cours de cette thèse ont consisté à vérifier l'impact du recouvrement d'une surface de culture (dans notre cas une lame de verre) par un film multicouche de polyélectrolytes sur la différenciation de progéniteurs endothéliaux circulants de lapin. La fibronectine, protéine de la matrice extracellulaire couramment employée pour la différenciation des progéniteurs endothéliaux, a été utilisée comme témoin.

Au début de ces travaux, deux films de type PSS-PAH ont été sélectionnés pour la culture des EPC :

- le film PEI-(PSS-PAH)₃ ;
- le film PAH-(PSS-PAH)₃ ;

En dépit des résultats préliminaires similaires entre ces deux films, nous avons très rapidement choisi de n'utiliser que le film PAH-(PSS-PAH)₃ pour la différenciation des progéniteurs circulants. L'utilisation du polyéthylène-imine (PEI, polycation) comme première couche a été largement décrite par les physicochimistes comme étant une couche stable qui permet une construction optimale du film, mais sa forte toxicité pour les cellules nous a encouragé à l'abandonner lors de la construction du film (Brunot et al 2007).

Les progéniteurs endothéliaux issus de sang périphérique de lapin et contenus dans la fraction leucocytaire ont été isolés par gradient de densité. Ces cellules ont ensuite étéensemencées sur le film PAH-(PSS-PAH)₃ ou sur la fibronectine.

Après caractérisation de ces cellules grace à l'expression de marqueurs précoces spécifiques (CD34⁺ et CD133⁺) leNous avons alors suivi l'évolution de la culture de ces cellules à différents temps sur les différents supports décrits ci-dessus.

I.2. Manuscrit

Ce premier article concerne l'effet des films multicouches de polyélectrolytes sur le comportement de progéniteurs endothéliaux de lapin. Cet article est paru en juillet 2008 dans la revue internationale *Advanced Materials*, journal à l'interface entre les sciences des matériaux et la biologie.

Polyelectrolyte Films Boost Progenitor Cell Differentiation into Endothelium-like Monolayers**

By Nicolas Berthelemy, Halima Kerdjoudj, Caroline Gaucher, Pierre Schaaf, Jean-François Stoltz, Patrick Lacolley, Jean-Claude Voegel, and Patrick Menu*

[*] Prof. P. Menu, N. Berthelemy, Dr. H. Kerdjoudj, Dr. C. Gaucher, Prof. J.-F. Stoltz
Group of Bioengineering (LEMTA-UMR CNRS 7563) UHP-Nancy 1, Faculté de Médecine
9, avenue de la forêt de Haye
54505 Vandœuvre-le`s-Nancy (France)
E-mail: patrick.menu@medecine.uhp-nancy.fr

Prof. P. Schaaf
Institut Charles Sadron (UPR 22, CNRS)
6, rue Boussingault
67083 Strasbourg Cedex (France)

Dr. P. Lacolley
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale,
INSERM Unité 684
UHP-Nancy 1, Faculté de Médecine
9, avenue de la forêt de Haye
54505 Vandœuvre-le`s-Nancy (France)

Dr. J.-C. Voegel
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale,
INSERM Unité 595
ULP-Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire
11, rue Humann
67085 Strasbourg Cedex (France)

[**] N. Berthelemy and H. Kerdjoudj contributed equally to this work. This work was partly supported by Région de Lorraine.
Supporting Information is available online from Wiley InterScience or from the authors.
2674 _ 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim Adv. Mater. 2008, 20, 2674–2678

Endothelial progenitor cells (EPCs) offer new opportunities in tissue bioengineering, in particular in the field of vascular grafts. Their autologous origin, high proliferation capacity and potential to differentiate into vascular phenotypes have aroused huge interest.[1] However, the major difficulty for endothelialization of vascular grafts with EPCs comes from their paucity in the peripheral circulation.[2] Thus, in vitro cell differentiation into a mature endothelial cell (EC) monolayer is required. The improvement of initial adhesion and differentiation was undertaken on different types of surfaces.[3,4]. On surfaces coated with

fibronectin (Fn), the most widely employed and efficient system, it takes about two months to reach a confluent EC monolayer,[5] a delay that is prohibitively long for practical applications. We present here a new type of surface coating based on polyelectrolyte multilayers (PEMs) that allows the EPC differentiation into neoendothelium to be speeded up to less than two weeks. PEMs are obtained by alternate deposition of poly(sodium-4- styrene-sulfonate) (PSS) and poly(allylamine hydrochloride) (PAH) on almost any kind of substrate.[6] Previous studies indicated that PSS/PAH multilayered films when terminated by PAH induce strong adhesion of ECs that spread and keep their phenotype on glass,[7] on expanded poly(tetrafluoroethylene) (ePTFE),[8] and on cryopreserved luminal arteries.[9] Also PSS/chitosan films on aminolyzed poly(L-lactic acid) improved the cytocompatibility of human ECs,[10] while patterning of chitosan by a poly(dimethylsiloxane) stamp with oligo(ethylene glycol) methacrylate and methacrylic acid copolymers allows spatial orientation of human endothelial cells.[11]

Peripheral blood mononuclear cells (approximately 40x10⁶) were obtained from 50mL of rabbit blood, as described previously.[3,5,12] Flow cytometry indicated that about 0.01% of the cells expressed CD34 and CD133 receptors, a characteristic of hematopoietic cells. EPCs were cultivated by exposure to EC-specific growth factors,[3,4] either on a PAH-(PSS-PAH)₃ film (terminated by PAH) or on Fn-coated glass surfaces, the usual culture substrate. After four days, the cells appeared to be round shaped without noticeable differences between the Fn- and the PEM-coated surfaces (Fig. 1A,D). After two weeks, strong differences appeared between the two systems. Cells grown on Fn were organized in small colonies but remained round shaped with a size only slightly larger than at day 4 (Fig. 1B) whereas on the PEMs the cells formed a confluent monolayer and exhibited an endothelium-like morphology similar to that found in mature jugular venous endothelial cells (JVECs) (Fig. 1E,F). It was only after about 60 days that a similar cellular morphology was observed on Fn (Fig. 1C), in accordance with the literature, where similarly long differentiation times were reported for cells on Fn[5] and on collagen.[4]

The EPC differentiation on Fn and PEMs was also evaluated more quantitatively. The morphological differences and cellular spreading were evaluated by means of the projected surface areas occupied by the cytoplasm. After 14 days, these areas represent about 65%_1.5%, 85%_0.3%, and 85%_ 0.5% of the total cell surfaces for Fn, PEMs, and JVECs, respectively (see Supporting Information, Fig. S1). These results highlight the importance of cell spreading (EC morphologic characteristics) for cells cultivated on PEMs. Cells bind to substrates via adhesion molecules, whose intracellular domains are connected to the

cytoskeleton (CK). Without binding to the CK, a cell adhesion molecule could be hydrolyzed and ripped out of the cellular membrane. At day 14 we did not observe any kind of actin polymerization or CK arrangement for cells cultivated on Fn, whereas on PEMs the presence of actin fibers lying parallel one to each other was observed, similarly to what is observed on JVECs (Fig. 2, A1–A3).

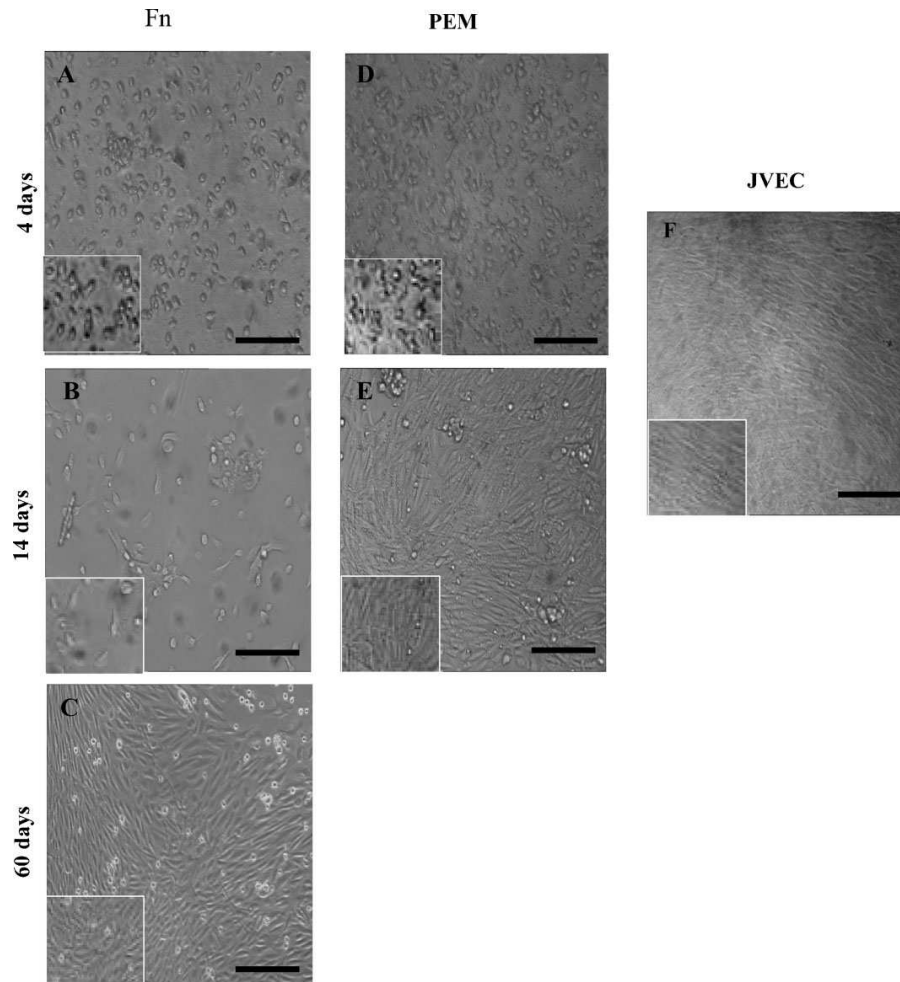


Figure 1: Morphological evolution of EPCs seeded on Fn (A–C) and PEMs (D,E) by optical phase contrast microscopy. EPCs at 4 days (A,D), 14 days (B,E), and 60 days (C). JVECs were used as a control (F). Objective $\times 20$, scale bars 100mm. Insets: A,D) typical round shape, B) colonies of round shape, C,E,F) spread confluent cells.

The cell viability was assessed by Alamar Blue assay. After four days, no metabolic activity was detected on either surface. However, at day 14, it was significantly higher for the cells grown on PEMs compared to those on Fn (1.15 ± 0.05 and 0.86 ± 0.04 , respectively) and became comparable to those found for JVECs (1.16 ± 0.1). This highlights the pronounced proliferation of the EPCs grown on PEMs (Supporting Information, Fig. S2).

The phenotype evolutions were also checked by means of specific markers: CD34, CD31 (also known as platelet EC adhesion molecules-1), and vWF (von Willebrand factor).[13,14] After four days, on both surfaces, confocal microscopy observations showed EPCs at different maturation stages, ranging from early EPCs (CD34^{+/+}) to late EPCs (CD31^{+/+} and vWF^{+/+}15] (see Supporting Information, Fig. S3). After 14 days, CD34 expression is fully abolished on both surfaces, indicating the full disappearance of the hematopoietic phenotype and signature of cellular differentiation, whereas CD31 and vWF are expressed on both surfaces. vWF is the first marker appearing during differentiation. Figure 2, B1–B3, shows its expression by all cells. Gray level analyses reveal a significant increase of its expression (Fig. 2, B4) on PEMs compared to Fn, indicating a larger number and greater maturation of EPCs seeded on PEMs. On Fn few cells express CD31 due to the low differentiation whereas on PEMs CD31 expression becomes comparable to that of the JVECs (Fig. 2, C1–C3). The CD31 distribution on Fn is uniform on the cellular level, confirming the not yet constituted cellular monolayer, whereas on PEMs the CD31 are localized on the cell borders, close to the cell junctions, as for JVECs (Fig. 2, C3, arrows). The complete lateral cell–cell junctions indicate stable endothelium formation on PEMs. These results are strengthened by analyses based on the gray levels, which emphasize the significant increase of the CD31 expressions of EPCs seeded on PEMs (Fig. 2, C4).

We checked similarly the capacity of EPCs to incorporate Dil-acetylated low-density lipoprotein (Dil-Ac-LDL), where Dil is 1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate, which constitutes a hallmark of ECs and macrophages.[16] At day 14, the cells seeded on both surfaces were positive for Dil-Ac-LDL uptake, similarly to the JVECs, with mostly a punctuated perinuclear distribution (Fig. 2, D1–D3). An analysis of the gray levels showed a significant increase of the Dil-Ac-LDL uptake by the cells cultivated on the PEMs as compared to those on Fn (Fig. 2, D4), confirming that, after two weeks, EPCs on PEMs exhibit an EC phenotype. Moreover, once again the Dil-Ac-LDL level is similar for cells grown on PEMs and for JVECs. In this connection, Gaffney et al. investigated the lipoprotein uptake by means of flow cytometry and showed that cells in a G2/M (mitosis) phase incorporated about 45% more Dil-Ac-LDL than those in a G1S (latency) phase.[17] The higher Dil-Ac-LDL uptake of EPCs on PEMs compared to Fn suggests that more cells are in the G2/M phase on PEMs, a signature for a higher proliferation. These results support the previous data (Alamar Blue), in which cells cultivated on PSS/ PAH multilayers exhibit high metabolic activity in the step preceding the mitotic phase, and hence proliferation.[18]

In conclusion, we have found that PSS/PAH multilayers terminated by PAH constitute ideal coatings that allow rapid—within only two weeks (two months for classical coatings)—differentiation of EPCs into mature ECs and the formation of an endothelium-like confluent cellular monolayer. This claim is demonstrated by the fact that all the characteristics of the cells grown on PSS/PAH PEMs are similar to those of JVECs. This result opens large possibilities in endothelialized vascular tissue engineering that require the rapid design of nonthrombotic surfaces (vascular grafts, stents, synthetic valves, etc.), and more generally the preparation of autologous ECs with a reduced risk of immunological reactions.

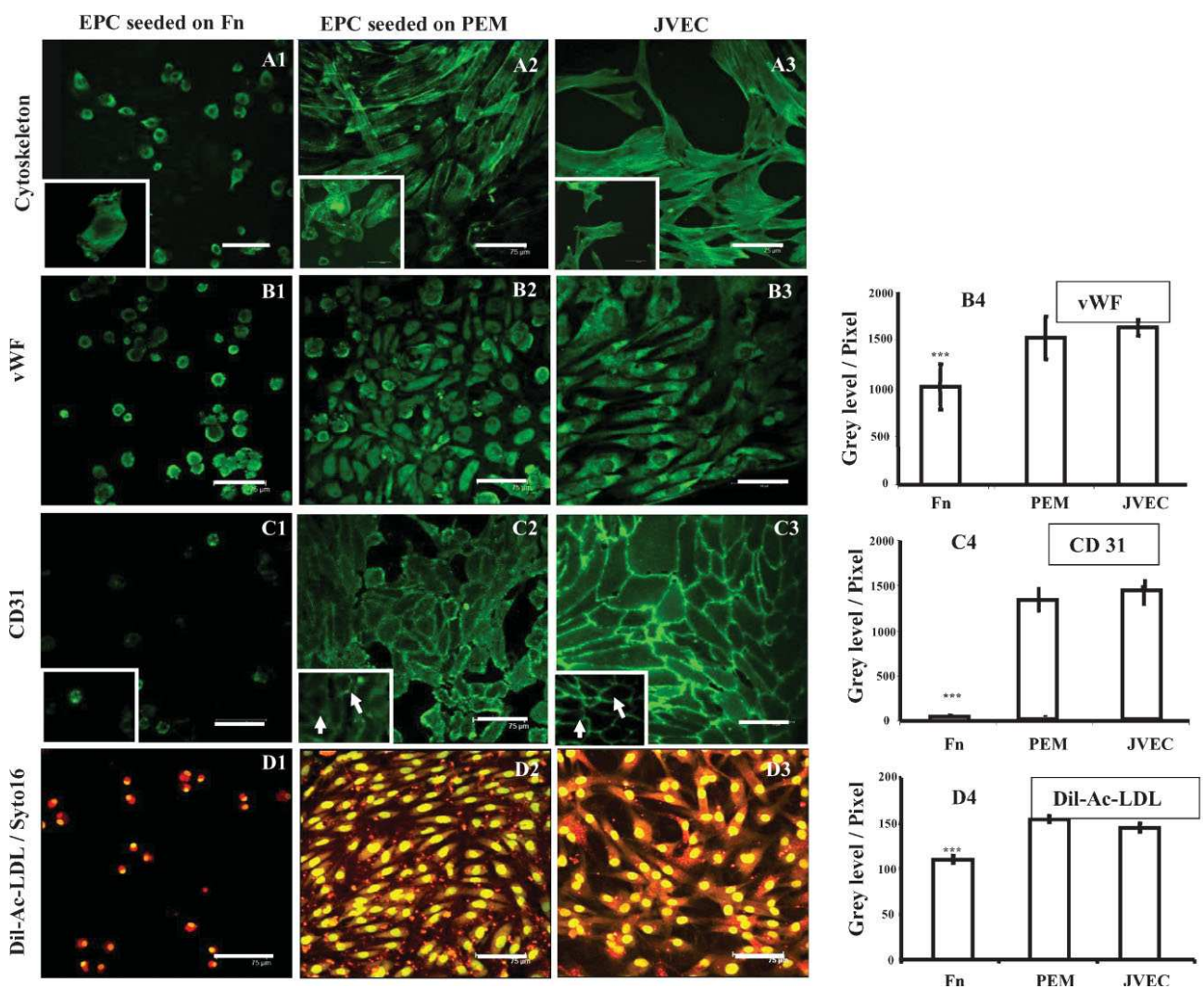


Figure 2: Cytoskeleton visualization, with absence (A1) or presence of actin polymerization (A2,A3), and cell phenotype characterization vWFp (B1–B3), CD31p (C1–C3), Dil-Ac-LDLp (D1–D3) by confocal microscopy after 14 days of culture on Fn (A1,B1,C1,D1), PEMs (A2,B2,C2,D2), and JVECs (A3,B3,C3,D3) as a control. The gray level analyses for vWF (B4), CD31 (C4), and Dil-Ac-LDL (D4), obtained by calculating cells areas, was estimated using the Histogram Leica Confocal software. The Fn shows a significant difference ***: ($p < 0.001$), unlike PEMs and JVECs. Insets: A1) absence of parallel actin fibers. A2,A3) Presence of parallel actin fibers. C1) uniform distribution of CD31 on the cellular level. C2,C3) CD31 localization on the lateral cell–cell junctions. Objective $\times 40$, numerical aperture NA $\times 0.8$, scale bars 75 μ m.

Experimental

Polyelectrolyte Multilayer (PEM) Films:

PEMs were fabricated from anionic PSS (MW 70 kDa) and cationic PAH (MW 70 kDa, Sigma-Aldrich, France) solution. PEMs were prepared on glass coverslips (CML, Nemours, France) pretreated with 0.01M sodium dodecyl sulfate (SDS) and 0.12M HCl for 15 min at 100 °C and then extensively rinsed with deionized water. Glass coverslips were deposited in 24-well plates (Nunc, France). PAH-(PSS-PAH)₃ films were obtained by alternate immersion of the pretreated coverslips for 10 min in polyelectrolyte solutions (300mL, 5mg/mL) in the presence of 10mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and 150mM NaCl at pH 7.4. After each deposition, the coverslips were rinsed three times for 10 min with 10mM Tris and 150mM NaCl at pH 7.4. Film characterization has been described previously by Boura et al. [7] Briefly, film characterization was performed by means of optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) and atomic force microscopy (AFM). All the films were sterilized for 10 min by UV light (254 nm).

Isolation of Rabbit Mononuclear Cells from Peripheral Blood

Circulation: Preparation of rabbit (white New Zealand rabbit, male, average weight 3–3.5 kg, CEGAV, France) blood was performed in accordance with institutional guidelines for animal experimentation. Blood (50 mL) was collected from the rabbit carotid in plastic syringes containing 250 USP heparin. Rabbit peripheral blood mononuclear cells (RP-BMCs) were isolated by centrifugation through a Histopaque 1077 (Sigma, France) density gradient. Briefly, blood diluted with phosphate-buffered saline (PBS) was layered over Histopaque 1077 in 50mL tubes and centrifuged at 400g for 30 min at 25 °C. RP-BMCs were collected and washed three times with an equal volume of MCDB 131 medium (Gibco, France) supplemented with sodium heparin (5U/mL). The cells were then resuspended in endothelial basal medium EBM-2 (Clonetics, Belgium) supplemented with EGM-2- singleQuots (Clonetics).

Cells were counted using Trypan Blue and were seeded in 24-well plates containing glass coverslips coated with PEMs or Fn at a density of 1×10^6 cells cm^{-2} and placed at 37 °C in 5%CO₂. After three days, the medium was changed in order to remove unattached cells.

From then on, the medium was changed every two days. Rabbit endothelial cells from the jugular vein (JVECs) cultivated under the same condition as EPCs were used as positive controls. Phase-contrast microscopy observations (Nikon DIAPHOT 300, Japan) allowed differentiation and morphological changes of the adherent cells to be followed after 4, 14, 21, and 60 days. We checked the absence of large and typically shaped macrophages.

Cell Metabolic Activity:

In order to measure cell metabolic activity, Alamar Blue redox assay (Serotec Ltd., Kidlington, England) was used. At days 4 and 14, the medium was removed and the cells were washed with RPMI 1640 without phenol red (Sigma, France). Then Alamar Blue reagent dissolved at 10% in RPMI 1640 without phenol red was added to each well. After 4 h incubation at 37 °C, the solution was removed and the color change, due to mitochondrial activity, was measured by monitoring the absorbance with a spectrophotometer (Beckman DU 640, USA) at 570 nm and 630 nm. The optical density difference $\Delta OD = OD_{570nm} - OD_{630nm}$ was calculated in order to estimate the metabolic activity of the cells. Wells without cells were used as a reference. The results were normalized with respect to counted cells.

Cellular Characterization by Immunostaining:

EPCs express different markers during their differentiation. In our studies, we evaluated CD34 and CD133 expression, specific to hematopoietic stem cells, and CD31 and von Willebrand Factor (vWF), specific to mature endothelial cells. Observations of cytoskeleton and nucleus were carried out to check their development on PEMs and Fn.

Immunostaining of Membrane Receptors (CD34, CD31, CD133):

Briefly, the cells were washed twice with RPMI 1640 without phenol red containing 0.5% bovine serum albumin (BSA). The cells were incubated with the primary monoclonal antibody diluted to 1/50 for 45 min at 37 °C; that is, anti-CD34 (Immunotech, France) or anti-CD31 (Dako, France) or anti-CD133 (Milteny, France) antibodies. Then the cells were washed twice with RPMI 1640 without phenol red to remove excess antibodies. These cells were incubated for 30 min at 37 °C with the secondary antibody, polyclonal goat anti mouse immunoglobulin G labeled with Alexa-Fluor 488 (Invitrogen, USA) diluted to 1/100. Cells

were washed with RPMI 1640 without phenol red, fixed with 4% paraformaldéhyde (polyoxymethylene) and observed using fluorescence confocal microscopy (Leica DMIRE2 HC Fluo TCS 1-B, Germany), using the 488nm spectral line. The gray level analysis of CD31 expression at 14 days is described below.

Immunostaining of the Intracellular Marker (vWF):

Prior to immunolabeling with the vWF antibody (Dako, France), the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and permeabilized with Triton X-100 (0.5%) for 15 min. The cells were incubated for 45 min at 37 °C with the primary monoclonal antibody anti vWF, diluted to 1/50 in Triton X-100 (0.1%), containing 0.5% BSA antibody. After two washes with RPMI 1640 without phenol red, the secondary antibody labeled with Alexa-Fluor 488 diluted to 1/100 was incubated for 30 min at 37 °C. The cells were observed by fluorescence confocal microscopy using the 488nm spectral line. The gray level analysis of vWF expression at 14 days is described below.

Immunostaining of the Cytoskeleton and Nucleus:

As for vWF immunostaining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and permeabilized with Triton X-100 (0.5%) for 15 min. The cells were then incubated for 30 min at 37 °C with Phalloidin labeled with Alexa-Fluor 488 (Invitrogen, France) diluted to 1/100 in Triton X-100 (0.1%) and followed by two rinses with RPMI 1640 without phenol red. The cells were then incubated with propidium iodide diluted with RPMI 1640 without phenol red for 30 min, followed by extensive rinses with RPMI 1640 without phenol red. The cells were observed by fluorescence confocal microscopy using the 488nm and 594nm spectral lines.

EPC Function Assay with Dil-Ac-LDL:

Dil-Ac-LDL constitutes a hallmark of ECs and macrophages. The specificity of the Ac-LDL uptake by the ECs was qualitatively confirmed by incubating EPCs and JVECs with Dil-labeled lipoproteins. We eliminated also the possibility of contamination by macrophages using phase-contrast microscopy observations. At day 14, the cells were incubated for 4 h at 37°C in RPMI 1640 without phenol red supplemented with 0.8mg/mL Dil-Ac-LDL (Tebu-bio, France). The cells were washed with RPMI 1640 without phenol red to remove Dil-Ac-LDL. The cells were then fixed with 4% paraformaldehyde and incubated for 5 min with Syto 16 (Invitrogen, France) diluted to 1/1000. The cells were visualized using fluorescence

confocal microscopy using the 488 and 543nm spectral lines. The gray level analyses of Dil-Ac-LDL are described below.

Gray Level Quantification:

The images (512 _ 512 pixels in size and 12 pixels in depth analyzed within the dynamic range of 4096 gray levels) were obtained from randomly selected fields from three separate cultures after immunostaining. More precisely, ten cells were randomly chosen from each of five different images from three independent experiments (150 cells per assay). This procedure holds for the quantitative analyses of CD31, vWF, and Dil-Ac-LDL. Data are represented as histograms. The gray level determinations were estimated using the Histogram Leica Confocal software (LCS, 61.1537, Germany).

Cell Size Measurements:

Morphological differences of EPCs were evaluated at day 14. Cells were immunostained with CD31 antibody for cell-surface visualization and propidium iodide for nuclear visualization, as described above. The surface areas occupied by the entire cell and cell nuclei were measured by the analysis (Image J Software, NIH, Germany) of the images from randomly selected fields from three separate cultures after immunostaining. More precisely, ten cells were randomly chosen from each of five different images taken from three independent experiments (150 cells per assay). All values were expressed in percentages of the total areas.

Statistical Analysis:

The data were expressed as mean_standard error of the mean (s.e.m.) for each condition. Each experiment was repeated independently three times. Mean values were compared with the unpaired t-test (Statview IV, Abacus Concepts Inc., Berkley, CA, USA), in which p represents the rejection level of the null-hypothesis of equal means.

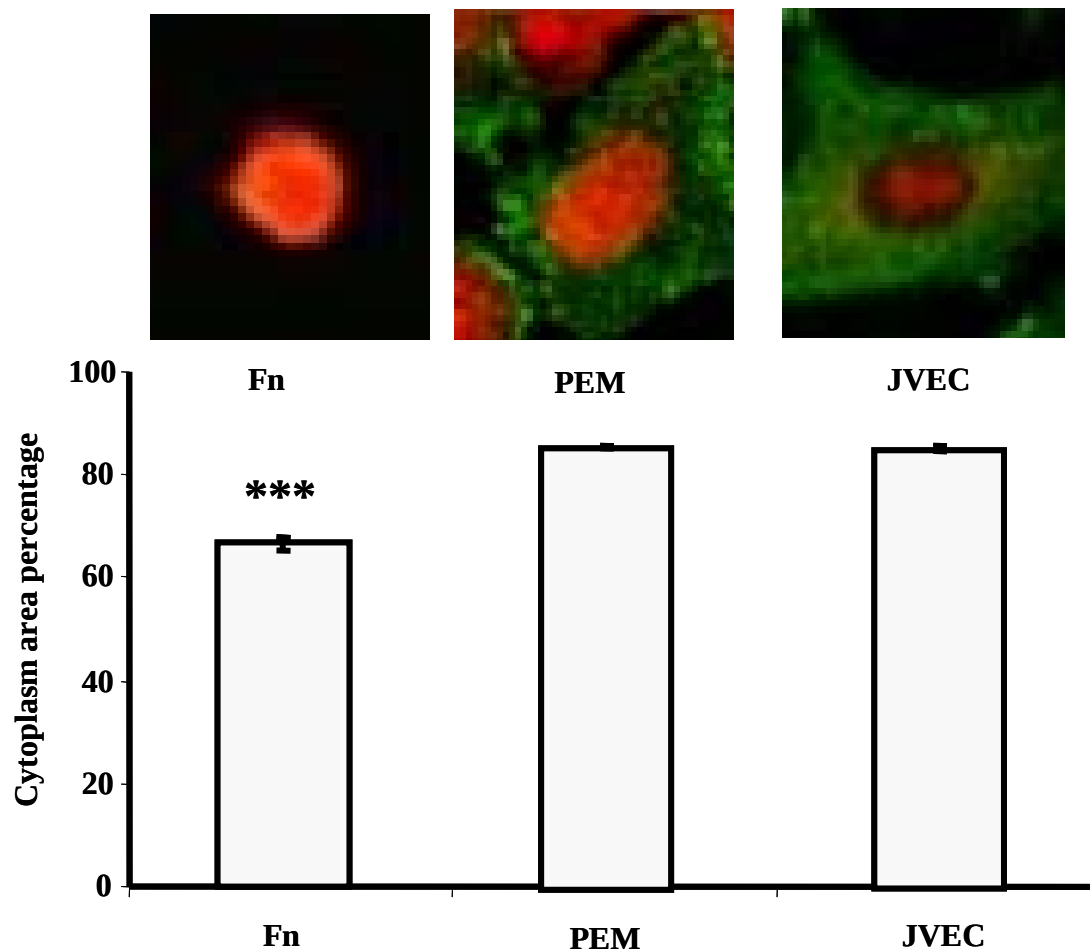
Received: September 24, 2007

Published online: June 2, 2008

References

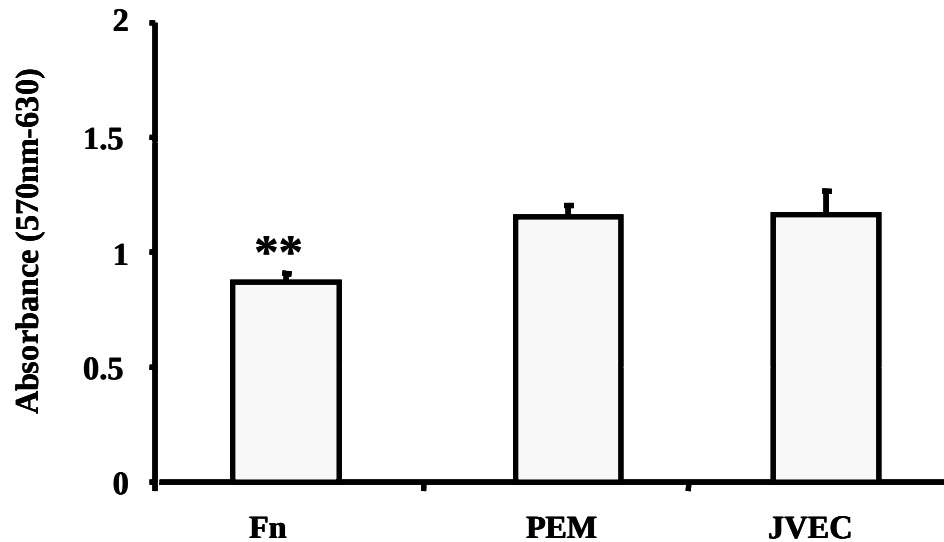
- [1] T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, J. M. Isner, *Science* 1997, 275, 964.
- [2] S. S. Khan, M. A. Solomon, J. P. McCoy, Jr., *Cytom. B. Clin. Cytom.* 2005, 64, 1.
- [3] S. Kaushal, G. E. Amiel, K. J. Guleserian, O. M. Shapira, T. Perry, F. W. Sutherland, E. Rabkin, A. M. Moran, F. J. Schoen, A. Atala, S. Soker, J. Bischoff, J. E. Mayer, Jr., *Nat. Med.* 2001, 7, 1035.
- [4] T. Shirota, H. Yasui, H. Shimokawa, T. Matsuda, *Biomaterials* 2003, 24, 2295.
- [5] Z. A. Khan, J. M. Melero-Martin, X. Wu, S. Paruchuri, E. Boscolo, J. B. Mulliken, J. Bischoff, *Blood* 2006, 108, 915.
- [6] G. Decher, *Science* 1997, 227, 1232.
- [7] C. Boura, P. Menu, E. Payan, C. Picart, J.-C. Voegel, S. Muller, J.-F. Stoltz, *Biomaterials* 2003, 24, 3521.
- [8] V. Moby, C. Boura, H. Kerdjoudj, J. C. Voegel, L. Marchal, D. Dumas, P. Schaaf, J. F. Stoltz, P. Menu, *Biomacromolecules* 2007, 8, 2156.
- [9] H. Kerdjoudj, C. Boura, V. Moby, K. Montagne, P. Schaaf, J.-C. Voegel, J.-F. Stoltz, P. Menu, *Adv. Funct. Mater.* 2007, 17, 2667.
- [10] Y. Zhu, C. Gao, T. He, X. Liu, J. Shen, *Biomacromolecules* 2003, 4, 446.
- [11] G. Kumar, Y. C. Wang, C. Co, C. C. Ho, *Langmuir* 2003, 19, 10550.
- [12] J. M. Melero-Martin, Z. A. Khan, A. Picard, X. Wu, S. Paruchuri, J. Bischoff, *Blood* 2007, 1, 4761.
- [13] P. J. Newman, M. C. Berndt, J. Gorski, G. C. White II, S. Lyman, C. Paddock, W. A. Muller, *Science* 1990, 247, 1219.
- [14] D. Meyer, G. Pietu, E. Fressinaud, J. P. Girma, *Mayo Clin. Proc.* 1991, 66, 516.
- [15] M. Hristov, C. Weber, *J. Cell. Mol. Med.* 2004, 8, 498.
- [16] L. E. Craig, J. P. Spelman, J. D. Strandberg, M. C. Zink, *Microvasc. Res.* 1998, 55, 65.
- [17] J. J. Gaffney, D. West, F. Arnold, A. Sattar, S. Kumar, *J. Cell Sci.* 1985, 79, 317.
- [18] S. Roussillon, M. Astruc, R. Defay, C. Tabacik, B. Descomps, A. Crastes de Paulet, *Biochim. Biophys. Acta* 1983, 17, 1.

Supplementary Figure 1 online



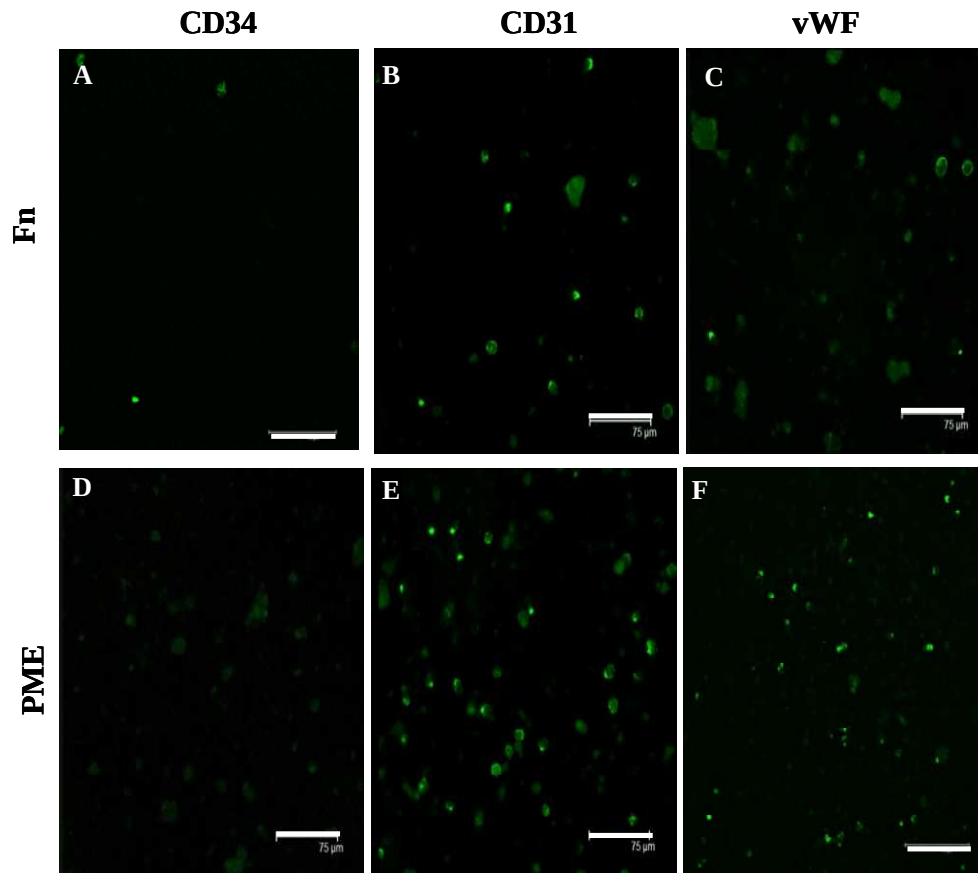
Cytoplasm area for EPC seeded on Fn and PEM coated surfaces after 14 days of culture and comparison with JVEC used as control. Results obtained show a cytoplasm area more pronounced for EPC growing on PEM compared to Fn. Areas become comparable to those for JVEC. Confocal microscopy observation illustrating the cytoplasm area (green) vs nucleus (red) for EPC seeded on Fn (left), PEM (middle), and JVEC (right). Histogram represents the proportion between the nucleus and cytoplasm area. Data are mean $\pm$ s. e. m. The Fn show a significant difference ***: ($p < 0.001$) compared to PEM and JVEC.

Supplementary Figure 2 online



Alamar blue™ viability assay test on EPC and JVEC. EPC were seeded on Fn and PME coated surfaces and compared to JVEC. After 14 days of culture, absorbance was measured in arbitrary units at 570 nm wavelength and at 630 nm. Optical difference $OD = OD_{570\text{ nm}} - OD_{630\text{ nm}}$ was calculated to estimate metabolic activity. Comparable results were obtained for cells grown on PEM and JVEC. Data are mean $\pm$ s. e. m. The Fn show a significant difference **: ($p < 0.01$) compared to PEM and JVEC.

Supplementary Figure 3 online



Cell phenotype characterization by confocal microscopy observation after 4 days of culture on Fn (A, B, C) and PME coated surfaces (D, E, F). Results show EPC going from early stage (CD34^{+/+}) (A, D) to late stage (CD31^{+/+} and vWF^{+/+}) (B,E and C,F) of differentiation. Objective $\times$ 40, NA 0.8, scale bars 75 μm .

I.3 Résumé des résultats

Nous avons montré dans ce manuscrit que le film multicouches de polyélectrolytes (PAH-PSS)₃-PAH représente un moyen simple et efficace pour modifier la surface de culture en vue la différenciation des progéniteurs endothéliaux.

Les observations effectuées en microscopie optique ont montré que deux semaines de culture seulement permettaient d'obtenir une monocouche de cellules pavimenteuses sur le film de polyélectrolytes. Ces progéniteurs ont révélé un bon comportement prolifératif sur ce dernier, comparable à celui du contrôle (CE matures issues de la veine jugulaire de lapin). Les progéniteurs ensemencés sur la fibronectine (support conventionnel) n'ont pas permis d'obtenir une monocouche après deux semaines, les cellules étant toujours rondes (Figure 1).

Les mesures de l'activité métabolique n'ont pas permis de révéler de différence entre les deux supports (fibronectine et film de polyélectrolytes) après 4 jours de culture. Cependant après 14 jours sur le film de polyélectrolytes, celle-ci devient comparable à celle de CE matures issues de la veine jugulaire ($1,15 \pm 0,05$ pour les EPC sur le film de polyélectrolytes et $1,16 \pm 0,1$ pour les CE de veine jugulaire) et significativement plus forte, comparée aux cellules ensemencées sur la fibronectine ($0,86 \pm 0,04$) ($p < 0,01$) (Supplément Figure 2).

L'adhésion des cellules sur le support de culture joue aussi un rôle très important dans la différenciation cellulaire. Ces molécules d'adhésion sont en contact avec le cytosquelette. L'interaction entre ces molécules et le support de culture provoque l'activation de voies de signalisation, permettant au cytosquelette de répondre à différentes stimulations mécaniques ou biochimiques, entraînant sa réorganisation. Dans notre cas, après 14 jours de culture, la visualisation des fibres de F-actine a permis de montrer la bonne organisation du cytosquelette sur le film de polyélectrolytes, preuve d'une bonne adhésion sur ce support contrairement à la fibronectine où aucune fibre d'actine n'a pu être observée (cytosquelette diffus), témoignant d'une adhésion limitée des EPC sur ce support (Figure 2). De plus, les mesures de la surface du cytoplasme de ces cellules ensemencées sur le film ou sur la fibronectine après 14 jours de culture, a montré que celui-ci était beaucoup plus important pour les EPC ensemencés sur la film et devient identique à celui des CE matures (JVEC) (Supplément Figure 1)

La caractérisation phénotypique des cellules obtenues après différenciation a été effectuée au cours du temps, à travers l'expression des marqueurs endothéliaux : CD31, le vWF et l'incorporation de LDL (Figure 2). Ces observations effectuées en microscopie confocale, ont montré, après 14 jours de culture, le phénotype endothélial de ces cellules grâce à l'expression de marqueurs spécifiques tels que le CD31, le vWF et l'incorporation de

LDL. La mesure de l'intensité de fluorescence de ces marqueurs est comparable à celle retrouvée pour des CE matures, ce qui signifie que ces cellules sont à un stade de différenciation et de maturation très proche de celui des cellules matures. Au contraire, avec les progéniteurs différenciés sur la fibronectine (support conventionnel), les observations au microscope optique à 14 jours de culture, ont révélé que ces cellules restaient rondes. De plus, celles-ci montrent une expression de CD31, de vWF et une incorporation des LDL beaucoup plus faible que pour les progéniteurs ensemencés sur le film et des CE matures de la veine jugulaire (Figure 2). Sur ce support conventionnel, des résultats identiques à ceux obtenus sur le film de polyélectrolytes n'ont été retrouvés qu'après 60 jours de culture.

Ces premiers résultats très encourageants ont permis de montrer qu'il était possible d'obtenir des CE matures autologues de façon non traumatisante (par simple prise de sang) et dans un temps très court. En ingénierie vasculaire, la cellularisation des substituts vasculaires synthétiques (PTFEe) ou biologiques (allogreffes cryoconservées) par des CE autologues est primordiale pour reconstituer *in vitro* une surface anti-thrombogénique. Cette technique, basée sur l'utilisation de films de polyélectrolytes, pourrait donc être utilisée dans ce domaine pour le développement de substituts vasculaires fonctionnels comprenant un endothélium issu de la différenciation de cellules autologues, ce qui limiterait les risques de rejet du greffon et pourrait être appliqué à des patients qui nécessitent le remplacement de vaisseaux malades.

II. Rôle de la concentration en oxygène dans la différenciation des progéniteurs circulants

II.1. Objectifs

Au cours des travaux précédents nous avons démontré que les films multicouches de polyélectrolytes favorisaient la différenciation de progéniteurs endothéliaux en CE matures. Depuis quelques années de nombreuses équipes dont celle à laquelle nous appartenons, ont évalué l'efficacité de leurs substituts vasculaires *in vivo*. Ces substituts ont été développés soit à partir d'hydrogels de polysaccharides à base de pullulan et de dextran (Chaouat et al 2006), soit à partir de feuillets de fibroblastes et de CE matures (L'Heureux et al, 2006). Cependant, lors de leur implantation chez l'animal, ces différentes constructions vasculaires ne possédaient pas de CML, car ces cellules deviennent nécrotiques quelque temps après l'implantation du greffon, notamment en raison de l'absence de *vasa vasorum*.

Au sein de notre équipe, l'implantation de substituts vasculaires traités simplement avec un film multicouches de polyélectrolytes a été réalisée au cours des travaux d'Halima Kerdjoudj (Kerdjoudj et al 2008). L'approche qu'elle a développée a consisté à recouvrir la surface interne d'artères ombilicales ou carotidiennes de lapin d'un film multicouches de polyélectrolytes et d'en évaluer l'efficacité chez l'animal (dans notre cas chez le lapin).

Les examens effectués sur les artères non traitées par le film ont montré l'apparition d'une thrombose précoce, certainement due à l'exposition du collagène de leur paroi aux différents éléments thrombogènes du sang (plaquettes et leucocytes). L'évaluation post-implantatoire de ces artères fonctionnalisées par le film de polyélectrolytes par écho-doppler a montré qu'ils restaient toujours perméables après 12 semaines. Les investigations macroscopiques et microscopiques ont révélé une bonne résistance de ces vaisseaux à la suture et l'absence de rejet immunologique.

D'une façon intéressante, les différents examens histologiques des parois artérielles réalisés au cours du temps ont montré une évolution structurale des artères implantées. Les artères prélevées après une semaine d'implantation montrent une réaction inflammatoire au niveau de l'adventice. Cependant cette inflammation n'apparaissait plus après 12 semaines en faisant place à une cicatrisation artérielle. De plus, une nécrose de la paroi, associée à une perte des CML de la média avaient été observées dès la première semaine d'implantation. Cette nécrose est très certainement due à l'absence de *vasa vasorum*, et donc de vascularisation intrinsèque des parois vasculaires (apport en nutriments et en oxygène). Après

12 semaines, nous avons pu observer une recolonisation de la média par des CML autologues dont l'origine reste à démontrer. C'est ce détail qui est à l'origine de ce chapitre. En effet, notre raisonnement s'est basé sur ces remarques : i) lors du remodelage vasculaire, le recrutement de cellules mononucléées au niveau de sites inflammatoires est à l'origine de la formation de nouveaux vaisseaux, ii) lors de l'implantation de greffons vasculaires, l'absence de *vasa vasorum* va entraîner une diminution de l'apport en oxygène au niveau de la paroi artérielle, créant ainsi une ischémie tissulaire. Cette ischémie favorise d'ailleurs la libération de cellules progénitrices dans la circulation sanguine, et leur mobilisation au niveau des sites ischémiques, permettant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. De nombreuses études ont montré le rôle de l'hypoxie (diminution de la concentration environnante en oxygène) quant à la différenciation cellulaire et la libération de nombreux facteurs de croissance angiogéniques. On peut donc imaginer que ces cellules mononucléées, contenant la fraction de cellules progénitrices, sont capables de se différencier sous une ambiance hypoxique. Nous avons, pour ces raisons, décidé de cultiver ces cellules à une faible concentration en oxygène (hypoxie) *in vitro*. Au niveau de la paroi artérielle, la teneur en oxygène est comprise entre 3 et 5% avec des variations plus ou moins importantes suivant la localisation des cellules. Notre culture des cellules progénitrices s'est faite à 5% O₂ sur des lames de verre recouvertes soit par le film multicouches de polyélectrolytes (PAH-PSS)₃-PAH, soit par du collagène de type I (utilisé comme contrôle).

II.2. Manuscrit

Cet article concerne l'effet de la concentration en oxygène sur la différenciation des progéniteurs vasculaires en CE matures et en CML. Cet article est paru en Mai 2009 dans *PLoS ONE* qui est, pour le moment, l'une des seules revues permettant un accès illimité et gratuit à des publications scientifiques de haute qualité et provenant de toutes les disciplines scientifiques.

O₂ Level Controls Hematopoietic Circulating Progenitor Cells Differentiation into Endothelial or Smooth Muscle Cells

Nicolas Berthelemy¹, Halima Kerdjoudj., Pierre Schaaf², Christine Prin-Mathieu³, Patrick Lacolley⁴, Jean-François Stoltz¹, Jean-Claude Voegel⁵, Patrick Menu^{1*}

¹ Group of Bioengineering (UMR CNRS 7561), UHP-Nancy 1, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France,

² Institut Charles Sadron (UPR 22, CNRS), Strasbourg, France,

³ CHU Nancy and UHP-Nancy 1, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France,

⁴ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, (INSERM Unité 961), UHP-Nancy 1, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France,

⁵ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, (INSERM Unité 977), Université de Strasbourg, Faculté de chirurgie dentaire, Strasbourg, France

Citation: Berthelemy N, Kerdjoudj H, Schaaf P, Prin-Mathieu C, Lacolley P, et al. (2009) O₂ Level Controls Hematopoietic Circulating Progenitor Cells Differentiation into Endothelial or Smooth Muscle Cells. PLoS ONE 4(5): e5514. doi:10.1371/journal.pone.0005514

Editor: Christophe Egles, Tufts University, United States of America

Received February 18, 2009; Accepted April 16, 2009; Published May 13, 2009

Copyright: © 2009 Berthelemy et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Région de Lorraine and Agence Nationale pour la Recherche (Project: SUBVACEL ANR-07-TECSAN-022-01). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

- E-mail: patrick.menu@medecine.uhp-nancy.fr.
- These authors contributed equally to this work.

Abstract

Background: Recent studies showed that progenitor cells could differentiate into mature vascular cells. The main physiological factors implicated in cell differentiation are specific growth factors. We hypothesized that simply by varying the oxygen content, progenitor cells can be differentiated either in mature endothelial cells (ECs) or contractile smooth muscle cells (SMCs) while keeping exactly the same culture medium.

Methodology/Principal Findings: Mononuclear cells were isolated by density gradient were cultivated under hypoxic (5% O₂) or normoxic (21% O₂) environment. Differentiated cells characterization was performed by confocal microscopy examination and flow cytometry analyses. The phenotype stability over a longer time period was also performed. The morphological examination of the confluent obtained cells after several weeks (between 2 and 4 weeks) showed two distinct morphologies: cobblestone shape in normoxia and a spindle like shape in hypoxia. The cell characterization showed that cobblestone cells were positive to ECs markers while spindle like shape cells were positive to contractile SMCs markers. Moreover, after several further amplification (until 3rd passage) in hypoxic or normoxic conditions of the previously differentiated SMC, immunofluorescence studies showed that more than 80% cells continued to express SMCs markers whatever the cell environmental culture conditions with a higher contractile markers expression compared to control (aorta SMCs) signature of phenotype stability.

Conclusion/Significance: We demonstrate in this paper that in vitro culture of peripheral blood mononuclear cells with specific angiogenic growth factors under hypoxic conditions leads to SMCs differentiation into a contractile phenotype, signature of their physiological state. Moreover after amplification, the differentiated SMC did not reverse and keep their contractile phenotype after the 3rd passage performed under hypoxic and normoxic conditions. These aspects are of the highest importance for tissue engineering strategies. These results highlight also the determinant role of the tissue environment in the differentiation process of vascular progenitor cells.

Introduction

During embryogenesis, vasculogenesis is one of the first initiated processes. Conversely in the adult, the new vessels formation is initiated from the existent blood vessel ramifications. Data accumulated in recent years indicate that the circulating mononuclear cell (MNCs) fractions contain a population of bone marrow derived cells called progenitor cells that contribute to the neovascularization of injured vessels. Different authors [1–5] suggested that these progenitor cells could differentiate in the presence of different specific cytokines and angiogenic growth factors (vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet derived growth factor BB (PDGF-BB)...), into mature and functional endothelial (ECs) or vascular smooth muscle (SMCs) cells depending on the added specific growth factors. During wound healing, ischemia, vascular wall remodelling or tumour development, the formation of new blood vessels is preceded by the recruitment of MNCs at the injured sites which further promote vasculogenesis [6–9]. Various authors investigated also the role of the oxygen concentration on stem cells differentiation and it was shown that hypoxia increased the production of angiogenic growth factors such as transforming growth factor b1, PDGF-BB and VEGF [10–12]. The main physiological factors implicated in cell differentiation are angiogenic growth factors (i.e: in the tissue (hypoxia) [5]. Oxygen plays a main role in physiological and pathological states [14]; it is a potent biochemical signalling molecule with important regulation properties for cellular behaviour (migration, differentiation, proliferation...) [15–17]. However, the possible involvement of hypoxia in MNCs differentiation into SMCs has never been demonstrated and even mentioned up to now.

We hypothesized here that the only oxygen concentration tuning combined with growth factors favouring ECs differentiation (VEGF, FGF, EGF, IGF) [18] allow the differentiation of circulating progenitor cells into mature ECs or contractile SMCs, characteristic of mature vascular cells found in vivo.

We demonstrate that progenitor cells isolated from rabbit fraction cultivated onto specifically coated solid substrates (either by type I collagen: a compound of the arterial wall and known as an ideal substrate for adhesion and proliferation of vascular smooth muscle cells in vitro [2] or by a Polyelectrolyte Multilayered Film architecture which previously demonstrated an important speeding up of endothelial progenitor cells differentiation into mature and functional endothelial cells [19]) in normoxic conditions (21% O₂ atmosphere or 151 mmHg) lead to mature ECs and to SMCs when cultivated in exactly the same medium but under moderate hypoxic conditions (5% O₂ or 36 mmHg). Whereas it is well established that the culture of mature SMCs leads to a decrease of contractile markers associated with a pathological phenotype [20–22], we focused on SMCs-like cells obtained under hypoxia conditions and we checked the preservation of the contractile phenotype after further cell expansion (effect of passage number) and culture even under normoxic conditions.

These experiments demonstrate clearly the deterministic role of the oxygen content in vascular progenitor cells differentiation into mature functional cells constituting the vascular wall (media and intima).

Methods

1) Polyelectrolyte Multilayer Films (PEMs)

PEMs were built with cationic poly (allylamine hydrochloride) (PAH, MW= 70 kDa), and anionic poly(sodium-4-styrene sulfonate) (PSS, MW= 70 kDa) solutions (Sigma-Aldrich, France) as previously described [19,23]. Briefly, PEMs were prepared on glass coverslips (CML, Nemours, France) pretreated with 0.01 M SDS and 0.12 M HCl for 15 min at 100°C and then extensively rinsed with deionized water. Glass coverslips were deposited in 24- well plates (Nunc, France). PAH-(PSS-PAH)₃ films were obtained by alternated immersion of the pretreated coverslips for 10 min in polyelectrolyte solutions (300 mL) at 5 mg/mL in the presence of 10 mM Tris-(hydroxymethyl) aminoethane (Tris) and 150 mM NaCl at pH 7.4. After each deposition, the coverslips were rinsed three times during 10 min with 10 mM Tris and 150 mM NaCl at pH 7.4. All the films were sterilized for 10 min by UV light (254 nm).

2) Isolation and culture of Mononuclear Cells from peripheral blood circulation

The experimental procedures were used in accordance with the “Principle of Laboratory Animal Care and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (National Institute of Health publication No. 80–23, revised 1978). Blood (50 mL) was collected from white New Zealand rabbits (male, average weight 3–3.5 kg, CEGAV, France) carotid into

heparinised plastic syringes. Peripheral Blood Mononuclear Cells (MNCs) were isolated using a density gradient as previously described [19]. The cells were then cultivated in endothelial basal medium (EBM-2: Lonza, Belgium) supplemented with angiogenic growth factors (EGM-2-single-Quots, Lonza, Belgium). Cells were counted using Trypan Blue and were seeded at a density of 16106 cells/cm² in 24-well plates containing glass coverslips coated either by Type I collagen 1% (BD Biosciences, France) or a PEMs films, made of PSS and PAH (Sigma, France) with a final PAH-(PSS-PAH)₃ architecture corresponding to 3.5 pairs of deposited PAH/PSS layers [19]. The cultures were placed in normal cell culture incubator at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂ and 21% O₂, (O₂/CO₂ incubator, Sanyo, France). After three days, the medium was removed in order to discard unattached cells. The cells (CD34 + , CD133 +)were identified previously [19]) were then placed under hypoxia at 37°C, 5% CO₂ and 5% O₂ or under normoxia at 37°C, 5% CO₂ and 21% O₂ (control) and medium changed every two days. The differentiation and morphological evolution of the adherent cells were followed by Phase-contrast microscopy observations (Nikon DIAPHOT 300, Japan).

3) Immunostaining for smooth muscle cells (SMCs) and endothelial cells (ECs) specific markers

At confluence and after the third passage, cells were also immunolabelled against SMCs and ECs specific markers. Three antibodies were used to characterize the contractile SMCs phenotype: i) Alpha Smooth Muscle Actin (α-SMA), ii) Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SM-MHC) and iii) Calponin. Two other antibodies were used for the ECs phenotype: i) CD31 ii) von Willebrand factor (vWF) (all from Dako, France). Prior to the immunolabelling with the intracellular antibodies (α-SMA, SMMHC, Calponin and vWF), the cells were fixed with paraformaldéhyde (PAF) 4% (w/v in phosphate buffer saline) for 10 min and permeabilized with Triton X-100 0.5% (w/v in distilled water) for 15 min. For CD31 labelling the second step (permeabilization) was not performed. The cells were incubated for 45 min at 37°C with the primary monoclonal antibodies, diluted at 1/50 in RPMI 1640 without phenol red, containing bovine serum albumin (BSA 0.5%, w/v). After two washes with RPMI 1640, the secondary antibody labelled with Alexa-FluorH 488 diluted at 1/100 was incubated for 30 min at 37°C. The cells were observed by fluorescence confocal microscopy (LEICA DMIRE2 HC Fluo TCS 1-B, Germany) using the 488 nm spectral line.

4) Immunostaining for extracellular matrix (ECM) proteins

At confluence, hypoxia differentiated cells were immunostained for ECM proteins characterization via two specific proteins such as i) laminin and ii) type IV collagen. The differentiated cells were fixed with PAF 4% for 10 min and incubated for 45 min at 37°C with the primary monoclonal antibodies, diluted at 1/50 in RPMI 1640 without phenol red, containing 0.5% BSA. After two washes with RPMI 1640, the secondary antibody labelled with Alexa-Fluor 488 diluted at 1/100 was incubated for 30 min at 37°C. The cells were observed using fluorescence confocal microscopy (LEICA DMIRE2 HC Fluo TCS 1-B, Germany).

5) Evaluation of the maintenance of the SMCs phenotype

In order to check that after a first step of culture under hypoxia, the differentiation into SMCs was stable versus time, cells were further cultivated either under hypoxia or normoxia. After differentiation the confluent cells cultivated on type I collagen and PEMs were amplified and separated in two batches. The first batch was kept under hypoxic condition (37°C, 5% CO₂ and 5% O₂) whereas the second batch was placed in normoxic conditions (37°C, 5% CO₂ and 21% O₂). Cells were then cultivated in these different conditions until the third passage (P3) and mature SMCs from rabbit aorta cultivated under the same conditions were used as control.

6) Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

FACS analyses (EPICS XL, Beckman Coulter, France) were performed to quantify the percentage of positive cells and the fluorescence intensity of the specific contractile markers expressed by the differentiated SMCs. After P3, FACS was performed to identify intracellular antigens in cells. For that, trypsinized differentiated cells were labelled as previously described. The non-specific binding was evaluated by the incubation of cells only with the second antibody. Within the differentiated cell area, as determined by forward and sideward scattering, 10,000 events were collected and the percentage of positive cells and the mean fluorescence intensity (MFI) were determined.

7) Statistics

The data were expressed as mean ± standard error of the mean (s.e.m.) for each condition. Each experiment was repeated in triplicate independently three times. Mean values were

compared with the unpaired t-test (Statview IV, Abacus Concepts Inc, Berkley, CA, USA), in which p represents the rejection level of the null-hypothesis of equal means.

Results and Discussion

Peripheral blood mononuclear cells (MNCs) fraction containing progenitor cells was isolated and seeded in 24-well plates containing glass coverslips coated with type I collagen or with a Polyelectrolyte Multilayer Film (PEMs) at 1×10^6 cells/cm². We used type I collagen known as an ideal substrate for vascular progenitor cells culture [2] and PEMs for their high potentialities to boost progenitor cell differentiation [19]. After 4 days of culture in normoxic conditions, unattached cells were removed and the adherent cells (CD34 + , CD133 +) were divided in two fractions and placed under hypoxia (5% CO₂ and 5% O₂) or normoxia (5% CO₂ and 21% O₂) until confluence (between 2 and 4 weeks). At confluence and for both surface types, the phase-contrast microscopy cell observation showed cobblestone morphology in normoxic conditions (Figure 1A, 1C) and a spindle like morphology in hypoxic conditions (Figure 1B, 1D).

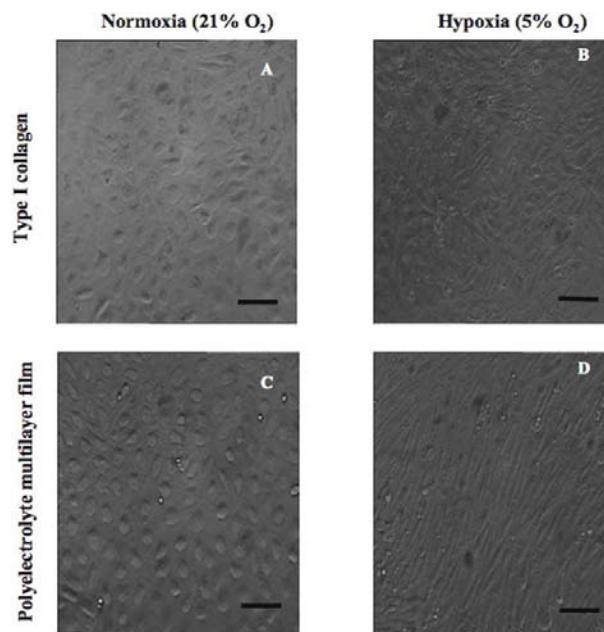


Figure 1: Morphological aspect of differentiated cell. Optical phase contrast microscopy visualization of differentiated cells seeded on type I collagen (A, B) and polyelectrolyte multilayer films (PEMs) (C, D) until confluence under normoxic (A, C) and hypoxic (B, D) environment. Objective620, scale bar 55 mm. The morphological examination of the confluent cells showed cobblestone shape (A, C) in normoxia and a spindle like (B, D) shape in hypoxia.

In order to evaluate the cell phenotype of differentiated cells, we checked the expression of specific markers of vascular cells (SMCs and ECs) i.e. alpha-Smooth Muscle Actin (α-SMA), Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SM-MHC) and Calponin known to

assess vascular SMCs differentiation and their contractile function [2,24,25] and CD31 and von Willebrand Factor (vWF) for the ECs phenotype evaluation [26,27]. As expected under normoxic conditions, the confocal microscopy observations showed the presence of positive cells for ECs markers [Figure 2A and 2E (for type I collagen coating), 2C and 2G (for PEMs coating)] and negative cells for SMCs markers [Figure 2I, 2M and 2Q (for type I collagen), 2K, 2O and 2S (for PEMs)]. Under hypoxia a surprising positive expression of SMCs markers was observed [Figure 2J, 2N and 2R (for type I collagen), 2L, 2P and 2T (for PEMs)]. No expression of ECs markers was noticed under this condition whatever the surface coating [Figure 2B and 2F (for Type I collagen), Figure 2D and 2H (for PEMs)] indicating thus a total absence of cellular differentiation into ECs at a low concentration of O₂. All these observations constitute a signature for the progenitor cells switching into SMCs phenotype. These results suggest first the potentiality of MNCs cells to differentiate into a SMCs phenotype under a hypoxic environment and second the expression of the specific markers confirmed the contractile phenotype of these cells [28] (similar to SMCs *in vivo*). In the literature the hematopoietic stem cells differentiation into mature and functional SMCs requires the culture medium supplementation with specific growth factors, especially PDGF-BB [2,3]. Our results demonstrate that the oxygen concentration tuning alone allows phenotype switch either to endothelial cells or smooth muscle cells.

The extracellular matrix (ECM) contributes to the control of the cellular function and is involved in maintaining the cells in a differentiated state [29,30]. During blood vessel formation the SMCs are responsible for extracellular matrix formation via protein (fibronectin, laminin, collagens...) secretion [31]. The ECM deposition contributes *in vivo* and *in vitro* (tissue engineering approach) to arterial wall constitution and cell function via different signalling pathways (kinase pathways activation) [31,32]. We investigated the capacity of the differentiated cells under hypoxic conditions to synthesize their own ECM, and we evaluated the secretion of two extracellular proteins (Laminin and type IV collagen), which play a major role in ECM synthesis and contribute to maintain the contractile phenotype of the differentiated cells [31]. Confocal microscopy observations showed the deposition of both of these proteins. The comparison between both surfaces showed moreover a stronger synthesis of ECM by the cells cultivated on PEMs (Figure 3). These data obtained under hypoxic conditions confirmed the capacity of MNCs to differentiate into SMCs, exhibiting a contractile phenotype, sign of a correct physiological state and integrity of the ECM. This integrity plays a key role to maintain this state and suggests stability over longer time periods.

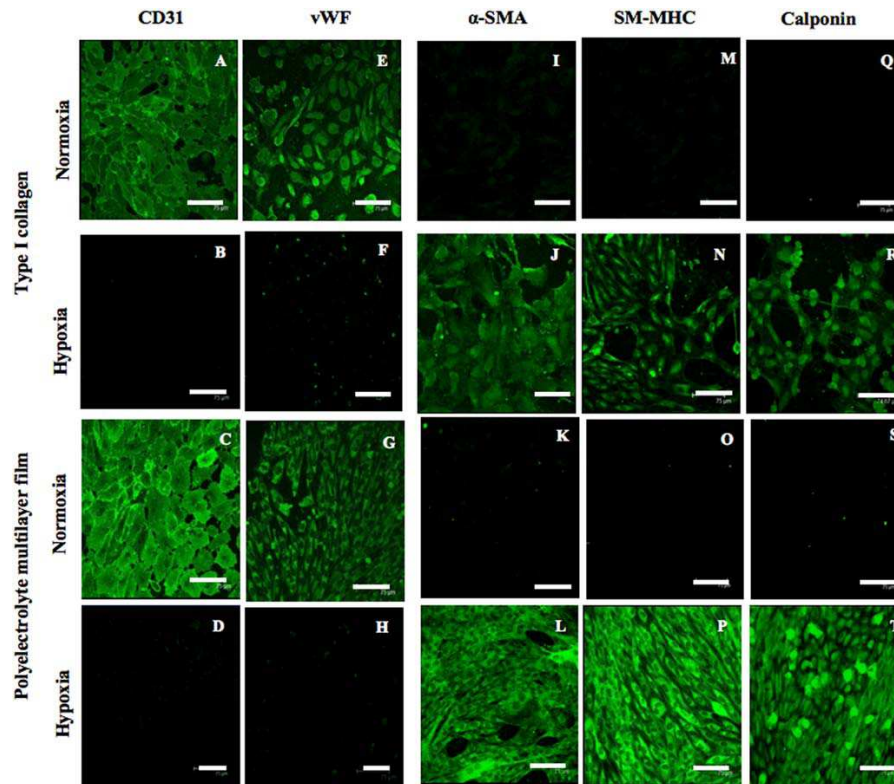


Figure 2: Vascular cell phenotype characterization. The endothelial cell were characterized by the expression of specific markers: CD31 (A–D) and von Willebrand Factor (E–H) and the smooth muscle cells by the expression of contractile markers: α -Smooth Muscle Actin (α -SMA: E–H), Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SM-MHC: I–L) and Calponin (M–P). Images were obtained by confocal microscopy observation at cell confluence on both coated surfaces (type I collagen and Polyelectrolyte Multilayer films (PEMs)) and cultivated under normoxic and hypoxic conditions. Objective x40, NA = 0.8, scale bars 75 μ m. The figure showed the positive expression of specific ECs markers for cell differentiated under normoxic environment and positive expression of specific contractile SMCs markers for cell differentiated under hypoxic environment.

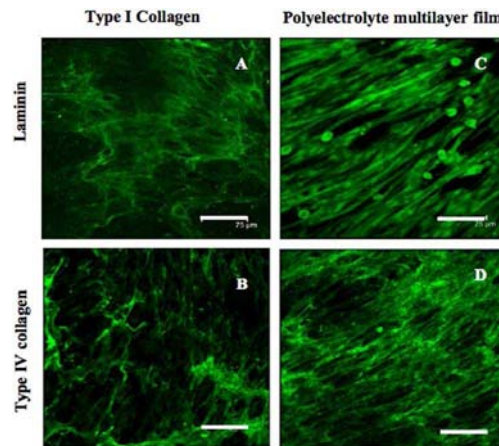


Figure 3: Extracellular matrix synthesis. The confocal microscopy observations of Extracellular matrix protein: laminin (A, B) and type IV collagen (C, D) of cells seeded on both coated surfaces (type I collagen and Polyelectrolyte Multilayer films (PEMs)). Objective 640, NA = 0.8, scale bars 75 μ m.

The phenotype stability over a longer time period of the SMCs derived from MNCs cultivated under hypoxia is a major issue to use this route in tissue engineering for example. The SMCs phenotype stability was investigated at low or high oxygen concentration. After

the first passage of hypoxic differentiated cells (cells positive to SMCs markers), the obtained cells were expanded under two conditions. For the first assay we maintained cells under hypoxic condition and for the second assay we placed cells in normoxic condition. In order to check the stability of the SMCs phenotype under these conditions, several passages (P3) were performed. Whatever the experimental condition (hypoxic and normoxic conditions) we never detected ECs markers (data not shown).

Under hypoxia the cell characterization showed the positive staining for SMCs markers with a regular cytosolic distribution of all observed SMCs markers (Figure 4A) for both coating types (Type I collagen and PEMs). These data were correlated with FACS analyses which indicated that, after the third passage, more than 80% of cells were positive for both surfaces (Figure 4B). We compared moreover the Mean Fluorescence Intensity (MFI) of SMCs contractile markers expression of the differentiated cells with mature SMCs extracted from rabbit aorta and cultivated in the same medium in normoxic and hypoxic conditions. Mature SMCs were cultivated on the usually employed tissue culture plastic surface (TCPS) [33] showing no difference with a control performed on type I collagen and PEMs. The expression of α -SMA, SM-MHC and calponin for cells cultivated on both Type I collagen and PEM coated surfaces was significantly higher for the differentiated cells compared to mature SMCs, although less important on the collagen coated surface for α -SMA.

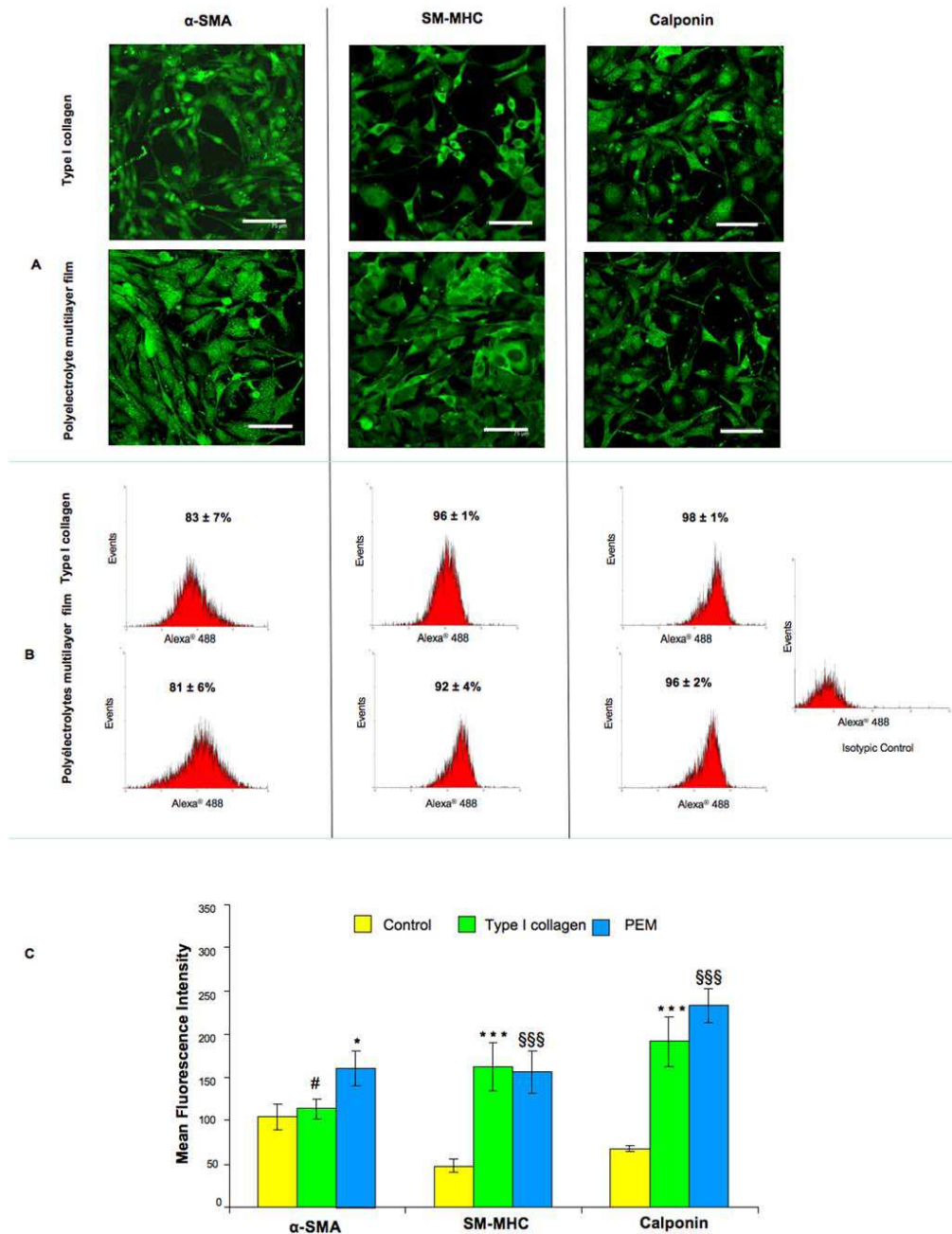


Figure 4: Phenotype stability under hypoxia. After the third passage, the smooth muscle cells phenotype stability of differentiated cell cultivated under hypoxic conditions was investigated by confocal microscopy observation (A) and flow cytometry analyses (B, C). A: Confocal microscopic observations showed positive cells for contractile markers: α- Smooth Muscle Actin (α-SMA), Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SMMHC) and Calponin confluence on both coated surfaces (type I collagen and Polyelectrolyte Multilayer films (PEMs)). Objective x40, NA = 0.8, scale bars 75 mm. B: Flow cytometry showed that more than 80% cells expressed SMCs markers. C: Mean fluorescence intensity analyses showed a higher SMCs contractile markers expression for differentiated cells compared to control (mature SMCs) whatever the surface coating. (1)PEMs versus control, (*) Collagen versus control, (#) PEMs versus collagen. (1,* and #: p,0.05 and 111 and ***: p,0.001).

Under normoxic conditions, the expanded cells were also qualitatively and quantitatively characterized by confocal microscopy observations and by FACS analyses. As for hypoxic conditions, the visualized cells were positive for SMCs contractile markers with

again a regular cytoplasmic distribution (Figure 5A). FACS analyses showed also that more than 80% of differentiated cells were positive to SMCs contractile markers (Figure 5B). The MFI of contractile markers for differentiated cells was significantly higher than for mature SMCs for both surfaces coating and with no differences for differentiated cells cultivated on type I collagen and PEMs coated surfaces (Figure 5C). It is also important to state that no significant difference was found in the expression of the three contractile markers once comparing the data obtained in hypoxic and normoxic conditions. It is well known that *in vitro* mature SMCs extracted from vessels switch their phenotype from a contractile (healthy) to a proliferative (pathological) phenotype [34,35]. This switch constitutes a strong limitation for blood vessel tissue engineering. The present differentiation approach allowed us to obtain a “healthy” phenotype of SMCs which could constitute an alternative for vascular tissue engineering. We observed effectively a quite stronger expression of the contractile markers for the differentiated cells compared to mature SMCs. In a different context (in particular during vascular wall remodelling after bypass surgery) a reduced tissue oxygenation together with the presence of inflammatory cells could be at the origin of vascular wall recolonization by SMCs, the origin of which was not elucidated up to now [9,36–38].

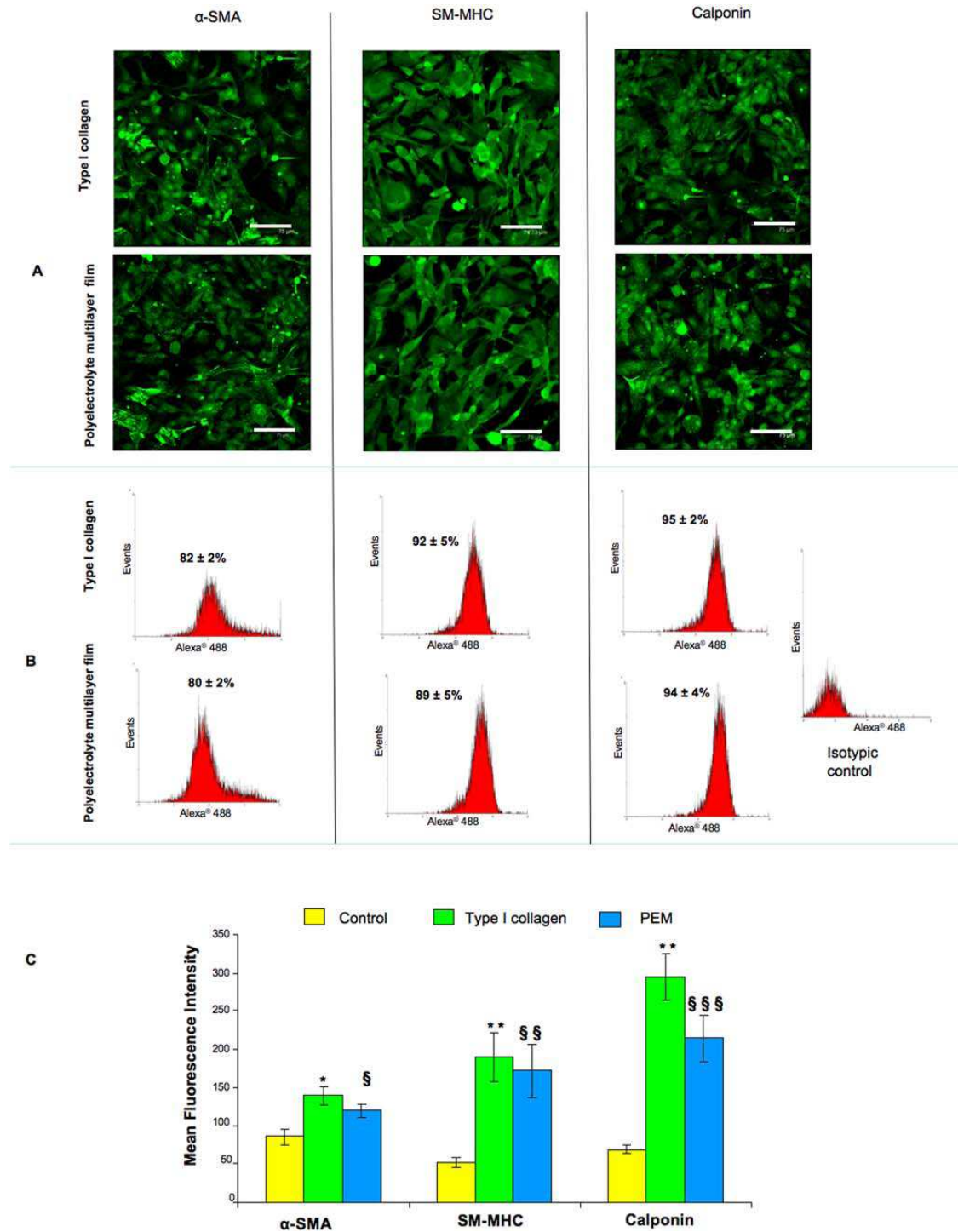


Figure 5: Phenotype stability under normoxia. After the third passage, the smooth muscle cells phenotype stability of differentiated cell cultivated under normoxic conditions was investigated by confocal microscopy observation (A) and flow cytometry analyses (B, C). A: Microscopical observations show positive cells for contractile markers: α- Smooth Muscle Actin (α-SMA), Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SM-MHC) and Calponin confluence on both coated surfaces (type I collagen and Polyelectrolyte Multilayer films (PEMs)). Objective640, NA = 0.8, scale bars 75 mm.

B: Flow cytometry showed that about 90% cells expressed SMCs markers. C: Mean fluorescence intensity analyses showed a higher SMCs contractile markers expression for differentiated cells compared to control (mature SMCs) whatever the surface coating. (1) PEMs versus control, (*) Collagen versus control. (1 and *: p,0.05, 11 and **: p,0.01, and *** p,0.001).

To conclude we demonstrated that progenitor cells cultivated in hypoxic conditions and without specific growth factor enhancing SMCs differentiation displayed morphological and phenotypic properties of SMCs as showed by the expression of SMCs contractile markers. Moreover, these differentiated SMCs maintained their contractile phenotype when replaced in normoxic conditions suggesting that these cells developed a stable and functional phenotype comparable to physiological SMCs found in functional blood vessels. These results highlight the crucial role of the tissue environment and especially the O₂ content in the differentiation process of vascular progenitor cells. These observations combined with previous ones [19] could constitute a basis for tissue engineering and clinical application strategies for in vitro tissue reconstruction. For example in vascular tissue engineering, starting from an unique peripheral blood sample cultivated on PEM and with the same culture media, but in normoxic or in hypoxic conditions either mature ECs (21% O₂) or contractile SMCs (5% O₂) can be obtained in less than one month. The different layers (media and intima) could be associated to build for example a natural a natural and autologous vascular graft.

Acknowledgments

The authors thank Pr. Pierre Labrude, Dr. Dominique Dumas, Dr. Huguette Louis and Monique Gentils for their technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NB HK PS PL JFS JCV PM.

Performed the experiments: NB HK CPM.

Analyzed the data: NB HK PSCPM PL JCV PM.

Contributed reagents/materials/analysis tools: JFS, PM.

Wrote the paper: NB HK PS JCV PM.

References

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, et al. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964–967.
2. Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM (2002) Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 106: 1199–1204.
3. Xie SZ, Fang NT, Liu S, Zhou P, Zhang Y, et al. (2008) Differentiation of smooth muscle progenitor cells in peripheral blood and its application in tissue engineered blood vessels. *J Zhejiang Univ Sci B* 9: 923–930.
4. Liu JY, Swartz DD, Peng HF, Gugino SF, Russell JA, et al. (2007) Functional tissue-engineered blood vessels from bone marrow progenitor cells. *Cardiovasc Res* 75: 618–628.
5. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Koerberling M, Willerson JT, et al. (2003) Transdifferentiation of human peripheral blood CD34⁺-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation* 108: 2070–2073.
6. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, et al. (1999) Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5: 434–438.
7. Davie NJ, Crossno JT Jr, Frid MG, Hofmeister SE, Reeves JT, et al. (2004) Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L668–L678.
8. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG (2006) Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res* 99: 675–691.
9. Kerdjoudj H, Berthelemy N, Rinckenbach S, Kearney-Schwartz A, Montagne K, et al. (2008) Small vessel replacement by human umbilical arteries with polyelectrolyte film-treated arteries: in vivo behavior. *J Am Coll Cardiol* 52: 1589–1597.
10. Falanga V, Qian SW, Danielpour D, Katz MH, Roberts AB, et al. (1991) Hypoxia upregulates the synthesis of TGF-beta 1 by human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 97: 634–637.
11. Payne TR, Oshima H, Okada M, Momoi N, Tobita K, et al. (2007) A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts. *J Am Coll Cardiol* 50: 1677–1684.
12. Cramer T, Schipani E, Johnson RS, Swoboda B, Pfander D (2004) Expression of VEGF isoforms by epiphyseal chondrocytes during low-oxygen tension is HIF-1 alpha dependent. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 433–439.
13. Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49: 507–521.
14. Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T (2006) Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 207: 331–339.
15. Malda J, Klein TJ, Upton Z (2007) The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues. *Tissue Eng* 13: 2153–2162.
16. Simon MC, Keith B (2008) The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 285–96.
17. Gerasimovskaya EV, Woodward HN, Tucker DA, Stenmark KR (2008) Extracellular ATP is a pro-angiogenic factor for pulmonary artery vasa vasorum endothelial cells. *Angiogenesis* 11: 169–182.
18. Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, et al. (2003) Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 108: 2710–2715.

19. Berthelemy N, Kerdjoudj H, Gaucher C, Schaaf P, Stoltz JF, et al. (2008) Polyelectrolyte Films boost Progenitor Cell Differentiation into Endothelium-like Monolayers. *Adv Mater* 20: 2674–2678.
20. Reusch P, Wagdy H, Reusch R, Wilson E, Ives HE (1996) Mechanical strain increases smooth muscle and decreases non-muscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 79: 1046–1053.
21. Rovner AS, Murphy RA, Owens GK (1986) Expression of smooth muscle and non-smooth muscle myosin heavy chains in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 261: 740–745.
22. Muto A, Fitzgerald TN, Pimiento JM, Maloney SP, Teso D, et al. (2007) Smooth muscle cell signal transduction: implications of vascular biology for vascular surgeons. *J Vasc Surg* 45: A15–24.
23. Kerdjoudj H, Boura C, Moby V, Montagne K, Schaaf P, et al. (2007) Reendothelialization of Human Umbilical Arteries Treated with Polyelectrolyte Multilayers: A Tool for Damaged Vessel Replacement. *Adv Func Mater* 17: 2667–2673.
24. Babu GJ, Pyne GJ, Zhou Y, Okwuchukwasanya C, Brayden JE, et al. (2004) Isoform switching from SM-B to SM-A myosin results in decreased contractility and altered expression of thin filament regulatory proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: 723–729.
25. Li S, Fan YS, Chow LH, Van Den Diepstraten C, van Der Veer E, et al. (2001) Innate diversity of adult human arterial smooth muscle cells: cloning of distinct subtypes from the internal thoracic artery. *Circ Res* 89: 517–525.
26. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC 2nd, Lyman S, et al. (1990) PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247: 1219–1222.
27. Meyer D, Pie´tu G, Fressinaud E, Girma JP (1991) von Willebrand factor: structure and function. *Mayo Clin Proc* 66: 516–523.
28. Owens GK (1995) Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 75: 487–517.
29. Ingber DE, Dike L, Hansen L, Karp S, Liley H, et al. (1994) Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis. *Int Rev Cytol* 150: 173–224.
30. Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH (1987) The influence of extracellular matrix on gene expression: is structure the message? *J Cell Sci* 8: 327–343.
31. Rzucidlo EM, Martin KA, Powell RJ (2007) Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg* 45: 25–32.
32. Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Davis GE, et al. (2001) Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1427–H1433.
33. L’Heureux N, Stoclet JC, Auger FA, Lagaud GJ, Germain L, et al. (2001) A human tissue-engineered vascular media: a new model for pharmacological studies of contractile responses. *FASEB J* 15: 515–24.
34. Cha JM, Park SN, Noh SH, Suh H (2005) Time-dependent modulation of alignment and differentiation of smooth muscle cells seeded on a porous substrate undergoing cyclic mechanical strain. *Artif Organs* 30: 250–258.
35. Bach AD, Stem-Straeter J, Beier JP, Bannasch H, Stark GB (2003) Engineering of muscle tissue. *Clin Plast Surg* 30: 589–599.
36. Chaouat M, Le Visage C, Autissier A, Chaubet F, Letourneur D (2006) The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats. *Biomaterials* 27: 5546–5553.

37. Mellander S, Fogelstrand P, Enocson K, Johansson BR, Mattsson E (2005) Healing of PTFE grafts in a pig model recruit neointimal cells from different sources and do not endothelialize. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 30: 63–70.
38. L'Heureux N, Dusserre N, König G, Victor B, Keire P (2006) Human tissue engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med* 12: 361–365.

O2 Controls Progenitor Cells

PLoS ONE | www.plosone.org 9 May 2009 | Volume 4 | Issue 5 | e5514

II.3. Résumé des résultats

Pour cette étude nous avons émis l'hypothèse que des variations de la concentration d'oxygène environnant, associées aux facteurs de croissance angiogéniques habituels, permettent la différenciation de progéniteurs vasculaires en CE matures ou en CML matures.

Après 14 jours de culture dont 11 en hypoxie (5%CO₂, 5%O₂), les cellules forment une monocouche. Contrairement à la monocouche obtenue en normoxie (5% CO₂, 21% O₂) décrite précédemment, les cellules cultivées sur les multicouches et différenciées dans les conditions hypoxiques (5% CO₂, 5% O₂), forment une monocouche de cellules fusiformes (Figure 1).

Cependant, à la suite des premières expériences effectuées, il nous est apparu que ces cellules étaient négatives pour les différents marqueurs endothéliaux étudiés (CD31 et vWF), contrairement à celles cultivées dans les conditions habituelles (normoxie 5% CO₂, 21%O₂).

Nous nous sommes alors intéressés aux résultats publiés dans le *Journal of American College of Cardiology* (Kerdjoudj et al 2008) et à l'origine des CML obtenues après 12 semaines d'implantation au niveau de la média des greffons vasculaires. Lors des expériences suivantes nous avons décidé de vérifier le phénotype musculaire des cellules obtenues en hypoxie en nous focalisant plus particulièrement sur l'expression d' α -actine (α -SMA), de chaîne lourde de la myosine (SM-MHC) et de calponine qui sont trois marqueurs spécifiques des CML matures fonctionnelles retrouvées *in vivo* (Figure 2).

Les résultats ont non seulement confirmé que ces cellules exprimaient les différents marqueurs des CML différenciées, mais aussi que ces cellules présentaient un phénotype stable après amplification (passage 3) (Figure 4). De plus, un retour en conditions normoxiques ne semble pas altérer le phénotype du muscle lisse car ces cellules ne se dédifférencient pas comme habituellement observé pour des CML matures issues d'artères natives (Figure 5). Il est également important de noter que le milieu de culture utilisé est

identique tout au long des expériences menées au cours de cette thèse. Ce milieu complémenté en facteurs de croissance angiogéniques, favorise la différenciation vers un phénotype endothélial, notamment du à la présence de VEGF. Aucune autre supplémentation en divers facteurs de croissance favorisant la différenciation en CML n'a été effectuée, la seule différence au niveau des conditions de culture réside dans la diminution de la concentration en oxygène du milieu environnant.

L'ensemble de ces travaux a permis de montrer que l'oxygène joue un rôle primordial dans la différenciation cellulaire vers l'une des deux lignées. Ces résultats pourront donc être d'un intérêt majeur en ingénierie vasculaire pour le développement de greffons totalement autologues comprenant des CE et des CML issues de la différenciation de cellules progénitrices d'un même lot. Afin d'obtenir un substitut vasculaire totalement autologue, un modèle récemment imaginé par L'Heureux et ses collaborateurs (L'Heureux et al, 2006) a été développé à partir de biopsie de peau. Ce substitut vasculaire est construit à partir d'une méthode d'assemblage de feuillets cellulaires. Chacun des feuillets composant le vaisseau est cultivé à partir de tissus humains. L'inconvénient de cette approche est de nécessiter au préalable, une chirurgie pour recueillir des cellules vasculaires matures, ce qui est une restriction majeure. De plus, le temps de maturation d'un tel substitut est très long (plus de 2 mois) ce qui limite son utilisation dans les situations d'urgence.

A l'issue de ces deux études, nous avons réussi à développer deux points forts dans la construction de substituts vasculaires naturels et autologues. D'une part, l'accélération du développement et de la différenciation des cellules progénitrices sur le film multicouches de polyélectrolytes, et d'autre part les conditions de culture permettant d'obtenir soit de CE, soit des CML. Cependant une limite doit être levée pour poursuivre le développement d'un tel substitut. Celle-ci concerne l'adhérence trop forte des cellules différenciées sur le film de polyélectrolytes. Afin de pouvoir détacher le feuillet cellulaire (sans dissociation de celui-ci) de son support de culture, une modification de notre protocole a été nécessaire.

L'objectif majeur de ce projet consiste à développer un film multicouches "détachable" de son support de construction et permettre ainsi la récupération du feuillet cellulaire avant de l'organiser en structure tubulaire.

Ce projet a donné lieu à un financement du CNRS. Nous le présentons ici ainsi que les récents résultats obtenus.

III. Programme interdisciplinaire -CNRS

Interface physique-chimie-biologie

Titre bref du Projet : VAISSEAU IN SITU

Titre long du Projet :

Construction *in situ* d'un vaisseau sanguin par ingénierie tissulaire basée sur les propriétés remarquables des multicouches de polyélectrolytes de type PSS/PAH quant à la culture et la différenciation de cellules souches en cellules musculaires lisses et cellules endothéliales.

III.1.Objectif du Projet et stratégie utilisée :

Notre projet a pour objectif de construire *in vitro* un vaisseau sanguin à partir de cellules souches autologues circulantes. Ce projet de recherche comporte deux grandes parties: (i) la mise au point de multicouches de type PSS/PAH détachables qui sera abordée par des approches physico-chimiques ; (ii) la culture de monocouches de cellules musculaires lisses sur ces supports, détachement de ces feuillets cellulaires, agencement et maturation de ces feuillets autour d'un cylindre, première étape vers le vaisseau.

i) Conception des films multicouches de polyélectrolytes détachables :

Les multicouches de type PSS/PAH, se terminant par PAH, semblent idéales pour la culture de monocouches de cellules endothéliales et musculaires lisses à partir de cellules progénitrices de cellules endothéliales circulantes. Afin de pouvoir détacher ces multicouches de leur support de dépôt, nous proposons de les construire sur une couche d'alginate permettant un détachement aisé de la surface culture.

ii) Culture cellulaire, détachement de feuillets mono-cellulaires et assemblage en structures 3D.

Les supports recouverts par de l'alginate puis par le film multicouches de type PSS/PAH serontensemencés par des cellules souches (progénitrices) issues de la circulation sanguine. Elles seront cultivées et différenciées selon la concentration ambiante en oxygène en cellules vasculaires matures (en cellules endothéliales lorsque les cellules sont cultivées en normoxie ou en cellules musculaires lisses lorsque les cellules sont cultivées en hypoxie).

Dans le cas de cellules différenciées en cellules musculaires lisses, nous attendrons la formation d'un feuillet mono-cellulaire avant son détachement en présence d'un agent réducteur (environ 14 jours après le début de la culture). Ce feuillet de cellules musculaires lisses, une fois détaché, sera enroulé autour d'un mandrin (tige en Téflon dont le diamètre ne dépassera pas 3mm). Ceci nous permettra de construire la média. Après maturation et consolidation de la média (estimé à environ une semaine) le mandrin est enlevé, conduisant à une structure cylindrique cellularisée, point de départ du vaisseau. Une autre fraction des cellules souches sera différenciée en cellules endothéliales que nous essaierons de détacher après 10 jours de culture, donc avant d'arriver à confluence. L'objectif est ainsi de préparer des cellules endothéliales que l'on pourra ensemer sur les parois internes des cylindres constitués des feuillets de cellules musculaires lisses enroulés afin de les rendre non thrombogéniques.

III.2. Difficultés du projet et prises de risques

Les difficultés attendues du projet sont les suivantes :

- les multicouches de type PSS/PAH sont des supports idéaux pour la culture des feuillets de cellules musculaires lisses et de cellules endothéliales. Les raisons en sont encore inconnues mais on peut penser que la charge de surface ainsi que les propriétés mécaniques du film en sont largement responsables.
- nous n'avons aucune expérience dans le domaine des multicouches dégradables et en particulier nous ne savons pas si les couches de PSS/PAH seront perméables. Ce projet nous permettra d'acquérir un savoir-faire dans ce domaine aux applications qui dépassent le cadre de ce projet (délivrance de médicaments...)
- **enfin, aucune des équipes ne possède une expérience dans la récupération de feuillets cellulaires à grande échelle, quelques millimètres, et surtout dans leur utilisation pour construire des structures 3D comme les cylindres. Ce projet nous permettra d'acquérir un nouveau savoir-faire, indispensable pour l'ingénierie tissulaire vasculaire.**

III.3. Avantages de notre substitut

Les avantages de notre substitut sont nombreux :

- l'obtention de cellules autologues du patient sans avoir recours à la chirurgie. En effet les progéniteurs étant disponibles dans la circulation sanguine, un simple prélèvement sanguin (environ 50 mL) suffira à obtenir les deux types de cellules ;
- l'utilisation d'un seul milieu de culture pour l'obtention des deux types cellulaires simplifie la procédure de caractérisation des milieux du point de vue d'application clinique ;
- l'accélération de la différenciation cellulaire sur les films multicouches de polyélectrolytes réduit le temps d'obtention du bio-vaisseau qui est estimé à 1 mois ;
- la construction d'un substitut vasculaire cellularisé autologue de petit diamètre.

III.4. Résultats préliminaires

Ces travaux se sont divisés en plusieurs étapes indispensables pour la mise au point de ce substitut autologue. Nous avons tout d'abord voulu savoir si le détachement des feuillets à base d'alginate recouvert par le film de polyélectrolytes de type PSS/PAH (sans cellules) était possible. Pour cela, nous avons effectué des essais préliminaires en utilisant de l'alginate à viscosité faible, recouvert par sept couches de PSS/PAH. Ces premiers essais n'ont pas permis le détachement du feuillet de la surface de culture (lame de verre), en raison de la faible viscosité de l'alginate qui se désagrège au cours du détachement et qui ne permettait donc pas l'obtention d'un feuillet uniforme.

Nous avons alors décidé d'utiliser de l'alginate avec une viscosité plus importante (viscosité moyenne), recouvert une nouvelle fois par sept couches de PSS/PAH. Les résultats montrent un parfait recouvrement de la surface de culture. La viscosité de l'alginate étant plus importante, il a été possible de détacher l'ensemble du support de culture (lame de verre) et de l'enrouler autour d'un support cylindrique (Figure 14).

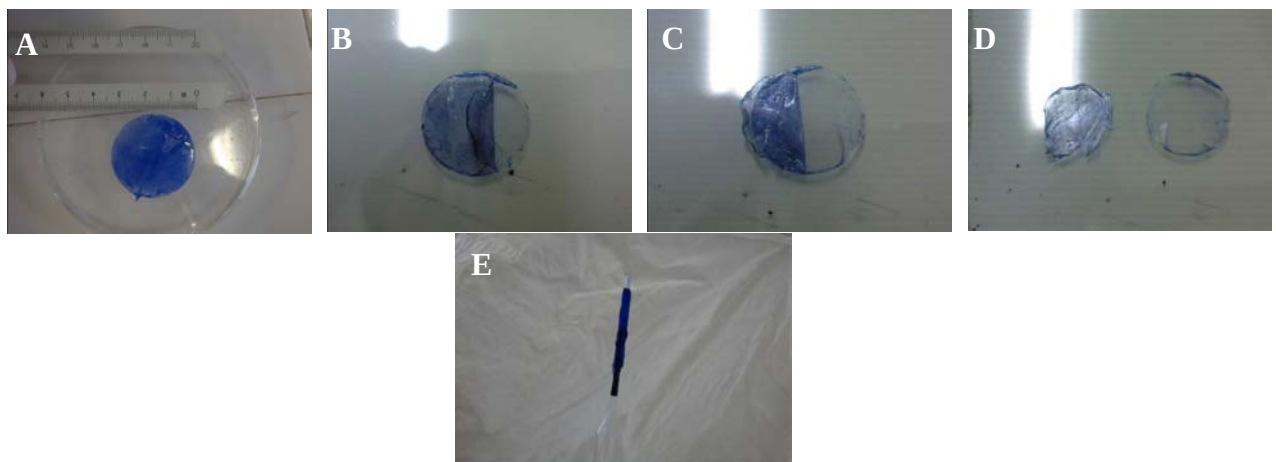


Figure 14 : dépôt de l'alginate recouvert par le film de polyélectrolytes sur une lame de verre (A), coloration au bleu de trypan. Détachement (B-D) et enroulement autour d'un mandrin en verre (E).

Nous avons ensuiteensemencé des CML matures issues d’aorte de lapin sur ce support d’alginate recouvert par le film de polyélectrolytes (PAH/PSS)₃- PAH afin de vérifier la possibilité de cultiver des cellules sur ce support. Des supports d’alginate seuls ont été utilisés comme témoins négatifs et le TCPS comme témoin positif (Figure 15).

Les résultats montrent une absence de développement cellulaire sur l’alginate seul, alors que sur l’alginate+film de polyélectrolytes, le développement cellulaire est identique à celui observé sur le TCPS.

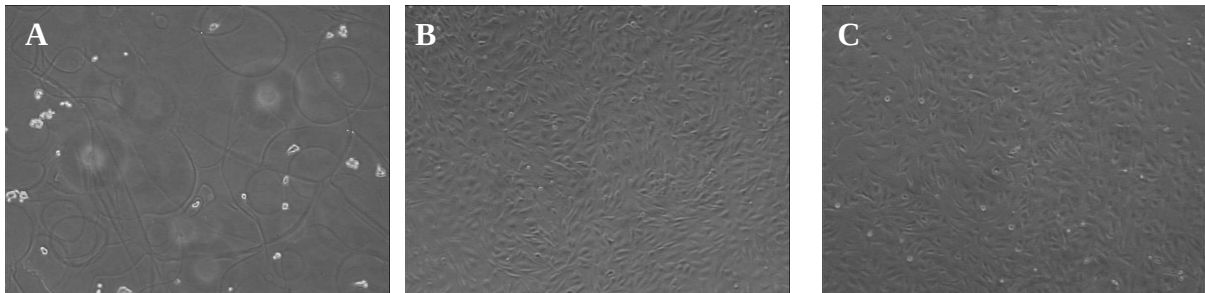


Figure 15 : observation en microscopie à contraste de phase de CML ensemencées sur les différents supports : A) alginate, B) alginate+film (PAH/PSS)₃- PAH, et C) TCPS

Pour finir, les observations effectuées en microscopie confocale ont permis de s’assurer de l’expression de différents marqueurs spécifiques aux CML (α -actine et SM-MHC) sur l’alginate+film (Figure 16).

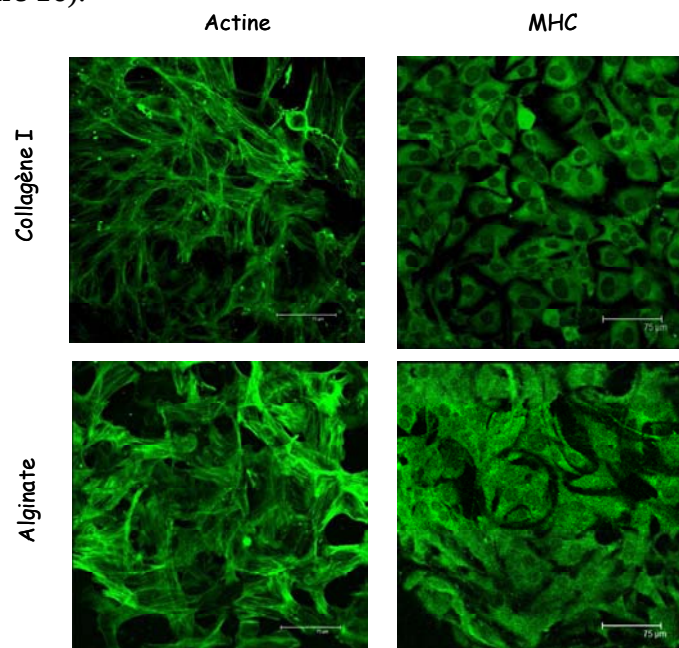


Figure 16: observation en microscopie confocale des marqueurs des CML (α -actine et MHC) sur l’alginate+film de polyélectrolytes et sur collagène

III.5. Conclusion et perspectives du projet

Les résultats préliminaires très encourageants de ce projet montrent la possibilité d'utiliser l'alginate et les films multicouches de polyélectrolytes pour la construction *in vitro* d'un vaisseau. Cependant de nombreux travaux restent à réaliser. Il va être nécessaire de cultiver les CML sur ces supports, de détacher l'ensemble et de l'enrouler autour d'un mandrin afin d'obtenir une structure cylindrique qui formera la paroi du vaisseau. Il sera également nécessaire d'ensemencer des CE à l'intérieur du cylindre afin de lui conférer une surface non thrombogène. Par la suite, l'ensemble de cette construction sera placé dans un bioréacteur permettant de reproduire les contraintes mécaniques appliquées aux vaisseaux natifs (contraintes de cisaillement et d'étirement) pour en évaluer le comportement et l'orientation cellulaire. Il sera également important d'étudier les caractéristiques mécaniques de ce vaisseau par des mesures de son élasticité et de sa compliance.

CONCLUSION GENERALE

Les pathologies cardiovasculaires devraient considérablement augmenter au cours des prochaines décennies, ce qui va entraîner de la part des chirurgiens vasculaires, une demande importante en substituts vasculaires, surtout de petit calibre.

Ces substituts doivent répondre à un cahier des charges très strictes. En plus d'être biocompatibles, ces derniers doivent posséder d'une surface luminale non thrombogénique, inhiber la prolifération des CML, avoir de bonnes propriétés mécaniques et une bonne résistance à la suture.

L'obtention d'une surface non thrombogène représente une limite majeure dans l'élaboration de tels substituts. Leur endothélialisation demande une modification de la surface interne afin de permettre une rétention optimale des CE. Les principales modifications de surface réalisées sur des greffons destinés à la clinique ont mis en œuvre des dérivés sanguins de type « colle de fibrine », fibronectine ou héparine. Cependant, ces dérivés biologiques quoique indispensables pour une meilleure adhésion cellulaire, peuvent entre autre être responsables d'accidents immunologiques et infectieux.

Il a été montré qu'un endothélium confluent est un élément primordial dans la prévention de l'initiation et de la progression du processus d'occlusion du substitut. Les techniques de colonisation cellulaire utilisent des CE extraites des vaisseaux des patients. Malheureusement, les personnes malades ne disposent souvent plus de vaisseaux de bonne qualité susceptibles d'être prélevés pour en récupérer les CE. De plus, les CE amplifiées *in vitro* ont un potentiel de prolifération diminué et peuvent même subir une dédifférenciation au cours de la culture.

Les études précédemment menées au laboratoire ont montré que des CE matures issues de cordon ombilical humainensemencées sur des prothèses vasculaires synthétiques et naturelles fonctionnalisées par un nouveau type de modification de surface, les films multicouches de polyelectrolytes, proliféraient et adhéraient pour donner un tapis confluent de CE matures après seulement quelques jours de culture.

Cependant, dans ces études, les cellules sont matures et donc susceptibles de présenter les inconvénients décrits précédemment en terme de quantité et de qualité, ce qui restreint leur champ d'application en ingénierie cellulaire. Nous nous sommes donc intéressés aux cellules souches et plus précisément les progéniteurs endothéliaux (EPC), présents dans la circulation sanguine et qui possèdent un potentiel de prolifération élevé comparé à celui des CE matures.

Notre travail de thèse avait donc pour finalité de vérifier le comportement des EPC directement ensemencés sur le film multicouches de polyélectrolytes (PAH/PSS)₃-PAH dans différentes conditions.

Nous avons montré, dans la première partie de ce travail, que le support sur lequel se développe les cellules n'est pas anodin et que son choix était un gage de réussite. Nos travaux font ressortir une meilleure prolifération cellulaire sur les films tout en favorisant la différenciation des EPC en CE matures en 14 jours seulement au lieu de 60 sur des supports conventionnels comme la fibronectine ou le collagène. Nous n'avons pas cherché, à ce jour, d'explications moléculaires ou mécanistique. Cependant, nous pouvons avancer l'hypothèse d'une meilleure compliance de la surface de culture. En effet, son recouvrement par le film (PAH/PSS)₃-PAH va assurer une cohérence et une rigidité à la surface du support, ce qui semble très appréciée par les cellules car leur encre en est facilité, favorise leur adhésion et accélère ainsi leur différenciation en CE.

Les nombreux avantages apportés par les films de polyélectrolytes en terme de différenciation sont cependant contrastés par un problème de détachement cellulaire. En effet, une fois différenciées sur les films de polyélectrolytes, il nous a été quasiment impossible de détacher les cellules; leur adhésion est si forte que même des traitements enzymatiques avec de la trypsine ou de la collagénase n'ont pas permis la récupération des cellules. Ces dernières ont dû être détachées du support par action mécanique en grattant la lame de verre, ce qui limite inévitablement le nombre de cellule viables récupérées et augmente considérablement le risque de contamination bactérienne, virale ou fongique. Cette difficulté qui nous a beaucoup gêné au cours de ces travaux pourrait être contournée par l'utilisation d'un recouvrement de surface détachable du support de culture, dans notre cas l'alginate, et qui permettrait l'obtention de feuillets cellulaires, utilisés par la suite pour la construction d'un substitut vasculaire.

Le support de culture ne doit pas être le seul critère à prendre en considération lors de la différenciation cellulaire. Nous avons montré que l'environnement cellulaire pourrait jouer également un rôle majeur au cours de ce processus. A cet égard, il est à préciser que quasiment tous les travaux de la littérature différencient les EPC en normoxie (21%O₂). Ce qui paraît paradoxal puisque certaines conditions pathologiques, comme l'ischémie, favorisent la libération des EPC dans la circulation sanguine. Ces cellules se dirigent alors vers les sites ischémiques afin de permettre la formation d'une circulation collatérale, favorisant ainsi l'apport tissulaire en nutriments et en oxygène. Cette constatation nous a amené à cultiver les

EPC en conditions hypoxiques (5%O₂) pour évaluer l'effet de cette privation d'oxygène sur le comportement cellulaire et plus précisément sa différenciation. Après 14 jours de culture, les cellules forment une monocouche et expriment les marqueurs spécifiques des CML et non plus ceux des CE matures. Rappelons ici que seule la concentration en oxygène a été modifiée, le milieu de culture étant le même par ailleurs.

A l'issue de cette observation, des questions nous interpellent pour comprendre ces mécanismes, en particulier n'existe-t-il :

- qu'une seule population de progéniteurs vasculaires capables, suivant les conditions, de se différencier en CE ou en CML ?
- plusieurs populations de progéniteurs vasculaires capables, suivant les conditions, de se différencier en un type cellulaire donné au détriment d'un autre ?

Récemment Simper et al 2002, Xie et al 2008 ont décrit que des cellules CD34⁺ étaient capables, en présence d'un milieu spécifique contenant des facteurs de croissance tels que le PDGF-BB, de se différencier en CML. Ces auteurs ont considéré que les cellules CD34⁺ isolées à partir de la fraction leucocytaire pouvaient être des précurseurs des CML et les ont donc appelées : cellules progénitrices des CML. Ces observations sont en contradiction avec nos résultats car il nous semble qu'il n'existe qu'une seule population de cellules CD34⁺ capables, suivant les conditions expérimentales ou physiopathologiques, de se différencier soit en CE, soit en CML. Ces divergences sont à vérifier et nourriront sans doute de nombreux débats.

Il faut également considérer que les cellules que nous avons utilisées sont issues de la circulation périphérique de LAPIN (modèle animal utilisé au laboratoire), ce qui peut poser des problèmes d'extrapolation, lorsque l'on envisage de travailler sur des cellules humaines issues de sang de cordon ou de la circulation périphérique. De plus les procédures font que les délais d'approvisionnement en sang sont beaucoup plus importants, ce qui pourrait influencer la culture cellulaire.

Dans ce cas, il semble nécessaire d'adapter les conditions et les temps de culture en fonction de l'origine cellulaire.

A l'issue de ces travaux, plusieurs projets d'études prennent naissance, en particulier la compréhension des mécanismes impliqués dans la plus forte adhésion des cellules sur le film de polyélectrolytes. Afin de vérifier cela, on pourrait étudier l'expression de différentes intégrines exprimées à la surface cellulaire au cours du temps. Une attention particulière

pourrait être portée sur l'intégrine $\alpha\beta 3$, exprimée par les CE matures et qui joue un rôle clé dans la formation de nouveaux capillaires (Brooks et al 1994). Par ailleurs, il serait également intéressant de savoir par quel(s) mécanisme(s) l'hypoxie engendre une différenciation en CML. Pour cela, nous pourrions nous intéresser au rôle d'HIF (Hypoxia Inducible Factor), facteur libéré lorsque les cellules sont soumises à un environnement hypoxique. L'augmentation de sa libération pourrait en effet influencer la différenciation des progéniteurs vasculaires en CML. De plus, l'étude des différentes voies de signalisation intracellulaire, et notamment l'étude des MAP kinases impliquées dans la transduction du signal d'adhésion ou dans l'expression des récepteurs des facteurs de croissance (VEGF-R2) représente également un paramètre très intéressant à étudier. Cette étude pourrait contribuer à expliquer comment les conditions de culture sont capables de privilégier une voie par rapport à une autre. Par ailleurs, il ne faut pas négliger l'effet des contraintes mécaniques, notamment le cisaillement et l'étirement, sur la vitesse de différenciation des progéniteurs vasculaires en CE ou en CML. Ces actions mécaniques peuvent modifier considérablement l'orientation cellulaire, leur organisation et leur fonctionnalité, en particulier lors de la construction de substituts vasculaires.

D'ailleurs, on peut miser, par l'utilisation de ces techniques, sur une application prochaine en ingénierie vasculaire. En effet, ces progéniteurs pourraient être différenciés sur un support de culture recouvert d'alginate et de film de polyélectrolytes et, en fonction des conditions environnementales, on obtiendrait différents feuillets cellulaires (CE ou CML) qui pourraient, par la suite, être associés pour construire un substitut vasculaire constitué de cellules autologues, dans un temps raisonnable (<1mois).

.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott WM, Callow A, Moore W, Rutherford R, Veith F, Weinberg S. Evaluation and performance standards for arterial prostheses. *J Vasc Surg* 17: 746-756, **1993**.

Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Badorff C, Massoudi S, Assmus B, Eckey T, Henze E, Zeiher AM, Dimmeler S. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labelling. *Circulation* 107: 2134-2139, **2003**.

Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 185: 111-120, **1997**.

Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406: 257, **2000**.

Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, Ong AT, McFadden EP, Sianos G, van der Giessen WJ, Regar E, de Feyter PJ, Davis HR, Rowland S, Kutryk MJ. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *J Am Coll Cardiol*. 45: 1574-1579, **2005**.

Aoki M, Yasutake M, Murohara T. Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood mononuclear cells isolated by a novel cell filtration device. *Stem Cells* 22: 994-1002, **2004**.

Aper T, Schmidt A, Duchrow M, Bruch HP. Autologous blood vessels engineered from Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 85:221-228, **1999**.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, **1997**.

Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*. 18: 3964-3972, **1999**.

Asai J, Takenaka H, Kusano KF, Ii M, Luedemann C, Curry C, Eaton E, Iwakura A, Tsutsumi Y, Hamada H, Kishimoto S, Thorne T, Kishore R, Losordo DW. Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation* 113: 2413-2424, **2006**.

Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D, Gazit Z. Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells*. 24: 1728-37, **2006**.

Ausprunk D, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 14: 53–65, **1977**.

Babij P, Kawamoto S, White S, Adelstein RS, Periasamy M. Differential expression of SM1 and SM2 myosin isoforms in cultured vascular smooth muscle. *Am J Physiol*. 262: C607-613, **1992**.

Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168: 342-57, **1995**.

Bär H, Wende P, Watson L, Denger S, van Eys G, Kreuzer J, Jahn L. Smoothelin is an indicator of reversible phenotype modulation of smooth muscle cells in balloon-injured rat carotid arteries. *Basic Res Cardiol*. 97: 9-16, **2002**.

Boneu B, Cazenave JP. Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose. 2ème édition révisée, Boehringer Ingelheim France, 8-15, **1997**.

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

Boura C, Muller S, Vautier D, Dumas D, Schaaf P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Endothelial cell-interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* 26 : 4568-4575, **2005**.

Brivanlou AH, Gage FH, Jaenisch R, Jessell T, Melton D, Rossant J. Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science* 300: 913-916, **2003**.

Brooks PC, Clark RA, Chersesh DA. Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. *Science* 264: 569-571, **1994**.

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64: 278-294, **1997**.

Brunot C, Ponsonnet L, Lagneau C, Farge P, Picart C, Grosgeat B. Cytotoxicity of polyethyleneimine (PEI), precursor base layer of polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* 28: 632-640, **2007**.

Chakfé N, Dieval F, Thaveau F, Rinckenbach S, Hassani O, Camelot G, Durand B, Kretz JG; Chaouat M, Le Visage C, Autissier A, Chaubet F, Letourneur D. The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats. *Biomaterials* 27: 5546–5553, **2006**.

Chiavegato A, Roelofs M, Franch R, Castellucci E, Sarinella F, Sartore S. Differential expression of SM22 isoforms in myofibroblasts and smooth muscle cells from rabbit bladder. *J Muscle Res Cell Motil.* 20: 133-146, **1999**.

Christen T, Bochaton-Piallat ML, Neuville P, Rensen S, Redard M, van Eys G, Gabbiani G. Cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. A new model with advanced differentiation. *Circ Res.* 85: 99-107, **1999**.

Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem* 277: 3101-3108, **2002**.

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3213-3218, **2000**.

Coulombel L. Adult stem cells: seing is not being. *Med Sci (Paris)* 19: 683-694, **2003**.

Crawford J, Ozer H, Stoller R, Johnson D, Lyman G, Tabbara I, Kris M, Grous J, Picozzi V, Rausch G, et al. Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 325: 164-170, **1991**.

Decher G, Hong JD, Schmitt J Buildup of ultrathin multilayer films by a selfassembly process. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charges surface. *Thin Solid Films* 210: 831-835, **1992**.

Decher G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* 277: 1232-1237, **1997**.

Denis CV. Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Int J Hematol* 75: 3-8, **2002**.

Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*. 107: 275-281, **1999**.

Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321:1218-1221, **2008**

D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res.* 14: 1115-1122, **1999**.

Drake CJ, Hungerford JE, Little CD. Morphogenesis of the first blood vessels. In: Fleischmajer R, Timpl R, Werb Z, editors. Morphogenesis cellular interactions. New York, NY: *The New York Academy of Sciences* 155–179, **1998**.

Eckle M, Decher G. Tuning the Performance of Layer-by-Layer Assembled Organic Light Emitting Diodes by Controlling the Position of Isolating Clay Barrier Sheets. *Nano Letters.* 1: 45-49, **2001**.

Eddinger TJ, Meer DP. Myosin isoform heterogeneity in single smooth muscle cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 117: 29-38, **1997**.

Erdödi F, Bárány M, Bárány K. Myosin light chain isoforms and their phosphorylation in arterial smooth muscle. *Circ Res.* 61: 898-903, **1987**.

Feletou M, Vanhoutte PM, Weston AH, Edwards G. EDHF and endothelial potassium channels: IKCa and SKCa. *Br J Pharmacol* 140: 594-601, **2003**.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-30, 1998. Erratum in: *Science* 281: 923, **1998**.

Flamme I, Frölich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis *J Cell Physiol* 173: 206-210, **1997**.

Folkman J. Angiogenesis: initiation and control. *Ann NY Ac Sc* 401: 212–227, **1982**.

Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res* 46: 467–473, **1986**.

Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 43: 175–203, **1985**.

Frid MG, Dempsey EC, Durmowicz AG, Stenmark KR. Smooth muscle cell heterogeneity in pulmonary and systemic vessels. Importance in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 1203-1209, **1997**.

Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Ckhashtonay C, Vandekerckhove J, Weber K, Franke WW. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78: 298-302, **1981**.

Gaffney JJ, West D, Arnold F, Sattar A, Kumar S. Differences in the uptake of modified low density lipoproteins by tissue cultured endothelial cells. *J. Cell Sci.*, 79: 317, **1985**.

Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95:3106-3112, **2000**.

Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res.* 88: 167-74, **2001**.

Graham LM, Vinter DW, Ford JW, Kahn RH, Burkel WE, Stanley JC. Endothelial cell seeding of prosthetic vascular grafts: early experimental studies with cultured autologous canine endothelium. *Arch Surg.* 115: 929-933, **1980**.

Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, Pratt RE, Mulligan RC, Dzau VJ. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 108: 2710-2715, **2003**.

Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, Simari RD. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res.* 93: 1023-1025, **2003**.

Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:1510-1520, **2003**.

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science.* 318:1920-1923, **2007**.

Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC. CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells* 19: 304-312, **2001**.

Harris CRS. The heart and the vascular system in ancient greek medicine. *Clarendon Press Oxford*, **1973**.

Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clin. Cardiol.* 20: 11-17, **1997**.

Hasegawa Y, Ueda Y, Watanabe M, Morita F. Studies on amino acid sequences of two isoforms of 17-kDa essential light chain of smooth muscle myosin from porcine aorta media. *J Biochem.* 111: 798-803, **1992**.

Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 193: 1005-1014, **2001**.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13: 69-80, **1992**.

Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 102: 1340-6, 2003. Erratum in: *Blood* 103: 4388, **2004**.

Helper DJ, Lash JA, Hathaway DR. Distribution of isoelectric variants of the 17,000-dalton myosin light chain in mammalian smooth muscle. *J Biol Chem* 264: 2391, **1989**.

Herscman, D. acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome following use of G-CSF during breast cancer adjuvant chemotherapy. *J Natl cancer Inst* 99: 196-205, **2007**.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 348: 593-600, **2003**.

Hiller J, Mendelsohn JD, and Rubner MF. "Reversibly erasable nanoporous antireflection coatings from polyelectrolyte multilayers." *Nature Materials* 1: 59-63, **2002**.

His W. Untersuchungen uber die erste Anlage des Wirbelthierleibes. Leipzig, **1868**.

Hoerstrup SP, Zund G, Sodian R, Schnell AM, Grunenfelder J, Turina MI. Tissue engineering of small caliber vascular grafts. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 20: 164-169, **2001**.

Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24: 288-293, **2004**.

Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104: 2752-2760, **2004**.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64: 295-312, **1997**.

Jarrell BE, Williams SK, Solomon L, Speicher L, Koolpe E, Radomski J, Carabasi RA, Greener D, Rosato FE. Use of an endothelial monolayer on a vascular graft prior to implantation. Temporal dynamics and compatibility with the operating room. *Ann Surg.* 203: 671-678, **1986**.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 238: 265-72, **1998**.

Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. 46: 3349-3360, **2002**.

Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 3422-3427, **2000**.

Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, Symes JF. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg*. 70: 829-34, **2000**.

Kamm KE, Stull JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 25: 593-620, **1985**.

Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Jr. Mayer JE. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat. Med*. 7: 1035-1040, **2001**.

Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103: 634-637, **2001**.

Kerdjoudj H, Berthelemy N, Rinckenbach S, Kearney-Schwartz A, Montagne K, Schaaf P, Lacolley P, Stoltz JF, Voegel JC, Menu P. Small vessel replacement by human umbilical arteries with polyelectrolyte film-treated arteries: in vivo behavior. *J Am Coll Cardiol* 52: 1589-1597, **2008**.

Kerdjoudj H, Boura C, Moby V, Montagne K, Schaaf P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Re-endothelialization of human umbilical arteries treated with polyelectrolyte multilayers: a tool for damaged vessel replacement. *Adv. Funct. Mater.* 17: 2667-2673, **2007**.

Khan SS, Solomon MA, Mc Coy JP JR. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 64: 1-8, **2005**.

Kim SH, Kwon JH, Chung MS, Chung E, Jung Y, Kim SH, Kim YH. Fabrication of a new tubular fibrous PLCL scaffold for vascular tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 17: 1359-1374, **2006**.

Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7: 430-436, **2001**.

Kocher O, Skalli O, Cerutti D, Gabbiani F, Gabbiani G. Cytoskeletal features of rat aortic cells during development. An electron microscopic, immunohistochemical, and biochemical study. *Circ Res.* 56: 829-838, **1985**.

Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24: 1442-1447, **2004**.

Kotov NA, Magonov S, Tropsha E Layer-by-layer self-assembly of aluminosilicate-polyelectrolyte composites: Mechanism of deposition, crack resistance, and perspectives for novel membrane materials. *Chemistry of Materials* 10: 886- 895, **1998**.

Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Müller PK, Rohwedel J. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev* 92: 193-205, **2000**.

Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res.* 100: 782-794, **2007**.

Lamm P, Juchem G, Milz S, Schuffenhauer M, Reichart B. Autologous endothelialized vein allograft: a solution in the search for small-caliber grafts in coronary artery bypass graft operations. *Circulation* 104: I108-I114, **2001**.

Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Mische E, Böhm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 109: 220-226, **2004**.

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

Leyland-Jones B. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol.* 4: 459-460, **2003**.

L'Heureux N, Dusserre N, König G, Victor B, Keire P, Wight TN, Chronos NA, Kyles AE, Gregory CR, Hoyt G, Robbins RC, McAllister TN. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med* 12: 361-365, **2006**.

L'Heureux N, Germain L, Labbe R, Auger FA. In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. *J. Vasc. Surg.* 17: 499-509, **1993**.

L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L. Auger FA. A completely biological tissue engineered human blood vessel. *FASEB J.* 12: 47-56, **1998**.

Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J.* 20: 1495-1497, **2006**.

Li L, Miano JM, Cserjesi P, Olson EN. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ Res.* 78: 188-95, **1996**.

Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hübel K, Cooper S, Hangoc G, Bridger GJ, Henson GW, Calandra G, Dale DC. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 102: 2728-30, **2003**.

Liu XY, Bruening ML. Size-selective transport of uncharged solutes through multilayer polyelectrolyte membranes. *Chemistry of Materials* 16: 351-357, **2004**.

Long MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis* 27: 677-690, **2001**.

Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 98: 2800-2804, **1998**.

Matsuda T, Akutsu T, Kira K, Matsumoto H. Development of hybrid compliant graft: rapid preparative method for reconstruction of a vascular wall. *ASAIO Trans* 35: 553-555, **1989**.

McCulloch EA, Till JE. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res* 13: 115-125, **1960**.

McGuigan AP, Sefton MV. The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity. *Biomaterials* 28: 2547-2571, **2007**.

Miller MD, Bruening ML. Controlling the nanofiltration properties of multilayer polyelectrolyte membranes through variation of film composition. *Langmuir* 20: 11545-11551, **2004**.

Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, Wang N, Uno Y, Koda M, Arai M, Misao Y, Lu C, Suzuki K, Goto K, Komada A, Takahashi T, Kosai K, Fujiwara T, Fujiwara H. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* 109: 2572-2580, **2004**.

Mitchell JJ, Reynolds SE, Leslie KO, Low RB, Woodcock-Mitchell J. Smooth muscle cell markers in developing rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3: 515-523, **1990**.

Moby V, Boura C, Kerdjoudj H, Marchal L, Dumas D, Schaaf P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. (Poly (styrene Sulfonate)/Poly (allylamine)) Multilayers: a route to favour Endothelial Cell Growth on ePTFE Vascular Grafts. *Biomacromolecules* 8: 2156-2160, **2007**.

Muller WA. AS9. CD31 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 10-14, 1996; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc. 362-364, **1997**.

Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105: 1527-1536, **2000**.

Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 105: 1527-1536, **2000**.

Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 46: 704-713, **2002**.

Nakamura H. Electron microscopic study of the prenatal development of the thoracic aorta in the rat. *Am J Anat*. 181: 406-418, **1988**.

Natori T, Sata M, Washida M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 297: 1058-1061, **2002**.

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

Nikkari ST, Rantala I, Pystynen P, Nikkari T. Characterization of the phenotype of smooth muscle cells in human fetal aorta on the basis of ultrastructure, immunofluorescence, and the composition of cytoskeletal and cytocontractile proteins. *Atherosclerosis* 74: 33-40, **1988**.

Niklason LE, Abbott WM, Gao J, Klagges B., Hirschi KK, Ulubayram K, Conroy N, Jones R, Vasanawala A, Sanzgiri S, Langer R. Morphologic and mechanical characteristics of engineered bovine arteries. *J. Vasc. Surg.* 33: 628-638, **2001**.

Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, Langer R. Functional arteries grown *in vitro*. *Science* 284: 489-493, **1999**.

Noël D, Djouad F, Jorgense C. Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. *Curr Opin Investig Drugs* 3: 1000-1004, **2002**.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann NY Acad Sci.* 938: 221-9; discussion 229-230, **2001**.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 10344-10349, **2001**.

Osborn M. Intermediate filaments as histologic markers: an overview. *J Invest Dermatol* 81(1 Suppl):104-109, **1983**.

Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*. *Stem Cells* 22: 377-384, **2004**.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, **1987**.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95: 952-958, **2000**.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284: 143-147, **1999**.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147, **1999**.

Poole TJ, Finkelstein EB, Cox CM. The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev Dyn* 220: 1–17, **2001**.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71-74, **1997**.

Prunier F, Pfister O, Hadri L, Liang L, Del Monte F, Liao R, Hajjar RJ. Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292: H522-529, **2007**.

Reagan FP. Vascularization phenomena in fragments of embryonic bodies completely isolated from yolk-sac blastoderm. *Anat Rec* 9: 329–341, **1915**.

Reyftmann L, Dechauda H, Hamamah S, Pucéat M, Hédon B. Fetal and umbilical blood cord stem cells: a room for the obstetrician and gynaecologist. Part two. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 32: 969–975, **2004**.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674, **1997**.

Roberts I. Mesenchymal stem cells. *Vox Sang* 87: 38-41, **2004**.

Roelofs M, Faggian L, Pampinella F, Paulon T, Franch R, Chiavegato A, Sartore S. Transforming growth factor beta1 involvement in the conversion of fibroblasts to smooth muscle cells in the rabbit bladder serosa. *Histochem J*. 30: 393-404, **1998**.

Roh JD, Brennan MP, Lopez-Soler RI, Fong PM, Goyal A, Dardik A, Breuer CK. Construction of an autologous tissue-engineered venous conduit from bone marrow-derived vascular cells: optimization of cell harvest and seeding techniques. *J. Pediatr. Surg.* 42: 198-202, **2007**.

Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol.* 164: 87-101, **1994**.

Roncalli JG, Tongers J, Renault MA, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in regenerative medicine and cancer: a decade of research. *Trends Biotechnol* 26: 276-83, **2008**.
Sabin FR. Studies on the origin of blood vessels and red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the secondary day of incubation. *Contrib Embryol* 36: 213-259, **1920**.

Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest.* 106: 571-578, **2000**.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66, **1995**.

Sharpe EE 3rd, Teleron AA, Li B, Price J, Sands MS, Alford K, Young PP. The origin and in vivo significance of murine and human culture-expanded endothelial progenitor cells. *Am J Pathol.* 168: 1710-1721, **2006**.

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92: 362-367, **1998**.

Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103: 2776-2779, **2001**.

Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78: 55-62, **1991**.

Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 106: 1199-1204, **2002**.

Skalli O, Vandekerckhove J, Gabbiani G. Actin-isoform pattern as a marker of normal or pathological smooth-muscle and fibroblastic tissues. *Differentiation* 33: 232-238, **1987**.

Sobue K, Sellers JR. Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and non muscle actomyosin systems. *J. Biol Chem* 266: 12115-12118, **1991**.

Stockard GR. The origin of blood and vascular endothelium in embryos without a circulation of the blood and in the normal embryo. *Am J Anat* 18: 227–327, **1915**.

Szmitko PE, Fedak PW, Weisel RD, Stewart DJ, Kutryk MJ, Verma S. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation* 107: 3093-100, **2003**.

Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, Hayashi T, Hayashida K, Nagatsuka K, Todo K, Mori K, Stern DM, Soma T, Naritomi H. Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 109: 2972-2975, **2004**.

Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 5: 434-438, **1999**.

Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*.2:3081-3089, **2007**.

Tang ZY, Kotov NA, Magonov S, Ozturk B Nanostructured artificial nacre. *Nature Materials*. 2: 413-418, **2003**.

Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, Gurtner GC. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood* 105: 1068-1077, **2005**.

Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 106: 2781-2786, **2002**.

Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31: 235-240, **2000**.

Ueki N, Sobue K, Kanda K, Hada T, Higashino K. Expression of high and low molecular weight caldesmons during phenotypic modulation of smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9049-9053, **1987**.

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med*. 14: 318-322, **2004**.

Van Craenenbroeck EM, Vrints CJ, Haine SE, Vermeulen K, Goovaerts I, Van Tendeloo VF, Hoymans VY, Conraads VM. A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *J Appl Physiol*. 10: 1006-1013, **2008**.

Van der Loop FT, Schaart G, Timmer ED, Ramaekers FC, van Eys GJ. Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *J Cell Biol* 134: 401-411, **1996**.

Vandekerckhove J, Weber K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol*. 126: 783-802, **1978**.

Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, van Ham SM, van Milligen FJ. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev*. 16: 91-104, **2007**.

Vascular graft prosthesis Groupe européen de recherche sur les prothèses appliquées à la chirurgie vasculaire. *Ann Chir* 129: 301-309, **2004**.

He H., T. Shirota, H. Yasui, T. Matsuda. Canine endothelial progenitor cell-lined hybrid vascular graft with nonthrombogenic potential. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 126: 455-464, **2003**.

Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood*. 88: 3424-3431, **1996**.

Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 269: 26988-26995, **1994**.

Walter DH, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz* 27:579-588, **2002**.

Watt SM, Gschmeissner SE, Bates PA. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma* 17: 229-244, **1995**.

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

Werner M, Kaloutsi V, Walter K, Buhr T, Bernhards J, Georgii A. Immunohistochemical examination of routinely processed bone marrow biopsies. *Path Res Pract* 188: 707-713, **1992**.

Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5856-61, **2008**.

Williams SK, Jarrell BE, Rose DG, Pontell J, Kapelan BA, Park PK, Carter TL. Human microvessel endothelial cell isolation and vascular graft sodding in the operating room. *Ann Vasc Surg.* 3:146-152, **1989**.

Winder SJ, Sutherland C, Walsh MP. A comparison of the effects of calponin on smooth and skeletal muscle actomyosin systems in the presence and absence of caldesmon. *Biochem J* 288: 733-739, **1992**.

Withfield P. Le corps humain. Paris: édition Solar, 124-125, **1996**.

Xie SZ, Fang NT, Liu S, Zhou P, Zhang Y, Wang SM, Gao HY, Pan LF. Differentiation of smooth muscle progenitor cells in peripheral blood and its application in tissue engineered blood vessels. *J Zhejiang Univ Sci B* 9: 923-930, **2008**.

Yanagisawa M, Kurihara ., Kimura S, Goto K, Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J Hypertens Suppl.* 6: S188- S191, **1988**.

Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, Koinuma S, Hara S, Tazaki A, Onozaki M, Hashimoto M, Musha T, Ogawa K, Fujita H, Nakamura Y, Shiozaki H, Utsumi H. Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis* 24: 1021-1029, **2003**. Erratum in: *Carcinogenesis* 24: 1567, **2003**.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90: 5002-5012, **1997**.

Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg A.* 80: 1745-1757, **1998**.

Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res.* 16: 406-413, **1998**.

Zilla I, Fasol R, Deutsch M, Fischlein T, Minar E, Hammerle A., Krupicka O, Kadletz M. Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report. *J Vasc Surg* 6: 535-541, **1987**.

ANNEXES

I. La microscopie confocale à balayage laser

Le microscope confocal à balayage laser ou CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope) dont nous disposons au laboratoire est un appareil Leica TCS SP2-AOBS (Leica microsystems, Allemagne) équipé d'un filtre opto-acoustique accordable, de lasers solides argon (457 nm, 476 nm, 488nm, 514 nm), laser hélium-néon (543nm et 633nm) et oscillateur femtoseconde VERDI (600- 1100nm) avec un objectif x40/1,4 à immersion à eau. optimisées au laboratoire.

I.1. Phénomène de Fluorescence

La fluorescence est la propriété d'une molécule à absorber un photon, puis à le réémettre à une longueur d'onde plus élevée (Figure 17). Soumise à une excitation lumineuse de longueur d'onde donnée, la molécule fluorescente est portée dans un état vibronique excité (S_1'). A température ambiante, la conversion interne entraîne une perte partielle de l'énergie absorbée par relaxation vibrationnelle, et la molécule se retrouve à un état excité moins élevé en énergie (S_1). Le retour de la molécule à son état électronique fondamental (S_0) est associé à une libération d'énergie lumineuse plus faible que l'énergie associée à l'excitation lumineuse, ce qui se traduit par une longueur d'onde d'émission supérieure à la longueur d'onde d'absorption (déplacement de Stokes).

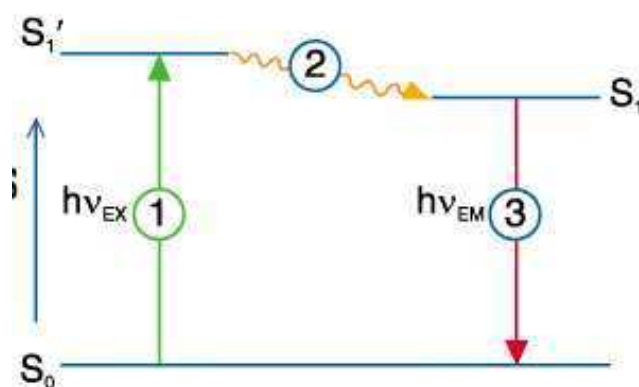


Figure 17 :diagramme de Jablonski

La molécule fluorescente initialement à l'état fondamental S_0 absorbe de l'énergie lumineuse (1) et se retrouve à l'état excité S_1' . Lors de la désexcitation, la molécule perd d'abord de l'énergie par conversion interne (2) (vibrations, chocs moléculaires) et se retrouve à l'état excité d'énergie inférieure S_1 puis subit une transition électronique de l'état S_1 à son état stable S_0 (3).

Cette transition libère de l'énergie sous forme lumineuse à une longueur d'onde plus élevée que la longueur d'onde d'excitation (car l'énergie d'émission est plus faible que celle d'excitation).

I.2. Principe de la microscopie confocale à balayage laser

Le principe général de la microscopie confocale a été proposé par Minsky (1957). Il s'agit de diriger un faisceau laser sur un point précis (point focal) de l'échantillon à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence. Cependant, le trajet du faisceau laser dans l'échantillon génère de la fluorescence en dehors du plan focal. Pour éliminer cette fluorescence parasite, un trou de filtrage appelé pinhole (« trou d'aiguille ») est placé en amont du détecteur et ne laisse passer que la lumière en provenance du point focal (Figure 18). L'image ainsi obtenue présente un bon rapport signal/bruit. La source laser est condensée par l'intermédiaire d'une première lentille, d'un miroir dichroïque et de l'objectif en un point focal. La fluorescence émise par l'échantillon est ensuite recueillie par un photomultiplicateur. Pour éliminer la fluorescence parasite (ligne en pointillé), le trou de filtrage (pinhole) est disposé au niveau du plan image de l'objectif.

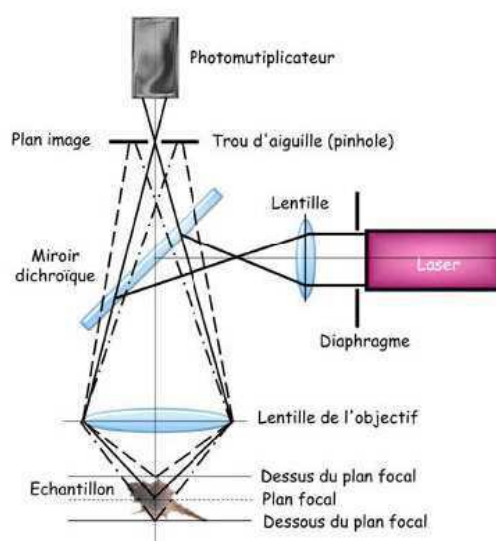


Figure 18 : Schéma de principe d'un microscope confocal à balayage laser.

Le balayage de l'échantillon par le laser, en tout point (x,y) de la surface fournit une image du plan focal. Ce balayage dans le plan horizontal est obtenu à l'aide de miroirs motorisés disposés sur le trajet optique du laser. Pour le balayage vertical (en z), l'objectif est monté sur un moteur piézo-électrique. Il est ainsi possible d'obtenir des images en provenance de différents plans focaux de l'échantillon et ainsi de reconstituer une structure en trois dimensions (Figure 19).

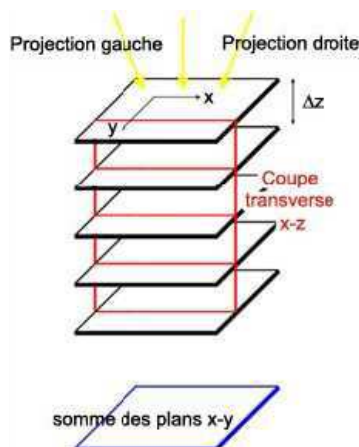


Figure 19 : Principe de reconstitution d'images en 3D.

Une image numérique (x,y) est réalisée à différentes hauteurs en z avec un pas de déplacement constant z et l'image en 3 D est reconstituée par la somme de ces plans. On peut alors accéder aux coupes transversales suivant les plans verticaux (xz) et (yz) .

II. La cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant l'analyse rapide d'un grand nombre de particules de manière individuelle. La caractérisation des particules est réalisée grâce à un appareil qui se compose d'une source lumineuse (laser), d'une chambre de prélèvement et un système optique possédant des photomultiplicateurs qui convertissent les signaux lumineux en impulsions électriques digitalisées et mémorisées par un ordinateur. Les cellules en suspension sont propulsées dans un flux de liquide appelé « liquide de gaine ». Elles sont alors entraînées une à une, en file indienne, dans une cellule de lecture (cuvette) où elles passent dans le faisceau lumineux émis par la source (Figure 20). Une analyse simultanée de la lumière diffractée à 90° (FSC : forward scatter detector) et aux petits angles (SSC : side scatter detector) fournit des données sur la taille et la structure des éléments étudiés. La mesure aux petits angles est principalement influencée par la taille des particules alors que la détection à 90° reflète plutôt leur structure.

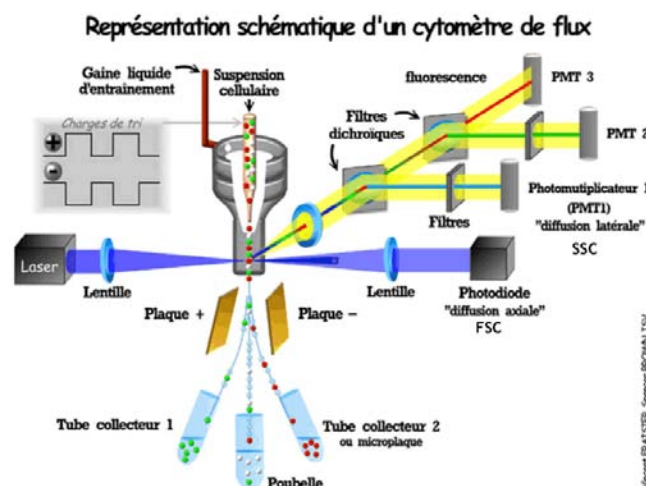


Figure 20 : principe de la cytométrie en flux

Les échantillons cellulaires sont analysés sur un cytomètre XL (Beckman coulter, USA) Chaque échantillon est d'abord analysé en diffusion (FSC et SSC) afin d'identifier les cellules en fonction de leur taille et de leur granulosité. Cette analyse permet de sélectionner la population cellulaire adéquate en utilisant le contrôle négatif qui ne contient que des cellules non marquées. Une région d'analyse est alors établie permettant de détecter les cellules d'intérêt et permettant ainsi d'éliminer les débris cellulaires, ou les doublets ou triplets de cellules. Pour obtenir l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) des cellules, le réglage de l'appareil est effectué à partir des contrôles négatifs et isotypiques (cellules + anticorps secondaire couplé au fluorochrome). La tension du photomultiplicateur 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 WinMIDI. Les échantillons d'intérêt sont alors passés un à un. L'acquisition se fait sur 10000 évènements analysés apparaissant dans la région d'intérêt préalablement définie.

Publications scientifiques

Publications scientifiques

N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, P. Schaaf, P. Lacolley, J. F. Stoltz, J. C. Voegel, P. Menu. O2 Level Controls Hematopoietic Circulating Progenitor Cells Differentiation into Endothelial or Smooth Muscle Cells. *PLoS One* 2009.

N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, C. Gaucher, P. Schaaf, J. F. Stoltz, P. Lacolley, J. C. Voegel, P. Menu. Polyelectrolyte films boost progenitor cells differentiation into endothelial like monolayers. *Adv Mater.* 2008 (IF : 8.2).

N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, S. Rinckenbach, A. Kearney-schwartz, K. Montagne, P. Schaaf, P. Lacolley, J. F. Stoltz, J. C. Voegel, P. Menu. Small vessel replacement by human umbilical arteries with polyelectrolyte films treated arteries: "In vivo" behaviour. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008 (IF: 11.05)

H. Kerdjoudj, **N. Berthelemy**, L. Bordenave, J. F. Stoltz, P. Menu. Natural matrix for vascular tissue engineering. *Bio-med. Mater. Eng.* 2007 (IF: 0.5).

H. Kerdjoudj, V. Moby, **N. Berthelemy**, M. Gentils, C. Boura, L. Bordenave, J-F. Stoltz, P. Menu. The ideal small arterial substitute: role of cell seeding and tissue engineering. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2007; 37: 89-98 (IF: 1.24).

Brevet

1)- Procédé de prolifération de cellules sur des multicouches de polyélectrolytes et son application notamment à la préparation de biomatériaux cellularisés.

Inventeurs : P. Menu, J.F. Stoltz, J.C. Voegel, P. Schaaf, C. Boura, H. Kerdjoudj, V. Moby, **N. Berthelemy**. Date de dépôt : 18 juin 2007. Numéro : PCT/FR2008/000832

2) - Cellular Differential Process and its Use for Blood Vessel Build-up

Inventeurs: P. Menu, H. Kerdjoudj, **N. Berthelemy**, J-F Stoltz

Date de dépôt : 24 juin 2008 Numéro : 08290599.3

Communications scientifiques

N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, H. Louis, J. F. Stoltz, P. Menu. Oxygen Concentration Modulates Smooth Muscle Cells Phenotype Regenerative Medicine. Advancing to Next Generation Therapies, Hilton Head workshop, Hilton Head Island, Caroline du sud, USA Mars 2009.

N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, C. Gaucher, P. Schaaf, J. F. Stoltz, P. Lacolley, J. C. Voegel, P. Menu. Endothelial Progenitor Cells Differentiation into Endothelial Cells on Polyelectrolyte Films. Regenerative Medicine. Advancing to Next Generation Therapies, Hilton Head workshop, Hilton Head Island, Caroline du sud, USA Mars 2008.

N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, P. Lacolley, J. F. Stoltz, P. Schaaf, J. C. Voegel, P. Menu. Role of Polyelectrolyte Films on Endothelial Progenitor Cells Differentiation. International Society for Applied Cardiovascular Biology (ISACB), Bordeaux, France Septembre 2008.

N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, C. Gaucher, P. Schaaf, J.F. Stoltz, P. Lacolley, J.C Voegel, P. Menu. Polyelectrolyte Films boost Progenitor Cell Differentiation into Endothelium-like Monolayers, Société Japonaise pour la Promotion de la Science (JSPS) Strasbourg, France, Novembre 2007.

H. Kerdjoudj, **N. Berthelemy**, S. Rinckenbach, J. F. Stoltz, P. Schaaf, J. C. Voegel, P. Menu. Rabbit carotid bypassed by cryopreserved human umbilical arteries treated with polyelectrolyte multilayer films. International Society for Applied Cardiovascular Biology (ISACB), Bordeaux, France Septembre 2008.

H. Kerdjoudj, **N. Berthelemy**, S. Rickenbach, A. Kearney-Schwartz, P. Schaaf, J. F. Stoltz, J. C. Voegel, P. Menu. In vivo behaviour of polyelectrolyte films arteries treated. Regenerative Medicine. Advancing to Next Generation Therapies, Hilton Head workshop, Hilton Head Island, Caroline du sud, USA Mars 2008.

H. Kerdjoudj, **N. Berthelemy**, E. Paternotte, P. Schaaf, J.F. Stoltz, J.C. Voegel, P. Menu. Human umbilical reendothelialization engineered by polyelectrolyte multilayer buildups: a tool for adult arteries revascularization. Société Japonaise pour la Promotion de la Science (JSPS) Strasbourg, France, Novembre 2007.

H. Kerdjoudj, V. Moby, **N. Berthelemy**, J. C. Voegel, P. Menu, J. F. Stoltz. Use of polyelectrolyte films in vascular tissue engineering. Summer Bioengineering Conference (SBC), Marco Island, Florida, USA June 2008.

H. Kerdjoudj, C. Boura, **N. Berthelemy**, V. Moby, K. Montagne, J-C. Voegel, J-F. Stoltz, P. Menu. Biomechanical properties of re-endothelialized cryopreserved umbilical arteries, 3rd international meeting on “medical engineering and therapy”, Nancy, France Mai 2006.

H. Kerdjoudj, V. Moby, C. Boura, **N. Berthelemy**, L. Marchal, J-C. Voegel, J-F. Stoltz, P. Menu. Improvement of endothelial cells adhesion on vascular substitutes modified with a polyelectrolyte multilayer film, First international symposium on “cardiovascular biology”, Praha, Czech Republic, Juin 2006.

Résumé

L'augmentation de la fréquence des pathologies vasculaires va créer ces prochaines années, des besoins importants en substituts vasculaires de petits calibres. L'idéal, à ce jour, reste l'utilisation de vaisseaux autologues réduisant les risques infectieux et immunologiques mais d'usage limité ce qui est à l'origine de l'ingénierie cellulaire. L'identification des progéniteurs vasculaires est d'un intérêt majeur dans ce domaine. Ces cellules d'origine autologues sont douées d'une grande capacité de prolifération et d'un potentiel de différenciation en cellules vasculaires (cellules endothéliales (CE) et cellules musculaires lisses (CML)) mais la difficulté réside dans le choix du recouvrement de la surface du support de culture qui favorise leur adhésion et prolifération. Dans ce travail, nous avons choisi les films multicouches de polyélectrolytes et mesuré leur impact sur le comportement de ces cellules progénitrices en fonction de différentes conditions de culture (normoxie ou hypoxie). Nous avons montré dans un premier temps, que ces films multicouches de polyélectrolytes permettaient d'accélérer la différenciation de ces cellules en CE matures. Nous avons également montré que ces mêmes cellules cultivées en hypoxie étaient capables de se différencier en cellules contractiles stables dans le temps, présentant un phénotype comparable à celui des CML matures. L'association de ces résultats additionnés aux avantages apportés par des feuillets détachables est à la base de la construction d'un substitut vasculaire autologue de petit calibre, composé de CE et de CML issues d'un même pool de cellules, mais cultivées dans des conditions différentes.

Mots clés : cellules progénitrices vasculaires, films multicouches de polyélectrolytes, différenciation cellulaire, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, ingénierie tissulaire, substitut vasculaire.

Abstract

The increase of vascular pathologies is going to create these next years, important needs in vascular substitutes of small calibres. The gold standard, this day, remains the use of autologous vessels reducing the infectious and immunological risks, but of limited custom, which is at the origin of tissue engineering. The identification of vascular progenitor cells is of major interest in vascular engineering. These autologous cells present a high capacity of proliferation and a potential of differentiation in vascular cells (endothelial cells (EC) and smooth muscle cells (SMC)) but the difficulty lies in the choice of the coated surface of culture which facilitates their adhesion and proliferation. In this work, we chose polyelectrolytes multilayer films and measured their impact on these vascular progenitor cells in various conditions of culture (normoxia or hypoxia). We showed at first, that these polyelectrolytes multilayer films allowed to accelerate the differentiation of these cells into matures EC. We also showed that these same cells cultivated under hypoxic conditions were able to differentiate into stable and contractile cells, presenting a phenotype comparable to the mature SMC. The association of these results added to the advantages brought by detachable sheet is the basis of the construction of an autologous small calibre vascular substitute consisting of EC and SMC differentiated from the same pool of cells, but cultivated in different conditions.

Keyword: vascular progenitor cells, polyelectrolytes multilayer films, cell differentiation, endothelial cells, smooth muscle cells, tissular engineering, vascular graft.