

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2009

Thèse n° 1614

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 14 décembre 2009

Par Noélie-Brunehilde THEBAUD

Née le 27 avril 1975 à Poitiers

Cellules endothéliales issues de progéniteurs humains : des acteurs pertinents en ingénierie vasculaire ?

Membres du Jury

Pr Georges DORIGNAC, Bordeaux..... Président
Pr Georges UZAN, Paris Rapporteur
Pr Dominique LAURENT-MAQUIN, Reims Rapporteur
Dr Catherine LE VISAGE, Paris Examineur
Pr Patrick MENU, Nancy Membre invité
Pr Laurence BORDENAVE, Bordeaux..... Directeur de thèse

« Le savant n'est pas l'homme qui fournit les vraies réponses, c'est celui qui pose les vraies questions ».

Claude Lévi-Strauss dans « Le cru et le cuit ».

Résumé

L'incidence des maladies cardiovasculaires d'origine athéromateuse demeure un problème majeur en santé publique et malgré le développement de techniques curatives endovasculaires, la chirurgie demeure nécessaire chez de nombreux patients. Le remplacement vasculaire se fait par une veine autologue qui reste le « gold standard » ou, lorsque les patients n'ont pas le capital vasculaire suffisant, par une prothèse. Actuellement, si les techniques utilisant des prothèses synthétiques sont satisfaisantes pour le remplacement d'artères de gros calibre, celui des artères de petit calibre demeure toujours un défi du fait du caractère thrombogène des biomatériaux utilisés et de leurs mauvaises propriétés mécaniques. Depuis quelques années, le concept d'ingénierie tissulaire a émergé et évolué. Il pourrait permettre de proposer de nouveaux types de substituts vasculaires hybrides et/ou biologiques, grâce en particulier à l'utilisation de cellules souches et de leurs progéniteurs, ouvrant d'intéressantes perspectives dans le domaine de l'ingénierie vasculaire. Le but de ce travail a été d'obtenir de manière fiable et reproductible des cellules à phénotype endothélial mature à partir de progéniteurs endothéliaux issus de moelle osseuse et sang périphérique humains et de définir leurs réponses dans des conditions proches de celles observées dans un vaisseau natif. Des cellules (PDECs : Progenitor Derived Endothelial Cells) ont pu être amplifiées à partir de progéniteurs, elles présentent les marqueurs membranaires classiquement utilisés pour définir des cellules endothéliales matures. Elles sont capables, sur différents revêtements utilisés cliniquement tels le collagène de type I et la colle de fibrine ainsi que sur un revêtement plus expérimental (Multicouches de PolyElectrolytes), de former une monocouche confluyente. Ces PDECs résistent à des contraintes mécaniques de cisaillement de type artériel et l'analyse de gènes et protéines impliqués dans la biologie de l'endothélium a montré qu'elles répondent à ces stimulations par l'expression d'un phénotype en lien avec une activité antithrombogène. De plus, les travaux préliminaires réalisés sur ces PDECs cocultivés avec des progéniteurs ostéoblastiques, ouvrent d'intéressantes perspectives concernant leur utilisation dans le cadre de l'ingénierie du tissu osseux vascularisé.

Mots clefs

Biomatériaux, ingénierie tissulaire, ingénierie vasculaire, progéniteurs endothéliaux humains, ostéoprogéniteurs humains, contraintes de cisaillement (shear stress), hydrogels de polysaccharide, multicouches de polyélectrolytes.

Abstract

The incidence of atherosclerotic arterial disease is still a major public health problem and despite endovascular surgery therapies, surgical treatment is necessary for many patients. Vascular bypass is performed with an autologous vein which remains the gold standard, or when patients do not have appropriate blood vessels to be used as replacement, with a synthetic prosthesis. Nowadays, synthetic vascular grafts have been successfully used in the treatment of the pathology of large arteries, but the replacement of the smaller sized arteries is still a challenge because synthetic vascular grafts are known to be highly thrombogenic and have poor mechanical properties. Recently, the tissue engineering concept has emerged and advances. It can allow to propose development of new hybrid or biologic vascular substitutes, using stem cells and progenitor cells, holding great promise for vascular tissue engineering. The aim of the present study was to obtain reliably and reproducibly, cells with mature endothelial phenotype from endothelial progenitor cells isolated from human bone marrow and peripheral blood and investigate cell response in conditions similar to those observed in a native vessel. We were able to expand cells (PDECs: Progenitor Derived Endothelial Cells) from progenitors which exhibit markers conventionally used to define mature endothelial cells. They were able, on scaffolds currently used in clinic like collagen type I and fibrin glue or on more experimental scaffold (Polyelectrolytes multilayers films), to form a confluent monolayer. These PDECs are able to withstand arterial shear stress and analysis of genes and proteins implicated in endothelium biology shows that these cells respond to shear stress stimulation with a phenotype connected to an anti-thrombogenic activity. Moreover, preliminary studies using co-cultures of PDECs and osteoblastic progenitors, open interesting perspectives concerning PDECs to be used in the field of vascularized bone tissue engineering.

Key words

Biomaterials, tissue engineering, vascular tissue engineering, human endothelial progenitors, human osteo-progenitors, shear stress, polysaccharide hydrogels, polyelectrolytes multilayers films.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	4
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	10
INTRODUCTION GENERALE.....	12
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	16
I. CONCEPT D'INGENIERIE TISSULAIRE : définition, genèse, enjeux, applications ..	17
A. Les acteurs intervenant dans le concept d'ingénierie tissulaire ou la triade de l'ingénierie tissulaire : généralités.....	18
1) Les biomatériaux.....	19
2) Les cellules.....	20
3) Les signaux.....	21
B. Exemples d'applications cliniques en ingénierie tissulaire et limites du domaine...	23
C. Perspectives en ingénierie tissulaire.....	25
II. LES SUBSTITUTS VASCULAIRES DISPONIBLES EN CLINIQUE ET EN COURS D'EXPERIMENTATION.....	25
A. Paroi artérielle normale et principales pathologies artérielles.....	26
B. Les substituts vasculaires actuels et leurs limites.....	31
1) Les substituts vasculaires autologues.....	31
a) Les substituts autologues veineux.....	31
b) Les substituts autologues artériels.....	31
2) Les substituts vasculaires d'origine synthétique.....	32
a) Prothèses en polytétrafluoroéthylène (PTFE).....	32
b) Prothèses en polytétraphtalate d'éthylène (PET).....	33
c) Prothèses en polyuréthane (PU).....	34
3) Limites des prothèses vasculaires biologiques et synthétiques.....	35
4) Le substitut vasculaire « idéal » : cahier des charges.....	36
C. Les substituts vasculaires issus de l'ingénierie tissulaire.....	37
1) Les différentes stratégies en ingénierie vasculaire.....	37
2) Les substituts vasculaires hybrides.....	39
3) Les substituts vasculaires constitués uniquement de matériel biologique.....	39
a) Méthode par assemblage de feuillets cellulaires.....	39
b) Méthodes utilisant le « bioprinting ».....	41
III. INGENIERIE VASCULAIRE : DEVELOPPEMENTS PORTANT SUR LES ELEMENTS DE LA TRIADE.....	43
A. Etat de l'art portant sur la composante matricielle (« scaffold »).....	44
1) Propriétés d'une matrice pour l'ingénierie vasculaire.....	44
2) Les différents types de « scaffolds » pour l'ingénierie vasculaire.....	45

a) Les matrices synthétiques.....	46
Les matrices synthétiques non-dégradables	46
Les matrices synthétiques dégradables	47
b) Les matrices biologiques.....	48
Les matrices biologiques décellularisées	48
Les préparations à partir de composants de la matrice extra-cellulaire	50
Les préparations à partir de protéines et de polysaccharides naturels	53
3) Modifications de surface des matériaux	55
a) Les principales modifications de surface	55
b) Modification des matériaux par des composés biologiques favorisant l'adhérence cellulaire	58
c) Fonctionnalisation de matériaux par des peptides d'adhérence	59
d) Modification des matériaux par films multicouches de polyélectrolytes	61
e) Modification des polymères par délivrance de gènes.	64
 B. Etat de l'art portant sur la composante cellulaire	 64
1) Rappels physiologiques concernant l'endothélium vasculaire mature	65
a) Marqueurs des cellules endothéliales (CEs)	66
b) Fonctions des CEs	68
c) Spécificités des CEs d'artère ou de veine	76
2) Les cellules souches embryonnaires et foetales	78
a) Les cellules souches embryonnaires.....	79
b) Les cellules souches foetales.....	79
3) Les cellules souches adultes	80
a) Définitions	80
b) Marqueurs des cellules souches adultes.....	80
c) Isolement des cellules souches adultes	81
d) Les cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques.....	82
4) Les cellules progénitrices et les EPCs	87
a) Origine et différenciation des EPCs.....	87
b) Caractérisation phénotypique des EPCs précoces et tardifs	92
c) Méthodes d'isolement <i>in vitro</i> des EPCs	96
d) Rôle du VEGF dans la différenciation des EPCs.....	99
e) Implication des EPCs dans l'angiogenèse et évolution du concept	100
f) Mécanisme de mobilisation des EPCs permettant la néovascularisation.....	101
g) Applications diagnostiques et thérapeutiques des EPCs.....	106
h) Différenciation des EPCs en CEs de type artériel ou veineux	113
5) Les cellules génétiquement modifiées	114
a) Modifications de CEs matures.....	114
b) Les cellules souches induites pluripotentes (iPS).....	114
 C. Les signaux/Les bioréacteurs	 115
1) La densité d'ensemencement cellulaire et l'adhérence cellulaire.	116
2) Les transports de nutriments et de facteurs de croissance à l'intérieur du scaffold	117
a) L'oxygène	117
b) Les facteurs de croissance.....	118
3) Les contraintes mécaniques	119
a) Les différents types de contraintes mécaniques exercées sur les CEs	119
b) Impact du shear stress sur les CEs matures	120
c) Impact du shear stress sur les progéniteurs endothéliaux	125
 OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	 127

RESULTATS	132
I. Progéniteurs endothéliaux issus de cellules souches de moelle osseuse.	133
A. Introduction	133
B. Article I : “ Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels : a pre-requisite for vascular tissue engineering”	134
C. Conclusions	135
II. Progéniteurs endothéliaux issus de sang périphérique humain : obtention et comparaison avec des CEs matures en vue d’une utilisation en ingénierie vasculaire... 136	
A. Introduction	136
B. Article II : “Human progenitor derived endothelial cells versus venous endothelial cells for vascular tissue engineering : an <i>in vitro</i> study”.	136
C. Conclusions	137
III. Progéniteurs endothéliaux issus de sang périphérique humain : impacts du support et du shear stress.....	139
A. Introduction	139
B. Article III : “Polyelectrolyte multilayer films allow seeded human progenitor derived endothelial cells to remain functional under shear stress <i>in vitro</i> ”.....	139
C. Conclusions	140
IV. Progéniteurs endothéliaux dans l’ingénierie du tissu osseux vascularisé	141
A. Introduction	141
B. Article IV : “Human progenitor derived endothelial cells are not suitable for inducing osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells”	146
C. Conclusions	147
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	148
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	155
BIBLIOGRAPHIE	157

LISTE DES ABREVIATIONS

AT	antithrombine
BAECs	Bovine Arterial Endothelial Cell
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMC	Bone Marrow Cells
BOECs	Blood Outgrowth Endothelial Cells
CAC	Circulating Angiogenic Cells
CE	Cellule Endothéliale
CEC	Circulating mature Endothelial Cell
CFU	Colony Forming Unit
CHD	Coronary Heart Disease
CML	Cellule Musculaire Lisse
CMMC	Culture Modified Mononuclear Cell
CMN	Cellule Mononuclée
CSF	Colony Stimulating Factor
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CSM	Cellule Souche Mésoenchymateuse
Cx37, Cx40, Cx43	Connexines 37,40 43
Dil-Ac-LDL	Acetylated Low Density Lipoprotein, labeled with 1,1'-dioctadecyl – 3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate
EC	Endothelial Cell
ECFC	Endothelial Colony Forming Cell
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	endothelial Nitric Oxyde Synthase
EPC	Endothelial Progenitor Cell
EPDC	Endothelial Progenitor Derived Cell
ePTFE	Polytétrafluoroéthylène expansé
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ET	Endothéline
FGF	Fibroblast Growth Factor
FT	Facteur Tissulaire
GAG	Glycosaminoglycane
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GM	Granulocyte-Macrophage
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GMP	Good Manufacturing Practice
HBMSC	Human Bone Marrow Stromal Cell
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HOP	Human OsteoProgenitor
HSC	Hematopoietic Stem Cell
HSF	Human Skin Fibroblast

HSVEC	Human Saphenous Vein Endothelial Cell
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
HUVSMC	Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cell
ICAM	Inter Cellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukine
iPS	induced Pluripotent Stem Cell
ITMO	Institut Thématique Multi-Organismes
KDR/Flk-1/ VEGFR-2	Kinase insert Domain Receptor/fetal liver kinase-1/ Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
MAP	Mitogen Activated Protein
MAPC	Multipotent Adult Progenitor Cell
MEC	Matrice Extracellulaire
MME	Matrix Metalloelastase
MMP	Matrix Métalloprotéinase
MO	Moelle Osseuse
MPE	Multicouche de Polyélectrolyte
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxydase
NFκB	Nuclear Factor kappa B
NO	Nitric Oxyde (Monoxyde d'azote)
NOS	NO synthase
NRP1	Neuropilin-1
OEC	Outgrowth Endothelial Cell
P4HB	Poly-4-hydroxybutyrate
PAH	Poly(allyamine hydrochlorure)
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
PB	Peripheral Blood
PCL	Poly(caprolactone)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDEC	Progenitor Derived Endothelial Cell
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (ou CD31)
PEI	Poly(ethyleneimine)
PET	Polyéthylène Téréphtalate
PGA	Poly(glycolic) Acid
PHA	Poly(hydroxyalkanoate)
PLA	Poly(lactic) Acid
PLLA	Poly(L-lactic) Acid
PLN	Peripheral Lymph Node
PMF	Polyelectrolyte Multilayer Film
PSS	Poly (styrene-4-sulfonate)
PTFEe	Polytetrafluoroéthylène expansé
PU	Polyuréthane
ROS	Reactive Oxygen Species
SCF	Stem Cell Factor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIS	Small Intestinal Submucosa
SMC	Smooth Muscle Cell
SS	Shear Stress

SSREs	Shear Stress Responsive Elements
TCPS	Treatment Culture Plastic Surface
TEBV	Tissue Engineered Blood Vessel
TF	Tissue Factor (Facteur Tissulaire)
THBD ou TM	Thrombomoduline
Tie-2	Tunica intimal endothelial cell kinase
TNF	Tumor Necrosis Factor
t-PA	tissue-Plasminogen Activator
UEA	Ulex Europeus Agglutinin lectin
u-PA	Urokinase-Plasminogen Activator
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VE-cadhérine	Vascular-Endothelial cadhérine
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
vWF	von Willebrand Factor

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des Figures

Figure 1: Evolution de la science des biomatériaux [Rabkin and Schoen, 2002].....	14
Figure 2 : Principe général de l'ingénierie tissulaire [Van Blitterswijk, 2008].....	17
Figure 3 : Paradigme « complet » de l'ingénierie tissulaire [Rabkin and Schoen, 2002].....	22
Figure 4 : Vision futuriste de bioréacteurs en systèmes clos pour la production automatisée en ingénierie tissulaire: [Martin et al., 2004].....	24
Figure 5 : Les différentes couches constitutives d'une artère et d'une veine www.coryi.org/cardiology/images/artery-vein.jpg.....	27
Figure 6: Concepts incomplets d'ingénierie tissulaire appliqués au domaine cardio-vasculaire [Rabkin and Schoen, 2002].....	38
Figure 7 : Production de vaisseaux humains par auto-assemblage [Stoclet et al., 2004].....	40
Figure 8 : Construction d'un TEBV par bioprinting [Norotte et al., 2009].	42
Figure 9 : Paramètres du contrôle de la structure et de la fonction d'un produit d'ingénierie.....	43
Figure 10 : Exemples de techniques de modifications de surface favorisant l'endothélialisation [de Mel et al., 2008].	57
Figure 11 : Représentation schématique de la formation des MPEs	62
Figure 12 : Facteurs synthétisés par les CEs [Galley and Webster, 2004].....	69
Figure 13 : Représentation simplifiée de la cascade de coagulation	72
Figure 14 : Régulation de la coagulation par la cellule endothéliale [Guillin et al., 1993].....	73
Figure 15 : Fibrinolyse simplifiée	75
Figure 16 : Différences entre artères et veines [Torres-Vazquez et al., 2003].....	77
Figure 17 : Cellules souches post natales et cellules progénitrices. [Asahara and Kawamoto, 2004]	82
Figure 18 : Cellules souches hématopoïétiques et cascade putative du profil de différenciation des progéniteurs endothéliaux issus de moelle osseuse [Asahara and Kawamoto, 2004]	85
Figure 19 : Origine des types cellulaires capables de se différencier en CEs [Urbich and Dimmeler, 2004a].....	88
Figure 20 : Origine et différenciation des EPCs [Smadja et al., 2007].....	89
Figure 21 : Origine des EPCs: marqueurs membranaires [Urbich and Dimmeler, 2004b].....	90
Figure 22 : Diagramme de Venn simplifié décrivant les sous-groupes d'EPCs [Fadini et al., 2008]	91
Figure 23 : Différenciation des EPCs précoces et tardifs et marqueurs antigéniques de surface [Shantsila et al., 2008].....	96
Figure 24 : Principales méthodes de culture permettant d'obtenir des EPCs.....	98
Figure 25 : Evolution du concept de néoangiogenèse chez l'adulte [Pearson, 2009].....	100
Figure 26 : Mécanisme de néovascularisation physiologique [Krenning et al., 2009].....	103
Figure 27 : Mécanismes et médiateurs de la mobilisation des EPCs à partir de la moelle osseuse [Leone et al., 2009]	104
Figure 28 : Progéniteurs endothéliaux : applications thérapeutiques potentielles.	107
Figure 29 : Contraintes mécaniques exercées sur la paroi artérielle [Ohashi, 2005]	120
Figure 30 : Réponse des CEs en fonction du flux [Hahn and Schwartz, 2009].....	121
Figure 31 : Le shear stress laminaire induit la réorganisation du cytosquelette et l'alignement des CEs [Li et al., 2005].	122
Figure 32 : Mécanotransducteurs endothéliaux [Hahn and Schwartz, 2009]	123
Figure 33 : Activation par le shear stress des voies de signalisation dans la CE [Chien, 2007]..	124
Figure 34 : Diagramme schématique montrant l'action du SS sur la CE	124
Figure 35 : Les stratégies de vascularisation d'un produit d'ingénierie tissulaire [Santos and Reis, 2009].....	143
Figure 36 : Mécanismes sollicités dans la réparation tissulaire.....	153

Liste des Tableaux

Tableau 1: Cellules utilisables en ingénierie tissulaire [Nerem, 2006]	20
Tableau 2: Choix possible pour les pontages coronariens et vasculaires périphériques	30
Tableau 3 : Matrices synthétiques et biologiques, d'après [Aper et al., 2009]	45
Tableau 4 : Séquences peptidiques utilisées pour favoriser l'adhésion, la prolifération et la différenciation des CEs	59
Tableau 5 : Marqueurs endothéliaux constitutifs des CEs humaines [Garlanda and Dejana, 1997]	67
Tableau 6 : Marqueurs inductibles des CEs humaines [Garlanda and Dejana, 1997]	68
Tableau 7 : Régulation de la coagulation par les CEs [Shireman and Pearce, 1996].....	72
Tableau 8 : Marqueurs moléculaires de l'endothélium vasculaire [Dela Paz and D'Amore, 2008]	78
Tableau 9 : Marqueurs communément utilisés pour identifier les cellules souches adultes dans différents tissus.....	81
Tableau 10 : Comparaison des CSHs issues de sang périphérique ou de sang de cordon ombilical [Hombach-Klonisch et al., 2008].....	86
Tableau 11 : Terminologie utilisée pour décrire les deux types de progéniteurs endothéliaux. [Smadja and Gaussem, 2009]	93
Tableau 12 : Caractérisation des deux types de progéniteurs endothéliaux.....	95
Tableau 13: Facteurs influençant la mobilisation des EPCs [Leone et al., 2009].....	105
Tableau 14 : Essais cliniques d'angiogenèse thérapeutique. [Krenning et al., 2009].....	109

INTRODUCTION GENERALE

L'inéluctable outrage du temps sur le corps humain et les nombreuses maladies qui en découlent, comme l'athérosclérose, l'arthrose... expliquent les besoins croissants en organes de remplacement. De plus l'atteinte des tissus ou des organes dans leur intégrité plastique et fonctionnelle par des lésions d'origine traumatique ou pathologique, n'est pas toujours réparable par les processus naturels.

Les réussites remarquables obtenues dans le domaine des transplantations d'organes, réussites techniques associées à une meilleure maîtrise des mécanismes de rejet, restent cependant tributaires de différents facteurs au premier rang desquels on trouve la pénurie de greffons, le risque de transmission d'agents pathogènes, et l'obligation du suivi d'un traitement immunosuppresseur. Scientifiques et médecins cherchent depuis longtemps à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisables pour la réparation ou le remplacement d'organes ou de tissus qui viendraient compléter ou se substituer à la réparation naturelle ou à ces greffes.

Ainsi pour pallier les déficiences du corps humain, l'utilisation de biomatériaux et de matériels implantables pour effectuer ou guider la réparation tissulaire artificielle est largement exploitée dans de nombreux domaines et spécialités médicales et chirurgicales. Mais la restauration des fonctions des organes ou tissus ainsi réparés ne peut être assurée à long terme que si le ou les biomatériaux utilisés s'intègrent parfaitement aux tissus au sein desquels ils sont implantés. Le site d'implantation, la nature chimique du biomatériau, ses propriétés physico-chimiques et électriques de surface, la libération éventuelle de produits de dégradation et de substances cytotoxiques sont autant de paramètres qui peuvent influencer la réponse cellulaire et conditionner la biocompatibilité. Le défi lancé aux chercheurs dans le domaine des biomatériaux est de parvenir à comprendre les mécanismes qui entrent en jeu à l'interface tissu vivant-matériau afin d'améliorer la biocompatibilité. La biocompatibilité d'un biomatériau ne peut être garantie que si l'on est : i) en mesure de contrôler à la fois la nature et la quantité de produits (solubles ou insolubles) transférés à l'organisme receveur à la suite de l'implantation et ii) capable d'orienter les interactions matériau-tissu en faveur de son intégration en optimisant les caractéristiques physico-chimiques superficielles.

Néanmoins, l'implant demeure un corps étranger dont les performances fonctionnelles se trouvent progressivement hypothéquées par son incapacité à s'intégrer

aux tissus vivants, ou à interagir positivement avec les systèmes biologiques avec lesquels il se trouve obligatoirement en relation.

C'est ainsi que plusieurs générations de biomatériaux se sont succédées (Figure 1) pour donner naissance à des biomatériaux biocoopératifs et bioactifs : avec la troisième génération de biomatériaux, l'objectif est de favoriser une réaction hautement spécifique des cellules aux niveaux moléculaire et protéique. Qu'ils soientensemencés avec des cellules *in vitro* pour une implantation subséquente, ou rendus aptes à fixer spécifiquement des cellules *in vivo*, de tels matériaux permettent la confection de constructions bioartificielles capables de remplacer des organes ou tissus et à même de garantir biocompatibilité fonctionnelle et pérennité à long terme, sans le recours à des thérapeutiques adjuvantes (par exemple pour minimiser la réaction immunitaire ou l'activation de la coagulation).

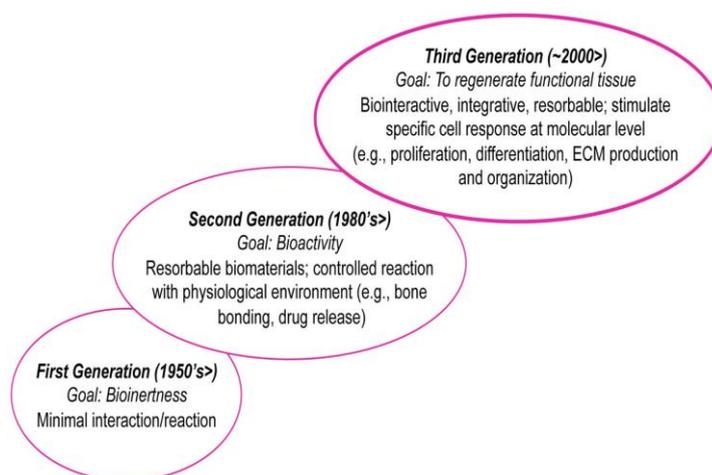


Figure 1: Evolution de la science des biomatériaux [Rabkin and Schoen, 2002]

Trois générations de biomatériaux utilisables en chirurgie se sont succédées : depuis les biomatériaux inertes (présentant des interactions minimales avec les tissus), en passant par les matériaux bioactifs (comportant des composants biologiques afin de favoriser une réaction contrôlée des tissus) et jusqu'à la dernière génération de biomatériaux capables de régénérer des tissus fonctionnels.

Le génie tissulaire ou ingénierie tissulaire, domaine à la croisée de l'industrie traditionnelle des organes artificiels et des biotechnologies, utilise la dernière génération de biomatériaux et matériels implantables. Dans l'arsenal des solutions qui s'offrent aux médecins et chirurgiens, la médecine régénératrice est une voie prometteuse, une alternative à la pratique de la greffe dont les limites ont été mentionnées plus haut. Aux côtés des médicaments, des dispositifs médicaux et des transplantations d'organes, le

développement de ces stratégies devrait déboucher sur de nouvelles familles de produits dont le corps médical pourra faire bénéficier les patients pour améliorer leur qualité de vie.

Actuellement, face aux atteintes à l'intégrité du système vasculaire (première cause de mortalité dans les pays occidentaux), dues à des phénomènes lents et irréversibles qui conduisent soit à l'obstruction, soit à la dilatation des vaisseaux et engagent le pronostic fonctionnel et parfois vital, des solutions symptomatiques existent. Elles consistent, dans le cas de vaisseaux de gros diamètre, à restaurer la circulation sanguine en remplaçant le segment artériel défectueux par un substitut vasculaire qui doit répondre à une double exigence : combiner des propriétés structurales garantissant un comportement mécanique satisfaisant c'est-à-dire adapté à la fonction attendue et des propriétés superficielles garantissant son hémocompatibilité (instauration de relations positives à l'interface matériau-tissu). Dans un vaisseau natif, la surface luminale endothéliale est parfaitement hémocompatible et thromborésistante à l'état physiologique et aujourd'hui, aucun des biomatériaux à usage vasculaire ne possède les propriétés de thromborésistance de l'endothélium normal.

C'est donc dans ce contexte que notre travail a été entrepris, en abordant les principes de l'ingénierie tissulaire (principalement des vaisseaux) par les éléments de la triade qui la définissent : endothélium ou progéniteurs de l'endothélium, biomatériaux et environnement biomécanique. Ce manuscrit de thèse se présente en 4 parties:

- La première partie, bibliographique, rappelle les différentes approches conduites pour la substitution vasculaire, qu'il s'agisse des solutions cliniques ou des travaux de recherche en ingénierie tissulaire, avec une attention particulière à la littérature portant sur les cellules endothéliales issues de progéniteurs, puisqu'elles sont au centre de notre travail ;
- Après la présentation des objectifs qui constitue la deuxième partie, la troisième partie présente les résultats sous forme d'articles issus des travaux réalisés au cours de ces quatre années de doctorat. Trois articles sont parus et le quatrième n'est pas encore soumis. Chaque article est accompagné de courtes introduction, limite et conclusion. Les matériels et méthodes utilisés ne sont présentés qu'en à eux, qu'à l'intérieur des articles ;
- La dernière partie concerne la conclusion générale de ces travaux et sera l'occasion de définir les perspectives qui s'inscriront dans le projet du futur contrat quadriennal de notre laboratoire, s'il est retenu.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. CONCEPT D'INGENIERIE TISSULAIRE: DEFINITION, GENESE, ENJEUX, APPLICATIONS

Le thème “Biomatériaux, ingénierie tissulaire et médecine régénératrice” est porteur de développement de nouveaux produits de santé qui offrent une alternative thérapeutique, voire un progrès par rapport aux greffes d'organes ou de tissus et aux solutions basées sur l'usage de matériels prothétiques. La médecine régénératrice recouvre les domaines de l'ingénierie tissulaire et des thérapies génique et cellulaire. La thérapie cellulaire consiste en l'ensemencement de cellules (cellules souches ou non, transformées ou non par thérapie génique), sous forme encapsulée ou non dans un organe lésé afin de restaurer ses fonctions. Quant au concept d'ingénierie tissulaire, il a pour but de développer des substituts biologiques qui vont restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus (Figure 2).

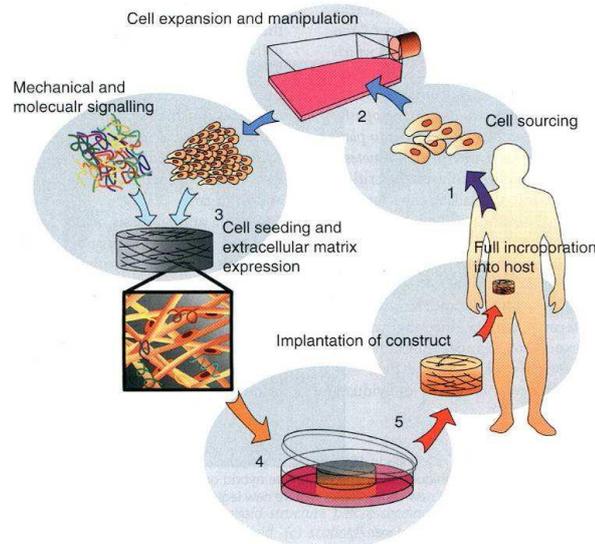


Figure 2 : Principe général de l'ingénierie tissulaire [Van Blitterswijk, 2008]

Résumé des principales étapes de l'ingénierie tissulaire « de la boîte de culture jusqu'au lit du patient ». Les cellules peuvent être prélevées chez le patient, multipliées et/ou différenciées en culture *in vitro* puis associées à une matrice ainsi qu'à des molécules actives. Cette structure est alors cultivée sous contraintes dynamiques et/ou biochimiques pour permettre la synthèse d'une matrice extra cellulaire par les cellules elles-mêmes. Enfin, ce produit d'ingénierie tissulaire est réimplanté chez le patient.

Pour équiper les matériaux de moyens propres à leur permettre de mieux s'intégrer au sein des tissus receveurs, l'ingénierie tissulaire permet d'envisager l'élaboration de substituts de tissus ou d'organes ou de guides de reconstruction de ces tissus en associant une composante artificielle d'origine synthétique ou naturelle (élaborée à partir d'un ou plusieurs biomatériaux rationnellement fonctionnalisés) et une composante cellulaire ou tissulaire d'origine autologue (un ou plusieurs types de cellules), aptes à participer à la néoformation des tissus à remplacer ou à réparer, ou à assurer la fonction de l'organe défaillant.

L'ingénierie tissulaire est une spécialité multidisciplinaire en plein essor, au carrefour des sciences du vivant et des sciences de l'ingénieur, qui utilise le biomimétisme. Elle tire parti entre autres des avancées réalisées par les spécialistes de biologie du développement et de biologie cellulaire (possibilité de cultures de cellules différenciées) et des progrès réalisés par les spécialistes des biomatériaux et du génie des procédés. De plus, l'élaboration de modèles animaux pertinents destinés à valider expérimentalement l'intérêt des produits issus de l'ingénierie tissulaire, et la mise au point de méthodologies d'exploration (si possibles non invasives) des performances fonctionnelles de ces produits et de leur intégration complètent le champ des préoccupations des chercheurs. Ainsi, pour fabriquer un tissu, de nombreuses disciplines sont impliquées : science des matériaux, biologie moléculaire et cellulaire, ingénierie chimique et mécanique, biochimie, robotique, bioinformatique, médecine et chirurgie.

A. LES ACTEURS INTERVENANT DANS LE CONCEPT D'INGENIERIE TISSULAIRE OU LA TRIADE DE L'INGENIERIE TISSULAIRE : GENERALITES

Selon Riha [Riha et al., 2005], l'ingénierie tissulaire se définit :

- soit par ses applications. L'ingénierie tissulaire peut être considérée comme la fabrication d'un tissu néoformé et fonctionnel qui peut être utilisé *in vivo* à des fins thérapeutiques ou *in vitro* pour la recherche.
- soit par ses bases scientifiques. L'ingénierie tissulaire est aussi la coalescence de plusieurs éléments : un support ou matrice appelé « scaffold » (échaffaudage), des cellules et des signaux (par l'intermédiaire d'un bioréacteur) dans le but de créer un tissu biologiquement actif.

1) LES BIOMATERIAUX

La Société Européenne des Biomatériaux (ESB) a défini lors de la conférence de Chester (UK) en 1991, puis à l'occasion de celle de Sorrento (Italie) en 2005, un biomatériau comme « un matériau conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle ». Les biomatériaux doivent diriger l'organisation, la croissance et la différenciation des cellules, en apportant un support physique. Dans le cas idéal, il doit se résorber au rythme de la réparation des tissus environnant la lésion. Parmi les biomatériaux en cours de développement les polymères et hydrogels occupent une place prépondérante en raison de leurs propriétés de biocompatibilité, d'injectabilité et de réticulation. Les biomatériaux sont fondamentaux dans les avancées de l'ingénierie tissulaire et une grande variété de supports a été développée, tels des analogues de la matrice extracellulaire capables de permettre l'attachement cellulaire et dans certains cas capables d'envoyer les signaux nécessaires pour contrôler le développement aux niveaux spatial et temporel. Aussi des molécules solubles ou insolubles peuvent-elles être utilisées pour guider les cellules. Le matériau et les signaux doivent fournir des instructions à l'hôte et/ou au donneur de cellules afin de permettre le contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaires. La conception de nouveaux substituts passe par la recherche de matériaux support, biologiques ou artificiels qui seront réhabités par des cellules à même d'élaborer leur propre matrice extracellulaire puis de plus ou moins dégrader le biomatériau à moyen ou long terme. La colonisation de ces matrices par des cellules nécessite la fonctionnalisation du matériau. La technologie actuelle fait appel à la création de fonctions bioactives de répartition plus ou moins homogène ainsi qu'à de nouvelles stratégies pour créer des nano ou microdomaines bioactifs. Ainsi l'amélioration de la situation passera par i) l'élaboration de nouveaux concepts pour améliorer les performances des dispositifs médicaux implantables actuels fabriqués avec les mêmes matériaux ou de nouveaux matériaux ; ii) l'utilisation de matériaux innovants ; iii) l'appel à de nouveaux traitements de surface permettant de maîtriser les caractéristiques superficielles des matériaux à l'échelle nanométrique grâce aux nanotechnologies.

2) LES CELLULES

Un deuxième défi dans la création d'un nouveau tissu vient du fait que les cellules qui sont mises en culture en dehors de l'organisme ne s'assemblent pas nécessairement en un organe tridimensionnel. En effet, les conditions de culture *in vitro* ne reproduisent pas complètement l'environnement *in vivo* beaucoup plus complexe : à l'intérieur du corps, des signaux sont transmis aux cellules par leur environnement extérieur. Ces signaux peuvent être chimiques, mécaniques et électriques et stimulent l'assemblage des cellules en organes. Il est donc nécessaire d'essayer de reproduire les conditions naturelles de différentes manières : mise en place de modes de culture et de maintien ou d'induction de la différenciation de ces cellules, bioréacteurs pour réguler le flux nutritif, compression ou tension des cellules, utilisation de facteurs de croissance...

L'identification des cellules appropriées à l'application souhaitée (cellules autologues versus allogènes, cellules génétiquement modifiées versus cellules souches, cellules souches adultes versus cellules souches embryonnaires, cellules de moelle osseuse versus cellules de tissu adipeux [Rada et al., 2009] [Locke et al., 2009] versus cellules pulpaire [Iohara et al., 2008] [Sloan and Waddington, 2009] est toujours source de débat en ingénierie tissulaire [Nerem, 2006]. Les cellules utilisées peuvent donc être des cellules matures ou des cellules souches (Tableau 1). En effet, les cellules souches capables d'autorenouvellement et de différenciation, ont l'avantage d'avoir un pouvoir prolifératif élevé.

Cellules utilisables	Commentaires/limites
Différenciées autologues	- A extraire, amplifier, ensemercer - Mais expansion limitée
Différenciées allogènes	Compatibilité immunologique
Embryonnaires	Disponibilité immédiate
Progénitrices/souches adultes	- Attractif - Recrutement in situ possible

Tableau 1: Cellules utilisables en ingénierie tissulaires [Nerem, 2006]

3) LES SIGNAUX

Aux choix d'une matrice (« scaffold ») appropriée et d'une source adéquate de cellules s'ajoutent des signaux spatio-temporels nécessaires pour optimiser le développement d'un tissu ou d'un organe par ingénierie tissulaire. L'identification de ces signaux ainsi que les approches pour les délivrer doivent aussi être effectuées pour permettre la différenciation et la morphogénèse.

Il est courant de distinguer des signaux de type biochimique ou biomécanique. Parmi les facteurs biochimiques on peut citer les : facteurs angiogènes, facteurs de croissance, cytokines, chemokines, facteurs de différenciation et protéines morphogéniques, exogènes ou produits par les cellulesensemencées dans ou au contact des biomatériaux. Ces derniers au cours de la maturation *in vitro* du tissu ou du remodelage *in situ* après leur implantation peuvent se trouver modifiés dans leurs propriétés physico-chimiques et alors fixer ou relarguer des facteurs solubles. La compréhension des interactions entre matrice extracellulaire et cellules adhérentes au « scaffold », la compréhension de l'expression des gènes nécessaires pour induire la différenciation et la croissance du tissu seront la base du développement de l'ingénierie tissulaire [Scheller et al., 2009].

Concernant les aspects biomécaniques, tout type de tissu étant *in vivo* soumis à des contraintes, il est nécessaire de les prendre en compte et d'étudier les propriétés des produits d'ingénierie tissulaire face à ces contraintes. Un des gages de réussite et de stabilité de ces constructions artificielles est dépendant de la mise en place de dispositifs permettant leur production dans des conditions mécaniques proches de celles des tissus qu'ils vont remplacer. Enfin l'agencement, « design », tissulaire est un élément fondamental et doit prendre en considération la croissance tissulaire en 3D et l'utilisation de bioréacteurs pour l'apport de nutriments et d'oxygène, le rôle de la néovascularisation de certains tissus, le stockage et la distribution des cellules. Les bioréacteurs sont des dispositifs de laboratoire qui peuvent être utilisés pour étudier et probablement améliorer les produits d'ingénierie tissulaire au niveau de leur structure, de leurs propriétés et de leur intégration. Utilisés avant l'implantation, ils permettent soit d'accélérer la croissance tissulaire et la différenciation, soit de tester la réponse physiologique des constructions à l'environnement biomécanique auquel elles seront confrontées ultérieurement après

implantation. Le bioréacteur mime ainsi les conditions *in vivo* et son utilisation influence viabilité, prolifération et phénotype cellulaires, contenu et architecture de la matrice extracellulaire dans le produit d'ingénierie tissulaire, sous l'action de forces mécaniques (tension, compression, contraintes de cisaillement, flux pulsatil...). Ces aspects sont essentiels non seulement pour des études fondamentales contrôlées du développement tissulaire 3D mais également pour réduire les coûts de fabrication des produits d'ingénierie tissulaire et favoriser leur utilisation clinique.

Pour résumer dans un schéma le cas de figure le plus général en ingénierie tissulaire, des cellules sontensemencées sur un échaffaudage composé par un polymère synthétique ou un matériel naturel, la construction est maturée *in vitro* et/ou ensuite implantée au lieu anatomique approprié (Figure 3). Chacun des éléments de la triade d'ingénierie tissulaire peut être modulé selon de nombreuses voies. Un des défis en ingénierie tissulaire est d'identifier la forme la plus appropriée de chacun des éléments de la triade pour l'application souhaitée. Par exemple, en ce qui concerne le matériau, sa forme (gel, fibre) peut de façon significative modifier la réponse biologique [Yeung et al., 2005].

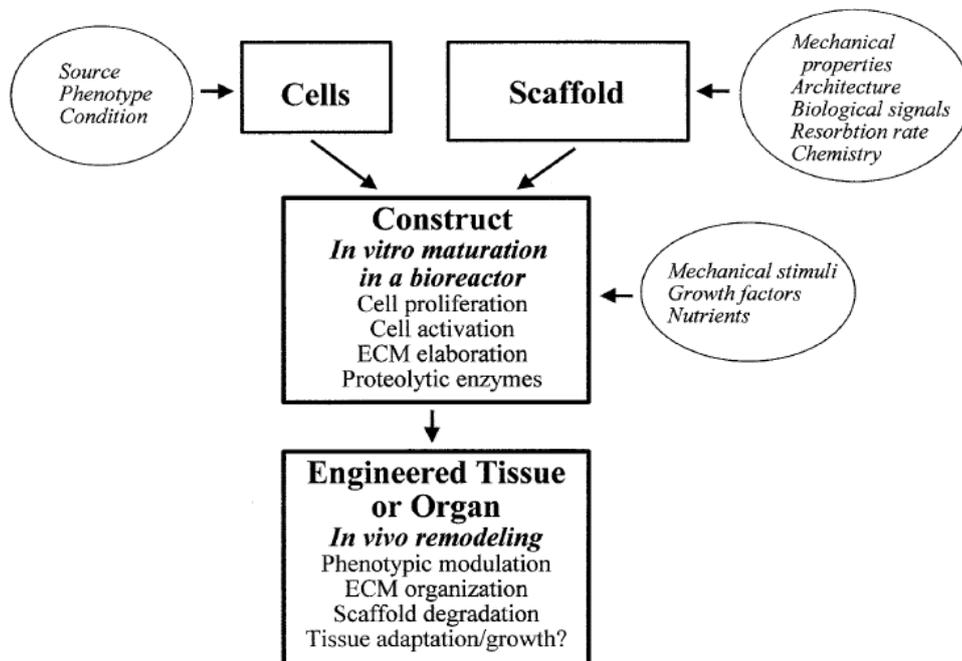


Figure 3 : Paradigme « complet » de l'ingénierie tissulaire [Rabkin and Schoen, 2002]

B. EXEMPLES D'APPLICATIONS CLINIQUES EN INGENIERIE TISSULAIRE ET LIMITES DU DOMAINE

L'ingénierie tissulaire a pour but ambitieux de synthétiser pratiquement tous les types de tissus humains, y compris le foie, les os, le cartilage, les vaisseaux sanguins, les muscles cardiaques, les nerfs... Aussi, le domaine de l'ingénierie tissulaire est-il en pleine émergence en raison d'une demande toujours croissante de substituts de tissus, du déficit d'organes pour les transplantations et des limitations des xénotransplantations. Des produits issus de l'ingénierie tissulaire sont actuellement utilisés cliniquement : citons la substitution vésicale, vasculaire (détaillée plus loin), osseuse, du cartilage [Kerker et al., 2008], la reconstruction de peau [Priya et al., 2008] et des produits disponibles au plan commercial comme Apligraf[®] (Novartis AG, Basle, Switzerland), Dermagraft[®] (Advanced BioHealing Inc., New York, NY), Integra[®] (Integra Life Sciences) et Carticel[®] (Genzyme Corporation, Cambridge, MA), ce dernier ayant été le premier produit autorisé en 1996. Les produits de l'ingénierie tissulaire peuvent grandement améliorer les thérapies actuelles tout en réduisant les coûts du traitement. Citons comme exemple la transplantation d'organes : un organe synthétisé éliminera les problèmes de rejet, rendant inutiles les médicaments immunosuppresseurs qui les préviennent et supprimant les complications qui découlaient de leur utilisation.

L'ingénierie tissulaire est un domaine qui s'est développé assez rapidement et attire l'intérêt scientifique de nombreuses équipes de recherche dans le monde. Les entreprises lancées dans ce domaine en Amérique du Nord au début des années 90, avec des fonds importants issus du capital-risque ont connu des difficultés à partir de 1995 avec une crise particulièrement grave en 2000-2002. Cependant, depuis cinq ans, l'activité économique en ingénierie tissulaire connaît un réel rebond, avec au cours de l'année 2007, plus d'un million de patients traités avec ces produits entraînant une résurgence d'entreprises (environ 200 dont 55% aux USA) ainsi que de nombreux produits en essai clinique ou pré-clinique (pour revue et recensement [Lysaght et al., 2008]). En Europe, en 2004, un rapport de la Commission Européenne [Bordenave et al., 2008] recensait seulement 113 entreprises (principalement des PME) impliquées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, dont dix seulement identifiées en France. Les raisons invoquées pour expliquer ces constatations sont en lien avec le cadre législatif européen, le rapport coût/efficacité, le « business plan » dans un domaine frontière entre l'industrie du médicament et celui du

dispositif médical, des aspects éthiques et enfin des aspects de formation. En France, comme le souligne le rapport «Orientations stratégiques de l'Institut Thématique Multi-Organismes (ITMO) Technologies pour la santé » récemment élaboré, le domaine Biotechnologies et Bioingénierie (auquel appartient celui de l'ingénierie tissulaire), comporte des faiblesses s'agissant du tissu industriel. Les sociétés impliquées en ingénierie tissulaire peinent à se développer, elle restent confrontées à une concurrence rude, à des choix stratégiques difficiles et enfin aux difficultés à mettre en place des essais cliniques associant biomatériaux et cellules dans un cadre législatif complexe, entre le dispositif médical, les produits de thérapie cellulaire et le médicament.

A terme il faudrait envisager la conception et la construction, à proximité des centres hospitaliers et blocs opératoires, d'unités de production semi-automatisées de produits d'ingénierie tissulaire, comme le suggérait I. Martin dans une vision futuriste (Figure 4) [Martin et al., 2004].

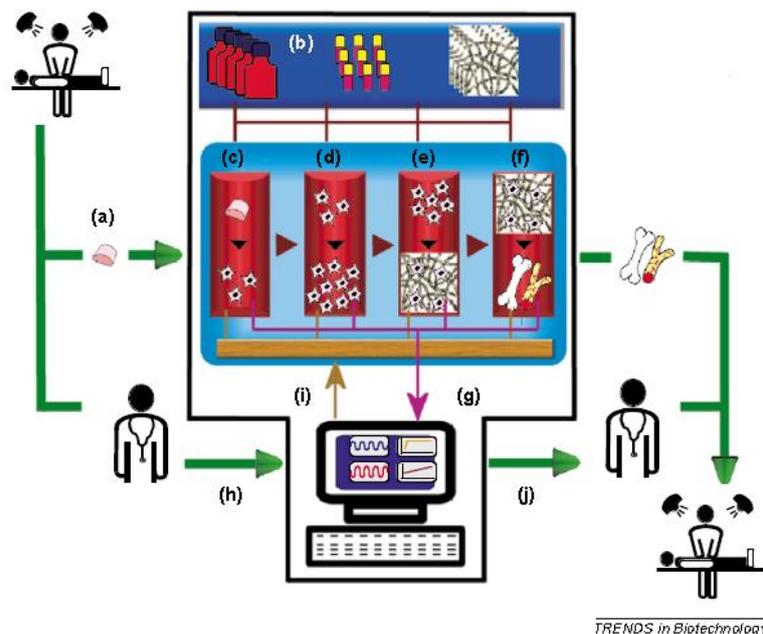


Figure 4 : Vision futuriste de bioréacteurs en systèmes clos pour la production automatisée en ingénierie tissulaire: [Martin et al., 2004]

a) Prélèvement d'un fragment biopsique et introduction dans le bioréacteur, sur le site hospitalier, b) Stockage des différents composants dans les conditions adéquates, c) Par l'intermédiaire du bioréacteur, isolement automatique des cellules, d) amplification, e) ensemencement sur le « scaffold », f) culture de la construction jusqu'à obtention du produit d'ingénierie tissulaire, g) « monitoring » et analyse des paramètres environnementaux de culture et de développement, h) en relation avec les résultats des études cliniques, i) les données obtenues peuvent être utilisées pour optimiser automatiquement les paramètres de culture, j) et fournir à l'équipe chirurgicale un planning d'implantation.

C. PERSPECTIVES EN INGENIERIE TISSULAIRE

Les perspectives pour l'évolution du domaine passent par des développements et des optimisations déjà mentionnés aux trois niveaux : choix des biomatériaux (« scaffolds »), des cellules (et du contrôle de leur différenciation) et des bioréacteurs. A cela s'ajoutent d'autres défis scientifiques et technologiques comme la nécessité de :

- développer des modèles de comportement multi-physiques et multi-échelles ; en effet le comportement des milieux vivants fait intervenir de multiples phénomènes couplés (fluides, transports, transferts...) à des échelles spatiale et temporelle variables (de la cellule à l'organe, de la seconde aux années) dans des complexités anatomiques, géométriques et pathologiques (selon le rapport de l'ITMO). Les modèles devront prendre en compte ces complexités.
- renforcer les bioprocédés de la cellule au produit afin de transformer une matière première biologique et/ou physico-chimique en produits possédant les qualités d'usage requises, dans des conditions GMP, pour des applications cliniques.
- développer des moyens non invasifs et objectifs pour suivre après implantation le devenir des assemblages (matériaux et cellules greffées).

II. LES SUBSTITUTS VASCULAIRES DISPONIBLES EN CLINIQUE ET EN COURS D'EXPERIMENTATION

Le concept d'ingénierie tissulaire, précédemment exposé, peut être appliqué au domaine vasculaire afin de développer des substituts vasculaires issus de l'ingénierie. En effet, malgré les progrès significatifs de la médecine vasculaire depuis ces 60 dernières années, et malgré des recherches intensives dans ce domaine, le matériel de pontage idéal n'est toujours pas disponible [Aper et al., 2009]. Ce champ d'investigation est d'autant plus fondamental que la prévalence des pathologies cardiovasculaires ne cesse d'augmenter, en lien avec l'augmentation de l'âge, de la sédentarité et des mauvaises habitudes alimentaires. Elles représentent la première cause de mortalité et de morbidité en France et dans le monde, leur prise en charge constituant donc un enjeu considérable en terme de santé publique [Fernandez et al., 2005].

L'élaboration de substituts vasculaires susceptibles d'assurer un service fonctionnel permanent sans le secours de thérapeutiques antithrombotiques constitue un double défi. Les solutions doivent permettre le contrôle de la relation entre le sang et la paroi des conduits prothétiques, contrôle qui passe par la mise au point de matériaux combinant des propriétés superficielles garantissant leur hémocompatibilité et des propriétés structurales adaptées à la confection de conduits tubulaires répondant aux critères de comportement mécanique à satisfaire pour un substitut vasculaire.

A. PAROI ARTERIELLE NORMALE ET PRINCIPALES PATHOLOGIES ARTERIELLES

La paroi d'une artère normale se compose de trois tuniques. De l'extérieur vers l'intérieur, on distingue : la tunique externe ou adventice, composée de tissus de connection en lien avec les tissus environnants et permettant l'innervation et la vascularisation des gros vaisseaux ; la tunique médiane ou média, constituée principalement de cellules musculaires lisses (CMLs) et de matrice extra-cellulaire, responsables de la vasomotricité du vaisseau ; la couche la plus interne ou intima est constituée par un sous-endothélium supportant une monocouche de cellules endothéliales (CEs). L'endothélium est responsable de l'hémocompatibilité du vaisseau. Deux limitantes élastiques interne et externe délimitent les couches (Figure 5).

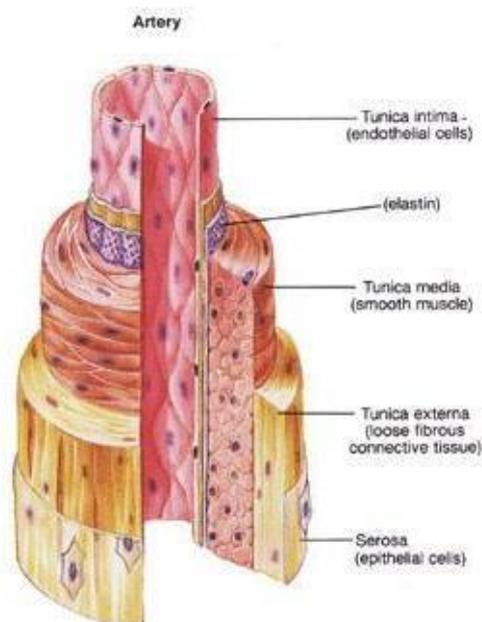


Figure 5 : Les différentes couches constitutives d'une artère et d'une veine
www.coryi.org/cardiology/images/artery-vein.jpg

Plusieurs pathologies peuvent atteindre les artères, dont les principales sont l'athérosclérose, la formation d'anévrismes, la dissection et la thrombose.

L'athérosclérose

La définition de l'athérosclérose proposée par l'OMS en 1957 est toujours d'actualité : « l'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et de moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires; le tout s'accompagnant de modification de la média ». Pour revue plus récente voir [Lusis, 2000]. Si elle touche principalement les artères de gros calibre (aorte et ses principales ramifications), elle peut également affecter les vaisseaux de petits calibres (artères coronaires et cérébrales). La principale caractéristique physiopathologique de l'athérosclérose est son évolution silencieuse pendant de très nombreuses années. La première étape de la formation de la plaque athéromateuse est la pénétration et l'accumulation des lipoprotéines de faible densité dans l'espace sous-endothélial. Les lipoprotéines subissent des modifications oxydatives qui activent les cellules endothéliales conduisant à l'expression de molécules d'adhésion à leur surface entraînant l'adhésion des

monocytes qui se transforment en macrophages et cellules spumeuses en captant les LDL-oxydées (low-density lipoprotein). Les macrophages et les lymphocytes infiltrant la lésion athéromateuse entretiennent une réaction inflammatoire chronique. Les macrophages et les CMLs, sources importantes de métalloprotéinases (MMPs), capables de dégrader la matrice extracellulaire (MEC), sont un élément régulateur de la stabilité des plaques. Elle résulte donc d'une cascade d'interactions complexes entre trois acteurs : les cellules (endothéliales, musculaires lisses, plaquettes, leucocytes, monocytes), les autres constituants de la paroi artérielle (tissu conjonctif) et les éléments plasmatiques (lipoprotéines).

Le développement de la plaque peut être compensé, au départ, par une augmentation de la taille de l'artère, c'est ce que l'on appelle le remodelage compensateur. Par la suite le développement de cette plaque athéroscléreuse tapissant la paroi interne des artères va obstruer partiellement (sténose), ou totalement (occlusion) la circulation sanguine. Les pathologies qui en découlent vont dépendre de la localisation de la plaque (syndromes coronaires aigus, accidents vasculaires aigus, artériopathies oblitérantes des membres inférieurs, ischémie mésentérique, maladie rénovasculaire....)

L'anévrisme

L'anévrisme artériel se définit comme une dilatation permanente et localisée d'un segment artériel avec perte du parallélisme des parois, d'au moins 1.5 fois le diamètre du vaisseau par rapport aux diamètres sus et sous-jacents du vaisseau normal. Les anévrysmes de l'aorte abdominale sont les plus fréquents. On distingue les anévrysmes fusiformes (les plus fréquents) avec une dilatation de toute la circonférence de l'aorte et des anévrysmes sacciformes où la dilatation est localisée sur une partie de la paroi. La principale cause des anévrysmes est l'athérosclérose (90%) mais des facteurs génétiques encore mal connus existent. Dans l'anévrisme « vrai » il y a atteinte des trois tuniques artérielles. On observe une destruction de la paroi par protéolyse de l'élastine et du collagène impliquant des MMPs (2 et 9). Elle s'accompagne d'une apoptose des CMLs et d'une réaction inflammatoire auxquelles s'ajoutent des contraintes biomécaniques conduisant à terme à la rupture.

La dissection

L'intégrité des trois tuniques constitutives d'une artère peut être rompue par déchirure (traumatique, iatrogène, maladie du tissu élastique). Il se produit alors une pénétration du sang au sein de la paroi de l'artère. La dissection peut donc entraîner la formation d'un faux chenal qui comprime la lumière du vaisseau et la naissance de ses collatérales. La paroi artérielle se trouve fragilisée et les débris libérés lors de la déchirure risquent de provoquer une embolie.

La thrombose

La thrombose est due à un phénomène de coagulation du sang (caillot sanguin ou thrombus) se produisant quand la plaque athéroscléreuse obstrue de façon importante la lumière du vaisseau. Un thrombus est constitué principalement de plaquettes, de fibrine et de globules rouges; l'ensemble adhère à la paroi artérielle. Les causes majeures de thrombose sont les modifications des propriétés des parois artérielles ou celles des propriétés du sang lui-même (hyperviscosité, troubles de la coagulation, maladies thromboemboliques) qui entraînent le ralentissement du flux sanguin. Le thrombus peut grossir jusqu'à obstruer totalement la lumière du vaisseau et arrêter le flux sanguin ; c'est le phénomène de thrombose oblitérante.

Le traitement de ces pathologies s'effectue en fonction de la gravité, selon deux types de techniques :

- Les techniques curatives endovasculaires (angioplastie, endoartériectomie et endoprothèse vasculaire ou stent).
- Les techniques réparatrices de pontage du segment vasculaire touché grâce à un substitut vasculaire. Le pontage instaure une dérivation qui contourne le point de sténose et restaure une circulation normale. En Europe 240 000 à 320 000 interventions pour pontage vasculaire périphérique et coronarien sont réalisées annuellement, représentant en France un total de 37 000 actes de même nature. La chirurgie de revascularisation s'applique schématiquement à deux types d'artères : des artères de gros et moyen calibre pour la chirurgie de l'ensemble de l'aorte et du carrefour aortique, et des artères de petit calibre pour la chirurgie de revascularisation sous-inguinale, des artères viscérales et des troncs supraaortiques [Chakfe et al., 2004].

Il existe trois grands types de substituts vasculaires : les substituts biologiques, synthétiques et ceux issus de l'ingénierie tissulaire [Bordenave et al., 2008] (Tableau 2).

Graft Type	Applied experimentally	Under clinical trial	Used routinely
Autogenous vein ^b	√	√	√
Radial artery [Yaginuma et al., 1998]	√	√	√
Internal mammary artery [Nollert et al., 1995]	√	√	√
Gastro-epiploic artery [Ishida et al., 2003]	√	√	√
ePTFE	√	√	√
Dacron	√	√	√
CPU	√	√	^a
<i>Tissue engineering</i>			
Seeded/hybrid	√	√	^c
Living graft	√	^c	^c

ePTFE: expanded polytetrafluoroethylene; Dacron: polyethylene terephthalate; CPU: compliant polyurethane graft.

^a In clinical trial imminent.

^b Saphenous or arm vein.

^c Not yet.

Tableau 2 : Choix possibles pour les pontages coronariens et vasculaires périphériques
[Vara et al., 2005]

B. LES SUBSTITUTS VASCULAIRES ACTUELS ET LEURS LIMITES

1) *LES SUBSTITUTS VASCULAIRES AUTOLOGUES*

Ce sont des substituts biologiques n'ayant subi aucun traitement susceptible de les rendre inertes. Les substituts autologues, aussi appelés autogreffes, sont utilisés notamment dans les pontages coronariens. L'intervention nécessite une greffe veineuse, la veine étant prélevée sur la jambe, ou une greffe artérielle, prélevée sur la paroi de la cage thoracique ou sur le bras.

a) Les substituts autologues veineux

Jose Goyanes a accompli avec succès dès 1906 la première interposition d'une greffe veineuse pour un segment d'anévrisme artériel chez l'homme. Près de cinq décennies plus tard, Kunlin a réalisé le premier pontage coronarien en utilisant la veine saphène autologue [Arnulf, 1987]. Avec ces greffons veineux autologues, on enregistre 80 à 90% de réussite après un an de mise en place, succès principalement attribué à la surface luminale endothélialisée [Lytle et al., 1985]. La dégénérescence tardive (occlusion au bout de dix ans) de ces greffons est considérée comme un effet secondaire dû au développement d'une sténose hyperplasique ou fibroblastique au niveau de l'anastomose [Davies and Hagen, 1994]. La prolifération cellulaire (CMLs), résulte en partie de la différence d'élasticité entre la veine saphène et l'artère receveuse [Ballyk et al., 1998]. La technique de prélèvement des greffons veineux doit être la plus atraumatique possible pour réduire les risques d'ischémie pariétale et de souffrance endothéliale. La crosse de la grande veine saphène est disséquée et sectionnée au ras de la veine fémorale, puis anastomosée sur une des artères du trépied fémoral. Son extrémité distale est ensuite disséquée et libérée des tissus environnants pour pouvoir être anastomosée sur l'artère receveuse [Kerdjoudj, 2007].

b) Les substituts autologues artériels

L'autogreffe artérielle constitue le substitut artériel idéal du fait de ses capacités de cicatrisation et de ses caractéristiques mécaniques. L'artère thoracique interne (ou mammaire interne) est la plus employée, notamment dans le cas de la revascularisation du

myocarde. Les premiers résultats concernant l'utilisation de l'artère thoracique interne ont été obtenus par Loop *et al.* [Loop et al., 1986]. Ces résultats montrent que 90% des greffons restent fonctionnels au-delà de dix ans après leur implantation.

Actuellement, il est admis que les vaisseaux autologues (veine saphène ou artère mammaire) restent le matériau de remplacement de choix pour les pontages coronariens ou périphériques [Vara et al., 2005]. Des autogreffes artérielles (plutôt que veineuses) sont cliniquement préférables pour les pontages coronariens, en raison de leurs meilleures propriétés mécaniques. Une étude a montré une perméabilité à dix ans de 85% dans le cas de pontage avec des artères mammaires internes versus 61% pour l'utilisation de veines saphènes [Goldman et al., 2004]. Ce sont les propriétés mécaniques de la paroi artérielle ainsi que les propriétés biochimiques de l'endothélium artériel qui assurent une meilleure efficacité du substitut artériel et sa survie à long terme. Les inconvénients majeurs qui limitent l'utilisation des substituts artériels sont le nombre réduit des sites de prélèvement, la difficulté de dissection et leur fragilité [Canver, 1995].

Cependant, dans le cas d'interventions répétées ou chez des patients ne présentant pas d'artères ou de veines de qualité suffisante pour permettre la réalisation du pontage, l'implantation d'un autre type de substitut est nécessaire : xélogreffes, allogreffes ou substituts synthétiques [Couet et al., 2007].

2) *LES SUBSTITUTS VASCULAIRES D'ORIGINE SYNTHETIQUE*

Actuellement, les seuls matériaux utilisés dans les prothèses vasculaires sont élaborés à partir de deux polymères principaux : le Teflon et le Dacron. Ces matériaux se sont imposés en raison de leur caractère bio-inerte (pas de décomposition dans l'organisme, propreté chimique du polymère, pas de contaminants de synthèse..). Ils ne sont pas pour autant biocompatibles, car il n'y a pas de ré-habitation du matériau par des cellules fonctionnelles, de colonisation cellulaire spontanée et de fait le sang coagule à leur contact.

a) Prothèses en polytétrafluoroéthylène (PTFE)

Le polytétrafluoroéthylène expansé (**ePTFE**) ou **Teflon®** est un polymère linéaire thermoplastique qui possède des propriétés remarquables en particulier une grande inertie

chimique. C'est un matériau facilement déformable, semi-cristallin, hydrophobe et son allongement est aisé. Il présente un coefficient de friction bas et reste stable à des températures élevées (327°C). De plus, il peut être transformé par frittage (densification sous des pressions élevées) pour la fabrication de tubes ou de canaux. Ces propriétés, associées à sa neutralité et sa biocompatibilité lui confèrent une valeur élevée en utilisation comme matériau d'implantation. Son utilisation dans le domaine médical a débuté au cours des années 60 pour les valves cardiaques artificielles.

Sa surface est électro-négative ce qui minimise sa réactivité avec les éléments figurés du sang [Xue and Greisler, 2003]. Cependant, il est à noter que l'hydrophobie du PTFE empêche l'adhésion des cellules endothéliales ce qui constitue un handicap pour la substitution des vaisseaux de petit calibre. Malgré ce handicap, le PTFE reste le matériel synthétique le plus utilisé pour les pontages fémoro-poplités et axillo-fémoraux.

Aujourd'hui, quand il est implanté comme substitut aortique, on observe un taux de perméabilité à cinq ans de 91 à 95%, alors qu'en pontage fémoro-poplité, le taux n'est que de 45% à cinq ans [Xue and Greisler, 2003]. Comparativement, une veine autologue permet d'obtenir un taux de perméabilité à 5 et 10 ans, respectivement de 77% [Taylor et al., 1990] et 50% [Donaldson et al., 1991].

Pour pallier le caractère thrombogène lié à l'hydrophobie, des modifications de la surface interne du substitut ont été proposées. Citons i) le recouvrement par une fine couche de carbone pour augmenter le caractère électro-négatif de la surface : ce traitement a montré une nette amélioration de la perméabilité sur une période de deux ans comparativement au ePTFE standard [Groegler FM, 2002 April 7-11] ; ii) le revêtement ou le greffage d'agents anticoagulants ou antithrombotiques, en particulier la fixation d'héparine avec des résultats prometteurs chez l'animal [Walpoth et al., 1998].

b) Prothèses en polytéréphtalate d'éthylène (PET)

Le polyéthylène téréphtalate (**PET**) ou **Dacron®** est un polyester dur et rigide. Les premières prothèses réalisées dans ce matériau ont été implantées en 1957 [Hess, 1985].

Il présente un taux de perméabilité à dix ans de 56% pour des pontages fémoro-aortiques chez des patients jeunes [Jackson et al., 2004]. Il se présente sous la forme textile tricotée ou tissée.

Les prothèses vasculaires en Dacron® ont suivi plusieurs évolutions. L'amélioration des techniques d'élaboration (tissage) a modifié favorablement les propriétés de ces prothèses. En effet, les premières présentaient une faible porosité qui ralentissait la colonisation cellulaire et la cicatrisation, tandis que les prothèses à porosité élevée présentaient une faible stabilité mécanique. L'incorporation de fibres texturées a permis d'améliorer la cicatrisation grâce à une meilleure encapsulation externe et à un meilleur ancrage tissulaire. Par la suite, la généralisation des tricots chaînes et des structures tissées a permis d'améliorer leur résistance mécanique, tout en révélant une excellente capacité de cicatrisation. Les prothèses Dacron® sont actuellement utilisées comme substituts des artères de gros et moyens calibres (pontages aorto-iliaques), en raison de leur perméabilité à long terme (97% à cinq ans [Davidovic et al., 2004]) mais demeurent inutilisables pour la substitution des vaisseaux de petit calibre (< 6 mm).

En dépit de certaines études anciennes ayant montré un dépôt de plaquettes [Allen et al., 1986] et une activation du complément plus faible [Shepard et al., 1984] sur les prothèses en ePTFE que sur les prothèses en Dacron, les taux de perméabilité de ces deux types de substituts sont semblables [Abbott et al., 1997]. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence sur la perméabilité à cinq ans, entre des prothèses en Dacron ou en Téflon utilisées en pontage fémoro-poplité [Post et al., 2001] [Jensen et al., 2007].

c) Prothèses en polyuréthane (PU)

Le polyuréthane est un copolymère composé de trois monomères : un diisocyanate « hard domain », un étendeur de chaîne et un domaine diol « soft domain ». Les PU de grade médical sont constitués de domaines « soft » en polyester, polyether ou polycarbonate. Le PU a été initialement proposé pour la réalisation de prothèses vasculaires en raison de son élasticité et de sa manipulation aisée. Si le PU possède des propriétés mécaniques proches de celles des artères natives, il n'est pas de façon générale très employé comme matériau de pontage, excepté pour l'hémodialyse [Tai et al., 2000], car un phénomène d'hydrolyse lui est souvent reproché. Les études expérimentales et cliniques n'ont pas été concluantes [Zhang et al., 1997]. Cependant, des modifications des structures ont été rapportées, enduction avec de la gélatine, de l'héparine, du polyéthylène glycol ou de l'acide polylactique, pour améliorer les propriétés des ces matériaux [Ravi et al., 2009].

Une étude récente a comparé les propriétés mécaniques de conduits vasculaires de 4 mm de diamètre interne réalisés en polyuréthane renforcé avec des fibres de polyester et des prothèses en polyuréthane [Xu et al., 2009]. Le PU renforcé présente une résistance à l'éclatement améliorée par rapport au PU pur ainsi qu'une elongation plus importante.

3) *LIMITES DES PROTHESES VASCULAIRES BIOLOGIQUES ET SYNTHETIQUES*

D'un point de vue clinique, il est admis que les prothèses biologiques et synthétiques ont un taux de perméabilité qui n'excède pas 50% des cas, dix ans après leur implantation [Kannan et al., 2005].

Utilisés depuis plusieurs décennies, les prothèses en Dacron et en ePTFE sont performantes pour le remplacement des vaisseaux de diamètre supérieur à 6 mm, en revanche aucun de ces matériaux ne convient pour remplacer des vaisseaux de diamètre inférieur à 4 mm. Deux limites majeures pour l'utilisation de substituts synthétiques sont souvent rapportées dans la littérature : (bio)mécanique et biologique.

- Faible compliance comparativement aux artères natives [Zidi and Cheref, 2003]. Les médiocres caractéristiques mécaniques de ces polymères synthétiques (Dacron et ePTFE) en terme de compliance et de taille sont des facteurs qui contribuent à leur perméabilité insuffisante [Tiwari et al., 2002] [Abbott et al., 1987]. Au niveau des substituts de petit diamètre, les circonstances hémodynamiques sont défavorables : débit sanguin ralenti, résistance élevée, il en résulte la formation de caillots sur les surfaces luminales thrombogènes.
- Non-endothélialisation de la totalité de la surface luminale de la prothèse, conduisant au développement de thromboses et défaillance du processus de cicatrisation avec développement d'une hyperplasie myointimale. Cette colonisation ne se produit pas chez l'homme [Seifalian et al., 2002] en dehors d'une zone péri-anastomotique [Ojha, 1993] [Davies, 1995], même si de rares auteurs ont rapporté le contraire : les prothèses vasculaires ne se réendothélialisent jamais chez l'homme [Sauvage et al., 1975] [Tiwari et al., 2003]. En revanche, chez l'animal (en particulier le porc), il existe une endothélialisation spontanée des prothèses [Berger et al., 1972]. Une des stratégies d'ingénierie a donc été de proposer la cellularisation (endothélialisation).

Devant ce constat d'échec, l'amélioration de la perméabilité des prothèses ou le développement de nouveaux matériaux ont suscité de très nombreuses voies de recherche : modifications du Dacron et du ePTFE afin d'améliorer leurs fonctions [Xue and Greisler, 2003].

4) LE SUBSTITUT VASCULAIRE « IDEAL » : CAHIER DES CHARGES

Le substitut cardiovasculaire idéal pour pontage doit avoir des propriétés semblables à celles du vaisseau natif [Aper et al., 2009], énoncées ci-dessous. Pour Venkatraman *et al.* certains critères sont indispensables et d'autres simplement recommandés pour faciliter leur utilisation [Venkatraman, 2008]. Le substitut doit :

- être biocompatible par de nombreux aspects : non-thrombogène, anti-inflammatoire, non-immunogène. Une prothèse complètement biocompatible ne doit provoquer aucune réaction tissulaire après l'implantation [Couet et al., 2007]. Il doit résister aux infections et ne pas les favoriser ;
- posséder les propriétés mécaniques les plus proches de celles observées physiologiquement, être compliant et élastique, afin de mimer le plus possible la nature unique viscoélastique d'une artère, ceci étant particulièrement important pour les vaisseaux de petit calibre et doit résister aux variations de pression. Certains auteurs vont jusqu'à fournir des valeurs quantitatives : résistance à la pression circonférentielle (résistance à l'éclatement) de 1680 mmHg, résistance aux forces de suture de 3N et compliance comprise entre 0,24 et 0,46 MPa⁻¹ à 150 mmHg [Chan-Park et al., 2009] ;
- être capable de remodelage, c'est-à-dire de résister à la dégradation rapide mais biodégradable avec porosité homogène ou croissante permettant la croissance des cellules et du tissu ainsi que le transport des nutriments et l'élimination des déchets issus du métabolisme *in vivo* ;
- générer une réaction optimale du tissu environnant permettant la guérison et non la formation d'une capsule fibreuse ;
- être facilement manipulable, flexible et facile à suturer ;
- être disponible en de nombreux diamètres et tailles [Hutmacher, 2001] pour correspondre aux différents types de reconstructions vasculaires cardiaques et

périphériques afin de respecter la forme et la taille de celles-ci [Thomas et al., 2003] ;

- être facile à stériliser.

C. LES SUBSTITUTS VASCULAIRES ISSUS DE L'INGENIERIE TISSULAIRE

1) LES DIFFERENTES STRATEGIES EN INGENIERIE VASCULAIRE

En théorie, les différentes stratégies pour obtenir un produit d'ingénierie tissulaire applicable au domaine cardiovasculaire sont résumées sur la Figure 6 avec des acteurs ou étapes manquants par rapport au concept complet décrit sur la Figure 3 [Rabkin and Schoen, 2002]. Pour illustrer chacune de ces approches, on peut citer pour :

- A, les travaux de [Deutsch et al., 2009; Kaushal et al., 2001] sur lesquels nous reviendrons plus bas, qui consistent en une endothélialisation d'un échaffaudage suivie d'une implantation de la construction, sans période de maturation *in vitro*.
- B, les modèles de transplantation cellulaire de myocytes ou de cellules souches, injectées dans la zone de lésion du myocarde [Szmitko et al., 2003] [Menasche, 2002], ou d'injection de progéniteurs endothéliaux dans un tissu ischémié permettant de favoriser la néoangiogénèse [Murohara et al., 2000] [Kalka et al., 2000b],
- C, les techniques de tissus décellularisés et matrices modifiés pour capter des cellules endogènes afin de permettre la recolonisation de l'échaffaudage tout en préservant son architecture [Cebotari et al., 2006] [de Mel et al., 2008]. On pourrait ranger dans cette catégorie la réparation tissulaire guidée qui consiste en l'utilisation du corps humain comme un bioréacteur naturel et exploite la capacité de cicatrisation face à un élément du « non-soi », afin de reproduire ou régénérer le fragment lésé d'un vaisseau [Campbell et al., 1999].
- D, les techniques permettant l'obtention *in vitro* d'équivalents de tissus. Ceci donne des outils pour comprendre les processus physiologiques et établir des modèles d'études pharmacologiques [L'Heureux et al., 2001].

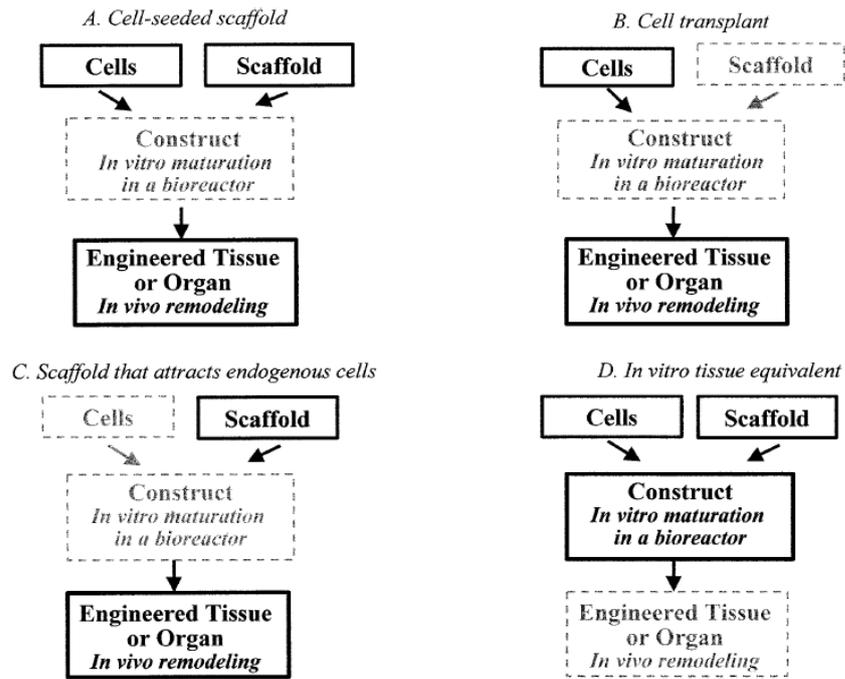


Figure 6: Concepts incomplets d'ingénierie tissulaire appliqués au domaine cardio-vasculaire [Rabkin and Schoen, 2002]

Dans trois des quatre configurations, l'étape ultime est un remodelage *in vivo* de la construction. Au cours de l'angiogenèse, des changements dynamiques dans la composition de la matrice extracellulaire (MEC) et au niveau des cellules (CEs et CMLs) vont permettre de réguler la formation de nouveaux vaisseaux. La digestion des composants de la MEC par les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) est essentielle pour permettre l'invasion par les CEs. Les MMPs peuvent réguler la prolifération et l'adhésion des CEs conduisant à l'activation ou l'inhibition de l'angiogenèse. En effet, les MMPs dégradent la MEC ce qui provoque la migration des CEs mais les MMPs peuvent aussi cliver et relarguer des facteurs anti-angiogènes [Bowers et al., 2009]. Le remodelage de l'échaffaudage qui permet la maturation de la construction, va aussi favoriser une interconnexion avec les tissus environnants, grâce à la participation de ces enzymes clefs, les MMPs [Ahmed et al., 2007; Davis et al., 2001; Rezai et al., 2004].

De plus, une stimulation mécanique prolongée est nécessaire pour permettre une maturation de la construction au niveau de l'organisation histologique, de la production de MEC et de l'acquisition des propriétés mécaniques. Il a été montré que les stimulations mécaniques augmentent l'expression et l'activation de MMP-2, enzyme connue pour

dégrader les collagènes courts qui peut conduire à la désintégration de la matrice [Seliktar et al., 2001].

En pratique, nous nous limiterons à détailler deux approches d'ingénierie vasculaire dont la première repose sur la notion de constructions hybrides cellules/matériaux et la deuxième a pour but de développer un vaisseau constitué uniquement de matériel biologique.

2) *LES SUBSTITUTS VASCULAIRES HYBRIDES*

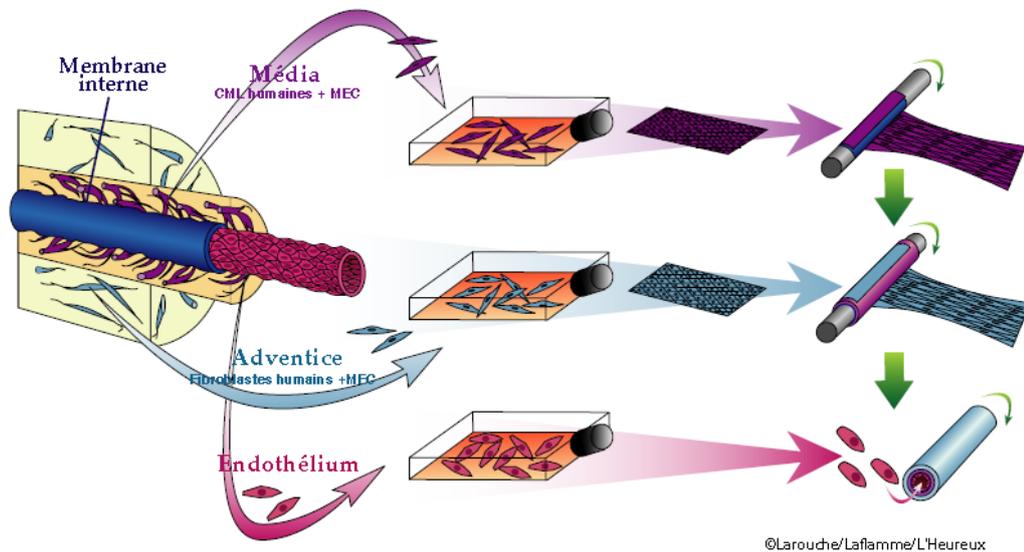
Le concept de substitut vasculaire hybride fait intervenir une composante cellulaire endothéliale et une composante matricielle, assemblées et maturées *in vitro*. Des résultats cliniques probants ont été obtenus en pontage coronarien [Laube et al., 2000] [Gabbieri et al., 2007] et périphérique [Deutsch et al., 2009] avec différentes approches méthodologiques (ensemencement en une ou deux étapes) [Bordenave et al., 2005]. Cependant, il demeure nécessaire d'envisager de nouvelles matrices, de nouvelles sources de cellules et l'utilisation de bioréacteurs. Ces aspects seront développés dans la partie III relative à ces trois éléments de la triade de l'ingénierie vasculaire.

3) *LES SUBSTITUTS VASCULAIRES CONSTITUES UNIQUEMENT DE MATERIEL BIOLOGIQUE*

Sur la base des effets délétères des échafaudages synthétiques permanents, différents groupes ont tenté de développer des approches totalement autologues [L'Heureux et al., 1998] [L'Heureux et al., 2006] [Boccafroschi et al., 2005; Norotte et al., 2009], ou utilisant des échafaudages partiellement résorbables [Nieponice et al., 2008; Shin'oka et al., 2005] [Niklason et al., 1999]. Cependant, peu d'entre eux ont conduit à des essais cliniques [Shin'oka et al., 2005] [McAllister et al., 2009].

a) Méthode par assemblage de feuillets cellulaires

L'Heureux *et al.* ont développé en culture un système de production de vaisseaux humains par auto-assemblage de feuillets cellulaires à base de collagène et de cellules [L'Heureux et al., 1998].



Avec l'aimable autorisation du Dr D. Larouche

Figure 7 : Production de vaisseaux humains par auto-assemblage [Stoclet et al., 2004]

Chacun des trois types cellulaires est cultivé à partir de tissus humains ; les cellules endothéliales et musculaires lisses sont respectivement isolées de l'endothélium et de la média du cordon ombilical, et les fibroblastes proviennent du derme. Des feuillets tissulaires produits à partir des cellules musculaires lisses (cultivées dans un milieu contenant du sérum et de l'acide ascorbique pour favoriser la formation de MEC) et des fibroblastes, englués dans leur propre matrice extracellulaire, sont enroulés autour d'un mandrin pour reconstituer un tube mimant la média et l'adventice. Ce tube est mûri afin d'obtenir un tissu cohésif. Le mandrin est enlevé et les cellules endothélialesensemencées à l'intérieur.

Ainsi, les différentes couches du vaisseau sont reconstituées. Ce substitut présente l'avantage de pouvoir résister à de fortes pressions de rupture (densité du collagène élevé). D'autres composantes de la matrice extracellulaire sont également présentes, dont l'élastine dans l'adventice. Les essais réalisés *ex vivo* chez le chien ont cependant été décevants après une semaine. Une étude publiée par ces mêmes auteurs [L'Heureux et al., 2006] a montré que l'assemblage du feuillet externe (fibroblastes) et de l'endothélium a permis de reconstituer un nouveau vaisseau avec des propriétés mécaniques proches du vaisseau natif. Les résultats obtenus après huit mois d'implantation chez le chien et chez le singe ont montré que 86% des substituts restaient perméables. Les examens histologiques ont révélé la formation de *vasa vasorum* et de la média (par migration des cellules

musculaires lisses). Les essais cliniques sont en cours [L'Heureux et al., 2007] [McAllister et al., 2009]. Dans une étude récente, ces auteurs ont comparé *in vitro*, les propriétés mécaniques de vaisseaux entièrement issus de l'ingénierie tissulaire, obtenus à partir de cellules de patients ayant des pathologies vasculaires, avec des fragments d'artère mammaire interne ou de veine saphène. Les diamètres internes des vaisseaux issus de l'ingénierie sont compris entre 2,4 et 6,6 mm et les diamètres des vaisseaux natifs entre 1,5 et 4,5 mm. Ces vaisseaux proviennent tous de patients considérés comme « à risque » vis-à-vis des pathologies cardiovasculaires. Des résultats comparables ont pu être mis en évidence en ce qui concerne la résistance à la pression circonférentielle et la résistance aux sutures, en revanche, la compliance est plus importante pour les vaisseaux natifs. Cependant, la compliance des vaisseaux issus de l'ingénierie après explantation est supérieure à celle de vaisseaux non implantés, en lien avec la migration et la transdifférenciation cellulaire. Ce processus de remodelage pourrait être induit par les signaux mécaniques venant du flux sanguin pulsatile [Konig et al., 2009].

Malgré tous ces progrès, le temps de fabrication et de maturation (plus de deux mois) de ces vaisseaux demeure une limite à leur utilisation dans des situations d'urgence.

b) Méthodes utilisant le « bioprinting »

Certaines équipes ont aussi mis au point des techniques permettant le dépôt en 3D, assisté par informatique d'« encre biologique » (sphéroïdes multicellulaires) sur des « biopaper » (gels biocompatibles à base de collagène par exemple) [Jakab et al., 2008]. La délivrance de particules d'encre biologique par ces techniques est, selon les auteurs, rapide, sûre, et permet une densité cellulaire élevée tout en réduisant de moindres dommages cellulaires [Norotte et al., 2009]. Le succès de ces technologies semble être hautement lié au type de « biopaper » [Jakab et al., 2008]. Le temps de gélification du collagène et sa concentration doivent être bien définis, afin de permettre le dépôt des sphéroïdes multicellulaires sur une surface lisse tout en assurant la fusion de ces sphéroïdes pendant la phase de post-impression [Jakab et al., 2004].

Norotte *et al.* ont décrit récemment [Norotte et al., 2009] la fabrication par ce procédé, de vaisseaux de petit diamètre, sans matrice (les « tuteurs » d'agarose sont éliminés après la fusion des sphéroïdes) ; entièrement biologiques, à base de CML de veine

ombilicale HUVSMCs) et de fibroblastes de peau humaine (HSFs); constitués de multicouches et rapidement perfusables pour accélérer leur maturation (Figure 8).

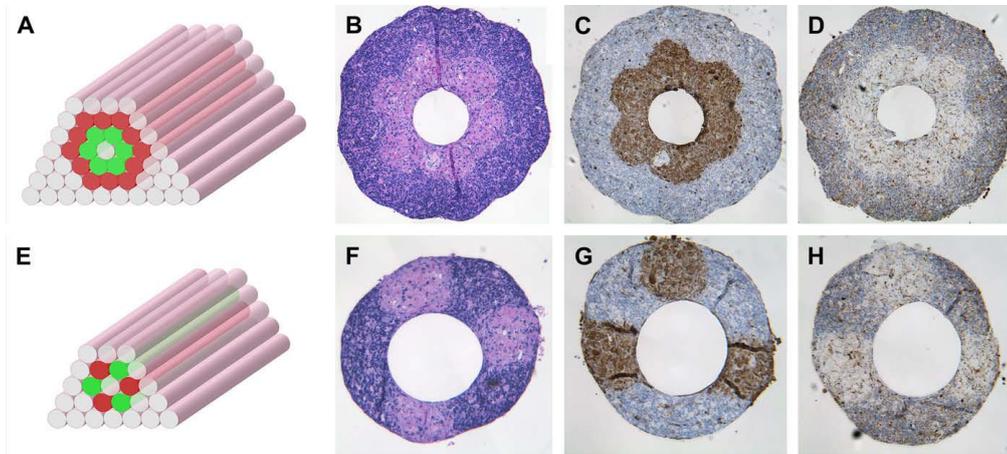


Figure 8 : Construction d'un TEBV par bioprinting [Norotte et al., 2009].

A et E : les HUVSMCs (vert) et les HSFs (rouge) sont assemblées selon différents motifs (" patterns "). B-D et F-H montrent les résultats de l'analyse histologiques des structures A et E, respectivement, après trois jours de fusion. Les marquages de l' α -actine en marron (C et G) montrent une limite nette entre les deux types cellulaires et de la caspase-3 en marron (D et H) révèle une faible proportion de cellules apoptotiques.

D'après ces auteurs, ces tubes sont suffisamment robustes pour être transférés dans des bioréacteurs de perfusion afin de permettre leur maturation et l'acquisition des propriétés mécaniques requises pour l'implantation. Dans ce modèle, l'étape d'élimination de l'agarose est une limite à la géométrie de l'arbre vasculaire formé, et de plus, aucune caractérisation biomécanique de ces tubes n'a été effectuée.

III. INGENIERIE VASCULAIRE : DEVELOPPEMENTS PORTANT SUR LES ELEMENTS DE LA TRIADE

Dans cette partie, nous allons développer les recherches visant à améliorer le concept d'ingénierie tissulaire portant à la fois sur les matrices/scaffolds, les cellules, ainsi que leurs interactions avec l'environnement par l'intermédiaire de bioréacteurs (Figure 9).

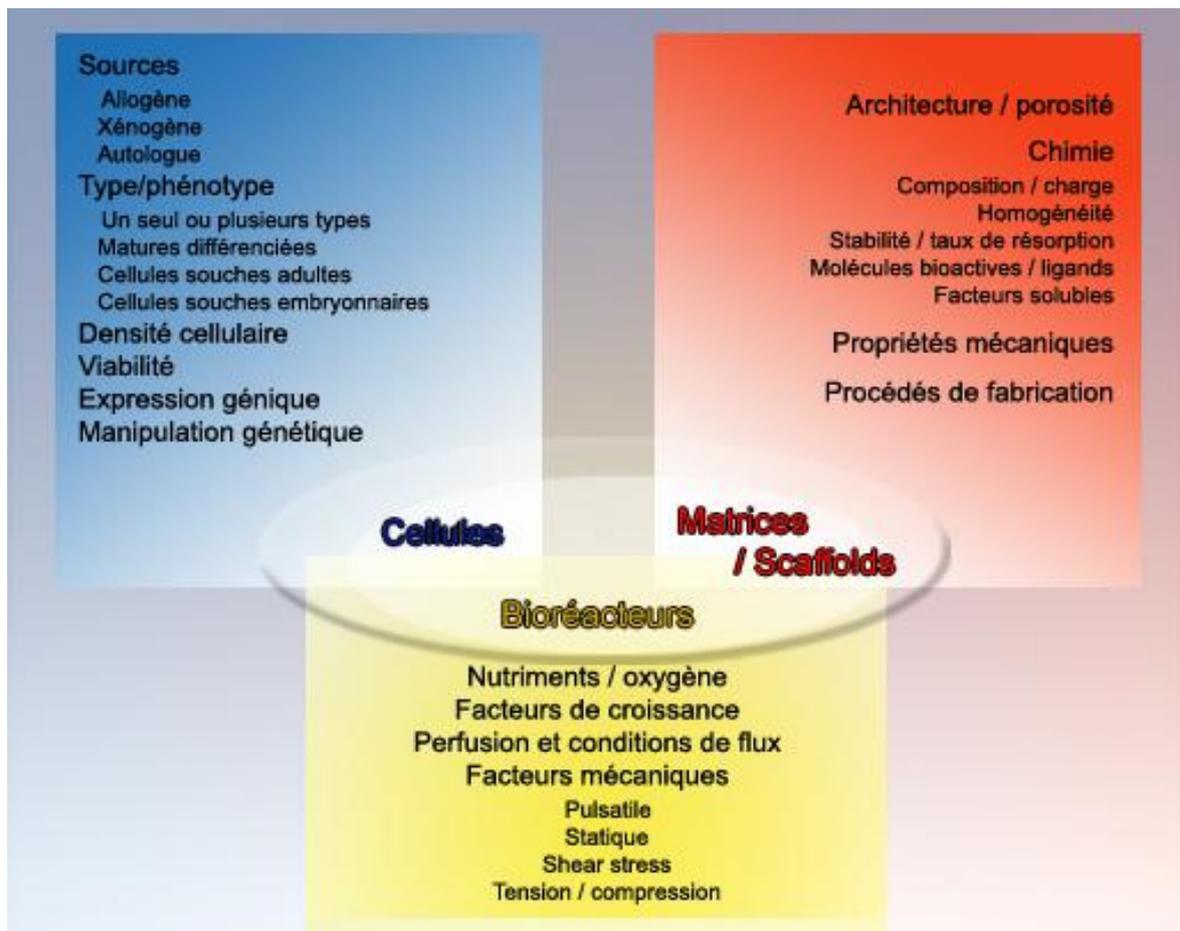


Figure 9 : Paramètres du contrôle de la structure et de la fonction d'un produit d'ingénierie

Les différents paramètres (cellules, matrices et bioréacteurs) contrôlables au cours du processus de fabrication d'un produit d'ingénierie tissulaire, permettant d'améliorer le produit obtenu.

A. ETAT DE L'ART PORTANT SUR LA COMPOSANTE MATRICIELLE (« SCAFFOLD »)

Le terme échaffaudage ou matrice ou « scaffold » est employé pour décrire toute structure dévolue au soutien des cellules pendant le processus de régénération. L'échaffaudage doit être distingué de la construction, celle-ci étant un scaffold déjà ensemencé avec des cellules et en maturation *in vitro* (en bioréacteur) ou *in vivo*. On peut considérer que la construction va progressivement devenir un vaisseau issu de l'ingénierie ou TEBV (tissue engineered blood vessel), une fois la maturation accomplie [Couet et al., 2007].

1) PROPRIETES D'UNE MATRICE POUR L'INGENIERIE VASCULAIRE

La matrice ou « scaffold » définit l'environnement tridimensionnel et fonctionnel du tissu. Les caractéristiques que doit présenter le substitut vasculaire idéal (décrites p 36) conditionnent les propriétés de l'échaffaudage à utiliser.

Une matrice utilisable pour l'ingénierie vasculaire doit posséder, outre le critère de biocompatibilité, les critères suivants :

- 1- Conductibilité pour permettre l'attachement des cellules ou de leurs progéniteurs, leur prolifération et la production de MEC. Pour Couet *et al.*, la structure de l'échaffaudage doit favoriser l'attachement et la différenciation cellulaires [Couet et al., 2007].
- 2- Capacité à incorporer des facteurs inductifs pour améliorer la croissance du tissu néoformé. Il doit permettre la diffusion de molécules qui vont induire la réponse cellulaire souhaitée [Rabkin and Schoen, 2002].
- 3- Permettre le développement d'un réseau vasculaire assurant le transport de l'oxygène et des biomolécules.
- 4- Intégrité mécanique pour supporter des charges au niveau de l'implant.
- 5- Dégradation contrôlée, reproductible, dégradation en éléments non toxiques facilement métabolisables.
- 6- Facilité de mise en œuvre pour produire des structures 3D de taille correcte pour être utilisées cliniquement.

Les critères 3 et 4 sont difficiles à faire co-exister dans un même matériau car ils sont pratiquement antinomiques puisque le transport est maximisé par des porosités importantes alors que les propriétés mécaniques sont d'autant plus favorables que la porosité est faible. L'intégration des critères 1 et 2 est aussi un défi puisqu'ils requièrent une complexité plus importante que la plupart des biomimétiques de la MEC généralement utilisés [Scheller et al., 2009]. De plus il est important de prendre en considération le micro-environnement avec lequel le matériau va interagir afin que le remodelage et sa fonctionnalité puissent être maintenus à long terme [Scheller et al., 2009].

2) LES DIFFERENTS TYPES DE « SCAFFOLDS » POUR L'INGENIERIE VASCULAIRE

Deux types de matrices, les polymères biologiques/naturels et les polymères synthétiques sont principalement utilisés (Tableau 3).

Deux approches co-existent concernant la conception des matrices pour l'élaboration de substituts vasculaires par ingénierie : la première consiste à développer un substitut qui présente une surface non adhésive, inerte qui empêche l'adhésion cellulaire. La deuxième a pour but la biofonctionnalisation d'une surface, dégradable ou non, dans le but d'activer une cascade de phénomènes biologiques qui vont permettre le remplacement ou la régénération d'un tissu [de Mel et al., 2008].

Matrices synthétiques	Non-dégradables	Polytétrafluoroéthylène (PTFE) Polyéthylentéréphthalate (Dacron) Polyuréthane
	Dégradables	Polyglycolic acid (Dexon), Polyglactine 910 (Vicryl), Polydioxanon, Polylactit, Polyepsilonaminocapron acid, Poly(1,8-octanediol-co-citrate)
Matrices biologiques	Matrices décellularisées	Allogéniques, xénogéniques
	Préparation à partir de composants de la matrice extra cellulaire	Collagène, élastine, glycoprotéines d'adhérence (Fibrine, Fibronectine, laminine, vimentine) et glycosaminoglycanes.
	Préparations à partir de protéines ou de polysaccharides naturels	Fibroïne de soie, chitosane, hydrogels ...

Tableau 3: Matrices synthétiques et biologiques, d'après [Aper et al., 2009]

a) Les matrices synthétiques

❖ *Les matrices synthétiques non-dégradables*

Ces matrices synthétiques non-dégradables sont constituées de PTFE, Dacron ou polyuréthane, matériels déjà décrits dans la première partie (pages 32-34). Quand elles sont utilisées dans le cadre de l'ingénierie vasculaire, c'est en tant que matrice pour l'ensemencement cellulaire.

En effet, afin d'augmenter la perméabilité fonctionnelle des prothèses vasculaires synthétiques de petit diamètre, Herring proposa dès 1978 d'ensemencer leur surface luminale avec des CEs. Son concept d'ensemencement est basé sur le fait que ces cellules forment un endothélium possédant les propriétés antithrombotiques [Herring et al., 1978]. Zilla *et al.* ont été les premiers à fonctionnaliser des substituts synthétiques avec des cellules endothéliales autologues [Zilla et al., 1987]. Les résultats cliniques satisfaisants obtenus par cette équipe ont encouragé de nombreux chercheurs à explorer cette voie. Bordenave *et al.* ont publié les résultats cliniques obtenus au cours de ces vingt dernières années à l'aide de matrices synthétiques en PTFE endothélialisées [Bordenave et al., 2005].

Différentes équipes ont réalisé des endothélialisations de prothèses en PTFE ou en Dacron, avec des résultats variables [Campbell et al., 1988] [Bellon et al., 1993] [Herring et al., 1994]. En 2009, Deutsch *et al.* ont rapporté une étude montrant que des prothèses de 7 et 6 mm enduites de colle de fibrine et endothélialisées avec des CEs autologues présentent une perméabilité de respectivement 71 et 55% à 10 ans [Deutsch et al., 2009]. Ces prothèses à 3 et 7 ans présentaient une perméabilité de 85 et 74%, alors que les mêmes non endothélialisées présentaient une perméabilité de seulement 55 et 0% [Deutsch et al., 1999]. De plus, la perméabilité de prothèses vasculaires de 4 mm endothélialisées avec des CEs autologues et utilisées en pontage coronarien était bien meilleure que celle de prothèses non ensemencées (90% à 27 mois contre 64% à 12 mois) [Laube et al., 2000].

Le problème majeur de ces matrices demeure le manque d'adhésion spontanée des cellules au polymère requérant la présence intermédiaire de colle biologique. Aussi les recherches se sont orientées vers les modifications de surface des matériaux pour améliorer l'adhésion cellulaire [Aper et al., 2009].

❖ *Les matrices synthétiques dégradables*

Le but de l'utilisation de ces matrices est de servir de guide jusqu'à ce qu'une structure comparable à celle d'une paroi vasculaire, suffisamment stable, se forme. Ces polymères synthétiques dégradables sont intéressants car leur chimie et leurs propriétés telles que macro- et microstructure, porosité, taille des pores, stabilité mécanique, temps de dégradation, peuvent être contrôlées. Les plus couramment utilisés en ingénierie tissulaire sont i) les acides poly(glycoliques) (PGA), ii) les acides poly(lactiques) (PLA), poly(L-lactiques) (PLLA) et leur copolymères, iii) les poly(caprolactone) (PCL) et iv) les polyhydroxyalkanoates (PHA). Ces polymères ont été utilisés comme matrices biodégradables mais ils ont généralement des propriétés insuffisantes pour leur utilisation en chirurgie : pour revue voir [Couet et al., 2007].

Niklason *et al.* [Niklason et al., 1999] [Niklason et al., 2001] ont entrepris de développer de nouveaux vaisseaux associant un tube polymère biodégradable élaboré à partir d'acide polyglycolique (PGA) et des CMLs d'aorte bovine. Ces tubes sont cultivés dans un bioréacteur mimant les contraintes d'un vaisseau sanguin natif. Ces cellules ainsi cultivées, remplissent les treillis de la matrice polymère et produisent de la MEC (essentiellement du collagène). Après huit semaines de culture, l'endothélialisation de la surface luminale est alors réalisée [Niklason et al., 1999]. Les vaisseaux obtenus dans ces conditions présentent une densité cellulaire et un contenu en collagène proches de la physiologie, et résistent à des pressions de rupture de l'ordre de 2000 mmHg. Des essais réalisés chez le porc ont révélé une bonne perméabilité à un mois. Ce groupe a aussi montré la possibilité d'obtenir ce type de vaisseaux à partir de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) humaines, capables de se différencier en CMLs. Les parois vasculaires présentent des similitudes avec celles de vaisseaux natifs sur les plans morphologiques, histologiques et de synthèse protéique [Gong and Niklason, 2008].

Comme pour les matrices synthétiques non dégradables, l'adhésion des CE sur ces polymères est souvent inefficace et insuffisante. De plus, la dégradation du polymère est difficile à contrôler et si elle se produit avant la formation d'une paroi vasculaire stable, des anévrismes ou des ruptures post-implantation peuvent se produire [Aper et al., 2009]. Enfin, les produits de dégradation de ces polymères peuvent provoquer une réaction immunologique conduisant à la détérioration du vaisseau. La présence de fragments résiduels de polymères peut perturber l'organisation normale de la paroi vasculaire [Dahl

et al., 2007] [Iwasaki et al., 2008] et influencer le phénotype des CMLs [Higgins et al., 2003].

Ces problèmes pourraient être résolus par l'utilisation de combinaisons de différents polymères et leur enduction [Hoerstrup et al., 2001] [Sung et al., 2004] [Wang et al., 2005b]. L'association du PGA à d'autres polymères comme : le poly-4-hydroxybutyrate (P4HB) [Hoerstrup et al., 2001], le PLLA, le polyéthylène glycol [Kim et al., 2006] ou le PCL [Roh et al., 2007] a permis d'améliorer les caractéristiques mécaniques du PGA. Une étude clinique réalisée à l'aide de substituts vasculaires à base de matrices biodégradables (association de PLLA, et de PGA et de PCL) a donné des résultats positifs après 16 mois d'implantation ; aucune occlusion ni anévrisme n'ont été observés [Shin'oka et al., 2005].

b) Les matrices biologiques

❖ Les matrices biologiques décellularisées

Ce sont des matrices dérivées de tissus humains (allogreffes) ou animaux (xénogreffes) qui, selon l'origine du prélèvement, sont qualifiées de conduits vasculaires ou avasculaires [Kakisis et al., 2005] [Yow et al., 2006]. Ces tissus décellularisés (la structure restante, une fois débarrassée des cellules, présente un caractère antigénique atténué) sont utilisés soit comme échaffaudage, avec ensemencement de cellules *in vitro*, soit modifiés pour fixer les cellules circulantes *in vivo* [Aper et al., 2009].

Les conduits vasculaires

Les conduits vasculaires sont généralement congelés à -180°C puis décellularisés, ou désendothélialisés [Kerdjoudj, 2007]. Les techniques de décellularisation utilisées sont diverses. Elles comprennent : des traitements chimiques (Triton et dodecyl sulfate de sodium SDS), des traitements enzymatiques par la trypsine ou la collagénase, des traitements mécaniques (éversion et abrasion). Le procédé de décellularisation peut avoir des répercussions sur les propriétés mécaniques du vaisseau (altération de la compliance) en cas d'utilisation d'agents de décellularisation inadéquates [Dahl et al., 2003].

Les matrices biologiques décellularisées présentent l'avantage d'être disponibles et d'avoir un faible pouvoir antigénique résultant de la congélation et de la décellularisation. Un des conduits vasculaires très utilisé fut la veine ombilicale humaine (à partir de la veine

du cordon ombilical de nouveau-nés) : prothèse Dardik-Biograft[®] qui n'est plus utilisée aujourd'hui [Dardik, 1995]. Ce type de prothèses présentait les avantages d'une conservation aisée et d'une grande disponibilité mais l'inconvénient de se dilater et de développer des anévrysmes.

Il a été montré que les propriétés mécaniques (en particulier la compliance) de ces matrices après une étape de décellularisation préservant les fibres de collagène et d'élastine, sont supérieures à celles de prothèses synthétiques [Aper et al., 2009]. Cependant, ces matrices ont un fort potentiel thrombogène lors de la mise en contact avec le flux sanguin [Tamura et al., 2003].

Des modifications de ces vaisseaux ont été évaluées, en particulier, la réendothélialisation du substitut décellularisé avec les cellules du receveur, soit avant l'implantation soit en développant un revêtement imprégné d'anticorps spécifiques de protéines de surface des progéniteurs endothéliaux circulants, (en particuliers des anti-CD34) afin de capter ces cellules. Pour revue voir [Avci-Adali et al., 2008]. La réendothélialisation avec des CEs et CMLs humaines de segments d'aorte porcine décellularisée, dans un système de bioréacteur, entraîne le développement d'une construction mécaniquement stable recouverte d'une monocouche endothéliale confluite. L'implantation de cette construction chez le porc montre un taux de perméabilité de 71% après un mois, significativement plus élevé que celui de prothèses non endothélialisées [Teebken et al., 2001]. Gui *et al.* ont montré que des artères ombilicales humaines désendothélialisées (en conservant la MEC) pouvaient être réendothélialisées avec des HUVECs et conservaient leur caractère fonctionnel après huit semaines d'implantation chez le rat, sans dilatation ou formation d'anévrysme. Ces artères pourraient donc être utilisées comme prothèse pour le remplacement de vaisseaux de petit calibre (le diamètre interne de ces artères étant de 4 mm) [Gui et al., 2009]. Chez l'homme, des pontages réalisés avec des allogreffes veineuses cryoconservées, désendothélialisées et réendothélialisées avec des cellules veineuses du patient, ont montré une bonne perméabilité sans dilatation après trois mois d'implantation sans traitement immunosuppresseur [Lamm et al., 2001].

Les conduits avasculaires

Akimaru *et al.* ont développé des substituts à partir d'uretère de boeuf ou de péritoine [Akimaru et al., 2000]. Yavuz *et al.* ont employé la sous-muqueuse intestinale

[Yavuz et al., 2006]. Plusieurs essais chez l'animal ont été réalisés. Les bons résultats obtenus avec la sous muqueuse intestinale (SIS : *Small Intestinal Submucosa*), dérivée de la sous-muqueuse du jéjunum de porc, s'explique par le fait que le SIS est un biomatériau acellulaire naturel. Après décellularisation, la MEC est composée de plus de 90% de collagène avec prédominance de collagène de type I, de fibronectine, de glycoaminoglycanes, de glycoprotéines, et de certains facteurs de croissance angiogènes comme le *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), avec une préservation du réseau capillaire. Enfin le SIS possède des qualités mécaniques intéressantes, notamment la résistance à l'étirement et à la suture. Des études *in vivo* ont montré des taux de perméabilité intéressants après implantation de tubes de SIS en position aortique, carotidienne ou au niveau de la veine cave. Cependant, pour le remplacement de vaisseaux de petit diamètre, des échecs ont été observés, attribués au maintien du potentiel thrombogène de la matrice [Lantz et al., 1993] [Schmidt and Baier, 2000].

❖ *Les préparations à partir de composants de la matrice extra cellulaire*

In vivo, les cellules sont en contact avec la MEC composée de protéines (collagènes, élastine), de glycoprotéines d'adhérence ou de glycosaminoglycanes (pour revue voir [Couet et al., 2007]). L'adhésion des CEs (grâce à des intégrines) à la MEC est nécessaire pour permettre la prolifération, la migration, la morphogénèse des cellules et la stabilisation du vaisseau sanguin [Davis and Senger, 2005]. Le recouvrement de la surface luminale des substituts vasculaires peut se faire avec ces composants de la MEC, en particulier, collagène, élastine. La MEC est plus qu'une simple matrice qui permet l'adhésion des cellules, elle est fondamentale dans la communication intercellulaire [Bowers et al., 2009], elle sert de guide à la morphogénèse des capillaires, à la stabilité et la maturation des néovaisseaux [Davis and Senger, 2005]. De plus différents facteurs de croissance peuvent facilement être ajoutés à ces préparations protéiques pour stimuler de façon spécifique les cellulesensemencées [Divya et al., 2007]. Cependant, les propriétés mécaniques de ces préparations et la stabilité des substituts vasculaires formés sont rarement suffisantes pour les utiliser seules comme échaffaudage pour l'ingénierie vasculaire, malgré des essais de différentes combinaisons de protéines [Lv et al., 2008].

Collagène

Le collagène est le constituant majeur de la MEC. C'est une protéine de structure dont la fonction principale est de garantir l'intégrité mécanique des différents tissus et organes tels que les tendons, l'os...En raison de leurs faibles caractères antigénique, inflammatoire et cytotoxique et pour leur caractère biodégradable, les gels de collagène sont des substrats intéressants pour la culture cellulaire [Boccafroschi et al., 2005]. L'attachement cellulaire est trois fois plus important sur des collagènes I, III ou IV que sur des surfaces non traitées (TCPS) [Feugier et al., 2005]. De plus, le collagène IV stimule *in vitro* la croissance des CEs [Sank et al., 1992] [Schneider et al., 1992].

Parmi les différents types de collagène connus [Gelse et al., 2003], le collagène de type I est celui qui est le plus utilisé comme matrice en ingénierie vasculaire.

Weinberg *et al.* ont décrit pour la première fois l'utilisation de structures constituées de multicouches de collagène avec un renfort en Dacron etensemencées avec des CEs et des CMLs [Weinberg and Bell, 1986].

Les gels de collagène sont utilisés en ingénierie vasculaire, soit comme « scaffold » (développé page 40-41) soit comme revêtement d'une matrice. Le principal défaut des échaffaudages en collagène est dû à leurs propriétés mécaniques inadéquates. Ceci s'explique par les diverses manipulations subies par les fibres naturelles de collagène au moment de leur solubilisation, entraînant une destruction de la microstructure naturelle, hautement organisée. Divers procédés physiques ou chimiques ont été testés afin d'améliorer les propriétés mécaniques du collagène utilisé comme matrice [Koob, 2004], en particulier le mélange de collagène avec d'autres protéines telles que l'élastine, afin de mimer la structure naturelle d'une artère.

L'élastine

L'élastine est une protéine retrouvée dans les parois artérielles et dans divers tissus de mammifères. Sa fonction principale est de fournir l'élasticité pour permettre une haute résistance à l'effort. Les CMLs et les fibroblastes sécrètent l'élastine comme un composant intrinsèque de la MEC. Différentes études ont eu pour but d'incorporer de l'élastine dans des gels de collagène. En particulier, Ito *et al.* en 1997 ont observé que l'ajout d'élastine dans un gel de collagène inhibe la prolifération et la migration des CMLs alors qu'elle

permet celles des CEs de façon dose-dépendante. L'incorporation d'un gel de collagène contenant de l'élastine dans la structure d'une prothèse artérielle va inhiber l'hyperplasie causée par les CMLs sans effet significatif sur la prolifération des CEs [Ito et al., 1997]. En 2003, Daamen *et al.* ont lyophilisé de l'élastine, des glycosaminoglycanes et du collagène de type I pour produire un échaffaudage pour l'ingénierie tissulaire, avec différents ratios de collagène et d'élastine. Ce travail a permis de conclure que l'élastine induit l'activité cellulaire et que la rigidité de tels échaffaudages collagène-élastine est réduite de façon significative [Daamen et al., 2003]. La limitation majeure de l'utilisation de l'élastine est due à sa difficulté de mise en oeuvre en raison d'une faible solubilisation avec les autres matériaux (en particulier le collagène).

Les glycoprotéines d'adhérence (fibrine, fibronectine...)

La fibrine est une protéine insoluble, utilisée en ingénierie vasculaire pour favoriser l'adhérence cellulaire. Dans un vaisseau natif, elle est essentielle pour la morphogénèse vasculaire [Astrof and Hynes, 2009]. La fibrine est formée par polymérisation du fibrinogène par addition de thrombine. Un de ses avantages est qu'elle peut être produite à partir du sang du patient ce qui évite la réponse inflammatoire après implantation [Ravi et al., 2009]. Elle a été reconnue comme un substrat adéquat à l'adhérence et à la prolifération des CEs à la surface de matériaux [Prasad et al., 2007]. De plus, des études ont montré que le VEGF et le FGF se fixaient à la fibrine et à la fibronectine avec une affinité élevée [Sahni et al., 2000] [Sahni and Francis, 2000]. Les matrices de fibrine stimulent la prolifération des CMLs, la synthèse de protéines de la MEC et la croissance de CEs [Shaikh et al., 2008]. La fibrine peut être utilisée sous forme de colle de fibrine pour servir de matrice aux CEs et aux myofibroblastes, et la formation de MEC a été montrée au cours du remodelage cellulaire sur ce type de matrice [Aper et al., 2009].

La fibronectine est une glycoprotéine adhésive essentielle à la morphogénèse vasculaire, en effet, les embryons de souris Knock Out pour la fibronectine présentent toujours un caractère léthal [Astrof and Hynes, 2009]. Elle permet l'induction de colonies de type endothélial à partir des EPCs humains CD34+. Des revêtements de fibronectine (10 µg/mL) augmentent de façon significative la différenciation induite par le VEGF. Quand le VEGF et la fibronectine sont utilisés de façon combinée, cinq fois plus de colonies de type

endothélial sont observées par rapport à d'autres revêtements, ce processus étant médié par les intégrines $\alpha_5\beta_1$ [Wijelath et al., 2004].

L'ensemencement cellulaire sur des préparations protéiques va conduire à un remodelage de la matrice, c'est-à-dire une dégradation et une néoformation d'une nouvelle MEC. Ce processus de remodelage mime l'angiogenèse *in vivo* [Aper et al., 2009].

L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane (GAG) non sulfaté. Il est retrouvé dans la peau, les tissus de soutien, le cordon ombilical, le sérum humain, le liquide synovial, les artères, les veines et de nombreux autres organes [Fraser et al., 1997]. Il peut aujourd'hui être synthétisé *in vitro* et suffisamment pur, il est biocompatible et biodégradable [Widner et al., 2005]. Il est principalement utilisé pour la réparation du cartilage articulaire [Yoo et al., 2005]. Cependant, il présente plusieurs faiblesses dont celle de peu susciter l'attachement cellulaire et de posséder de piètres propriétés mécaniques et un taux de dégradation très rapide [Couet et al., 2007]. Afin d'améliorer l'adhérence cellulaire, des gels d'acide hyaluronique ont été revêtus avec du collagène, de la laminine ou de la fibronectine [Ramamurthi and Vesely, 2002].

❖ Les préparations à partir de protéines et de polysaccharides naturels

La fibroïne de soie

Depuis quelques années, des échaffaudages de fibroïne de soie sont étudiés en raison de leur biocompatibilité, de leur dégradation lente et de leurs bonnes propriétés mécaniques. De plus, la possibilité de contrôler leur structure moléculaire et leur morphologie a entraîné l'utilisation de cette protéine pour l'ingénierie tissulaire. Wang *et al.* ont montré que ces scaffolds permettent l'adhésion, la prolifération et la différenciation *in vitro* de cellules souches. Pour revue voir [Wang et al., 2006]. Ces fibres de soie ont été utilisées comme matrice pour la culture de CE [Bondar et al., 2008] ou pour des cocultures progéniteurs endothéliaux et ostéoblastiques montrant une maturation progressive de ces cellules sur la soie [Fuchs et al., 2009].

Le chitosane

La chitine, dont dérive le chitosane, est le polysaccharide le plus retrouvé dans la nature. Structurellement, le chitosane est similaire aux GAG et est biodégradable [Drury and Mooney, 2003]. Un de ses avantages pour son utilisation en ingénierie vasculaire est son coût faible, sa disponibilité à grande échelle, son activité antibactérienne et sa biocompatibilité [Huang et al., 2005]. Chupa *et al.* ont montré que le chitosane permet l'attachement et la croissance de CEs et CMLs humaines. Implantés chez le rat, ces échaffaudages montrent après deux semaines, une croissance tissulaire significative avec une croissance plus faible des CMLs comparativement aux CEs. Les auteurs suggèrent que le chitosane pourrait induire une activité biologique intrinsèque qui inhiberait l'hyperplasie provoquée par les CMLs [Chupa et al., 2000]. Cependant, ses propriétés mécaniques insuffisantes sont un frein à son utilisation en ingénierie vasculaire. Pour pallier ce déficit, des associations avec des matrices synthétiques dégradables comme le poly(caprolactone) ont été proposées [Sarasam and Madihally, 2005].

Hydrogels de polysaccharides

Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels de polymères hydrophiles réticulés de façon covalente ou ionique qui gonflent jusqu'à l'équilibre en présence d'eau. L'interaction polymère-solvant confère au gel des propriétés mécaniques particulières : comportement mou, élastique et déformable. De par leur consistance et leur teneur élevée en eau, les hydrogels se rapprochent des tissus biologiques et sont bien tolérés dans les milieux biologiques. Ces hydrogels peuvent être constitués de matériaux naturels (agarose, alginate, chitosane, collagène, fibrine, gélatine, acide hyaluronique, pullulane) ou de polymères synthétiques (polyéthylène oxyde, polyvinylalcools).

L'équipe de Letourneur *et al.* a développé des hydrogels de polysaccharides obtenus par réticulation de polymères neutres biocompatibles, le pullulane et le dextrane. Des prothèses vasculaires de 2 mm de diamètre, constituées par ces hydrogels enveloppés d'un treillis de nylon, sont restées perméables après huit semaines d'implantation chez le rat. Cependant, à l'issue de cette période, la surface luminale n'était que peu endothélialisée [Chaouat et al., 2006]. Cette équipe a aussi mis au point des prothèses vasculaires constituées par des hydrogels synthétiques d'alcool polyvinylique. Tout en

étant biocompatibles, ces hydrogels possèdent des propriétés mécaniques supérieures à celles des hydrogels de polysaccharide, avec une résistance à la rupture, une compliance et une suturabilité compatibles avec les contraintes hémodynamiques du système artériel. L'implantation chez le rat a confirmé le bon comportement hémodynamique *in vivo* à court terme [Chaouat et al., 2008]. **Ces hydrogels de polysaccharide constituent les premières matrices que nous avons utilisées (premier article).**

3) MODIFICATIONS DE SURFACE DES MATERIAUX

Le succès clinique d'une prothèse est lié en grande partie à la qualité de l'adhérence des cellules à la surface du matériau. Dans une revue récente, Mel *et al.* ont décrit différentes modifications de surfaces de biomatériau, envisageables afin d'accélérer leur endothélialisation [de Mel et al., 2008].

a) Les principales modifications de surface

Il est actuellement reconnu que les propriétés physico-chimiques et mécaniques de surface des biomatériaux ont un impact sur l'adsorption protéique et/ou l'adhésion cellulaire [Engler et al., 2007].

Les modifications des paramètres topographiques (Figure 10 a) sont connues et utilisées pour influencer la réponse des cellules et des tissus sur les implants : modifications de porosité, de rugosité conduisant à des modifications de topographie [Chollet, 2007].

La porosité est définie comme étant le pourcentage d'espace vide dans un solide, il s'agit d'une propriété morphologique indépendante du matériau. Dans le domaine de la substitution vasculaire, des études ont montré que la porosité était essentielle pour les prothèses synthétiques de petit diamètre. Ces recherches ont ainsi statué qu'une porosité interne des substituts vasculaires était nécessaire à l'ancrage du néointima et qu'une porosité externe permettait la colonisation de la prothèse par les tissus périphériques. Des prothèses en PTFE à double porosité (deux tiers externes avec une porosité élevée, soit une distance inter nodale supérieure à 45 μm ; et le tiers interne à faible porosité, distance

internodale inférieure à 30 μm) ont permis de mettre en évidence une différence de colonisation par les capillaires du receveur, les zones à porosité élevée étant davantage colonisées [Zilla et al., 2007]. La présence de porosité permet également une endothélialisation plus rapide en favorisant l'angiogenèse [Zhang et al., 2004].

Les surfaces présentant des rugosités et des discontinuités vont induire des interactions biologiques spécifiques comparativement à une surface plane, cependant la réponse cellulaire par rapport à une surface rugueuse dépend du type cellulaire étudié [Chollet, 2007]. Chung *et al.* ont comparé l'adhérence et la croissance *in vitro* de cellules endothéliales humaines sur des matériaux polyuréthanes présentant différentes rugosités. Ils ont, par cette étude, mis en évidence qu'une augmentation de la rugosité de 10 à 100 nm suffisait à stimuler l'adhésion des cellules endothéliales [Chung et al., 2003].

Les modifications de surface telles que la porosité et la rugosité se font généralement de façon homogène cependant de nombreuses publications ont prouvé l'intérêt d'une structuration de la surface à une échelle micrométrique voire nanométrique pour contrôler les interactions matériaux-cellules [Kasemo and Gold, 1999] (Figure 10 b). Clark *et al.* ont défini que l'influence de la topographie sur les réponses cellulaires dépend de la taille, de la profondeur et du nombre de domaines [Clark et al., 1991].

Les modifications de type physico-chimique peuvent se faire par traitement plasma ou irradiation UV du biomatériau afin d'influencer l'adsorption protéique et/ou, le comportement cellulaire à la surface du matériau [de Mel et al., 2008] (Figure 10 c). Ces modifications vont influencer le caractère hydrophile/hydrophobe, la charge, la rugosité, de la surface. Kim *et al.* ont mis au point des polymères présentant des caractères hydrophiles variés et contrôlés et les ontensemencés avec des cellules souches humaines issues de la moelle osseuse. L'étude a montré notamment que l'adhésion et l'étalement des cellules étaient beaucoup plus importants sur les surfaces hydrophiles que sur les surfaces hydrophobes [Kim et al., 2007]. Parallèlement, des surfaces chargées négativement peuvent être obtenues par le revêtement ou le greffage de groupements acide ou sulfonate alors que la présence de groupements amine donnera une surface chargée positivement. Ces propriétés ont été largement étudiées, notamment pour la recherche sur les matériaux vasculaires. En effet les surfaces chargées négativement sont connues pour ralentir le phénomène de thrombose, contrairement aux surfaces chargées positivement qui l'accélèrent. Ceci peut s'expliquer par le fait que la surface de l'endothélium naturel est

chargée négativement. De plus, à pH physiologique, la majorité des protéines plasmatiques sont sous forme anionique. Par exemple, le fibrinogène, protéine impliquée dans la cascade de coagulation, possède un point isoélectrique à $pH_i = 5,6$, de ce fait, à pH physiologique il ne s'adsorbe que très peu sur les surfaces chargées négativement. Il existe plusieurs méthodes pour obtenir des surfaces chargées mais à l'heure actuelle, le cas le plus étudié est le greffage de fonctions sulfonates à la surface de matériaux pour augmenter leur hémocompatibilité [Chollet, 2007].

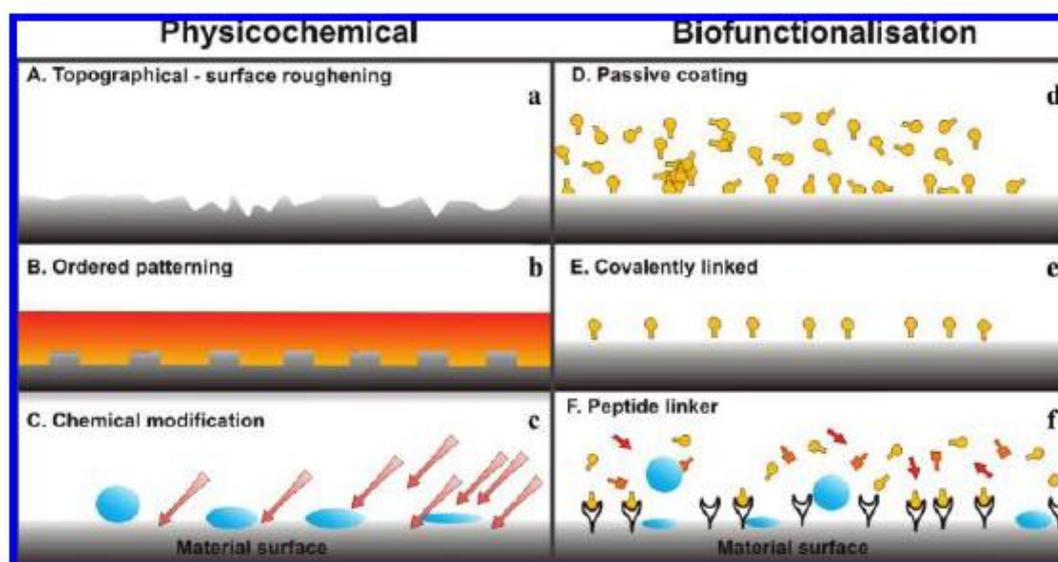


Figure 10 : Exemples de techniques de modifications de surface favorisant l'endothélialisation [de Mel et al., 2008].

Techniques physico-chimiques et de biofonctionnalisation permettant de favoriser l'endothélialisation *in situ*. La topographie du matériau (rugosités aléatoires (a), motifs définis (b), ou modifications chimiques de surface, par traitement plasma ou irradiation UV (c)) influence l'adsorption protéique et donc l'adhérence cellulaire. La biofonctionnalisation du matériau peut être obtenue par attachement de peptides spécifiques capables de fixer des récepteurs cellulaires et d'induire une adhérence plus ferme. Différentes techniques existent pour accrocher ces peptides (enduction passive (d), greffage covalent (e) et utilisation de peptides de liaison (f)).

Les modifications biologiques de surface ont pour but de contrôler les réponses cellulaires et tissulaires sur un implant en mobilisant des biomolécules à sa surface. Afin de contrôler l'adhérence spécifique des cellules, la recherche actuelle vise à immobiliser, de façon covalente ou par adsorption physico-chimique, des oligopeptides ou des oligosaccharides capables de promouvoir l'attachement cellulaire. Des travaux ont rapidement démontré l'intérêt de travailler avec des séquences peptidiques courtes plutôt

qu'avec des protéines car les peptides résistent mieux aux variations de pH et de température. L'utilisation de ces peptides peut alors permettre un contrôle de la réponse cellulaire. La biofonctionnalisation peut se faire par fixation de motifs peptidiques spécifiques en surface de biomatériaux. Ces ligands sont susceptibles d'être reconnus par des récepteurs cellulaires (par exemple des intégrines telles que $\alpha_v\beta_3$) et d'induire une fixation « ferme » [Engler et al., 2007]. Différentes techniques existent pour fixer ces peptides (Figure 10), elles incluent l'adsorption simple (Figure 10c) ou la liaison covalente (Figure 10e). La réponse biologique va de fait, dépendre de la densité et de la distribution spatiale de ces peptides [de Mel et al., 2008].

Nous détaillerons uniquement les modifications de surface par utilisation de composés biologiques (composants de la MEC), greffage de peptides ou modifications de charges par multicouches de polyelectrolytes.

b) Modification des matériaux par des composés biologiques favorisant l'adhérence cellulaire

Pour rendre une surface synthétique apte à l'adhésion cellulaire, on peut fixer sur cette surface des constituants de la MEC (Figure 10d): collagènes, fibronectine, laminine, vitronectine [de Mel et al., 2008].

L'imprégnation des prothèses avec des colles à base de fibrine favorise la prolifération de CEs [Fernandez et al., 2005; Kaehler et al., 1989; Santhosh Kumar and Krishnan, 2001; Vinard et al., 1999]. Les collagènes I, II ou III recouvrant des prothèses synthétiques augmentent l'attachement et la prolifération cellulaires [Feugier et al., 2005] [Berard et al., 2009] [Boccafosci et al., 2005] [Vinard et al., 1999]. L'immobilisation de VEGF dans des substrats de gélatine permet d'augmenter l'adhérence et la prolifération de CEs. La prolifération des HUVECS augmente significativement avec l'augmentation des quantités de VEGF immobilisé [Ito et al., 2005].

Compte tenu de la non parfaite innocuité de ces protéines, la synthèse de peptides est apparue comme une solution pour remplacer ces protéines naturelles.

c) Fonctionnalisation de matériaux par des peptides d'adhérence

De nombreuses séquences peptidiques, connues pour influencer l'adhérence cellulaire, ont été isolées et greffées sur des matériaux (Tableau 4). Pour revue voir [Shin et al., 2003] [Hersel et al., 2003]. Ces ligands peptidiques vont interagir directement avec les récepteurs membranaires cellulaires.

RGD	Arg - Gly - Asp
REDV	Arg - Glu - Asp - Val
SVVYGLR	Ser - Val - Val - Tyr - Gly - Leu - Arg
YIGSR	Tyr - Ile- Gly - Ser - Arg
WQQPPRARI	Trp - Gln - Gln - Pro - Pro - Arg - Ala - Arg - Ile

Tableau 4 : Séquences peptidiques utilisées pour favoriser l'adhésion, la prolifération et la différenciation des CEs

Le peptide RGD, constitué par la séquence tri-peptidique Arginine-Glycine-Aspartate, est probablement le plus étudié. Il est présent dans de nombreuses protéines de la MEC, telles que la fibronectine, la vitronectine et le collagène. Il possède une forte affinité pour les récepteurs cellulaires de la superfamille des intégrines qui font partie des molécules d'adhérence cellulaire. Les intégrines favorisent les interactions entre les cellules et la MEC, et du côté intracellulaire, elles réagissent avec les éléments du cytosquelette. Ce sont des hétérodimères formés de deux sous-unités α et β qui contiennent dans leur partie extra-cellulaire des sites de liaisons spécifiques dont l'activité requiert la présence de calcium et qui reconnaissent la séquence tripeptidique RGD. A ce jour 24 intégrines ont été découvertes dont la moitié sont connues pour être RGD dépendantes. Il a été montré que les CEs expriment au moins 13 intégrines, en fonction de leur stade de développement ou de différenciation et de leur fonction [Ruegg et al., 2004]. La migration des EPCs vers les tissus ischémiés est connue pour faire intervenir les intégrines $\alpha_4\beta_1$, alors que $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ sont impliquées dans l'adhérence des progéniteurs au cours de

l'endothélialisation [Urbich and Dimmeler, 2004b]. Le peptide RGD est reconnu par les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$, cependant, il est peu spécifique d'un type cellulaire.

Plusieurs études se sont intéressées à des peptides plus spécifiques de l'adhérence des CE. Des travaux sur les séquences peptidiques REDV et SVVYGLR ont montré que les CE étaient capables de se fixer à des surfaces portant ces peptides. La séquence REDV (un des domaines de la fibronectine) est spécialement reconnue par les intégrines $\alpha_4\beta_1$. Les peptides REDV greffés sur des surfaces synthétiques sont connus pour induire sélectivement l'adhésion des CE et cette séquence va médier la migration des CE sur un revêtement de fibronectine via les récepteurs $\alpha_4\beta_1$ [Moon and West, 2008]. Le greffage de peptides SVVYGLR induit l'adhésion et la migration des CE. Hamada *et al.* ont montré que ce peptide stimule la migration des CE et induit la formation de tubes par les CE dans des gels de collagènes en trois dimensions, ils concluent que SVVYGLR stimule l'angiogenèse [Hamada et al., 2003]. Cependant, Monchaux *et al.* ont montré que REDV et SVVYGLR ne sont pas capables seuls de favoriser l'adhérence des HUVECs mais qu'ils doivent être co-immobilisés avec des peptides RGD [Monchaux and Vermette, 2007].

Un autre peptide étudié est la séquence YIGSR. Ce peptide dérivé des chaînes B1 de la laminine fait partie d'une classe de peptides adhésifs qui contrairement aux RGD, REDV et SVVYGLR, n'interagit pas avec des intégrines mais avec la « laminin binding protein » (LBP). Ce peptide a été utilisé pour favoriser l'adhérence de CE sur des substrats non-adhésifs. Des polyuréthanes dans lesquels sont incorporés des séquences YIGSR favorisent l'adhésion de CE et leur prolifération tout en minimisant l'adhérence plaquettaire [Taite et al., 2007]. Des hydrogels de polyéthylène glycol modifiés avec des séquences YIGSR favorisent l'adhérence et la migration des CE [Fittkau et al., 2005].

Des techniques de « micropatterning » capables de promouvoir l'adhérence et la prolifération des cellules endothéliales ont été développées. Plus spécifiquement, un peptide agissant comme signal d'adhérence (GRGDS) et un autre comme signal de prolifération (WQQPPRARI) ont été greffés conjointement selon un motif déterminé sur du PTFE en utilisant la technologie d'impression par jet d'encre. Les résultats des cultures cellulaires ont clairement mis en évidence une augmentation significative de la migration cellulaire sur les surfaces « à motifs déterminés » par opposition aux observations faites sur des surfaces sur lesquelles les peptides avaient été co-conjugués de façon aléatoire [Gauvreau and Laroche, 2005] [Gagne et al., 2006].

d) Modification des matériaux par films multicouches de polyélectrolytes

Dans les années 1990, Decher *et al.* [Decher, 1997] ont développé une méthode d'assemblage de couches de polyélectrolytes. Les polyélectrolytes sont des macromolécules possédant un grand nombre de groupes chargés quand ils sont dissous dans des solvants polaires, en particulier l'eau. La méthode d'assemblage est basée sur le dépôt alterné de polycations (charges positives) et de polyanions (charges négatives) sur une surface chargée ce qui mène à la construction de films appelés multicouches de polyélectrolytes (MPE) [Schonhoff, 2003] [Decher, 1997]. Dans cette méthode, un substrat chargé négativement ou positivement est recouvert d'une solution de polyélectrolytes de charge opposée pendant un temps court. Les polyélectrolytes présents en solution s'adsorbent sur la surface du substrat et le surplus est éliminé par rinçage. L'excès de charges lors de l'adsorption conduit à inverser le signe de la charge de surface : la surface devient positive dans le cas d'un substrat initialement chargé négativement. Ceci permet l'adsorption d'un second polyélectrolyte de charge opposé au précédent. Cette nouvelle adsorption est également suivie d'une étape de rinçage et la charge de surface s'inverse à nouveau. Des étapes successives d'adsorption alternée de polyélectrolytes de charges opposées permettent la construction d'un film (Figure 11). Grâce aux multiples interactions électrostatiques entre les polyélectrolytes et le substrat et entre les couples de polyélectrolytes, les films présentent une bonne uniformité et une forte adhérence au substrat. Le film multicouche forme un dépôt régulier, parfaitement contrôlé et de faible épaisseur. Son utilisation pour revêtir un substitut vasculaire ne réduirait donc pas la lumière du vaisseau [Kerdjoudj et al., 2008].

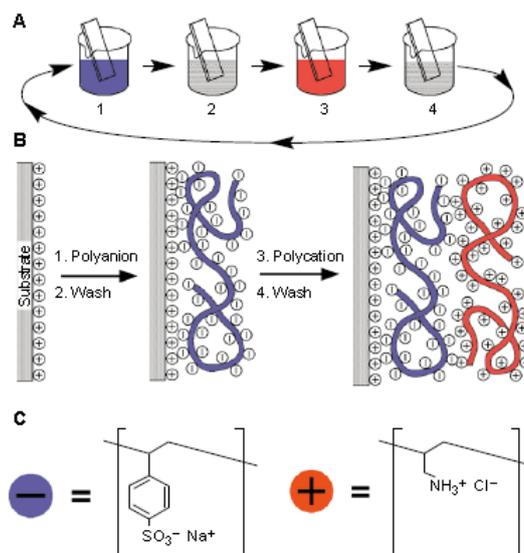


Figure 11 : Représentation schématique de la formation des MPEs

D'après [Decher, 1997]

Représentation schématique du procédé de déposition des films sur lames de verre. Les étapes 1 et 3 représentent l'adsorption d'un polyanion (PSS) et d'un polycation (PAH), respectivement, et les étapes 2 et 4 sont des étapes de lavage. Ces 4 étapes correspondent à la séquence basique de construction d'un film à l'architecture la plus simple.

Boura *et al.* [Boura et al., 2003] ont étudié l'adhérence de cellules HUVECs sur MPEs constitués par des couches alternées d'hydrochlorure de polyallyamine : PAH et de poly(styrene-4-sulfonate) : PSS. Ils ont montré que sur ces films PSS/PAH, les cellules présentent la morphologie pavimenteuse typique de la CE comparée à celle sur des revêtements de boîtes de culture classiques (TCPS). Un des avantages de ces films est leur facilité de construction et la possibilité de faire varier leurs propriétés physico-chimiques en modifiant les conditions de préparation. Parmi les différents types de polyélectrolytes testés, ils ont montré que le film PEI-(PSS-PAH)₃ (PEI : poly(ethyleneimine)) présente une excellente biocompatibilité cellulaire et apparaît comme une surface testée très intéressante en terme d'adhérence et de prolifération cellulaires. Les travaux réalisés par C. Boura, sur lame de verre, ont permis de définir le film qui permet la meilleure adhérence et le meilleur étalement des CEs. Le recouvrement total de la lame de verre a été obtenu avec un film construit par alternance de sept couches PAH et PSS. La construction de ces films présente des avantages certains : la simplicité de la procédure, l'homogénéité des dépôts, la reproductibilité et la possibilité de moduler les propriétés physico-chimiques par de simples modifications des conditions opératoires. De plus, le choix du polyélectrolyte

formant la dernière couche permet de fixer la charge surfacique du film. Ainsi il est possible de réaliser des films pour empêcher, lorsque la charge de surface est négative, ou améliorer, lorsque la charge de surface est positive, l'adhérence des cellules [Kerdjoudj et al., 2006].

Dans le cadre de l'ingénierie vasculaire, les films MPE ont été utilisés pour modifier les propriétés physico-chimiques, d'endoprothèses vasculaires [Thierry et al., 2003a], de la lumière des artères endommagées [Thierry et al., 2003b] et de supports synthétiques [Boura et al., 2003; Liu et al., 2005], afin d'y faire adhérer des CE.

Compte tenu de ces résultats, des expérimentations ont été poursuivies sur ces films [Kerdjoudj, 2007]. Le but a été : d'utiliser des artères ombilicales cryoconservées et désendothélialisées et d'apposer à leur face interne un film de MPE, pour remédier à deux inconvénients majeurs : l'altération des propriétés biomécaniques de la paroi décongelée et l'exposition de la matrice artérielle hautement thrombogène. Le dépôt homogène et régulier de la multicouche est objectivé par l'incorporation du PAH couplé à la rhodamine (PAH*). En microscopie confocale, le recouvrement est complet avec un dépôt homogène du film MPE sur toute la surface interne de l'artère. L'observation en microscopie électronique à balayage révèle aussi une surface homogène et reproductible. Le film recouvre les fibres de collagène et d'élastine qui entrent dans la constitution de la matrice artérielle. Ce travail a permis de montrer que la construction d'un film MPE par alternance de couches de PSS et PAH permettait de modifier la face interne des artères, favorisant l'adhérence et la rétention des cellules endothéliales lorsque la charge de la dernière couche est positive. Lorsqu'elle est négative, une bonne perméabilité et intégration des substituts est observée *in vivo* après trois mois d'implantation chez le lapin [Kerdjoudj et al., 2008]. De plus, les propriétés biomécaniques (élasticité) de la paroi artérielle semblent restaurées après dépôt du film, ce qui permettrait d'éviter l'apparition de complications tardives comme l'hyperplasie intimale au niveau des sites d'anastomose.

Les MPEs constituent une des surfaces que nous avons utilisées dans l'article 3.

e) Modification des polymères par délivrance de gènes.

Le transfert local de gènes codant pour des facteurs de croissance semble intéressant pour contrôler l'adhérence et la différenciation de progéniteurs circulants et favoriser la croissance cellulaire sur le polymère implanté (voir revue [Bleiziffer et al., 2007]). La libération de gènes par le matériau polymère peut se faire par incorporation directe d'un plasmide ADN dans la matrice [Flugelman, 1995].

B. ETAT DE L'ART PORTANT SUR LA COMPOSANTE CELLULAIRE

L'endothélium joue un rôle clef dans la régulation de l'hémostase, de l'inflammation, de la vasorégulation et de l'angiogenèse. Le concept de l'endothélialisation des matériaux (qu'ils soient synthétiques ou biologiques) a pour but d'engendrer une surface hémocompatible et d'améliorer la perméabilité à long terme de la construction.

Plusieurs types cellulaires sont envisagés pour la colonisation de biomatériaux vasculaires. Les cellules utilisées peuvent être allogènes, xénogènes ou autologues. Le faible nombre de donneurs ainsi que les risques de rejets ou de contamination possibles a orienté les recherches vers les cellules autologues. La source cellulaire est une considération importante dans la mise au point d'études sur l'ingénierie vasculaire. Il existe un certain nombre d'espèces pour lesquelles des cellules endothéliales sont rapidement disponibles, les CEs bovines, porcines, humaines et de rat sont commercialement disponibles chez Clonetics, Cell Applications Inc... D'un point de vue historique, les CEs bovines (BAECs) et les CEs de la veine du cordon ombilical humain (HUVECs) sont les plus communément utilisées pour les études fondamentales sur la biologie de l'endothélium, alors que les CEs de veine saphène humaine (HSVECs) sont plus employées pour les études concernant les prothèses vasculaires [McGuigan and Sefton, 2007].

Le choix de la source de CEs pour une application particulière est important puisqu'il existe des variations phénotypiques entre les CEs en fonction de leur source, de leur situation dans un organe, de leur situation dans et selon la taille du vaisseau. En fonction de la source de CEs, des différences ont été rapportées dans les niveaux

d'expression de vasoconstricteurs, de marqueurs cellulaires spécifiques, de médiateurs de la coagulation tels que le récepteur de la protéine C ou le facteur tissulaire, de médiateurs de la fibrinolyse et dans la production de MEC. Des différences ont aussi été montrées entre des cellules éparses et des cellules à confluence, des variations dans l'expression des gènes de CEs de différentes origines [Ho et al., 2003] ainsi qu'entre des CEs *in vitro* ou *in vivo*. De même les lignées de cellules immortalisées utilisées dans de nombreux laboratoires peuvent avoir une expression altérée de certains marqueurs clefs par rapport à ceux de cellules étudiées *in vivo* [Galley and Webster, 2004].

L'utilisation de cellules autologues permet d'éviter toute réaction immunologique. Parmi les différentes possibilités d'approvisionnement en cellules autologues, trois grandes catégories peuvent être distinguées : les cellules matures, les cellules souches subdivisées en cellules souches embryonnaires/fœtales et cellules souches adultes et les cellules progénitrices.

1) RAPPELS PHYSIOLOGIQUES CONCERNANT L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE MATURE

La source des cellules est le plus souvent veineuse et plus rarement artérielle. Elle consiste en des cellules autologues issues d'une veine prélevée directement chez le patient. Dans ce cas, les CEs sont récoltées, cultivées et amplifiées *in vitro* avant d'être ensemencées dans la matrice vasculaire. L'inconvénient de cette procédure est d'obtenir un nombre insuffisant de cellules pour une endothélialisation totale du substitut vasculaire. De plus, elle nécessite une première intervention chirurgicale permettant d'obtenir une veine autologue [Zilla et al., 1987] [Herring et al., 1994]. Une autre source est constituée par les cellules microvasculaires provenant de tissus adipeux (graisses sous-cutanées) dont la première utilisation a été montrée par Williams *et al.* [Williams et al., 1989].

L'endothélium vasculaire a été largement défini et décrit par Boneu et Cazenave [Boneu, 1997] et plus récemment par Aird *et al.* [Aird, 2007]. D'un point de vue anatomique, il représente la couche cellulaire interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Du point de vue de l'embryogenèse, l'endothélium dérive du mésoderme par la différenciation des hémangioblastes (pour revue voir [Coults et al., 2005]). Cependant, d'autres lignées cellulaires peuvent se trans-différencier en CEs et les CEs en

d'autres lignées [Planat-Benard et al., 2004], [Wurmser et al., 2004], [Iohara et al., 2008], nous développerons cette notion dans la partie sur les progéniteurs endothéliaux.

L'endothélium vasculaire est un système dynamique qui participe à de nombreux processus physiologiques, incluant le développement et le remodelage vasculaire, le contrôle du tonus vasculaire et de la fluidité sanguine, la circulation des cellules sanguines et des nutriments. L'endothélium ajuste la balance entre vasodilatation et vasoconstriction, entre inhibition et stimulation des cellules musculaires vasculaires et des monocytes, entre thromboformation et fibrinolyse.

L'endothélium est un tissu constitué approximativement de $1 \text{ à } 6 \times 10^{13}$ cellules. Il couvre une surface de $1 \text{ à } 7 \text{ m}^2$ et représente approximativement 1% du poids d'un individu. Il est formé d'une monocouche continue de CEs et occupe une position anatomique stratégique dans la paroi vasculaire. Les cellules endothéliales mesurent entre $0,3 - 0,5 \text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur, $25 - 50 \text{ }\mu\text{m}$ de long et $15 \text{ }\mu\text{m}$ de large. Elles ont une forme polygonale et leur juxtaposition forme un tapis en mosaïque. Elles sont orientées dans la direction du flux sanguin. Les constituants intracellulaires sont ceux retrouvés habituellement dans le cytoplasme de toutes les cellules. Les CEs se distinguent par la présence d'organelles qu'elles partagent avec les mégacaryocytes, appelées corps de Weibel-Palade. Ces corps se présentent sous la forme de bâtonnets de $3 \text{ }\mu\text{m}$ de long et $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ de large. Les corps de Weibel-Palade (pour revue récente voir [Goligorsky et al., 2009]) sont des lieux de stockage de nombreux facteurs et de multimérisation du facteur de von Willebrand (vWF) impliqué dans les phénomènes d'hémostase qui seront secrétés sous l'effet de stimuli [Metcalf et al., 2008]. Les cellules endothéliales *in vivo* sont polarisées et reposent sur un sous-endothélium thrombogène composé de collagène, élastine, fibronectine, laminine, vWF...

a) Marqueurs des CEs

Ils sont utilisés pour caractériser le phénotype endothélial. Certains marqueurs sont ubiquitaires et exprimés par les CEs mais aussi par d'autres types cellulaires. Certains d'entre eux ne sont pas exprimés dans tous les types de vaisseaux et dans tous les tissus (Tableau 5).

MARKERS	CELL TYPE
Factor VIII-related antigen	ECs (irregularly expressed by capillaries and tumor vessels), platelets, megakaryocytes
CD31/PECAM-1	ECs, platelets, megakaryocytes, B and T lymphocyte subsets, monocytes, neutrophils
Angiotensin-converting enzyme	ECs, epithelial cells, monocyte-macrophages, T lymphocytes
Type I scavenger receptor (acetylated-LDL uptake)	ECs, macrophages, SMCs, pericytes, fibroblasts
<i>Ulex europaeus</i> I agglutinin binding/O(H) blood-type antigen	ECs, erythrocytes
Weibel-Palade bodies	ECs
Vascular endothelial cadherin	ECs, trophoblasts, PLN sinus macrophages
CD34	ECs, hemopoietic precursors
CD102/ICAM-2	ECs, lymphocytes, monocytes, platelets
CD51/61 (vitronectin receptor)	ECs (overexpressed in tumor ECs), platelets, megakaryocytes, osteoclasts, mast cells, B lymphocytes
CD105/endoglin	ECs (overexpressed in tumor ECs), monocyte-macrophages, B lymphocytes, syncytiotrophoblasts
CD36	Microvascular ECs, monocyte-macrophages, erythroid cells, platelets, megakaryocytes
CD73/VAP-2	ECs, T and B lymphocytes, tonsillar epithelium
S-ENDO 1/MUC18	ECs, SMCs, dendritic cells, leukocytes, melanoma cells, carcinoma cells
Thrombomodulin	ECs, SMCs
AAMP	ECs, cytotrophoblasts, mononuclear inflammatory cells, melanoma cells, adenocarcinoma cells

AAMP, angio-associated migratory cell protein; SMC, smooth muscle cell, and PLN, peripheral lymph nodes.

Tableau 5 : Marqueurs endothéliaux constitutifs des CEs humaines

[Garlanda and Dejana, 1997]

Si un certain nombre de marqueurs sont constitutifs et présents dans presque tous les types d'endothélium, d'autres molécules sont inductibles et ne sont exprimées qu'après activation par des cytokines inflammatoires et des facteurs de croissance [Garlanda and Dejana, 1997], (Tableau 6).

Markers	Cell Type	Stimulus
CD54/ICAM-1	ECs, leukocytes, epithelium, fibroblasts	Upregulated in ECs by inflammatory CKs
CD106/VCAM-1	ECs, macrophages, sinovia, dendritic cells, mesothelium	Upregulated in ECs by inflammatory CKs
CD62E/E-selectin	ECs, postcapillary venules restricted <i>in vivo</i>	Induced by inflammation, CK and neoangiogenesis
CD62P/P-selectin	ECs, platelets	Membrane exposed after CK activation
KDR/Flk-1 (VEGFR-2)	ECs	Neoangiogenesis, KS, vascular tumors
Flt-1 (VEGFR-1)	ECs	Neoangiogenesis, KS
Tie-1	ECs	Neoangiogenesis
Tie-2/Tek	ECs	Neoangiogenesis
FB5/endosialin	ECs of tumor vessels	Tumor neoangiogenesis
Fibronectin ED-B	ECs of tumor vessels	Tumor neoangiogenesis

CK indicates cytokine; KS, Kaposi's sarcoma.

Tableau 6 : Marqueurs inductibles des CEs humaines [Garlanda and Dejana, 1997]

b) Fonctions des CEs

La fonctionnalité de l'endothélium vasculaire peut être appréhendée de plusieurs façons (pour revue voir [Galley and Webster, 2004]), selon son implication dans des fonctions de transports ou de synthèses. En effet, l'endothélium qui se comporte comme une barrière semi-perméable sélective, autorise et régule les échanges de molécules entre le sang et les tissus. Les modes et mécanismes de transport au travers de la barrière endothéliale varient selon la localisation artérielle, veineuse ou microcirculatoire. L'endothélium assure principalement le transport du glucose et des acides aminés par l'intermédiaire d'invaginations de la membrane cellulaire (les cavéoles, responsables du transport transcellulaire) et de jonctions serrées.

Les CEs sont aussi capables de synthétiser et sécréter de nombreuses substances qui diffusent et influencent la fonction des CMLs, des plaquettes et des leucocytes circulants (Figure 12).

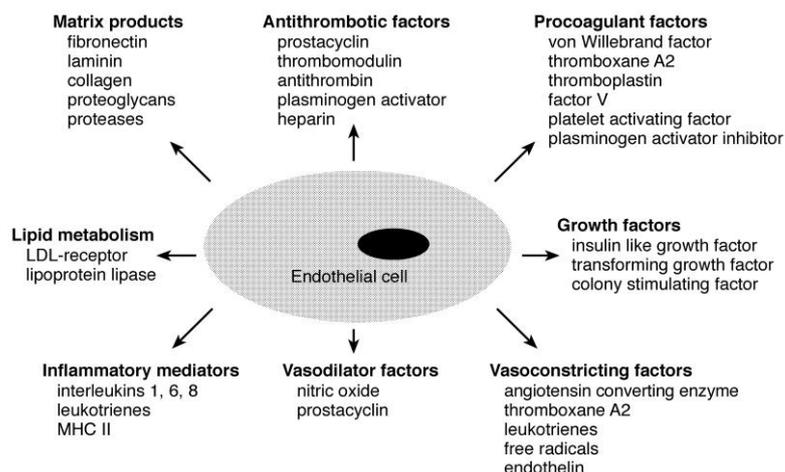


Figure 12 : Facteurs synthétisés par les CE [Galley and Webster, 2004]

Médiateurs sécrétés par les CE et capables d'influencer les fonctions cellulaires dans tout l'organisme.

La dysfonction endothéliale est impliquée dans de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose, l'hypertension, les syndrômes septiques et inflammatoires [Galley and Webster, 2004].

❖ *Fonction de régulation du tonus vasculaire*

L'endothélium joue un rôle majeur dans la régulation du tonus vasculaire par la production de médiateurs vasoactifs. Ces substances vasodilatatrices (monoxyde d'azote, prostacycline) et vasoconstrictrices (endothéline et « Platelet Activating Factor ») sont libérées par l'endothélium en réponse à des stimuli humoraux et mécaniques et peuvent affecter profondément la fonction et la structure des CMLs sous-jacentes.

Le monoxyde d'azote ou (NO) est un puissant vasodilatateur. La production constitutive de NO par l'endothélium maintient les vaisseaux dans un état de vasodilatation. Le NO est produit grâce à la réaction de conversion de la L-arginine en citrulline + NO, catalysée par deux enzymes, la NOSynthase de type II (inductible) et la NOSynthase de type III (endothéliale constitutive) [Ait-Oufella et al., 2008]. Furchgott et Zawadzki ont montré en 1980, le rôle de l'endothélium dans la vasodilatation. Le NO diffuse dans la paroi vasculaire et active une cascade enzymatique dans les CMLs, aboutissant à la diminution du stock de calcium libre dans le cytosol, ce qui déphosphoryle la myosine et donc inhibe la contraction des CMLs. La production de NO par les CE inhibe l'expression de molécules d'adhérence, en stabilisant IκB (inhibiteur du facteur de transcription NF- kappa B) ce qui atténue la réponse pro-inflammatoire. Les CE produisent aussi l'Endothéline (ET), vasoconstricteur puissant, particulièrement

l'ET-1. Celle-ci stimule la prolifération de cellules, augmente l'expression de nombreux gènes dont les collagénases, les « prostaglandin endoperoxidase synthase » et le « platelet-derived growth factor » (PDGF). L'ET n'est produite par l'endothélium qu'en réponse à un stimulus comme l'hypoxie et les forces de cisaillement. L'ET diffuse et se fixe sur son récepteur spécifique présent à la surface des CMLs, ceci favorise la libération de calcium depuis le réticulum endoplasmique et induit la vasoconstriction (pour revue sur les endothélines voir [Shah, 2007]).

Il existe des interactions entre l'endothéline, le NO et les prostaglandines dans le contrôle du tonus vasculaire [Galley and Webster, 2004].

❖ *Fonction de défense de l'hôte*

Les CEs occupent une position stratégique comme facteurs clefs dans les moyens de défense de l'hôte et l'inflammation. L'orchestration des réponses immunes et inflammatoires dépend de la communication entre les cellules grâce à des molécules solubles appelées de façon générique cytokines. Ces cytokines incluent des chemokines, des colony stimulating factors (CSF), les Interleukines (IL), facteurs de croissance et interférons (IFN). Ce sont des protéines de faible poids moléculaire qui régulent à la fois l'amplitude et la durée des réponses immunes et inflammatoires. Les CEs en produisent une large variété [Galley and Webster, 2004].

De plus, les CEs régulent la migration des leucocytes dans les tissus par un processus hautement contrôlé impliquant des molécules d'adhésion et des liaisons ligand-récepteur. L'interaction des leucocytes avec les CEs fait intervenir plusieurs étapes : le « rolling », l'adhérence lâche puis ferme et la diapédèse. A chacune de ces étapes interviennent différentes molécules d'adhérence membranaire. Les CEs expriment les sélectines (E-sélectine et P-sélectine) qui permettent les premières interactions puisqu'elles résistent aux forces de cisaillement élevées et qu'elles se lient (et se délient) très rapidement. Les intégrines sont plutôt impliquées dans l'adhérence des monocytes et des polynucléaires. L'adhérence ferme fait intervenir des molécules de la superfamille des immunoglobulines : l'intercellular adhesion molecule (ICAM-1 et ICAM-2), le vascular cell adhesion molecule (VCAM) [Ait-Oufella et al., 2008]. L'expression de ces molécules d'adhérence, par exemple, ICAM-1 et VCAM se fait a minima, dans les CEs à l'état basal,

mais elle peut être augmentée par une activation par des cytokines ou le LPS (Lipopolysaccharide) (endotoxine) [Galley and Webster, 2004].

Ce phénomène de régulation active de l'entrée des leucocytes et de différentes substances vers les tissus fait aussi intervenir la séparation des ponts unissant les cadhérines au niveau des jonctions serrées [Dejana et al., 1995]. La présence de VE-cadhérine aux jonctions cellulaires permet le contrôle de la perméabilité des vaisseaux. La VE-cadhérine est une molécule d'adhérence spécifique des CEs localisée au niveau des jonctions cellulaires. Elle joue un rôle capital dans le maintien et le contrôle des contacts inter-CEs. La VE-cadhérine appartient à la famille des cadhérines (cadhérines de type II), une des familles majeures de molécules d'adhésion. Elles possèdent un domaine spécifique extracellulaire et l'adhérence est médiée par des interactions calcium dépendantes. L'adhérence optimale des cadhérines nécessite l'association de leur partie C terminal avec des protéines cytoplasmiques : les caténines. Outre ses fonctions dans l'adhérence, la VE-cadhérine régule différents processus cellulaires comme la prolifération, l'apoptose, et module les fonctions de VEGF-R, faisant de la VE-cadhérine une molécule essentielle pendant l'angiogenèse embryonnaire [Vestweber, 2008].

❖ *Implication des CEs dans l'hémostase et la coagulation*

L'hémostase regroupe l'ensemble des phénomènes survenant à la suite d'une lésion vasculaire et aboutissant à la formation d'un caillot plaquettaire stable ou clou plaquettaire. L'activation des protéines de la coagulation (Figure 13) vise ensuite à former le caillot définitif, avant que les mécanismes de réparation tissulaire ne se mettent en place parallèlement à la fibrinolyse. Les CEs jouent un rôle à chacune de ces étapes puisqu'elles participent à l'activation plaquettaire et qu'elles produisent des facteurs de la cascade de la coagulation et du système fibrinolytique. Comme nous l'avons dit plus haut, l'endothélium est un organe dynamique, siège d'un équilibre subtil entre un état anticoagulant et un état procoagulant (Tableau 7), selon les circonstances respectivement physiologiques ou pathologiques, faisant souvent comparer l'endothélium vasculaire à une balance.

- En cas de lésion vasculaire, le premier temps consiste en une vasoconstriction réflexe suivie du temps plaquettaire qui fait intervenir le facteur de Willebrand, produit par les CEs assurant l'établissement d'un pont entre sous-endothélium et

plaquettes. Les CE limitent aussi l'hémostase primaire en libérant des substances vasodilatatrices (prostacyclines et NO).

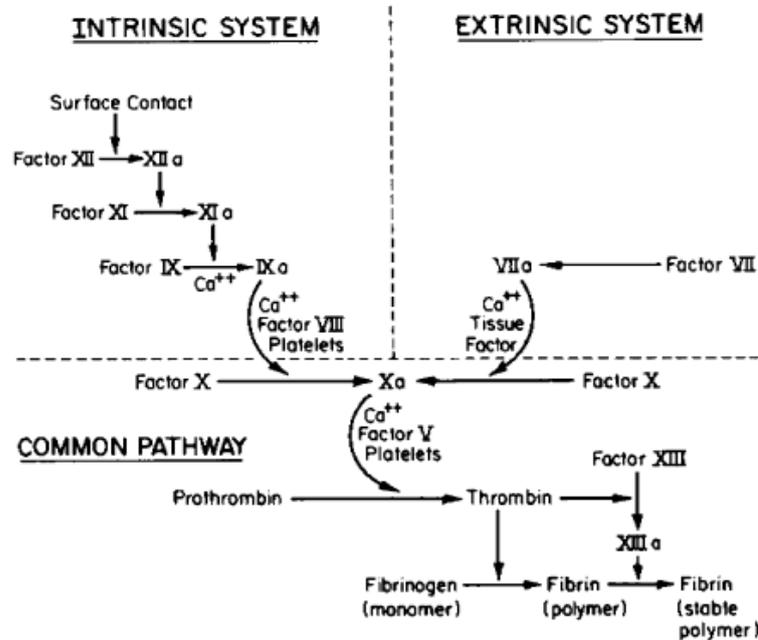


Figure 13 : Représentation simplifiée de la cascade de coagulation

[Gorbet and Sefton, 2004]

Procoagulants	Anticoagulants
Thromboxan	Prostacyclin
von Willebrand's factor	Protein C
Interleukin-1	Protein S
Platelet-activating factor	Thrombomodulin
Phospholipids	Heparan sulfate
Tissue factor	Tissue factor pathway inhibitor
Plasminogen activator inhibitor type 1	Urokinase
	Tissue type plasminogen activator

Tableau 7 : Régulation de la coagulation par les CEs [Shireman and Pearce, 1996]

- L'étape majeure d'acquisition pour l'endothélium d'un phénotype procoagulant passe par l'expression du facteur tissulaire (FT). C'est l'un des principaux facteurs déclenchant de la coagulation *in vivo*. Cette molécule peut être induite par les CEs, après leur stimulation par la thrombine, certaines cytokines, l'endotoxine, les forces de cisaillement, l'hypoxie ou les lipides oxydés [Ait-Oufella et al., 2008]. L'expression du FT par les CEs est polarisée, la molécule produite est progressivement accumulée essentiellement au niveau du sous-endothélium. Le FT est le récepteur cellulaire du facteur VII. Dans l'activation de la voie extrinsèque, pour atteindre sa pleine efficacité coagulante, le facteur VII doit être transformé en facteur VIIa et se combiner aux phospholipides membranaires procoagulants et au facteur tissulaire. L'activation du facteur VII par le FT, active alors le facteur X qui combiné au facteur Va, permet la conversion de la prothrombine en thrombine. Le facteur tissulaire est à lui seul dépourvu d'activité procoagulante. C'est un cofacteur macromoléculaire d'enzymes. Le facteur tissulaire se trouve à l'intérieur ou à la surface de nombreuses cellules de l'organisme : monocytes, CMLs et CEs. Pour déclencher la voie extrinsèque, le FT doit émerger à la surface cellulaire, soit lorsque les cellules subissent des lésions soit à la suite d'actions modulatrices de cytokines (ex : TNF, endotoxine, interleukine-1). La molécule de FT extériorisée demeure ancrée dans la bicouche phospholipidique ; ainsi son action se limite-t-elle à ce site ponctuel où elle est immobilisée. Le FT est une intégrine, il ne circule pas, seul 10% sont présents dans le cytoplasme, et 90% sont situés à l'extérieur de la cellule, dans le plasma. Aussi, les cascades de la coagulation ont lieu, non pas en phase liquide dans le plasma, mais principalement sur les membranes cellulaires et les caillots en formation. L'endothélium est donc la principale surface sur laquelle a lieu la réaction de coagulation que celle-ci implique la voie intrinsèque ou extrinsèque. Physiologiquement, la voie extrinsèque semble incapable de réaliser à elle seule l'hémostase (même si dans l'éprouvette le test appelé temps de Quick, qui évalue la voie extrinsèque, peut former un caillot en moins de 10 secondes). Mais *in vivo*, le FT n'est pas injecté dans le plasma (comme on le fait pour le temps de Quick), puisqu'il est fixé à des sites précis. Le rôle de la voie extrinsèque semble être de servir de « bougie d'allumage » à toutes les cascades de la coagulation, afin qu'elles démarrent, gagnent en intensité et atteignent leur plénitude. Le vWF est

aussi impliqué dans la cascade de coagulation puisqu'il fixe et stabilise le complexe facteur VIII.

- Enfin, la fibrinolyse fait intervenir plusieurs molécules: t-PA (activateur tissulaire du plasminogène), u-PA (l'urokinase) et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), produits par l'endothélium (Figure 15 et Tableau 7). Le t-PA est une protéase synthétisée et sécrétée par les CEs qui transforme le plasminogène en plasmine au niveau du caillot sanguin ou à la surface de l'endothélium. La plasmine dégrade la fibrine et libère dans la circulation les produits de dégradation de la fibrine ou D-dimères. Il existe un autre activateur du plasminogène, l'u-PA ou Urokinase exprimé uniquement lors des processus de réparation tissulaire et d'angiogenèse, suggérant qu'il a un rôle important dans la migration cellulaire et le remodelage tissulaire [Ait-Oufella et al., 2008]. Le t-PA et l'u-PA sont inhibés en fin de fibrinolyse par les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAI-1 et PAI-2). Le PAI-1 est produit à la fois par le foie et l'endothélium activé.

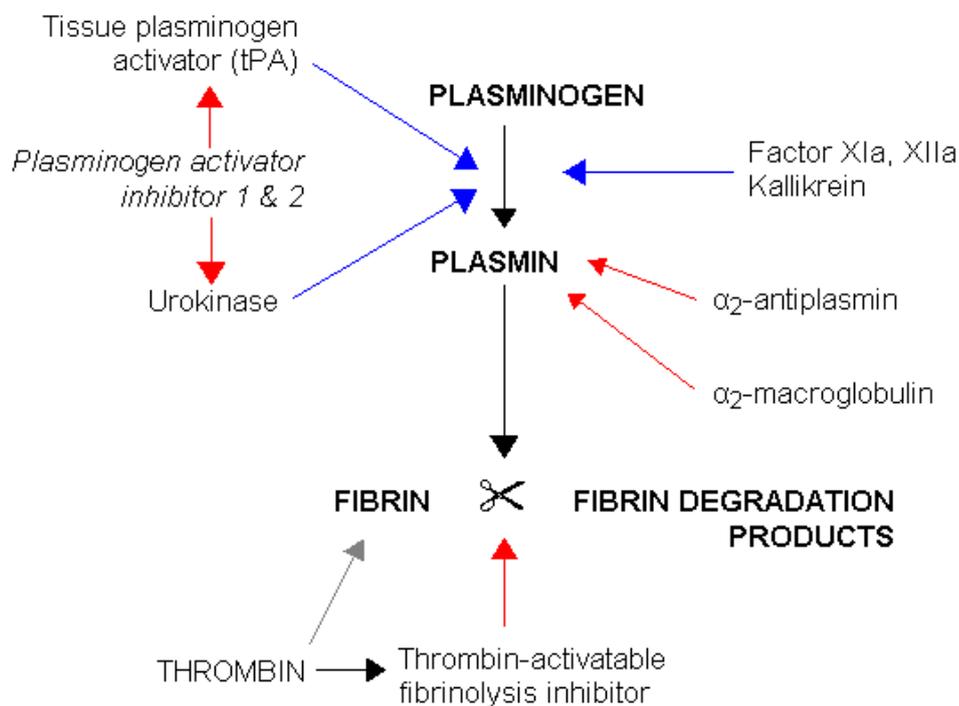


Figure 15 : Fibrinolyse simplifiée (flèches bleues représentent une stimulation et les rouges une inhibition)

www.answers.com/topic/fibrinolysis

❖ *Implication des CEs dans l'angiogenèse*

Les CEs (ainsi que d'autres types cellulaires) produisent du VEGF, facteur angiogène présentant des récepteurs spécifiques sur l'endothélium. L'angiogenèse définie comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir de l'endothélium pré-existant, est médiée par le VEGF. Il appartient à une famille de protéines constituée de 6 membres: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et Placenta Growth Factor [Cross et al., 2003].

Les récepteurs au VEGF, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) et VEGFR-3, sont des récepteurs à tyrosine kinase et se dimérisent après activation. Chacun des récepteurs a une fonction propre [Neufeld et al., 1999].

Flt-1 peut être activé par le VEGF-A, le VEGF-B ou le PlGF et est impliqué dans le développement des CSHs ainsi que la migration des macrophages, monocytes. Il est exprimé par les CSHs, les macrophages et les monocytes. Ce récepteur existe également sous forme soluble. En se fixant au VEGF, il limite l'accessibilité de ce facteur aux récepteurs membranaires fonctionnels et va alors réguler négativement la vasculogenèse.

Le VEGFR-3 est principalement exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques et impliqué dans le développement du système lymphatique. Les formes matures du VEGF-C et du VEGF-D peuvent se lier à ce récepteur.

Le KDR, exprimé par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques mais aussi les mégacaryocytes et les CSHs, peut reconnaître le VEGF-A, le VEGF-C, le VEGF-D et le VEGF-E. Ce récepteur est considéré comme le médiateur majeur des différents effets physiologiques et pathologiques du VEGF-A. Ainsi, en se fixant au KDR, le VEGF-A active différentes voies de signalisation et régule les mécanismes de l'angiogenèse [Olsson et al., 2006].

c) Spécificités des CEs d'artère ou de veine

Les CEs forment la partie la plus interne de tous les vaisseaux sanguins. Comme les systèmes artériels et veineux diffèrent par leur fonction, il n'est pas surprenant qu'ils diffèrent aussi par leur structure incluant les CEs qui sont elles aussi distinctes (Figure 16).

Les conditions circulatoires (le type de flux) vont conditionner la différenciation des CEs de ces deux types vasculaires [Dela Paz and D'Amore, 2008].

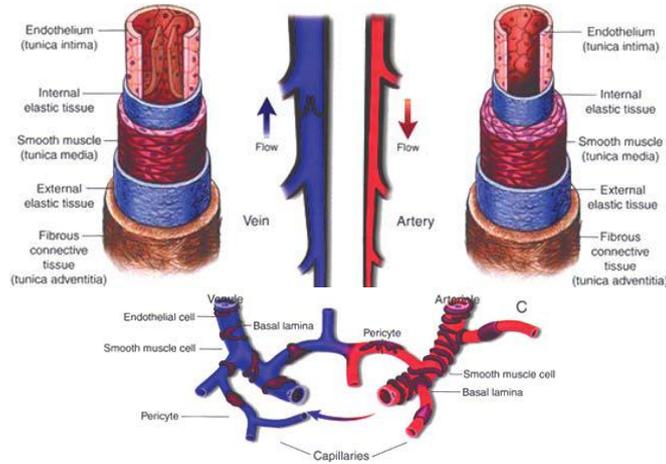


Figure 16 : Différences entre artères et veines [Torres-Vazquez et al., 2003]

Les spécificités portent sur :

❖ *Des différences structurelles entre CEs des artères et des veines :*

Les CEs des artères sont longues et étroites ou ellipsoïdales, et s'alignent dans la direction du flux sanguin. Les CEs des veines sont courtes et larges, puisque le débit sanguin des veines est significativement plus faible que dans les artères [Dela Paz and D'Amore, 2008]. Les jonctions intercellulaires dans les artères quel que soit leur calibre, sont beaucoup plus serrées que celles des veines. Les veinules post-capillaires présentent peu d'organisation de jonctions serrées. Parmi ces jonctions on distingue les « tight junctions » (ou zona occludens ou jonctions serrées), les jonctions adhérentes, (zona adherens) et les jonctions de type gap junctions.

❖ *Des différences fonctionnelles*

Les CEs des artérioles contrôlent le tonus vasculaire, alors que les CEs des veinules post-capillaires constituent le premier site du trafic leucocytaire au cours de l'inflammation [Aird, 2007].

❖ *Des différences moléculaires*

Différentes expérimentations (Tableau 8) indiquent que la spécification artério-veineuse est médiée par l'expression de gènes codant des molécules de signalisation, incluant ligands, récepteurs et facteurs de transcription.

Cell type	Gene name	Species	
Arterial EC	EphrinB2/ephrin-B2a	Mouse (Adams et al. 1999; Wang et al. 1998), chick (Moyon et al. 2001a; Othman-Hassan et al. 2001), zebrafish (Lawson et al. 2001)	
	Neuropilin 1	Mouse (Mukoyama et al. 2002), chick (Herzog et al. 2001; Moyon et al. 2001a)	
	Connexin 40	Mouse (van Kempen and Jongsma 1999)	
	Bmx	Mouse (Ekman et al. 1997; Rajantie et al. 2001)	
	Notch 1	Mouse (Villa et al. 2001)	
	Notch 4	Mouse (Villa et al. 2001)	
	Notch 5	Zebrafish (Lawson et al. 2001)	
	Delta-like4	Mouse (Shutter et al. 2000)	
	Jagged1	Mouse (Villa et al. 2001)	
	Jagged2	Mouse (Villa et al. 2001)	
	Hey2/gnidlock	Human (Chi et al. 2003), zebrafish (Zhong et al. 2000, 2001)	
	DeltaC	Zebrafish (Smithers et al. 2000)	
	Flkl	Zebrafish (Liao et al. 1997)	
	Tbx20	Zebrafish (Ahn et al. 2000)	
	Alkl	Mouse (Seki et al. 2003)	
	EPAS	Mouse (Tian et al. 1997)	
	Depp	Mouse (Shin and Anderson 2005)	
	VEGF	Mouse (Maharaj et al. 2006)	
	Venous EC	EphB4	Mouse (Adams et al. 1999; Wang et al. 1998), zebrafish (Lawson et al. 2001; Zhong et al. 2001), frog (Helbling et al. 2000)
		Lefty-1	Human (Chi et al. 2003)
Lefty-2		Human (Chi et al. 2003)	
Ft4		Mouse (Kaipainen et al. 1995), zebrafish (Thompson et al. 1998)	
Neuropilin 2		Mouse (Yuan et al. 2002), chick (Herzog et al. 2001)	
Tie2		Chick (Moyon et al. 2001a, b)	
COUP-TFII		Mouse (You et al. 2005)	
Endomucin		Human (Kuhn et al. 2002; Liu et al. 2001), mouse (Morgan et al. 1999)	

Tableau 8 : Marqueurs moléculaires de l'endothélium vasculaire
[Dela Paz and D'Amore, 2008]

Le VEGF est exprimé uniquement par les CEs aortiques mais non par les CEs d'origine veineuse [Maharaj et al., 2006]. La voie Notch est impliquée dans le développement vasculaire et plus particulièrement dans la différenciation des CEs en type artériel. Enfin, la spécification artério-veineuse initiale, définie par l'expression de marqueurs artériels ou veineux et les voies de signalisation qui s'y rapportent, est réversible, c'est à dire que les facteurs environnementaux influencent l'identité cellulaire [Othman-Hassan et al., 2001].

2) LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES ET FOETALES

Les cellules souches étant par définition capables d'autorenouvellement et de différenciation offrent l'avantage théorique d'avoir un potentiel de prolifération élevé et d'être relativement accessibles pour l'ingénierie tissulaire [Lavik and Langer, 2004].

a) Les cellules souches embryonnaires

Elles sont issues de la masse interne du blastocyste, structure de 16 - 40 cellules issues des divisions de l'ovocyte fécondé. S'il est implanté dans l'utérus progestatif, le blastocyste entier peut se développer en un fœtus viable. A ce stade de développement, chacune des cellules est pluripotente, voire totipotente puisqu'elle peut produire tous les feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme), les tissus qui en dérivent ainsi que les cellules germinales. Une fois le blastocyste dissocié, les cellules souches embryonnaires ne présentent plus la possibilité de se développer en un embryon ; cependant, elles peuvent être cultivées au laboratoire « à l'infini » tout en conservant leur caractère de pluripotence. Placées dans des conditions de culture précises (stimulations biochimiques et/ou mécaniques), ces cellules ont également la capacité de se différencier en cellules spécialisées correspondant à tous les tissus de l'organisme (cœur, sang, neurones,.....), y compris vers une différenciation vasculaire (pour revue [Hanjaya-Putra and Gerecht, 2009]).

Obtenir des cellules souches embryonnaires implique soit la production d'embryons humains, soit l'utilisation d'embryons surnuméraires issus de la fécondation *in vitro*.

b) Les cellules souches foetales

Les organes et les tissus prélevés lors des interruptions volontaires de grossesse (IVG) comportent un important contingent de cellules souches. Ces cellules multipotentes ont la particularité d'être déjà orientées vers un type cellulaire bien défini, selon les feuillets, ecto, méso ou endodermique. Le recueil de ce type de tissus présente un défi éthique et technique (lourdeur de la procédure, matériel nécessaire à l'intervention).

En France, les recherches au moyen de cellules souches embryonnaires ou fœtales humaines, ou de cellules/tissus/organes post-mortem, doivent être préalablement autorisées par l'Agence de la Biomédecine qui délivre l'autorisation pour une durée de cinq ans sous forme d'un arrêté public au journal officiel. En 2008, 36 autorisations ont été délivrées pour des protocoles de recherche, 17 sites ont été autorisés pour la conservation et 26 autorisations d'importation ont été données.

3) LES CELLULES SOUCHES ADULTES

a) Définitions

Les cellules souches adultes sont des cellules pluripotentes, capables d'autorenouvellement et de différenciation en cellules spécifiques des tissus dans lesquelles elles résident [Filip et al., 2004]. Elles sont la base du renouvellement naturel d'un tissu et de sa réparation à la suite d'une lésion. Ces cellules sont déjà utilisées dans des traitements de plus d'une centaine de maladies. Une activité de cellules souches a été mise en évidence dans de nombreux tissus et organes (sang, peau, intestin...) mais la localisation exacte de ces cellules n'est toujours pas clairement établie. Généralement, les cellules souches se localisent dans des niches dont le microenvironnement détermine le statut d'activation de la cellule souche, ceci permettant d'assurer une balance entre le maintien d'un pool de cellules souches et la production de cellules progénitrices engagées dans la différenciation tissulaire [Kindler, 2005]. Elles sont qualifiées de somatiques, et peuvent être trouvées non seulement chez les adultes, mais aussi chez les enfants et dans le cordon ombilical.

b) Marqueurs des cellules souches adultes

Hombach-Klonisch *et al.* regroupent les différents marqueurs classiquement utilisés pour identifier les cellules souches, en fonction du tissu dans lequel elles se trouvent [Hombach-Klonisch et al., 2008] (Tableau 9).

Marker	Synonym	Significance
Endothelial progenitor cells		
CD146	MCAM, MUC18, S-endo-1	Integral membrane protein expressed on endothelial precursor cells and circulating endothelial cells
CD34		Cell surface protein on bone marrow cells, HSCs, endothelial progenitor and muscle stem cell
CD133	Prominin	
Tie-2		Receptor for angiopoietin on endothelial progenitor cells and HCS
Fetal liver kinase-1	Flk1, KDR VEGFR2	Endothelial cell surface receptor protein that identifies endothelial cell progenitor
Hematopoietic stem cells		
CD34		Cell surface protein on bone marrow cells, HSCs, endothelial progenitor and muscle stem cell
c-Kit	CD117, YB5.B8	Cell surface receptor on bone marrow cell types that identifies HSC, hematopoietic progenitor cells and mesenchymal stem cell (MSC)
Stem cell antigen	Sca1, Ly-6A/E	Cell surface protein on bone marrow (BM) cell, indicative of HSC and MSC
Mesenchymal stem cells		
CD146	MCAM, MUC18, S-endo-1	Cell surface protein found on bone marrow fibroblasts
STRO-1 antigen		Cell surface glycoprotein on subsets of bone marrow stromal (mesenchymal) cells
Thy-1		Cell surface protein on HSC, MSC
Neural stem cells		
CD133	Prominin	Cell surface protein that identifies neuronal stem cells
Nestin		Marker for NSC in the CNS and in culture
Neuronal cell adhesion molecule	NCAM	Cell surface molecule that promotes cell-cell interaction; NSC migration; primitive neuroectoderm formation
Breast stem cells		
CD24 CD29		Cell surface proteins on mammary repopulating units in mice
Stem cell antigen	Sca1, Ly-6A/E	Cell surface protein on human mammary repopulating units
Intestinal stem cells		
NCAM		Marker for liver and pancreas stem cells
CD34		Marker for liver and pancreas stem cells
Thy-1		Marker for liver and pancreas stem cells
c-Kit		Marker for liver and pancreas stem cells
Flt-3		Marker for liver and pancreas stem cells

Tableau 9 : Marqueurs communément utilisés pour identifier les cellules souches adultes dans différents tissus.

En plus de la présence de ces marqueurs, d'autres méthodes d'identification des cellules souches existent, en particulier la capacité de certaines cellules souches à exclure les colorants fluorescents (rhodamine et Hoechst 33342) et à retenir un marquage ADN [Hombach-Klonisch et al., 2008].

c) Isolement des cellules souches adultes

L'isolement des cellules souches peut se faire selon plusieurs méthodes [Hombach-Klonisch et al., 2008] :

- Isolement par cytométrie en flux : les cellules sont sélectionnées et triées grâce au marquage avec un anticorps spécifique de cellule souche, couplé à un fluorochrome.

- Isolement par billes immunomagnétiques : des billes magnétiques revêtues d'un anticorps spécifique sont utilisées soit pour la sélection, soit pour la déplétion de différents types cellulaires. Des cellules avec plusieurs marqueurs de surface peuvent être isolées par la combinaison d'isolements positifs et négatifs.
- De nombreuses autres techniques d'isolement des cellules souches ont été proposées ces dernières années, en particulier l'isolement par ondes acoustiques (acoustophorèse).

Riha [Riha et al., 2005] décrit deux grands types de cellules souches qui peuvent être isolées chez l'adulte : les cellules souches mésenchymateuses et les cellules hématopoïétiques.

d) Les cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques

❖ Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) ont été identifiées en 1966 par Friedenstein [Friedenstein et al., 1966]. Elles proviennent d'une partie de l'embryon appelée mésoderme capable de former de nombreux tissus (Figure 17).

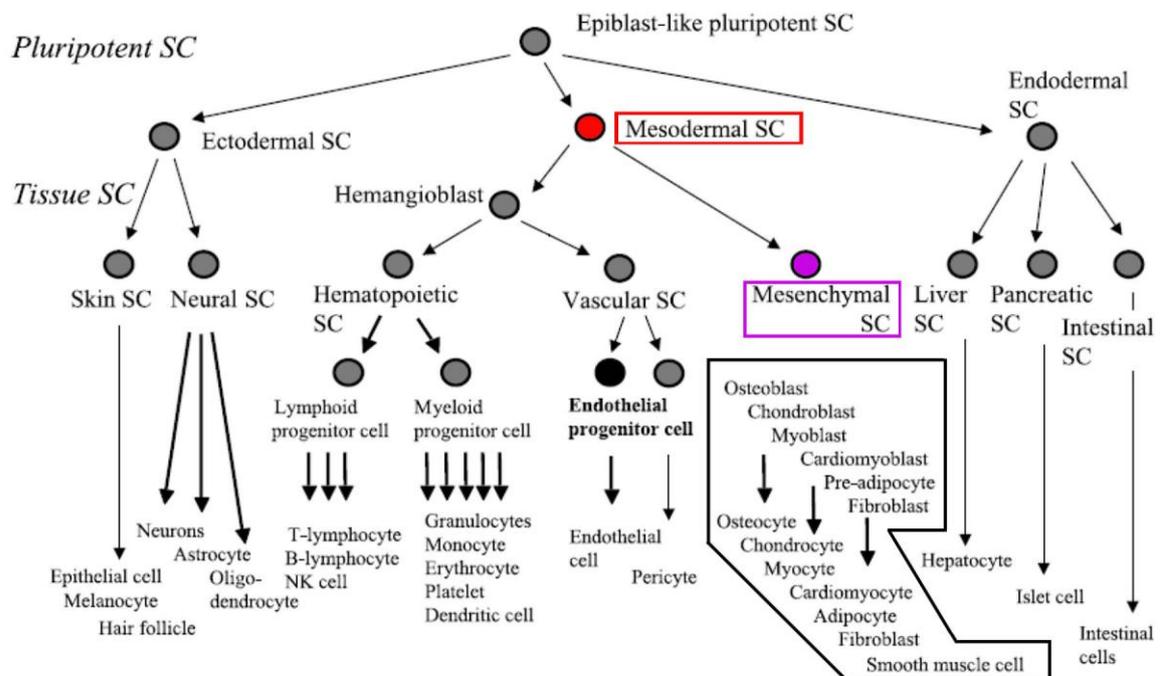


Figure 17 : Cellules souches post natales et cellules progénitrices.

[Asahara and Kawamoto, 2004]

La difficulté de caractérisation réside dans l'absence de marqueur unique des CSMs. La présence de nombreux marqueurs CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124, CD166, SH2, SH3, SH4 et la présence d'intégrines $\alpha 1$, $\alpha 5$ et $\beta 1$ suggèrent un phénotype de CSM [Riha et al., 2005]. Mais le fait que ces marqueurs soient communs à d'autres types cellulaires rend nécessaire l'absence d'autres marqueurs sur ces cellules pour qu'elles soient reconnues comme de vraies CSM, en particulier, CD14, CD34, CD45, HLA-DR (marqueurs de cellule souche hématopoïétiques), CD11a et CD31. Pour Hombach-Klonisch, les marqueurs des CSM sont CD146, MCAM, MUC18, S-endo-1, STRO-1, Thy-1 [Hombach-Klonisch et al., 2008].

D'un point de vue morphologique, ces cellules sont de type fibroblastique et en forme d'aiguille « spindle shaped » [Roberts, 2004]. Les CSMs peuvent être scindées en deux groupes, les cellules issues ou non de la moelle osseuse. Les CSMs de la moelle osseuse permettent de garantir un environnement stromal adéquat pour le maintien de l'hématopoïèse. Les CSMs représenteraient 0,01 à 0,0001% du total de cellules mono nucléées [Roberts, 2004] et le prélèvement par aspiration au niveau de la crête iliaque serait le protocole standard. D'autres méthodes d'isolement des CSMs se sont développées à partir de sources non issues de la moelle osseuse, en particulier à partir du sang périphérique. En effet, différentes études ont montré que l'isolement de CSMs à partir du sang périphérique était possible, en particulier après administration de granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) ou de granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [Kuramochi et al., 2003] [Zvaifler et al., 2000]. Cependant, d'autres études n'ont pas pu reproduire cet isolement malgré des techniques comparables [Wexler et al., 2003].

Dans des conditions favorables, les CSMs peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires, incluant l'os, le cartilage, le muscle, le tendon, le tissu adipeux, les cellules endothéliales et en cellules stromales hématopoïétiques [Pittenger et al., 1999] [Oswald et al., 2004] [Reyes et al., 2002]. Ceci en fait de bons candidats pour l'ingénierie vasculaire en vue de l'obtention de CMLs et de CEs. Les CSMs issues de la moelle osseuse ont été utilisées comme sources de cellules vasculaires autologues [Cho et al., 2005]. La différenciation des cellules souches est fortement influencée par les deux facteurs environnementaux que sont les facteurs de croissance et l'environnement mécanique. Ainsi, Oswald *et al.* [Oswald et al., 2004] a montré que des CSMs (positives pour les marqueurs CD105, CD73, CD166, CD90 CD44 et négatives pour les marqueurs

endothéliaux ou de cellule souche hématopoïétiques) peuvent se différencier en CEs, cellules adipocytaires ou de la lignée ostéoblastique en fonction des conditions de culture. Afin de promouvoir leur différenciation en CEs, les CSMs sont cultivées en présence de VEGF (50 ng/mL) sur une période de 7 jours à l'issue de laquelle la présence du facteur de Willebrand est confirmée par immunomarquage *in situ* et par cytométrie en flux.

L'intérêt de ces cellules souches est qu'elles permettraient de construire un vaisseau implantable complet avec CEs et CMLs.

Parmi cette population des CSMs, peut être co-purifié un autre type de cellules progénitrices, les MAPCs (multipotent adult progenitors cells) (Figures 20 et 21). Leur statut est très débattu. Les MAPCs pourraient représenter un précurseur des CSMs avec un potentiel de développement plus important [Oswald et al., 2004]. D'autres suggèrent que les cellules « endothelial-like » pourraient dériver à la fois des cellules souches hématopoïétiques et des MAPCs, rendant plus incertaine la relation entre MAPCs et CSMs. Reyes a établi une caractérisation de ces MAPCs qui sont négatives pour CD31, CD34, CD36, CD44, CD45, CD62L, CD62P HLA classe I, HLA-DR, c-Kit, Tie, Tek VE-cadherin, VCAM (vascular cell adhesion molecule) et ICAM (intercellular adhesion molecule). Ces cellules expriment des taux faibles de β_2 -microglobuline, $\alpha_v\beta_5$, CD133, Flk-1, Flt-1 et des taux élevés de CD13 et CD49b. Ces MAPCs montreraient en culture plus de 80 doublements de population [Reyes et al., 2002].

❖ *Les cellules souches hématopoïétiques*

Les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) représentent une autre possibilité de cellules souches utilisables en ingénierie vasculaire. Comme les CSMs, elles peuvent être isolées chez l'adulte et ont montré un potentiel de différenciation intéressant pour l'ingénierie vasculaire. Elles sont capables de se différencier en leucocytes, en hématies et en plaquettes (Figure 18). Ce type de cellules partage une origine embryonnaire commune avec les précurseurs des cellules endothéliales. De telles cellules souches, dites hémangioblastes, peuvent se différencier en CEs comme en CSHs et ont été identifiées chez l'adulte alors qu'on pensait qu'elles existaient seulement au cours du développement embryonnaire [Pelosi et al., 2002]. Les CSHs semblent persister non seulement dans la

moelle osseuse mais aussi dans le foie, en particulier chez le jeune enfant, voire chez l'adulte.

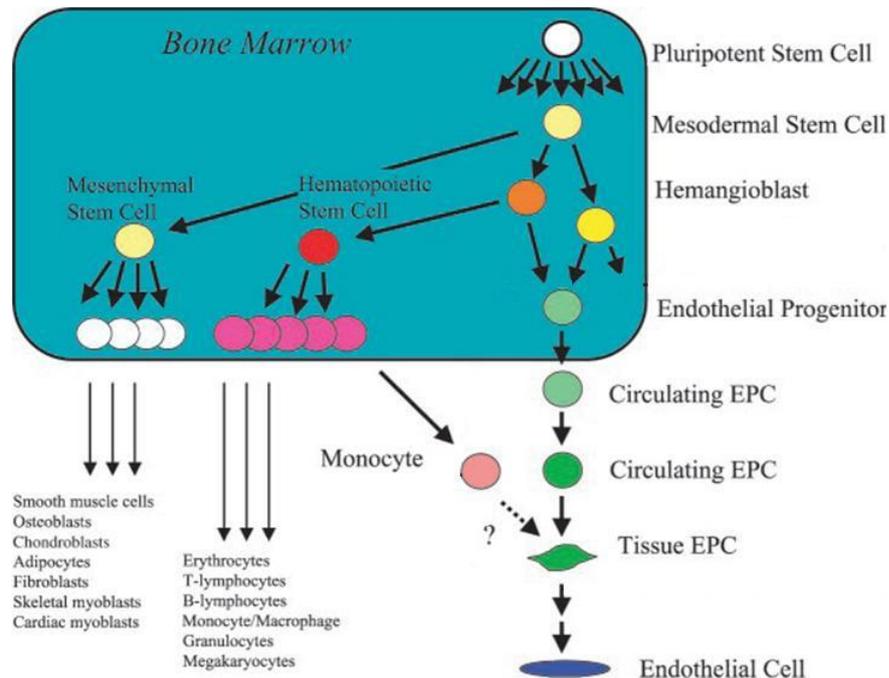


Figure 18 : Cellules souches hématopoïétiques et cascade putative du profil de différenciation des progéniteurs endothéliaux issus de moelle osseuse [Asahara and Kawamoto, 2004]

Les CSHs peuvent être isolées à partir de la moelle osseuse. Mais la moelle osseuse contient aussi des cellules stromales, des CSMs, des cellules sanguines matures ainsi que leurs cellules progénitrices. Les CSHs constituent donc une faible fraction des cellules de la moelle osseuse (1 pour 10^4 à 1 pour 10^8 cellules nucléées de moelle osseuse).

Les CSHs peuvent aussi être isolées à partir du sang périphérique où elles existent en petit nombre [Hombach-Klonisch et al., 2008]. La stimulation grâce à des agents mobilisants, comme le G-CSF seul ou en association avec le GM-CSF augmente de façon importante le passage des CSHs depuis la moelle osseuse vers le sang périphérique [Flomenberg et al., 2005].

Une autre source importante de CSHs pour des applications cliniques est le sang de cordon ombilical qui en contiendrait beaucoup plus que le sang périphérique. Un des facteurs freinant leur utilisation est leur quantité limitée, due principalement au faible volume de

sang qu'il est possible d'obtenir à partir de ces tissus. Les CSHs obtenues du sang périphérique ou du sang de cordon diffèrent par certaines caractéristiques (Tableau 10).

	PB/G-CSF	UC blood
Advantage	Easier, less aggressive collection High number of progenitor cells Faster engraftment Faster neutrophil, platelet, immune system recovery Less frequency of donation-associated risks	Easy to collect without any risk for the donor Less restriction for HLA compatibility Lower rate of GVHD Better accessibility from UC blood banks for unrelated transplantations Can be stored for years
Disadvantage	Administration of mobilizing agents is required Higher risk of chronic GVHD in allografts	Limited supply Low number of progenitor cells, inadequate for transplant in adults Slower engraftment Unable to provide additional cells in case of need for second transplant

PB/G CSF Peripheral-blood-derived HSC treated with G-CSF

Tableau 10 : Comparaison des CSHs issues de sang périphérique ou de sang de cordon ombilical [Hombach-Klonisch et al., 2008]

D'un point de vue général, les CSHs obtenues de tissus à des stades de développement précoces ont des capacités d'autorenouvellement et de croissance à long terme *in vitro* plus importante que des tissus plus tardifs [Kim et al., 1999].

Un des intérêts des CSHs pour l'ingénierie vasculaire est qu'elles sont capables de se différencier à la fois en CE et en CML pour la construction d'un vaisseau [Schatteman, 2004] [Sata, 2003].

Cependant, il n'existe pas de vrai consensus concernant la caractérisation et la définition de ces cellules, si ce n'est qu'elles représentent une population de cellules multipotentes capables de reconstituer de façon permanente les lignées sanguines [Hirschi et al., 2008]. L'expression du CD34 est considéré comme un pré-requis pour définir une CSHs [Peichev et al., 2000] [Hombach-Klonisch et al., 2008]. Des études ont montré que les cellules CD34- seraient des précurseurs des CD34+ , capables de proliférer et de se différencier en CD34+ quand elles sont dans les conditions requises [Guo et al., 2003].

Le CD34 permettrait de distinguer les CSHs des CSMs. Le CD133 et le KDR (VEGF-R2) ont aussi été proposés comme des marqueurs de CSHs [Yin et al., 1997] [Ziegler et al., 1999]. Ces deux marqueurs sont utilisés pour d'identifier une population connue comme cellules progénitrices endothéliales (EPCs) [Peichev et al., 2000]. Ces EPCs partagent un certain nombre de marqueurs avec les CSHs et les CEs, et pourraient se

trouver à un stade de différenciation intermédiaire entre les CSHs et les CEs [Riha et al., 2005], voir infra.

En culture, ces deux types de cellules (CSH et CSM) pourraient être différenciées par le fait que les CSMs de moelle osseuse adhèrent toujours au puits de culture et croissent pendant plusieurs semaines avant de commencer à se différencier, alors que les CSHs nécessitent des systèmes de co-cultures contenant des couches nourricières de fibroblastes permettant leur croissance et leur différenciation [Hombach-Klonisch et al., 2008].

4) *LES CELLULES PROGENITRICES ET LES EPCs*

a) Origine et différenciation des EPCs

Ces cellules ont déjà acquis lors de leur développement, un certain degré de spécialisation et sont physiologiquement fonctionnelles. Nous nous focaliserons sur les progéniteurs des CEs (Endothelial Progenitor Cells : EPCs).

Depuis leur mise en évidence par Asahara en 1997 [Asahara et al., 1997], une littérature abondante n'a cessé de tenter de mieux définir ces EPCs. Pour Fadini, les EPCs seraient une sous-population de cellules immatures impliquées dans la réparation endothéliale et la néoangiogenèse [Fadini et al., 2008]. Ils sont définis aussi comme des cellules dérivant de moelle osseuse ou issus de sources non médullaires, capables de passer dans la circulation sanguine et de se différencier en CEs matures [Schatteman et al., 2007]. Pour Smadja, ce que l'on appelle un « progéniteur endothélial » par abus de langage est en fait un précurseur engagé dans la lignée endothéliale [Smadja and Gaussem, 2009].

Une grande variété de définitions phénotypiques et de méthodologies ont été utilisées pour définir les EPCs. Ils ont été caractérisés par différents groupes [Asahara et al., 1997] [Peichev et al., 2000] [Gehling et al., 2000] [Lin et al., 2000] [Hristov et al., 2003a] [Rehman et al., 2003] [Oswald et al., 2004] [Schatteman, 2004] [Kawamoto and Losordo, 2008] [Hombach-Klonisch et al., 2008].

Pour définir le phénotype antigénique des EPCs en restant en accord avec le terme de progéniteur endothélial, il est nécessaire d'être en présence de marqueurs de cellules

immatures ou de cellules souches et en présence de marqueurs endothéliaux. Les marqueurs les plus communs de cellules souches chez l'homme sont le CD34 et le CD133. Les marqueurs endothéliaux les plus typiques sont le KDR (VEGFR2), le CD31 (PECAM) et le vWF [Fadini et al., 2008].

Les EPCs peuvent être isolés à partir de la moelle osseuse [Quirici et al., 2001] mais aussi à partir de sang périphérique [Asahara and Kawamoto, 2004; Melero-Martin et al., 2007; Rehman et al., 2003; Yoder et al., 2007], de la paroi des vaisseaux sanguins [Ergun and Gehling, 2007; Ingram et al., 2005b], de la pulpe dentaire [Iohara et al., 2008], du foie [Aicher et al., 2007], des tissus adipeux [Miranville et al., 2004; Planat-Benard et al., 2004], musculaire [Beltrami et al., 2003], nerveux [Wurmser et al., 2004]. Ils sont retrouvés aussi dans le tissu embryonnaire, le sang de cordon ombilical [Murohara et al., 2000], ou encore le foie fœtal [Peichev et al., 2000]. Cependant, les colonies de type endothélial issues de ces EPCs seraient plus faciles à obtenir à partir de sang de cordon ombilical. En effet, le nombre de colonies de type endothélial obtenues serait 15 fois plus important à partir du sang de cordon qu'à partir du sang périphérique. De plus, ces colonies seraient plus volumineuses et apparaîtraient en moyenne une semaine plus tôt avec du sang de cordon ombilical [Ingram et al., 2004].

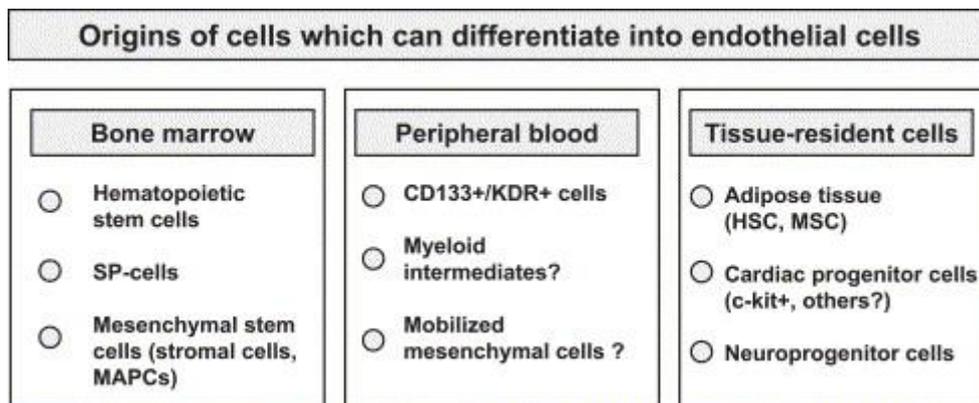


Figure 19 : Origine des types cellulaires capables de se différencier en CEs

[Urbich and Dimmeler, 2004a]

Les EPCs auraient deux origines principales : une origine hématopoïétique et une mésenchymateuse. L'hémangioblaste, retrouvé dans la moelle osseuse, exprime les marqueurs de cellules souches hématopoïétiques tels que le CD34 et le CD133 aussi bien

que le marqueur endothélial VEGFR2. Ces cellules sont mobilisées de la moelle osseuse vers le sang périphérique grâce à l'action de cytokines (comme le stromal-cell-derived factor-1 ou le VEGF synthétisés par les tissus ischémiés et les tumeurs), puis jusqu'aux sites ischémiés pour donner des CEs et contribuer ainsi à la formation de nouveaux capillaires [Takahashi et al., 1999]. Mais la moelle osseuse contient aussi des cellules souches mésenchymateuses dont il a été montré qu'elles pouvaient se différencier en CEs et améliorer la vascularisation *in vivo* [Reyes et al., 2002]. Ces cellules souches mésenchymateuses peuvent aussi être mobilisées vers le sang périphérique jusque vers les sites d'ischémie et contribuer à la réparation tissulaire [Kuznetsov et al., 2001]. La Figure 20 montre cette double origine potentielle des EPCs, dérivant à la fois des CSHs mais aussi des CSMs.

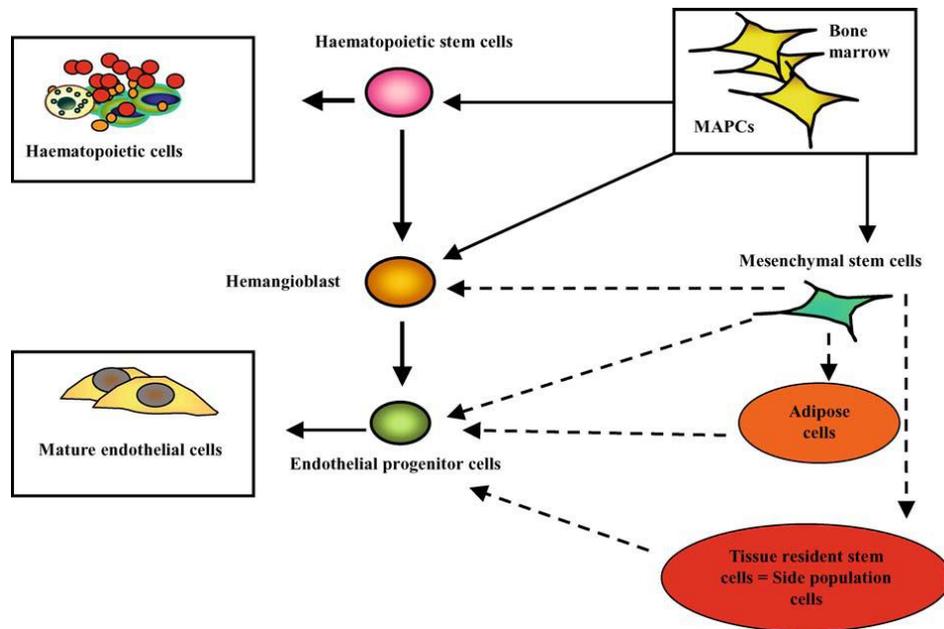


Figure 20 : Origine et différenciation des EPCs [Smadja et al., 2007]

La Figure 20 fait état des MAPCs (multipotent adult progenitors cells) déjà évoqués dans le paragraphe sur les CSMs mais faisant de ces cellules une catégorie à part, issue de la moelle osseuse et capable de donner l'hémangioblaste. A chaque étape de la différenciation, quelle que soit la cellule souche considérée, des marqueurs spécifiques permettent de caractériser les différents types cellulaires dont dérivent les EPCs (Figure 21).

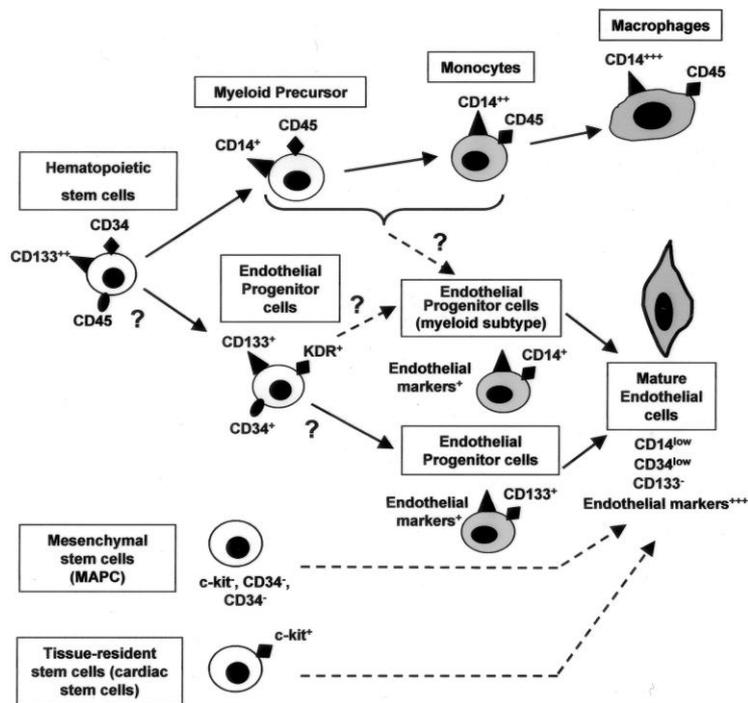


Figure 21 : Origine des EPCs: marqueurs membranaires
[Urbich and Dimmeler, 2004b].

Origines et voies de différenciation potentielles des EPCs à partir de cellules souches hématopoïétiques et non hématopoïétiques et principaux marqueurs membranaires de chacun de ces types cellulaires.

Concernant le phénotype antigénique des EPCs, Peichev *et al.* [Peichev et al., 2000] décrivent les EPCs comme CD34+, VEGFR2+ (KDR) et CD133+, ces marqueurs étant des marqueurs de progéniteurs hématopoïétiques immatures. Le but de ces auteurs était de différencier les EPCs des cellules endothéliales circulantes, les CECs (circulating mature endothelial cells) présentes dans le sang périphérique. Les EPCs diffèrent des cellules endothéliales circulantes qui proviennent d'une lésion de l'endothélium vasculaire, par un potentiel de prolifération supérieur en culture dans un milieu contenant des facteurs de croissance spécifiques ([Blann et al., 2005; Bonello et al., 2006a; Bonello et al., 2006b; Delorme et al., 2005]). Plus récemment, Woywodt *et al.* ont mis au point un protocole de séparation immunomagnétique utilisant le CD146, afin de mesurer le nombre de CECs [Woywodt et al., 2006].

Le CD133 est exprimé sur des cellules plus immatures que les cellules CD34+ et il n'est jamais exprimé dans les cellules matures, ceci expliquant la plus grande rareté des cellules CD133+/KDR+ dans la circulation que les cellules CD34+/KDR+ [Friedrich et al., 2006]. Cependant, les cellules CD133+/KDR+ et CD34+/KDR+ peuvent être incluses dans

le phénotype antigénique putatif des EPCs. L'intersection (CD34+/CD133+/KDR+) peut être utilisée pour définir un phénotype restreint d'EPCs, mais ces cellules sont si rares dans la circulation que chez certains sujets, elles ne peuvent être identifiées que très difficilement (Figure 22).

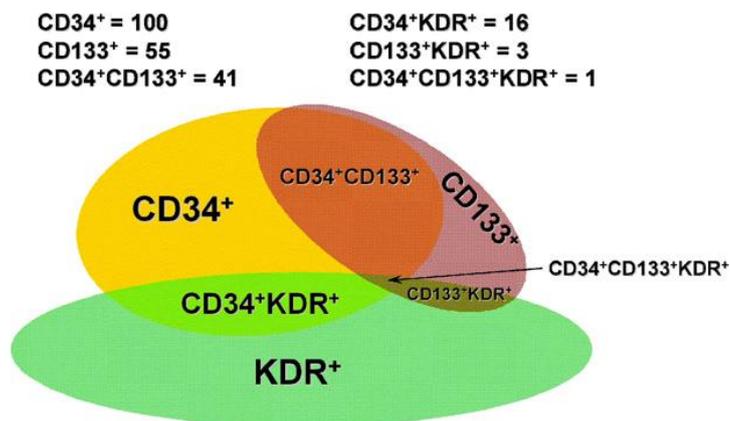


Figure 22 : Diagramme de Venn simplifié décrivant les sous-groupes d'EPCs [Fadini et al., 2008]. Les fréquences des différentes populations cellulaires ont été calculées par rapport aux cellules CD34+ (référence 100), à partir de comptages cellulaires chez 439 sujets, incluant des patients sains et présentant des pathologies cardio-vasculaires.

Cependant, pour Ribatti, il est impossible de différencier des EPCs immatures des CSHs primitives [Ribatti, 2007]. En 2007, il a été montré que les CD34+/CD133+/KDR+ correspondraient d'avantage à des cellules souches hématopoïétiques qu'à des EPCs [Case et al., 2007], et que les « vrais » EPCs ne dériveraient finalement pas des cellules CD133+ [Timmermans et al., 2007]. D'autre part, le CD45, marqueur de CSHs, ne serait pas détecté sur les EPCs [Timmermans et al., 2007], et pour Case, les EPCs seraient parmi la fraction CD45 moins [Case et al., 2007]. Pour Schatteman, l'expression de eNOS peut être considérée comme le meilleur marqueur antigénique des EPC [Schatteman et al., 2007].

En 2008, Hombach-Klonisch a établi une classification des marqueurs permettant de distinguer les EPCs des CSHs. Les EPC seraient CD146, MCAM, MUC18, S-endo-1, CD34, CD133, Tie-2, Flk-1, KDR(VEGFR2) et les CSHs, CD34, CD117, c-kit et Scf [Hombach-Klonisch et al., 2008]. Les EPCs expriment aussi EphrinB2 et EphrinB4 mais les facteurs physiologiques qui modifient l'expression de ces deux molécules sont peu connus [Obi et al., 2009].

Certains de ces marqueurs VEGFR2, Tie-1, Tie-2, VE-cadhérine, sont communs aux EPCs et aux CEs matures.

Il existe donc une controverse concernant la définition des EPCs, ceci principalement en raison de l'absence d'un marqueur spécifique unique des EPCs. Aussi, pour définir un EPC, faut-il de nombreux critères, non seulement la capacité à incorporer des dil-LDL acétylés ou à fixer la lectine Ulex [Asahara et al., 1997; Dernbach et al., 2004] [Hristov and Weber, 2004], mais aussi l'expression de tout un panel de marqueurs endothéliaux ainsi que des caractéristiques fonctionnelles précises. C'est la raison pour laquelle les EPCs sont souvent caractérisés a posteriori, une fois leur différenciation effectuée.

Ingram *et al.*, en raison de la définition variable des EPCs, a décidé d'utiliser des tests clonogéniques, analogues à ceux utilisés pour définir les progéniteurs hématopoïétiques afin de clarifier s'il y avait vraiment chez l'adulte des cellules, dans le sang périphérique ou le sang de cordon ombilical, capables de proliférer et de se différencier pour former des cellules endothéliales. Il a ainsi défini que ces cellules seraient celles capables de former des colonies, obtenues à partir de la mise en culture de CMNs (cellules mononucléées) pendant au moins deux semaines. Ces cellules sont appelées ECFC (endothelial colony forming cells) [Ingram et al., 2004].

b) Caractérisation phénotypique des EPCs précoces et tardifs

Les nombreux travaux consacrés à la biologie des EPCs au cours des dernières années font désormais apparaître une hétérogénéité phénotypique avec obtention en culture d'au moins deux types de cellules ([Gulati et al., 2003] [Hur et al., 2004] [Yoon et al., 2005]) : des cellules précoces et des cellules tardives. La distinction en cellules précoces et tardives a permis de clarifier la dénomination des EPCs. En effet, jusqu'à ces travaux, ces différents types cellulaires étaient indistinctement dénommés progéniteurs endothéliaux. Ces deux populations morphologiquement et fonctionnellement distinctes dériveraient probablement des CMNs circulantes [Shantsila et al., 2008]. Aujourd'hui ces EPCs précoces ou tardifs sont référencés selon de nombreuses terminologies [Smadja and Gaussem, 2009] Tableau 11.

EPCs PRÉCOCES

* **Références comme**

- endothelial progenitor cells (EPC)
- Early-EPC
- circulating angiogenic cells (CAC)
- CFU-Hill
- culture-modified mononuclear cells (CMMC)
- CE-EPC
- CFU-EC

EPCs TARDIFS

* **Références comme**

- endothelial progenitor cells (EPC)
- Late-EPC
- Endothelial colonies forming cells (ECFC)
- CE-EPC
- CFU-EC
- Endothelial Progenitor Derived Cells (EPDC)
- Outgrowth endothelial cells (OECs)
- Blood outgrowth endothelial cells (BOECs)
- LPP-HPP endothelial cells

Tableau 11 : Terminologie utilisée pour décrire les deux types de progéniteurs endothéliaux. D'après [Smadja and Gaussem, 2009]

❖ *Les cellules « précoces » (early)*

Ces cellules « early outgrowth EPCs » [Hur et al., 2004], sont aussi nommés colony forming unit-ECs [Yoder et al., 2007], endothelial-like cells [Krenning et al., 2007], ou CD14+ EPC [Krenning et al., 2008]. Elles sont issues de la lignée monocyttaire (CD14+) [Krenning et al., 2009] et présentent une expression variable du CD34, CD133, CD45 et KDR [Shantsila et al., 2008]. Les EPCs précoces ont donc plus de marqueurs communs avec les CSHs (CD34, CD133, VEGFR2) [Bailey and Fleming, 2003] que les tardifs.

Elles forment après environ 7 jours de culture, des colonies de cellules à la morphologie en aiguilles (« spindle-shaped morphology »). Elles présentent des points communs avec les CEs et monocytes/macrophages quant à leurs marqueurs et fonctions [Krenning et al., 2009], tels que la phagocytose [Yoder et al., 2007; Zhang et al., 2006a], l'activité antithrombotique [Smadja et al., 2008] et la production de substances vasoactives [Krenning et al., 2008; Zhang et al., 2007].

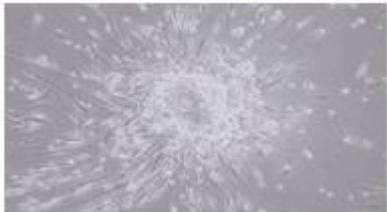
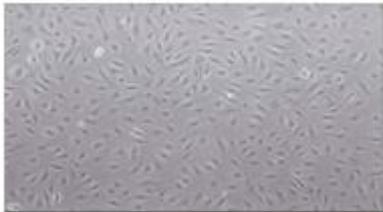
Leur potentiel de prolifération est faible et transitoire *in vitro* [Krenning et al., 2007; Krenning et al., 2008], et elles ne peuvent pas être amplifiées pendant de nombreux passages. Ces cellules ne sont pas capables de s'intégrer à une monocouche endothéliale mais peuvent favoriser l'angiogenèse. Cependant, elles sécrètent de fortes concentrations de facteurs de croissance, en particulier des cytokines qui participeraient à leurs propriétés angiogènes *in vivo* [Smadja and Gaussem, 2009]. Pour Sieveking, elles ne participent pas directement à la formation de structures « vascular-like » mais la stimulent grâce à une action paracrine [Sieveking et al., 2008].

Les EPCs précoces sont les cellules identifiées par Asahara en 1997 [Asahara et al., 1997] et qui ont généré beaucoup de travaux de recherche.

❖ *Les cellules « tardives » (late)*

Les « late outgrowth EPCs » aussi référencés comme « endothelial colony forming cells » [Yoder et al., 2007] [Ingram et al., 2004], CD34+ EPCs [van der Strate et al., 2007], proviennent des cellules souches CD34+ [Yoder et al., 2007] [Ingram et al., 2004] et expriment après mise en culture, exclusivement des marqueurs des CEs [Krenning et al., 2009]. Ces cellules sont obtenues en culture après 7 à 28 jours (7 à 20 jours selon [Smadja and Gaussem, 2009]), (14 à 28 jours selon [Krenning et al., 2009] et apparaissent comme des colonies pavimenteuses « cobblestone » qui ressemblent aux CEs « microvasculaire », et montrent un pouvoir prolifératif important [Smadja and Gaussem, 2009] pouvant aller jusqu'à 100 doublements de populations pour Ingram *et al.* [Ingram et al., 2004] et pour Fuchs *et al.* [Fuchs et al., 2006]. Ils peuvent être amplifiés sur de nombreux passages pendant 3 à 4 mois de culture. Contrairement aux EPCs précoces, les EPCs tardifs n'ont pas de fonctions en commun avec d'autres lignées [Krenning et al., 2009].

S'il a été considéré que les EPCs tardifs isolés par cytométrie en flux seraient CD34+/CD133+/KDR+, il semble aujourd'hui admis que le « vrai » EPC tardif dériverait d'une petite population de CD34+/CD133-/CD45-/CD14- [Shantsila et al., 2008]. L' EPC tardif dériverait d'une cellule souche hématopoïétique CD34+ et exprimerait après mise en culture, exclusivement des marqueurs de CE mature [Krenning et al., 2009]. Cependant, une définition ferme établie à partir des marqueurs membranaires n'existe toujours pas. De plus, selon leur origine, le potentiel de prolifération de ces cellules est différent, ce qui a conduit l'équipe d'Ingram à établir une hiérarchie à l'intérieur de ces progéniteurs tardifs, comparable à la classification établie pour les CSHs qu'il a dénommé endopoïèse ([Ingram et al., 2005a; Ingram et al., 2004]). Shirota a aussi défini que parmi les EPCs tardifs, sur 11 prélèvements de sang, 9 donnent des clones et deux types de proliférations sont observés. Dans un cas, de petites colonies dont la taille évolue rapidement apparaissent entre 10 et 21 jours après la mise en culture, dans l'autre cas, les cellules croissent plus lentement. Sur les 9 prélèvements donnant des clones, seulement deux sont des « EC-like » possédant un haut potentiel prolifératif alors que les autres sont des « low proliferative potential » [Shirota et al., 2003].

EPCs précoces	Caractéristiques	EPCs tardifs
3 à 5 jours	Temps d'émergence en culture	7 à 28 jours
 Hétérogène	Morphologie	 Homogène
+	Incorporation des Dil-Ac-LDL et fixation de la lectine UEA-1	+
CD14+/ CD45+/ CD34+ ; KDR faible ; CD133 ^{+/-} , vWF ^{+/-} , Tie2 ^{+/-} ; CD144-/eNOS-	Marqueurs antigéniques	CD34+/ KDR+ ; CD133+/- CD14-/CD45- vont acquérir : CD31+/vWF+/CD144+/eNOS+ Tie2+
faible	Pouvoir prolifératif <i>in vitro</i>	élevé
Elevée (VEGF, IL8, HGF, G-CSF)	Sécrétion de cytokines angiogènes	faible
Plus que les CEs matures	Résistance à l'apoptose et au stress oxydatif	Plus que les CEs matures
Taux faibles	Production de NO	Taux élevés
non	Formation de tubes dans le Matrigel	oui
non	Incorporation dans des tubules de CEs différenciées	oui
Faible ou bon (selon auteurs)	Potentiel angiogène <i>in vivo</i>	élevé

Le caractère +/- indique qu'il existe ou pas, en fonction de la description donnée par les différents auteurs.

Tableau 12 : Caractérisation des deux types de progéniteurs endothéliaux

D'après [Yoon et al., 2005], [Sieveking et al., 2008], [Shantsila et al., 2008], [Krenning et al., 2009], [Smadja and Gaussem, 2009].

Si les EPCs précoces et tardifs proviennent d'origines différentes (CD14+ et CD34+) [Krenning et al., 2009] et montrent des propriétés fonctionnelles différentes *in vitro*, ils semblent avoir les mêmes capacités à améliorer la néovascularisation dans les modèles expérimentaux [Urbich and Dimmeler, 2004a] [Zhang et al., 2006b], bien que le mécanisme d'action de ce phénomène demeure controversé.

Les EPCs précoces seraient plus facilement identifiables par leur capacité à former des colonies en culture (colony-forming unit) alors que les EPCs tardifs seraient plus facilement identifiables par cytométrie en flux [Shantsila et al., 2008] (Figure 23).

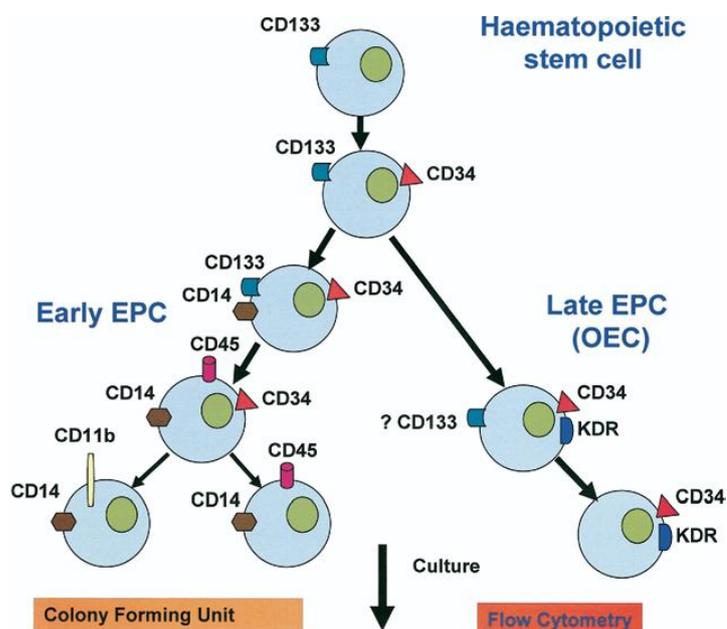


Figure 23 : Différenciation des EPCs précoces et tardifs et marqueurs antigéniques de surface [Shantsila et al., 2008].

c) Méthodes d'isolement *in vitro* des EPCs

Deux principales méthodes sont utilisées pour isoler les EPCs : la cytométrie en flux avec tri et la méthode de mise en culture [Fadini et al., 2008]. Cependant, à l'heure actuelle, les méthodes permettant de les isoler n'ont toujours pas été standardisées.

❖ *Mise en culture.*

Cette méthode utilisée pour identifier les EPCs, ne permet pas uniquement de les isoler mais permet aussi leur expansion.

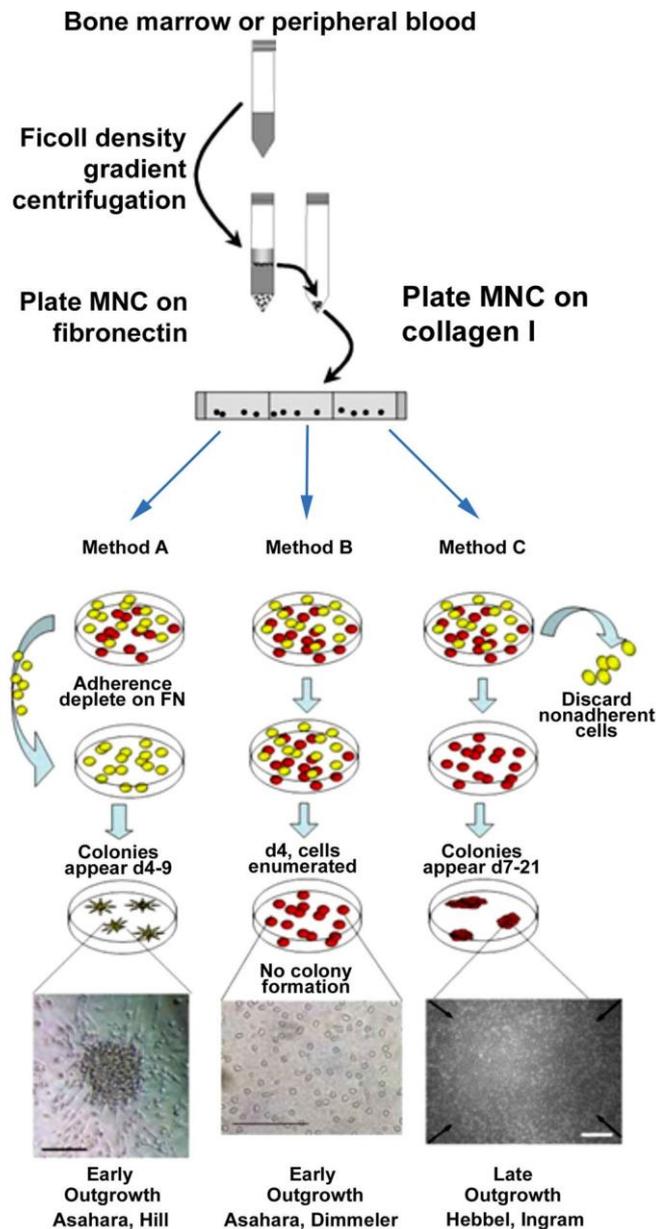
De façon générale, trois méthodes de culture sont décrites pour isoler des EPCs. La méthode d'origine, décrite par Asahara [Asahara et al., 1997], puis légèrement modifiée [Hill et al., 2003], peut aujourd'hui être suivie grâce à une trousse commerciale (Endocult StemCell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canada) méthode A de la Figure 24. Dans cette méthode, les CMNs de sang périphérique adulte ou de sang de cordon ombilical sont mis en culture dans des puits revêtus de fibronectine. Après 48h, afin de dépléter l'échantillon en macrophages adhérents et en CEs adultes, les cellules non adhérentes sont recueillies et remises en culture dans de nouveaux puits revêtus de fibronectine. Cette pré-mise en culture a pour but d'éliminer les cellules rapidement adhérentes qui sont d'origine mésenchymateuse. Des colonies apparaissent entre 5 et 9 jours et comportent des cellules rondes au centre d'où émergent des cellules « en aiguille » à la périphérie. Ces cellules sont des EPCs précoces.

Dans la méthode B, la fraction totale des CMN est mise en culture, supplémentée en milieu de croissance endothélial pendant 4 jours, puis les cellules non adhérentes sont éliminées. Après environ 4 jours de culture apparaissent des cellules capables de fixer la lectine (UEA-1) et d'incorporer les lipoprotéines acétylées de faible densité [Dimmeler et al., 2001] [Kalka et al., 2000b]. Elles expriment aussi le vWF, CD31, VEGFR-2, VE-cadhérine, Tie-2 (tunica intimal endothelial cell kinase) [Dimmeler et al., 2001], [Kalka et al., 2000b], [Asahara et al., 1999b], [Gehling et al., 2000]. Cependant, ces cellules ont aussi été référencées comme des CAC (Circulating angiogenic cells), référencées comme EPCs précoces (Tableau 11).

Dans la méthode C, les CMNs sont mises en culture sur du collagène de type I dans du milieu de culture spécifique pour la différenciation endothéliale [Yoder et al., 2007], [Ingram et al., 2004], [Fuchs et al., 2006]. Les cellules non-adhérentes sont éliminées rapidement après la mise en culture par des rinçages légers. Les premières colonies à l'aspect pavimenteux apparaissent entre 10 et 21 jours [Yoder et al., 2007] [Ingram et al., 2005b]. Ces cellules, comme nous l'avons déjà décrit, possèdent les marqueurs de CEs matures.

Cependant, différentes variantes de ces protocoles existent. Concernant le revêtement, les cellules peuvent êtreensemencées sur gélatine, collagène ou fibronectine.

Si les méthodes d'isolement classiques sont la mise en culture des CMNs totales après séparation sur gradient de Ficoll, certains auteurs décrivent aussi une mise en culture après une sélection positive par l'utilisation de microbilles recouvertes d'anticorps spécifiques de marqueurs d'immaturité (CD133, CD34), endothéliaux (CD146) ou monocytaires (CD14) [Smadja and Gaussem, 2009].



Les cellules jaunes représentent les cellules non adhérentes et les cellules rouges sont les cellules adhérentes.

Figure 24 : Principales méthodes de culture permettant d'obtenir des EPCs

D'après [Fadini et al., 2008], [Yoder et al., 2007], [Prater et al., 2007]

❖ *Cytométrie en flux*

L'utilisation d'antigènes de surface spécifiques des EPCs permettrait de sélectionner une population plus homogène. Cependant, la sélection des EPCs par cette méthode est complexe en raison de l'absence d'un marqueur unique d'EPCs. Pour la cytométrie en flux, sont utilisés au moins un marqueur de cellule souche, CD133 ou CD34, et au moins un marqueur de CEs matures (le KDR étant le plus communément utilisé) [Fadini et al., 2008].

En fait les EPCs isolés par cytométrie en flux et ceux isolés par culture n'auraient que peu de points communs [Obi et al., 2009]. Pour Fadini *et al.*, les protocoles de mise en culture des cellules devraient être réservés à l'étude des fonctions cellulaires dans des conditions cliniques ou expérimentales données, mais ces techniques de mise en culture ne seraient pas pertinentes pour compter les EPCs circulants, les techniques de cytométrie en flux étant à favoriser dans ce cas [Fadini et al., 2008].

d) Rôle du VEGF dans la différenciation des EPCs.

L'environnement est important pour la différenciation des EPCs. Le facteur de croissance indispensable à la différenciation des CSHs et des EPCs en CEs est le VEGF. L'étude de Shi en 1998 a montré que le VEGF est indispensable à la différenciation des cellules CD34+ en colonies endothéliales [Shi et al., 1998]. D'autres facteurs comme le basic fibroblast growth factor (bFGF) ou l'insulin like growth factor (IGF-I) sont ajoutés au milieu de culture en plus du VEGF mais quand le VEGF est exclu de la culture, la formation des colonies endothéliales est négligeable [Shi et al., 1998]. Le rôle du VEGF est fondamental dans la transition progéniteur-cellule endothéliale [Peichev et al., 2000] [Rehman et al., 2003] [Gehling et al., 2000] [Asahara et al., 1999b]. Le fait d'ajouter d'autres facteurs de croissance permet simplement d'obtenir une différenciation plus rapide. Afin d'induire la différenciation endothéliale à partir de cellules souches ou de progéniteurs, certaines équipes utilisent uniquement du VEGF [Asahara et al., 1999b] alors que d'autres ajoutent IGF-I, bFGF, epidermal growth factor (EGF), stem cell growth factor (SCGF). Le VEGF est toujours le dénominateur commun avec des concentrations variant

de 5 à 100 ng/mL. S'il est admis que le VEGF est indispensable à la différenciation des EPCs, l'effet de sa concentration n'a pas été très étudié [Kim and von Recum, 2008].

Outre les facteurs de croissance, l'environnement mécanique est important dans la différenciation des CSH et des EPC. Des modèles de travail *in vitro* ont été mis au point pour mimer les conditions biologiques favorables à la différenciation. Certaines études ont montré que le niveau de contrainte de cisaillement (« shear stress ») ainsi que la durée d'exposition affectent la morphologie endothéliale, la prolifération et la différenciation [Yamamoto et al., 2003] [Yamamoto et al., 2005].

e) Implication des EPCs dans l'angiogenèse et évolution du concept

L'angiogenèse est le processus selon lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir des vaisseaux pré-existants. La vasculogenèse, génération de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de cellules souches, a longtemps été considérée comme un processus restreint au stade de l'embryogenèse mais ce concept a évolué depuis les dix dernières années.

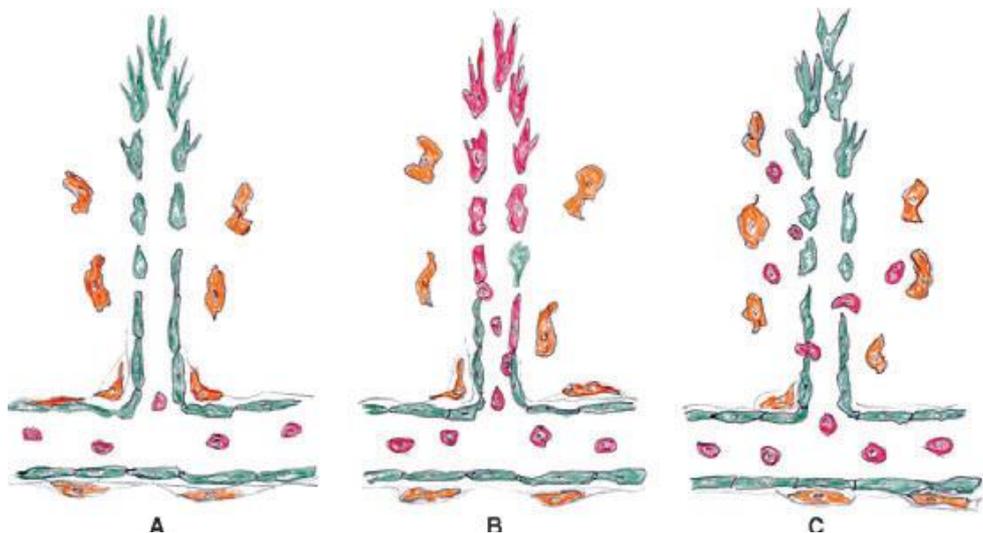


Figure 25 : Evolution du concept de néoangiogenèse chez l'adulte [Pearson, 2009]
CEs matures (vert), péricytes et cellules murales (orange), EPCs (rouge).

La figure 25A : illustre, chez l'adulte, l'angiogenèse qui permet le développement d'un réseau de capillaires par bourgeonnement des vaisseaux préexistants. Dans les années 90,

Risau *et al.* [Risau and Flamme, 1995] décrivait que les CEs des vaisseaux néoformés dérivait bien d'un hémangioblaste mais uniquement au stade embryonnaire. Cependant, chez l'adulte, il était admis jusque dans les années 1990 que la formation de nouveaux capillaires, en particulier suite aux travaux de Folkman [Folkman, 1984], se faisait par migration locale et division des cellules endothéliales existantes (vertes), généralement à partir des veinules. Les péricytes et autres cellules murales (orangées) migrent et se répliquent au cours de la maturation du vaisseau. Aucune contribution des cellules issues du sang circulant (rouges) n'est reconnue.

B : En 1997, Asahara [Asahara et al., 1997] a révolutionné le concept d'angiogenèse en isolant et en identifiant à partir de sang périphérique adulte, des EPCs. Les EPCs mobilisés à partir de la moelle osseuse, se fixent aux CEs existantes dans les sites d'angiogenèse, migrent à travers l'endothélium vers les tissus dans lesquels ils prolifèrent, se différencient et induisent l'angiogenèse [Asahara et al., 1999a] [Hristov et al., 2003b] [Rafii and Lyden, 2003]. Ce concept définit une « vasculogenèse post-natale ».

C : D'autres travaux ont entraîné à nouveau la révision de ce concept, [Blann et al., 2005; Ingram et al., 2005b; Rajantie et al., 2004], suggérant que la contribution des EPCs à la néovasculogenèse, est due à leur migration sur le site où ils délivrent des signaux activant les péricytes qui à leur tour jouent un rôle actif en sécrétant des médiateurs qui stimulent la migration et la division des cellules endothéliales locales.

f) Mécanisme de mobilisation des EPCs permettant la néovascularisation

La réponse naturelle du tissu entrant en hypoxie par obstruction d'artères périphériques ou coronaires est d'augmenter la production et la sécrétion de facteurs stimulant l'inflammation et la néovascularisation. Un facteur particulièrement important dans ce cadre, appartenant à la famille des hypoxia-inducible transcription factors (HIFs), est le HIF-1. En condition hypoxique, le HIF-1 α est stabilisé et induit la transcription de multiples protéines pro-angiogènes (VEGF [Asahara et al., 1999b] [Grunewald et al., 2006] et MCP-1 monocyte chemotatic protein [Capoccia et al., 2008], d'angiopoïétine

[Hattori et al., 2001], d'érythropoïétine [Heeschen et al., 2003] qui vont recruter les cellules CD34+ et CD14+ (EPCs) à partir de la moelle osseuse, vers la circulation et jusqu'aux sites en hypoxie Figure 26 (a).

En réponse à ces facteurs, en particulier le VEGF, la perméabilité vasculaire augmente. Celle-ci est due à la destruction des jonctions adhérentes entre CEs. En effet, l'intégrité de la barrière endothéliale est maintenue par des jonctions adhérentes entre les VE-cadhérines exprimées sur les CEs. Le VEGFR-2 associé à la VE-cadhérine, est activé par le VEGF, ce qui entraîne la dimérisation de ce récepteur et la phosphorylation de la VE-cadhérine, conduisant à son internalisation et donc à une diminution des contacts entre les CEs [Gavard and Gutkind, 2006; Tzima et al., 2005]. La perméabilité vasculaire est donc augmentée et les EPCs recrutés adhèrent à l'endothélium et peuvent commencer leur migration transendothéliale Figure 24 (b). Le VEGF peut être considéré comme le médiateur principal de la mobilisation des EPCs induite par l'hypoxie [Eguchi et al., 2007]. Différentes études réalisées chez la souris [Asahara et al., 1999b] puis chez des patients présentant une ischémie critique des jambes [Kalka et al., 2000a], ont montré que le VEGF contribue à la néovascularisation en mobilisant les EPCs à partir de la moelle osseuse.

En réponse aux stimuli pro-inflammatoires envoyés par les tissus en hypoxie, les CEs expriment de façon accrue les molécules d'adhésion intercellulaires (E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1). Ceci va faciliter la formation d'adhésions fermes entre les EPCs CD14+ circulants et les CEs. Après leur migration transendothéliale, les EPCs entrent en contact avec la membrane basale du vaisseau et la matrice extra cellulaire. Les EPCs CD14+ vont sécréter des MMP (matrix metalloproteases) et MME (matrix metalloelastases) qui dégradent localement la membrane basale et la MEC. Cette dégradation ainsi que la migration des EPCs CD14+ va créer un réseau de tunnels qui forment, de façon temporaire, un « capillary-like scaffold » pour la néovascularisation Figure 26 (c).

Les cellules CD34+ sont alors activement recrutées au niveau des tunnels « capillary-like » par la sécrétion de chemokines (IL-8, SCF (stem cell factor)) par les CD14+. Ces signaux paracrines émis par les EPCs CD14+ et les EPCs CD34+, entraînent la mise en place d'un micro-environnement angiogène qui stimule la prolifération de l'endothélium préexistant et favorise la conversion des « capillary-like tunnels » en capillaires matures et fonctionnels Fig 26 (d). La différenciation des EPCs en CEs matures va aussi contribuer à

cette conversion. Ceci montre bien que la néovascularisation résulte de l'interaction entre des CEs matures et des EPCs qu'ils soient précoces ou tardifs. Sieveking *et al.* ont montré par un test *in vitro* d'angiogenèse que les EPCs précoces ne pouvaient pas former de tubes alors que les EPCs tardifs en étaient capables. Cependant, l'addition des EPCs précoces dans la culture (ou des facteurs paracines qu'ils sécrètent) augmentait significativement la formation des tubes par les late EPCs [Sieveking *et al.*, 2008].

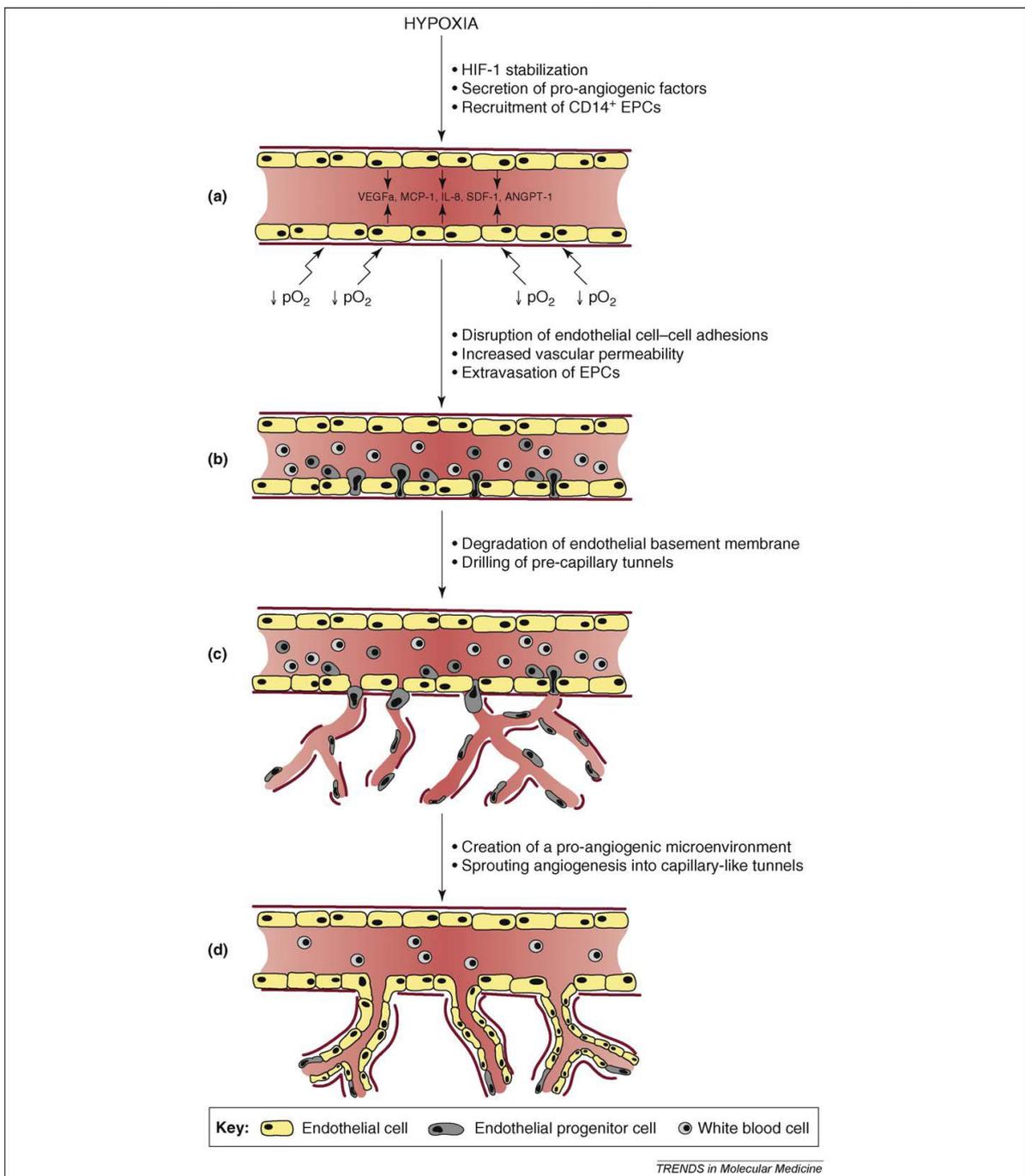


Figure 26 : Mécanisme de néovascularisation physiologique [Krenning *et al.*, 2009]

Le VEGF, le G-CSF (granulocyte monocyte colony-stimulating factor), SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) et l'érythropoïétine seraient également capables de mobiliser les hémangioblastes à partir de la moelle osseuse. Ce mécanisme serait médié par le NO (produit grâce à la eNOS par les composants du microenvironnement médullaire) et la MMP-9 [Leone et al., 2009]. Une étude clinique pilote a montré que le GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) jouait un rôle dans la mobilisation des EPCs puisque son injection entraînait une augmentation significative des EPCs circulants chez des patients après un infarctus du myocarde [Seiler et al., 2001].

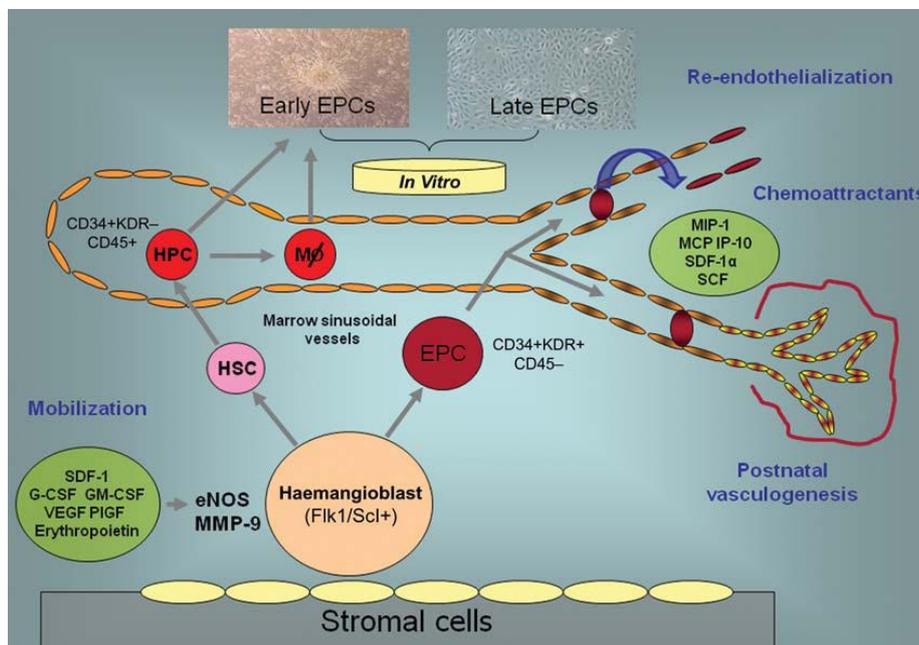


Figure 27 : Mécanismes et médiateurs de la mobilisation des EPCs à partir de la moelle osseuse [Leone et al., 2009]. Les hémangioblastes, précurseurs communs aux lignées hématopoïétiques et endothéliales, sont mobilisés depuis la moelle osseuse par différents facteurs (MIP-1 : Macrophage Inflammatory Protein, MCP : Monocytic Chemotactic Protein, IP-10 : Interferon-inducible Protein, SCF : Stem Cell Factor, PIGF : Placental Growth Factor...).

De nombreux facteurs sont capables de modifier la mobilisation des EPCs : des facteurs physiologiques (âge, exercice physique...) ou facteurs pathologiques (diabète...) Tableau 13. De la même façon, différents médicaments vont augmenter les taux d'EPCs circulants, comme par exemple les statines utilisées classiquement comme traitement de l'hypercholestérolémie (pour revue voir [Leone et al., 2009]).

STIMULUS	RESPONSE
<u>Age</u>	<ul style="list-style-type: none"> ↓ EPC cytopoiesis ↓ EPC mobilization (chronic e acute) ↓ EPC survival ↓ EPC functional activity
<u>Oestrogens</u>	↑ EPC concentration
<u>Exercice</u>	↑ EPC concentration
<u>CV risk factors</u>	
Number of CV risk factors	↓ EPC number
Framingham CV total risk score	<ul style="list-style-type: none"> ↓ EPC number ↓ CD34/KDR⁺ number
Optimal flow-mediated dilation	<ul style="list-style-type: none"> ↑ EPC number ↑ CD34/KDR⁺ number
Smoking	↓ EPC number
Hypertension	<ul style="list-style-type: none"> ↑ EPC proliferation ↓ EPC survival
Hypercholesterolaemia	<ul style="list-style-type: none"> ↓ EPC proliferation ↓ EPC migratory capacity ↓ EPC vasculogenetic property ↓ EPC survival
Diabetes mellitus	↓ EPC number
<u>Myocardial ischaemia</u>	
Myocardial infarction	<ul style="list-style-type: none"> ↑ EPC number ↑ CD34⁺ cell number
Unstable angina	↑ EPC number
Stress test-induced ischaemia in CSA	↑ CD34/KDR ⁺ number
Severe CAD without ischaemia	↓ EPC number
Severe CAD requiring revascularization	↑ EPC number
Global ischaemia in extracorporeal circulation	↑ CD34 ⁺ cell number
Cardiac syndrome X	<ul style="list-style-type: none"> ↑ EPC number ↓ e-CFU capacity ↓ EPC functional activity
<u>Myocardial necrosis</u>	
<i>Trans</i> -catheter ablation	↑ EPC number
<u>Heart failure</u>	
Early NYHA class (I and II)	↑ CD34/KDR ⁺ number
Advanced NYHA class (III and IV)	↓ CD34/KDR ⁺ number
Post-ischaemic heart failure	<ul style="list-style-type: none"> ↓ e-CFU capacity ↓ EPC niches in bone marrow
Primary angioplasty	<ul style="list-style-type: none"> ↑ CD34⁺ cell number ↓ EPC number
<u>Renal failure</u>	↓ EPC number

Tableau 13: Facteurs influençant la mobilisation des EPCs [Leone et al., 2009]

g) Applications diagnostiques et thérapeutiques des EPCs

Pour Case *et al.*, les EPCs peuvent être utilisés comme biomarqueurs des pathologies cardiovasculaires ou dans le cadre de la thérapie cellulaire [Case et al., 2007].

❖ *Utilisation des EPCs en pathologie cardiovasculaire*

Chez l'homme, une corrélation inverse a été établie entre le taux d'EPCs circulants et l'augmentation du risque de développer une pathologie coronarienne [Vasa et al., 2001]. Les patients présentant des pathologies coronariennes possèdent un nombre d'EPCs détectables (circulants ou colonies) inférieur à celui de patients sains du même âge. Werner *et al.* ont mesuré le nombre basal d'EPCs circulants chez une large série de patients et ils ont démontré que plus le taux d'EPCs est bas, plus le risque de pathologie grave est élevé [Werner and Nickenig, 2007]. De plus, la migration des EPCs en réponse au VEGF est moins importante si l'âge et le taux de LDL du donneur augmentent [Vasa et al., 2001], [Hill et al., 2003].

Ces études indiquent que le nombre et la fonctionnalité des EPCs sont plus faibles chez les sujets avec un risque élevé de pathologies cardio-vasculaires, ceci permettant de considérer que les EPCs sont importants pour définir une « bonne santé vasculaire » [Pearson, 2009]. De façon générale, plus le nombre d'EPCs est élevé, meilleur est l'état vasculaire [Leone et al., 2009].

Hill *et al.* ont développé une méthode permettant d'obtenir des EPCs précoces (CFU-EC assay) afin d'établir un lien entre la concentration d'EPCs circulants et le risque de développer une pathologie cardio-vasculaire. Ils ont observé une diminution de colonies CFU-EC chez les patients avec des scores à risque. De plus, les taux de CFU-ECs étaient plus bas dans le sang périphérique chez les patients présentant des taux de cholestérol élevés, une hypertension, un diabète de type 2. [Hill et al., 2003].

D'autres études ont démontré que les concentrations en CFU-ECs diminuaient chez les patients atteints : de diabète de type 1 [Loomans et al., 2004], de bronchopneumopathie chronique obstructive [Palange et al., 2006], d'insuffisance cardiaque congestive [Valgimigli et al., 2004] et d'arthrite rhumatoïde [Grisar et al., 2005]. Cependant, certaines études ont contredit le fait que le faible nombre d'EPCs précoces dans le sang périphérique soit le signe d'une susceptibilité aux pathologies cardiovasculaires. Les concentrations en

CFU-EC sont augmentées de façon significative chez les patients au moment d'un infarctus du myocarde [Massa et al., 2005] et pendant les 7 jours qui suivent cet infarctus [Shintani et al., 2001]. Des études montrent une réduction du nombre de CFU-EC chez les patients à risque pour les pathologies vasculaires et une augmentation au cours d'une atteinte cardiovasculaire aiguë. Ces observations ont contribué au développement de l'hypothèse selon laquelle les EPCs circulants auraient un caractère protecteur vis-à-vis de certaines pathologies du système cardiovasculaire [Prater et al., 2007].

Il est important de bien différencier les EPCs des CECs (cellules endothéliales circulantes) puisque chez les sujets sains, les CECs sont rares dans le sang périphérique alors que leur nombre va augmenter chez les sujets atteints de pathologies cardiovasculaires [Blann et al., 2005]. Il serait donc possible de définir une "compétence vasculaire individuelle" à partir d'un phénotype endothélial clinique qui prendrait en compte des biomarqueurs comme le nombre de CEC, le taux d'EPCs et de microparticules dérivées de l'endothélium, dosés dans la circulation générale par des techniques validées. Leur intégration dans une stratégie multimarqueurs offre de nouvelles perspectives pour évaluer le risque vasculaire et suivre l'efficacité d'une thérapeutique [Sabatier et al., 2009].

Les EPCs peuvent aussi avoir des applications thérapeutiques (Figure 28) [Levenberg, 2005]. Après la mise en évidence du rôle des EPCs dans la néovascularisation, de nombreuses études ont eu pour but d'évaluer l'impact de l'injection d'EPCs pour le traitement des ischémies.

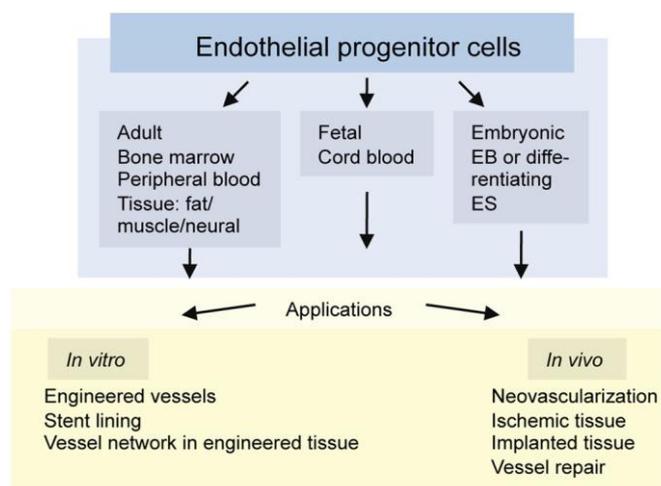


Figure 28 : Progéniteurs endothéliaux : applications thérapeutiques potentielles.

[Levenberg, 2005]

❖ *Utilisation des EPCs pour la thérapie cellulaire*

Considérant l'hypothèse "protective" des EPCs, ceux-ci ont été administrés comme thérapie cellulaire potentielle afin de favoriser l'angiogenèse dans des modèles animaux pré-cliniques d'ischémies vasculaire et du myocarde (Reviews de [Asahara and Kawamoto, 2004], [Rafii and Lyden, 2003], [Urbich and Dimmeler, 2004b]).

Kalka *et al.* ont montré que l'administration intraveineuse d'EPCs issus de sang périphérique humain chez des souris immunodéprimées ayant subi une ischémie d'un membre inférieur, contribue à la formation de nouveaux vaisseaux et à la récupération du flux, permettant de sauver le membre ischémié. L'analyse histologique montre l'incorporation et la différenciation des EPCs en CEs [Kalka et al., 2000b]. L'injection d'EPCs humaines directement dans le muscle permet l'amélioration de la circulation sanguine des membres ischémiés de souris [Kalka et al., 2000b]. De la même façon, l'injection intraveineuse d'EPCs humaines à des rats immunodéprimés, après infarctus du myocarde, inhibe la fibrose, préserve la fonction et contribue à la néovascularisation [Kawamoto et al., 2001]. L'injection d'EPCs CD34+ fraîchement isolés produit des effets similaires chez le rat ayant un infarctus du myocarde [Kocher et al., 2001]. La conclusion générale de ces nombreuses études est que l'injection d'EPCs circulants dans des modèles animaux d'atteintes vasculaires peut avoir un effet thérapeutique.

Les résultats prometteurs obtenus à partir des études pré-cliniques d'injection d'EPCs chez l'animal ont conduit à la mise en place d'essais cliniques chez l'homme [Kawamoto and Losordo, 2008], principalement pour le traitement de l'infarctus du myocarde et l'ischémie des membres inférieures. Le Tableau 13 résume les principaux essais cliniques réalisés ou en cours.

Disease	Study	Cell source	Injection site	Outcome	EPC engraftment in neovasculature?
Human clinical trials					
Myocardial infarction	Ahmadi <i>et al.</i> 2007	CD133 ⁺ EPCs	Intramyocardial	Effective: ↓ WMSI, ↑ myocardial viability, ↑ myocardial perfusion at 6 months	Unknown
	BOOST trials Meyer, GP <i>et al.</i> 2006, Wollert, KC <i>et al.</i> 2004	Unselected BMCs	Intracoronary	Ineffective at 18 months	Unknown
	HEBE Hirsch, A. <i>et al.</i> 2006, Hirsch, A. <i>et al.</i> 2008	Unselected BMCs	Intracoronary	Effective: ↑ LVEF, ↓ infarct size at 4 months	Unknown
	REPAIR-AMI Schachinger, V <i>et al.</i> 2006, Erbs, S <i>et al.</i> 2007	CD14 ⁺ EPCs and CD34 ⁺ EPCs	Intracoronary	Effective: ↑ LVEF, ↑ CBF at 12 months	Unknown
	TOPCARE-AMI Assmus, B <i>et al.</i> 2002, Schachinger, V <i>et al.</i> 2004	CD14 ⁺ EPCs	Intracoronary	Effective: ↑ LVEF, ↓ LEV at 12 months	Unknown
Intractable angina	Losordo <i>et al.</i> 2007	CD34 ⁺ EPCs	Intramyocardial	Inconclusive	Unknown
Critical limb ischemia	Tateishi-Yuyama <i>et al.</i> 2002	Unselected BMCs	Intramuscular	Effective: ↑ Exercise ability, ↑ ABI, ↓ rest pain at 6 months	Unknown
	Van Huyen <i>et al.</i> 2008	Unselected BMCs	Intramuscular	Effective: ↑ tissue perfusion at 6 months	Inconclusive
	Zhang <i>et al.</i> 2008	Unselected BMCs	Intramuscular	Effective: ↑ tissue perfusion, ↑ capillary density, ↑ ABI, ↓ rest pain, ↑ exercise ability at 1 month	Unknown

ABI : ankle-brachial index ; AMI : acute myocardial infarctus ; BMC: bone marrow cells; CBF: coronary blood flow; CHD: coronary heart disease; LEV: late enhancement volume; LVEF: left ventricular ejection fraction; WMSI: wall motion score index.

Tableau 14 : Essais cliniques d'angiogenèse thérapeutique. [Krenning et al., 2009]

Dans l'ischémie des membres inférieurs, Tateishi-Yuyama *et al.* ont rapporté une augmentation locale de l'angiogenèse et un bénéfice clinique significatif dans un groupe de 22 patients présentant une ischémie des membres inférieurs chez lesquels des CMNs issues de moelle osseuse autologue avaient été injectées directement en intramusculaire [Tateishi-Yuyama *et al.*, 2002] . Van Huyen *et al.* ont montré que l'injection de CD34⁺ issus de moelle osseuse autologue dans des zones d'ischémie critique des membres, pouvait induire une néoangiogenèse active et durable même si elle n'empêchait pas l'amputation chez les patients les plus atteints [Van Huyen *et al.*, 2008]. Les études cliniques, effectuées chez des patients non curables par d'autres traitements, ont montré des effets prometteurs avec en particulier une diminution des douleurs à la marche [Lenk *et al.*, 2005] [Zhang *et al.*, 2008].

Cependant, la majorité des études cliniques impliquant des EPCs s'est faite sur l'infarctus du myocarde. En effet, les EPCs semblent particulièrement intéressants pour la régénération cardiaque, car il a été montré que s'ils peuvent être apportés en concentration élevée au niveau des tissus lésés, il en résulte un effet positif sur le remodelage vasculaire. Martin-Rendon *et al.* [Martin-Rendon *et al.*, 2008a; Martin-Rendon *et al.*, 2008b] ont rapporté les résultats d'études randomisées examinant les bénéfices possibles de thérapies

basées sur l'utilisation de cellules issues de moelle osseuse dans le traitement de l'infarctus du myocarde. La plupart des ces études comportent un petit nombre de patients, et les procédures d'isolement et de purification des cellules diffèrent, ainsi que leur stade de différenciation au moment de l'injection. Si la procédure semble sûre et prometteuse de bénéfices cliniques, d'autres essais cliniques avec un nombre plus important de patients et un suivi sur une période plus longue sont cependant nécessaires pour confirmer ou réfuter un bénéfice clinique et le rendre significatif. Ainsi, si Schachinger *et al.* [Schachinger et al., 2006] montrent une légère amélioration des fonctions cardiaques après injection de cellules issues de moelle osseuse après infarctus du myocarde, Lunde *et al.*, utilisant un protocole similaire, n'ont mis en évidence aucun effet [Lunde et al., 2006]. Les résultats des différents essais cliniques d'injection d'EPCs chez l'homme n'ont pas révélé le même niveau d'efficacité que celui donné à espérer par les études pré-cliniques. Malgré tout, dans une revue récente, Aper *et al.* [Aper et al., 2009] précisent que si les premières études de transplantation d'EPCs dans le myocarde n'ont pas entraîné la différenciation de ces cellules en cardiomyocytes, différentes études cliniques d'injection d'EPCs après angioplastie coronaire, ont cependant montré une augmentation de fonction du ventricule gauche et une diminution de la taille de la zone lésée [Schachinger et al., 2006; Schaefer et al., 2006] [Losordo et al., 2007] [Erbs et al., 2005] [Britten et al., 2003] [Assmus et al., 2006].

Parmi les défis les plus importants, il est nécessaire d'améliorer la rétention et la viabilité des EPCs sur le site d'injection et d'améliorer leur capacité fonctionnelle de réparation. Hofmann *et al* [Hofmann et al., 2005] ont utilisés un TEP scan (tomographie par émission de positons) pour détecter la distribution de cellules de moelle osseuse marquées avec ¹⁸F-FDG chez six patients. Quand des cellules totales de moelle osseuse sont injectées, seulement 2% demeurent dans le cœur une heure après l'injection, quand les cellules injectées sont des CD34+, le pourcentage va de 14 à 39%. Ces études suggèrent que l'effet bénéfique de la thérapie cellulaire est moins du à l'incorporation directe des cellules et à leur expansion, qu'à un effet paracrine causé par le relargage de facteurs angiogènes par ces cellules pour stimuler les mécanismes de réparation locale [Pearson, 2009].

❖ *Utilisation des EPCs en ingénierie tissulaire vasculaire*

Pour Brown *et al.*, cinq critères doivent tout d'abord être remplis avant de pouvoir utiliser les EPCs ou les CEs issues d'EPCs pour l'ingénierie vasculaire: (1) ils doivent provenir d'une source facile et sûre, (2) ils doivent présenter des marqueurs spécifiques endothéliaux sans marqueurs monocytaires, (3) ils doivent avoir une forte adhésion au matériau, (4) ils doivent présenter les propriétés anti-thrombotiques et anti-inflammatoires caractéristiques des CEs natives, (5) ils doivent inhiber l'hyperplasie néointimale et la thrombose [Brown *et al.*, 2009].

Un des avantages de l'utilisation des EPCs à la place des CEs matures pour endothélialiser des prothèses vasculaires, est la facilité de prélèvement (ponction veineuse à la place d'une procédure chirurgicale) [Ward *et al.*, 2007].

Des études ont montré qu'il était possible de reconstituer *in vitro* un néo-endothélium sur des substituts vasculaires synthétiques et biologiques, à partir d'EPCs issus de sang périphérique de mouton [Kaushal *et al.*, 2001] ou d'EPCs de sang périphérique de porc [Aper *et al.*, 2007]. Shirota *et al.* ont montré qu'il était possible, *in vitro*, d'endothélialiser totalement une prothèse vasculaire en polyuréthane avec des EPCs de sang périphérique humain. Ces cellules recouvrent la totalité de la surface et s'orientent dans le sens du flux quand le substitut vasculaire est exposé au shear stress [Shirota *et al.*, 2003]. Kaushal *et al.* [Kaushal *et al.*, 2001] ont ensemencé des cellules souches progénitrices circulantes sur des matrices décellularisées d'artères iliaques de porc et les ont implantées en remplacement d'artères carotides. Ils ont observé une perméabilité à 130 jours après implantation chez le mouton et des caractères de contractilité identique à celle d'un vaisseau natif.

Rotmans *et al.* ont décrit une méthode d'endothélialisation de prothèse vasculaire en utilisant la technique « d'auto-ensemencement ». Des anticorps anti-CD34 sont immobilisés à la surface d'ePTFE afin de capturer les EPCs circulants et d'établir une monocouche endothéliale à la surface du matériau implanté en shunt artérioveineux chez le porc. Cependant, même si l'endothélialisation est bien obtenue, les auteurs ont montré le développement d'une hyperplasie intimale au niveau des sites d'anastomose [Rotmans *et al.*, 2005]. Les EPCs semblent aussi particulièrement intéressants en ce qui concerne la réendothélialisation d'endoprothèses (stents) implantés. En effet, des anti-CD34

immobilisés à la surface de stents facilitent la capture d'EPCs circulants qui se différencient en CEs matures, permettant ainsi une réendothélialisation totale de l'endoprothèse et de la section dénudée du mur vasculaire [Aoki et al., 2005].

Cependant, l'application thérapeutique des EPC reste malheureusement limitée du fait de leur très faible nombre dans la circulation sanguine. Le pourcentage de ces cellules varie de 0,01 à 0,0001% des cellules mononucléées périphériques [Khan et al., 2005].

❖ *EPCs et néoplasies*

Dans une revue sur les applications thérapeutiques potentielles des EPCs, Khoo *et al.* font état de leur implication dans le développement tumoral. En effet, les premiers stades du développement de la néovascularisation tumorale sont caractérisés par une sécrétion élevée de VEGF qui favorise la mobilisation et le recrutement des EPCs qui vont participer à la progression cancéreuse via la formation de nouveaux vaisseaux. Ces auteurs montrent un taux significativement plus faible d'EPCs chez des patients en rémission complète par rapport à des patients montrant une évolution de la pathologie. Ainsi, le nombre d'EPCs circulants pourrait être un indicateur de progression tumorale, un biomarqueur, permettant d'apprécier l'efficacité d'une chimiothérapie ou d'un traitement anti-angiogène [Khoo et al., 2008]. Des EPCs génétiquement modifiés pourraient aussi être utilisés pour la thérapie anti-cancéreuse, afin de délivrer des inhibiteurs de l'angiogenèse (ex : anti-VEGF) aux microvaisseaux de la tumeur, ceci entravant la progression cancéreuse [Roncalli et al., 2008]. Une évaluation préliminaire de cette approche a été menée chez la souris avec des EPCs modifiés montrant une diminution significative de l'angiogenèse de la tumeur ainsi qu'une croissance tumorale retardée [De Palma et al., 2003].

h) Différenciation des EPCs en CEs de type artériel ou veineux

Nous avons décrit (p 76-78) les différences de structures et de fonctions qui existent entre les CEs des artères et des veines. Il est donc important de définir le type de CEs obtenues à partir de la différenciation des EPCs.

Dans une publication récente Obi *et al.* ont étudié si les EPCs issus de sang périphérique humain se différencient en CEs de type artériel ou veineux en réponse au « shear stress ». En effet, comme nous l'avons vu, les fonctions des CEs ne sont pas modulées uniquement par des médiateurs chimiques mais aussi par des forces mécaniques, incluant le « shear stress » généré par le flux sanguin et l'étirement. La réponse des CEs à ces forces hémodynamiques est essentielle pour maintenir le système vasculaire dans un état physiologique [Obi et al., 2009]. Des EPCs issus de sang périphérique humain sont exposés à une contrainte de cisaillement laminaire de 0,1 à 5 dynes /cm² pendant 6 ou 24 heures dans un système de disque rotatif [Nomura et al., 1988]. L'exposition au « shear stress » des EPCs entraîne une augmentation des taux d'ARNm des marqueurs de type artériel (*ephrinB2*, *Notch1/3*, *Hey1/2* et *ALK1*) et une diminution des marqueurs de type veineux (*EphB4* et *NRP2*). De plus l'analyse par Western blot du taux de protéine *ephrinB2* montre qu'après 24h de « shear stress » le taux est trois fois plus important qu'en conditions statiques. Le shear stress choisi par cette équipe correspond à un shear stress de type veineux, cependant, les résultats montrent que les EPCs se différencient en CEs matures de type artériel quand les EPCs y sont exposés. Contrairement à cette étude, l'expression de *ephrinB2* diminue en réponse au « shear stress » pour des CEs de veine ombilicale et pour des CEs d'artère coronaire humaine [Goettsch et al., 2004]. La régulation biomécanique de l'expression de *ephrinB2* diffère selon que les cellules sont des CEs matures ou des EPCs.

5) LES CELLULES GENETIQUEMENT MODIFIEES

a) Modifications de CEs matures

Une autre stratégie pour améliorer l'ingénierie vasculaire est l'ensemencement des matrices avec des cellules génétiquement modifiées dans le but d'augmenter leur adhérence au support et/ou d'obtenir des cellules capables de sécréter des facteurs actifs d'un point de vue thérapeutique [Vara et al., 2005]. Afin de diminuer le caractère thrombogène d'un matériau, des polymères ont été ensemencés avec des CEs modifiées pour surexprimer le t-PA (tissue plasminogen activator) et l'urokinase-type PA. Des études sur un modèle expérimental de thrombose ont montré une diminution du dépôt de plaquettes et de thrombine à la surface du matériau [Dichek et al., 1996]. Cependant, le même groupe a montré que l'augmentation de l'expression du t-PA entraînait une diminution significative de l'adhérence des CEs ensemencées [Dunn et al., 1996]. Pour y remédier, différents travaux ont transduit des CEs avec le gène du VEGF (pour revue voir [Zarbiv et al., 2007]). Il est aussi possible d'utiliser des cellules infectées avec un rétrovirus permettant le transfert d'une protéine fluorescente (GFP), autorisant de façon simple la visualisation et le suivi des cellules ensemencées à la surface d'un matériau [Fields et al., 2003].

b) Les cellules souches induites pluripotentes (iPS)

Récemment, des cellules souches pluripotentes ont été obtenues à partir de fibroblastes reprogrammés de peau murine, puis adulte humaine, après introduction de 4 facteurs de transcription [Takahashi et al., 2007]. Ces cellules sont appelées iPS pour "induced pluripotent stem cells". Les travaux de Taura *et al.*, [Taura et al., 2009] montrent que ces cellules iPS humaines ont la capacité de se différencier en cellules vasculaires (CEs et CMLs) exprimant les marqueurs classiques, qu'elles sont pratiquement identiques à celles des cellules ES, ouvrant ainsi des perspectives de médecine régénératrice vasculaire.

C. LES SIGNAUX/ LES BIOREACTEURS

Un des problèmes majeurs du développement de constructions, de taille clinique acceptable, par ingénierie tissulaire est l'apport en nutriments et l'élimination des produits issus du métabolisme. Pour cela, des bioréacteurs ont été développés. Les bioréacteurs sont des systèmes de culture tissulaire en trois dimensions qui permettent de développer de façon automatisée, un environnement contrôlable, reproductible, mécaniquement actif, favorisant l'obtention d'un produit issu de l'ingénierie tissulaire qui soit standardisé, avec une traçabilité, fiable, garantissant ainsi l'adéquation du produit avec les exigences légales et commerciales et permettant d'envisager sa production à grande échelle [Martin et al., 2009].

A l'intérieur de bioréacteurs les processus biologiques et/ou biochimiques se développent dans un environnement hautement contrôlé : pH, température, pression en oxygène, addition de nutriments et de facteurs de croissance, élimination des déchets, avec l'application de forces mécaniques. Tous ces facteurs ont une répercussion sur l'activité et le phénotype cellulaire et permettent le développement d'une construction fonctionnelle pour le remplacement de tissus ou d'organes [Martin et al., 2004]. Les bioréacteurs sont utilisés avant l'implantation pour accélérer la différenciation et la croissance tissulaire. Ils permettent aussi de tester la réponse physiologique de la construction vis-à-vis de l'environnement dans lequel elle sera exposée après implantation, afin d'améliorer son intégration future [Freed et al., 2006].

Les bioréacteurs ne sont pas utilisés pour la maturation de tous les types de tissus issus de l'ingénierie. En effet, à part des cas particuliers dans lesquels la fonctionnalité de la construction doit être vérifiée avant implantation (c'est le cas des vaisseaux issus de l'ingénierie [Niklason et al., 1999]), il est aujourd'hui admis que la maturation d'un tissu peut être plus efficacement induite par les signaux physiologiques, biochimiques et mécaniques du corps utilisé comme un « bioréacteur *in vivo* » [Stevens et al., 2005].

Pour l'ingénierie vasculaire, un système de bioréacteur consiste en un système de culture permettant : l'ensemencement de la matrice avec les cellules et la culture dans des conditions stériles. Le système peut être perfusé pour simuler les conditions du flux sanguin [Williams and Wick, 2004]. Après l'adjonction de la suspension cellulaire à l'intérieur de la matrice, leur adhérence va être favorisée par la mise en rotation du

bioréacteur [Aper et al., 2009]. Le vaisseau issu de l'ingénierie vasculaire doit se comporter biochimiquement, métaboliquement et mécaniquement comme un vaisseau naturel. Les systèmes de bioréacteurs doivent donc permettre la culture de ces vaisseaux en 3D dans des conditions qui favorisent la nutrition des cellules, ainsi que l'application de stimuli mécaniques qui miment les conditions observées *in vivo*. Martin *et al.* ont décrit les différents types de bioréacteurs applicables à l'ingénierie tissulaire [Martin et al., 2004] et Bilodeau *et al.* ceux utilisés pour l'ingénierie vasculaire [Bilodeau and Mantovani, 2006].

La croissance d'un tissu en bioréacteur va avoir des répercussions sur la viabilité, la prolifération cellulaire, la constitution et la structure de la MEC du tissu en soumettant le tissu à une tension physiologique, une compression, un « shear stress » et un flux pulsatile [Bordenave et al., 2008]. Il est aujourd'hui établi que l'utilisation de bioréacteurs permettant d'appliquer des contraintes choisies sur les constructions est essentielle pour leur maturation. Les bioréacteurs permettent ainsi d'augmenter les propriétés mécaniques des constructions [Couet et al., 2007].

La culture d'une construction à l'intérieur d'un bioréacteur va permettre de contrôler plusieurs paramètres : la densité cellulaire d'ensemencement, le transport des nutriments et des facteurs de croissance et les contraintes mécaniques.

1) LA DENSITE D'ENSEMENCEMENT ET L'ADHERENCE CELLULAIRES

Afin de favoriser l'adhérence cellulaire, en plus des modifications de surface des échaffaudages déjà décrites, différentes techniques d'ensemencement peuvent être utilisées :

- ensemencement par flux de cellules, directement au travers des pores d'un « scaffold 3D » qui produit un ensemencement plus uniforme que si l'ensemencement se fait en conditions statiques [Li et al., 2001],
- ensemencement selon un gradient de pression à l'intérieur d'une structure poreuse [Tada and Tarbell, 2002],
- ensemencement sous vide « vacuum cell seeding » [van Wachem et al., 1990],

- ensemencement avec des cellules marquées grâce à des nanoparticules magnétiques [Perea et al., 2007].

2) LES TRANSPORTS DE NUTRIMENTS ET DE FACTEURS DE CROISSANCE A L'INTERIEUR DU « SCAFFOLD »

L'apport en nutriments solubles et en oxygène est limité pour les cultures de tissus en 3D *in vitro*. En effet, des études ont montré que des sphères de 1 mm de diamètre contiennent un centre hypoxique et nécrotique entouré par une couronne dans laquelle les cellules sont viables. Comme les produits issus de l'ingénierie tissulaire doivent avoir une taille d'au moins quelques millimètres pour permettre leur utilisation clinique, les transferts doivent être favorisés [Martin et al., 2004].

a) L'oxygène

Par rapport à des nutriments comme le glucose, l'oxygène a une diffusion plus lente, une solubilité plus faible et sa consommation par les cellules est beaucoup plus élevée. Aussi, si l'apport en oxygène est inadéquat, l'hypoxie est fréquente dans les zones les plus centrales de la construction vasculaire. Le manque d'oxygène peut créer un environnement léthal et limiter la croissance cellulaire, cependant, il peut aussi, sur des cellules souches, augmenter la production des composants de la matrice extra cellulaire et favoriser l'angiogenèse. Une bonne maîtrise du degré d'oxygénation peut permettre de choisir les conditions les plus favorables au développement d'un tissu par ingénierie vasculaire [Malda et al., 2007].

La réponse cellulaire vis-à-vis d'un environnement hypoxique est médiée en premier par l'intermédiaire du HIF (Hypoxia inducible factor). Le HIF-1 joue un rôle clef dans la régulation de nombreux processus qui augmentent la délivrance d'oxygène aux tissus, en particulier la formation de nouveaux vaisseaux sanguins *via* la stimulation de la sécrétion de VEGF et la synthèse de VEGFR-1 [Semenza et al., 2006].

Grâce à l'utilisation d'un bioréacteur, il est possible de perfuser la construction endothélialisée afin de permettre la pénétration de l'oxygène jusqu'à l'intérieur et d'augmenter le dépôt de matrice, la prolifération cellulaire [Malda et al., 2007]. Cependant, en fonction du type de bioréacteur choisi, le profil d'oxygénation du tissu va varier [Martin and Vermette, 2005].

b) Les facteurs de croissance

Si l'incorporation de CEs au sein d'une matrice n'entraîne pas nécessairement *in vitro* le développement de nouveaux vaisseaux sanguins, c'est parce que ce processus dépend de la sécrétion coordonnée de facteurs de croissance et en particulier du VEGF et fait intervenir d'autres types cellulaires qui sont normalement retrouvés *in vivo* [Laschke et al., 2006].

Comme nous l'avons décrit, le VEGF est particulièrement impliqué dans la différenciation des progéniteurs endothéliaux en CEs matures. Lanner *et al.* ont montré que des cellules FLK-1+ se différencient en CEs matures en présence de VEGF et que des taux élevés de VEGF (50 ng/mL) induisaient la différenciation en CEs de type artériel alors que des concentrations plus faibles induisaient l'expression de marqueurs de type veineux [Lanner et al., 2007]. Sur des EPCs CD34+ issus de moelle osseuse, le VEGF est nécessaire pour permettre l'obtention de colonies de type endothélial. D'autres facteurs de croissance (bFGF ou IGF-1) peuvent accélérer la différenciation mais en absence de VEGF, ils seront incapables d'induire seuls cette différenciation [Shi et al., 1998]. Il est aujourd'hui admis que le VEGF est indispensable à la différenciation des EPCs, cependant, ni l'effet de sa concentration ni l'association avec d'autres facteurs de croissance n'ont été clairement déterminés [Kim and von Recum, 2008].

3) LES CONTRAINTES MECANIQUES

Les forces mécaniques sont connues pour être d'importants modulateurs de la physiologie cellulaire, elles pourraient augmenter l'activité de biosynthèse des cellules sur des matrices bioartificielles et donc améliorer ou accélérer la régénération d'un tissu *in vitro* [Butler et al., 2000]. Les bioréacteurs en permettant le développement de forces mécaniques sur la construction 3D, modifient ainsi la croissance tissulaire. L'application de ces contraintes peut aussi permettre de prédire le comportement et la réponse du tissu issu de l'ingénierie quand celui-ci sera implanté *in vivo*. Cette caractérisation biomécanique peut aider à déterminer quand le tissu issu de l'ingénierie présente des propriétés mécaniques suffisantes pour être implanté [Martin et al., 2004]. Concernant l'ingénierie vasculaire, des recherches ont montré que les stimuli mécaniques augmentaient l'alignement des cellules celui-ci conduisant à une augmentation des propriétés mécaniques de la construction [Grenier et al., 2005].

a) Les différents types de contraintes mécaniques exercées sur les CEs

Les forces mécaniques qui s'exercent sur les cellules de la paroi vasculaire regroupent trois forces hémodynamiques principales (Figure 29) :

1-Etirement circonférentiel (circumferential stretch) correspondant à une distension de la paroi induite par la pression transmurale. Il est fonction de l'épaisseur du vaisseau, de sa composition et du degré de contraction des CMLs. Il est lié à la présence d'élastine et de collagène qui confèrent une tension à la paroi. Le principal effet de l'étirement cyclique est l'induction d'un stress oxydatif au niveau des CEs.

2-Pression transmurale : force cyclique normale exercée par la pression sanguine sur la paroi vasculaire (lois de Pascal). Pression et tension sont des forces opposées et s'équilibrent pour une certaine valeur du rayon vasculaire (Loi de Laplace).

3-Contrainte de cisaillement (shear stress) : les cellules recouvrant la surface luminale sont soumises à cette force de friction tangentielle exercée à la surface apicale des CEs par le flux sanguin et sur les CMLs du fait du flux interstitiel transmurale. Les taux physiologiques

du shear stress sont compris pour les veines entre 1-5 dynes /cm² (0,1-0,5 Pa) et pour les artères entre 10-40 dynes/cm² (1-4 Pa) [Dela Paz and D'Amore, 2008]. Les contraintes de cisaillement ont été reconnues comme un important modulateur du phénotype endothélial, de la morphologie et de l'expression des gènes des CEs matures [Chien, 2007, , 2008a, 2008b; Chien et al., 1998].

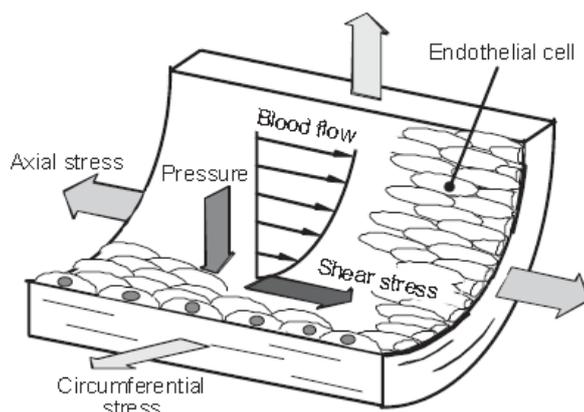


Figure 29 : Contraintes mécaniques exercées sur la paroi artérielle [Ohashi, 2005]

Les deux forces ayant le plus de répercussion sur la paroi vasculaire sont l'étirement circonférentiel et le « shear stress » et celui-ci tout particulièrement sur les CEs.

b) Impact du shear stress sur les CEs matures

Il y a plus de 20 ans, Nerem, a suggéré que les modifications de morphologie et d'orientation des CEs étaient corrélées avec les propriétés du flux sanguin [Nerem, 1984]. Plusieurs études ont depuis montré que le « shear stress » semble être le déterminant principal de la fonctionnalité des CEs mais aussi de l'organisation primitive du plexus vasculaire (Pour revue [Hahn and Schwartz, 2009]). En fonction du type de contrainte de cisaillement exercé sur la CE, le comportement et la réponse cellulaire vont être modifiés (Figure 30).

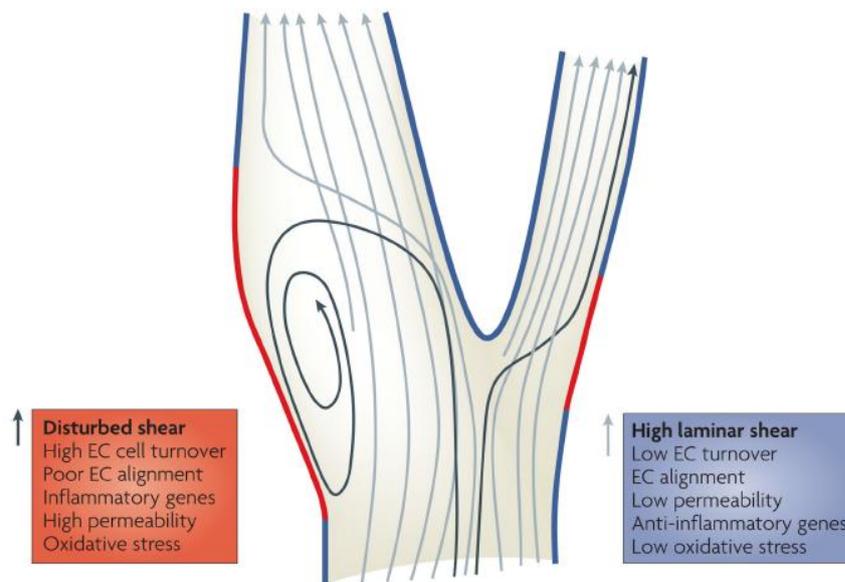


Figure 30 : Réponse des CEs en fonction du flux [Hahn and Schwartz, 2009].

Dans les régions rectilignes des artères, le flux est laminaire (zones bleues) mais dans les régions de division artérielles, le flux est perturbé et de type oscillatoire (zones rouges), entraînant des modifications au niveau de la réponse des CEs.

Dans les portions vasculaires rectilignes, le débit sanguin varie au cours du cycle cardiaque, mais le flux reste laminaire en physiologie. Dans les régions où le flux est élevé et laminaire, les CEs présentent un phénotype quiescent, anti-inflammatoire, avec un faible taux de stress oxydatif, de renouvellement cellulaire et les cellules sont protégées vis-à-vis du développement de l'athérosclérose. En revanche, au niveau des bifurcations ou de plaques d'athérome (en rouge sur la figure), le flux devient perturbé, turbulent, oscillatoire. Dans ces régions, les CEs adoptent un phénotype pro-inflammatoire, caractérisé par une absence d'alignement, un renouvellement cellulaire élevé, l'expression de gènes pro-inflammatoires. Ce type de flux induit l'expression de récepteurs leucocytaires tels que ICAM1 (intracellular adhesion molécule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion-1 molecule), et de chemokines telles que MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) qui recrutent les leucocytes, initiant et entretenant une inflammation de la paroi vasculaire. Quand des facteurs de risque systémiques s'y ajoutent, ces phénomènes évoluent vers l'athérosclérose.

In vitro, lorsque les CEs prolifèrent dans leur milieu de culture en conditions statiques, elles ont une forme pavimenteuse cubique à confluence. En revanche, dès qu'elles sont exposées à des contraintes de cisaillement, comme dans une chambre de

perfusion mimant le flux sanguin, elles prennent en quelques heures une forme allongée dans le sens du flux avec un remaniement important de leur cytosquelette [Davies, 2009]. *In vivo*, on retrouve cette organisation allongée des CEs dans le sens du flux, surtout dans les artères où les forces de cisaillement sont 30 à 50 fois plus élevées que dans les veines [Ait-Oufella et al., 2008]. Pour illustrer l'influence des contraintes mécaniques sur le comportement endothélial, on peut citer l'exemple des pontages aorto-coronaires. Chez l'homme, les CEs de greffons saphènes, une fois en connexion avec le flux artériel, changent de forme, elles s'allongent dans leur grand axe parallèlement à l'écoulement du sang [Allaire and Clowes, 1997]. L'exposition des CEs à un « shear stress » artériel de 15 dynes/cm² pendant 24h entraîne une réorganisation du cytosquelette et un alignement des cellules dans le sens du flux (Figure 31).

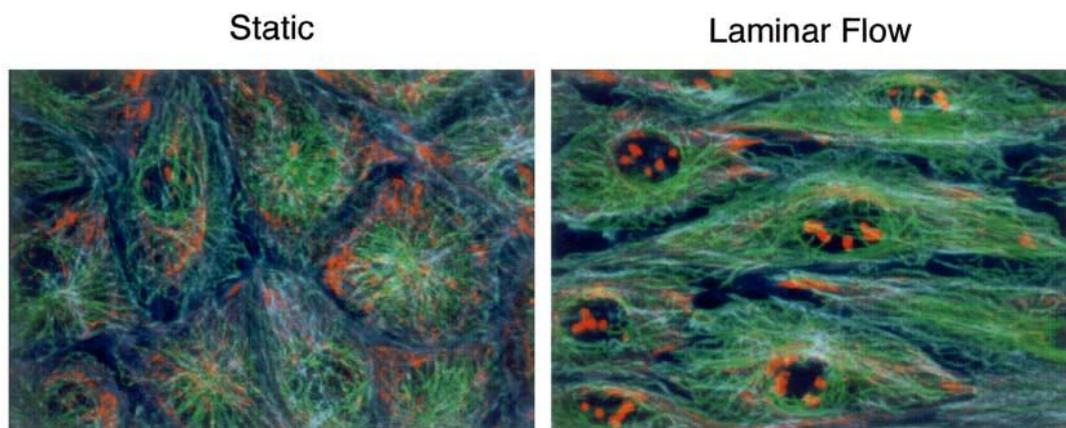


Figure 31 : Le shear stress laminaire (15 dynes/cm² pendant 24h) induit la réorganisation du cytosquelette et l'alignement des CEs [Li et al., 2005].

Marquages des microtubules par la tubuline (vert), de l'actine (bleue) et des filaments intermédiaires par la vimentine (rouge).

Si le niveau du shear stress, ainsi que la durée d'exposition, modifient les fonctions des CEs, c'est que ces stimuli mécaniques physiques sont convertis en signaux biochimiques intracellulaires par l'intermédiaire de mécanorécepteurs.

Certains de ces mécanosenseurs ont été bien identifiés (pour revue voir [Chatzizisis et al., 2007] et [Hahn and Schwartz, 2009]) (Figure 32). Les éléments du cytosquelette (microtubules, filaments d'actine et filaments intermédiaires) peuvent se connecter physiquement à différentes régions de la CE afin de transmettre les forces depuis le domaine apical jusqu'aux régions basales ou latérales où les phénomènes de

mécanotransduction ont été observés. En effet, l'inhibition des éléments du cytosquelette peut bloquer la réponse des CE au flux. Des molécules d'adhérence telles que le complexe protéique PECAM/VE-cadhérine/Flk-1 retrouvé aux jonctions intercellulaires, sont capables de médier de nombreuses réponses au flux. Les canaux ioniques (K^+ , Ca^{2+} ...), les récepteurs à activité tyrosine kinase, les protéines G hétérodimériques, la bi-couche phospholipidique, les cils primaires, les cavéolines et la nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase (NADPH) sont autant de mécanorécepteurs et de mécanotransducteurs au niveau de la CE (Figures 32 et 34).

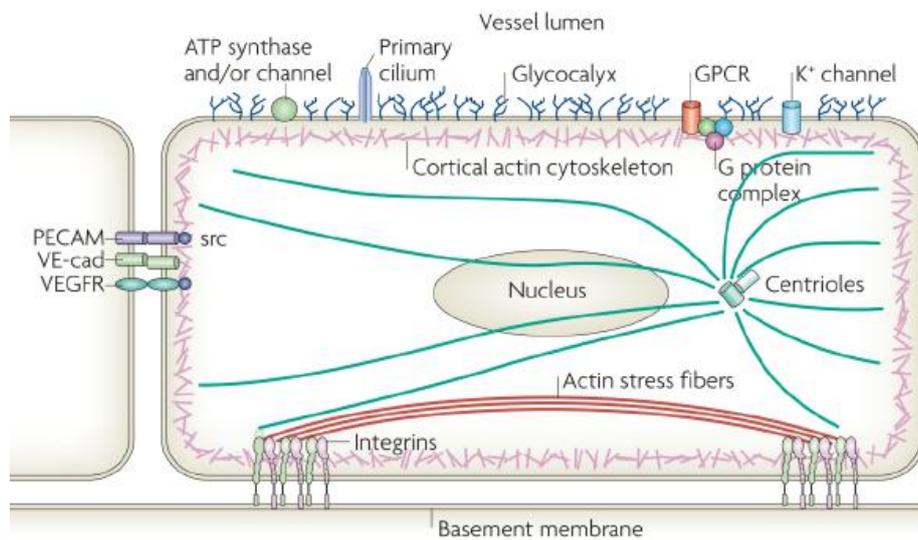


Figure 32 : Mécanotransducteurs endothéliaux [Hahn and Schwartz, 2009].

La contrainte de cisaillement est perçue par les mécanorécepteurs de la membrane cellulaire (Canaux ATP et ATP synthases, cils primaires, GPCR : G Protein coupled receptor, canaux ioniques, complexe PECAM-VE-cadhérine-VEGFR) et elle est transmise aux éléments du cytosquelette ainsi qu'au niveau des jonctions intercellulaires et de la membrane basale.

Ces derniers activent différentes voies de signalisation qui à leur tour activent des facteurs de transcription (*trans*) qui se fixent avec les éléments *cis* appropriés au niveau de la région du promoteur du gène et modulent son expression. Ceci conduit à des modulations de l'expression des gènes et protéines et donc des fonctions cellulaires [Chien, 2007] (Figure 33).

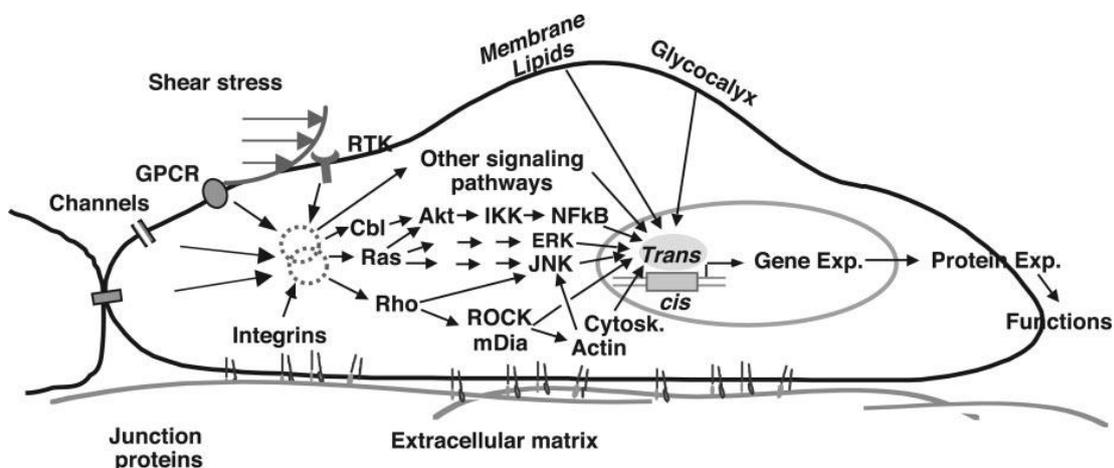


Figure 33 : Activation par le shear stress des voies de signalisation dans la CE

[Chien, 2007]

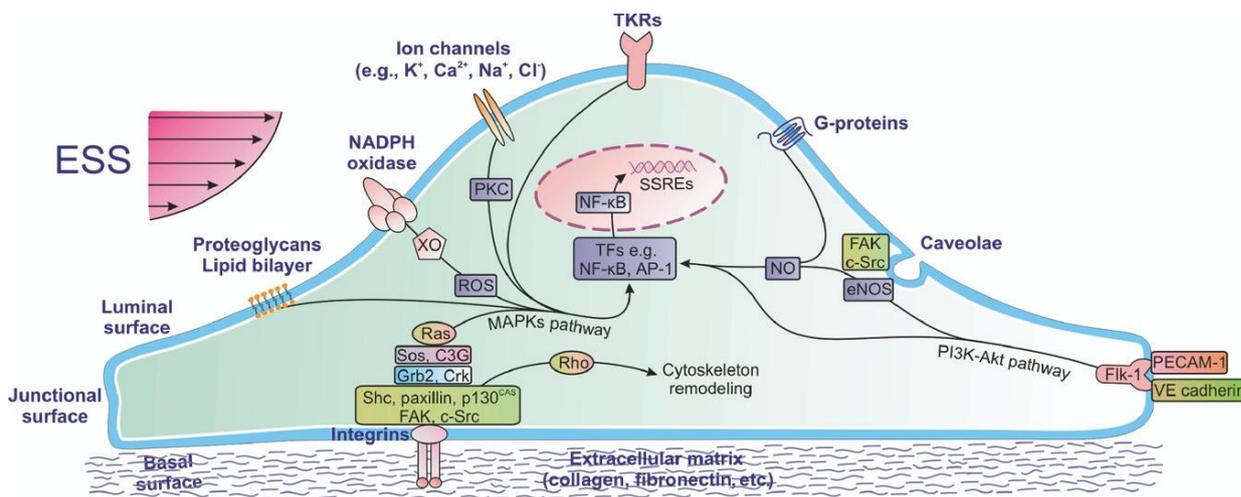


Figure 34 : Diagramme schématique montrant l'action du SS sur la CE [Chatzizisis et al., 2007]. La contrainte de cisaillement (ESS) est perçue par des mécanorécepteurs endothéliaux, ce signal mécanique est converti en signaux chimiques ce qui initie l'activation de différentes voies de signalisation (cascade des MAPKinases, voie PI3K-Akt, GTPases de la famille Rho...).

Dans la cascade de signalisation, on peut citer l'activation des Ras qui activent à leur tour la voie des MAP kinases (Mitogen activated protein) (Figure 33), incluant ERK et JNK (Figure 34). L'activation de la voie Rho (Figures 33 et 34) conduit au remodelage du cytosquelette induisant les changements structurels des CEs. Le complexe PECAM/VE-cad/Flk-1, en activant Flk-1, recrute et active la voie P13K qui de façon Akt-dépendante, phosphoryle la eNOS qui contribue à la sécrétion de NO. La voie de signalisation P13K/Akt, est une des principales cascades de signalisation régulant le métabolisme, la

croissance, la migration et la survie de nombreuses cellules. En plus de la mécanotransduction médiée par les intégrines, le « shear stress » active d'autres voies de signalisation, en particulier, la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) à partir de la NADPH oxydase.

L'activation de ces différentes voies de signalisation conduit de façon ultime, à la phosphorylation de facteurs de transcription tels le NF- κ B et l'activator protein-1 (AP-1) (Figure 34). Ces facteurs de transcription protéiques se fixent à des « shear stress responsive elements » (SSREs) positifs ou négatifs, au niveau du promoteur de gènes, induisant ou réprimant leur expression, modulant ainsi les fonctions cellulaires.

Les CEs apparaissent comme des cellules probablement plus dynamiques que d'autres types cellulaires. Leur aptitude à s'adapter à leur environnement est le reflet de leur capacité à percevoir et à transmettre les signaux extracellulaires (revue voir [Groenendijk et al., 2007] et [Hierck et al., 2008]). Des CEs non soumises au « shear stress » deviennent apoptotiques [Bartling et al., 2000].

c) Impact du « shear stress » sur les progéniteurs endothéliaux

Ces paramètres de « shear stress » et d'étirement cyclique sont reconnus comme importants pour permettre la différenciation des cellules souches [Riha et al., 2005] [Hamilton et al., 2004] [Yamamoto et al., 2003]. Cependant, l'impact du « shear stress » sur les EPCs est moins connu que sur les CEs matures et peu d'études se sont focalisées sur la réponse des EPCs au shear stress, en incluant à la fois la transduction du signal et la réponse au niveau des gènes [Obi et al., 2009] [Yang et al., 2006].

L'équipe de Yamamoto [Yamamoto et al., 2003] a montré que le « shear stress » augmentait la prolifération des EPCs, leur différenciation en CEs matures et leur capacité à former des tubes dans les gels de collagène. Ces résultats suggèrent que les EPCs, comme les CEs matures, perçoivent la contrainte de cisaillement et y répondent. Ces EPCs appartiennent à la catégorie des EPCs précoces.

Murasawa *et al.* ont montré que des EPCs ou des cellules CD133+ étaient capables de se différencier en cellules du myocarde ou en cellules exprimant des marqueurs endothéliaux en fonction de l'environnement mécanique et des autres cellules présentes

[Murasawa et al., 2005; Wang et al., 2005a]. Ye *et al* [Ye et al., 2008] ont montré que le « shear stress » (5 dynes /cm² pendant 12 heures) ou la co-culture (de part et d'autre d'une membrane) avec des CMLs vasculaires permettait la différenciation endothéliale des EPCs issus de sang de cordon ombilical (objectivée par l'apparition des marqueurs CD31 et vWF et la diminution de CD133 et CD34), et que le degré de différenciation était beaucoup plus prononcé quand les cellules étaient exposées au « shear stress » en présence de cellules musculaires. La différenciation des EPCs a pu être obtenue pour Ye avec un temps d'exposition au « shear stress » plus court que pour Yamamoto [Yamamoto et al., 2003]. Cependant, l'origine des EPCs était distincte puisqu'ils provenaient respectivement de sang de cordon et de sang périphérique humain.

Il a été montré aussi que le « shear stress » peut augmenter la sécrétion du tPA et l'expression de l'ARNm correspondant sur des EPCs humains [Yang et al., 2006]. Sur des périodes de 24h, le « shear stress » induit une augmentation de la sécrétion de tPA, seulement quand il est appliqué à des taux élevés (15-25 dynes/cm²) mais pas à des taux faibles (5 dynes/cm²). Dans une étude réalisée par le même groupe, il a été rapporté que le « shear stress » augmente l'expression de l'ARNm de la NO synthase et la production de NO sur des EPCs humains et ceci de manière dépendante du « shear stress », dès 4 heures d'exposition [Tao et al., 2006].

Cependant, les différentes études réalisées pour élucider les effets du « shear stress » sur les EPCs montrent toutes des taux et des durées d'exposition au « shear stress » très variables ainsi que des cellules à des stades différents de différenciation, rendant difficiles les conclusions et leur comparaison, source de nombreuses controverses.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'incidence des maladies cardiovasculaires d'origine athéromateuse demeure un problème majeur en santé publique et malgré le développement de techniques curatives endovasculaires, la chirurgie reste nécessaire chez de nombreux patients. Le remplacement vasculaire se fait par une veine autologue, qui reste le « gold standard » ou, lorsque les patients n'ont pas le capital vasculaire suffisant, par une prothèse. Actuellement, si les techniques utilisant des prothèses synthétiques comme le PTFEe (polytétrafluoroéthylène expansé) ou le Dacron (polyéthylène téréphtalate) sont satisfaisantes pour le remplacement d'artères de gros calibre, le remplacement des artères de petit calibre (inférieur à 6 mm de diamètre) demeure toujours un challenge du fait du caractère trombogène des biomatériaux utilisés et de leurs mauvaises propriétés mécaniques. Afin d'assurer la perméabilité à long terme de ces prothèses, l'endothélialisation, avec les cellules du patient, entraînant la création d'une monocouche cellulaire continue sur la paroi interne de la prothèse, permet d'obtenir une surface hémocompatible et thromborésistante. Cette voie de recherche est développée depuis longtemps au sein de l'unité Inserm U577 Biomatériaux et Réparation tissulaire ce qui avait permis dans le cadre du programme hospitalier de recherche clinique au CHU de Bordeaux (2001) de recevoir un avis favorable pour démarrer l'implantation chez l'homme de prothèses vasculaires de 6 mm de diamètre endothélialisées *in vitro*.

Depuis quelques années, comme il est décrit dans l'introduction, le concept d'ingénierie tissulaire a beaucoup évolué et les cellules souches font l'objet de nombreuses études. Ces cellules qui possèdent à la fois les capacités d'autorenouvellement et de différenciation, ouvrent de nouvelles perspectives dans le domaine de l'ingénierie vasculaire.

Ainsi, notre premier objectif a été d'obtenir de manière fiable et reproductible des **cellules à phénotype endothélial mature** à partir de progéniteurs endothéliaux de différentes origines (moelle osseuse et sang périphérique). Plusieurs paramètres entrant en jeu dans ce processus de différenciation (environnement cellulaire en facteurs de croissance, support matriciel des cellules et contraintes de cisaillement), notre deuxième objectif fût de définir leurs impacts sur des cellules issues de progéniteurs endothéliaux.

Ces progéniteurs offrant la perspective de pouvoir être utilisés à terme en ingénierie vasculaire pour l'endothélialisation de prothèses vasculaires, nous avons, dans le même

temps, recherché **des matériaux biocompatibles capables de leur servir de support favorable.**

Le premier matériau testé qui nous a donné l'occasion d'une collaboration avec l'équipe Inserm U698 de D. Letourneur à Paris, a été un hydrogel de polysaccharides. Ces matériaux préparés par réticulation chimique de pullulane/dextrane/fucoïdan sont biodégradables, biocompatibles et ont montré de bonnes propriétés mécaniques. Ce travail a permis la **première** publication.

Dans le but de fonctionnaliser des substituts destinés à êtreensemencés, soit par des cellules endothéliales matures, soit par des progéniteurs, quelle que soit leur origine, nous avons aussi étudié l'impact de différents types de revêtements sur l'adhérence des cellules ainsi que leur capacité à résister à des contraintes mécaniques. En effet, l'équipe du Pr P. Menu (LEMTA-UMR CNRS 7563 à Nancy), avec laquelle nous collaborons dans le cadre du projet ANR-TECSAN SUBVACEL-2007-2010, a montré une meilleure adhérence et une différenciation plus favorable des EPCs de sang périphérique de lapin sur des films constitués de multicouches de polyélectrolytes, que sur fibronectine. Nous avons voulu étudier le comportement des cellules issues des EPCs de sang périphérique humain : les PDECs, sur ces films comparativement à de la colle de fibrine (Tissucol) et du collagène. Ces deux protéines sont déjà utilisées en chirurgie de substitution vasculaire avec des cellules matures et ont montré d'intéressantes propriétés : excellente biocompatibilité, réponse inflammatoire minime, bonne disponibilité...

De plus, les vaisseaux sanguins sont exposés à un nombre important de stimuli mécaniques incluant tension, pression et contraintes de cisaillement à la paroi. Ce cisaillement ou « shear stress » est dû au frottement d'un liquide visqueux, le sang, tangentiellement à l'endothélium, de façon laminaire ou turbulente, pulsatile, en fonction du niveau de l'arbre vasculaire et d'éventuelles bifurcations et s'applique principalement aux CEs.

Afin **d'étudier *in vitro* l'impact de ces contraintes de cisaillement sur l'endothélium,** différents systèmes capables d'engendrer un flux défini ont été mis au point. S'appuyant sur des travaux réalisés au laboratoire, nous avons mis en place un système de chambres de flux nous permettant d'appliquer sur des cellules à la surface de lamelles de verre, un flux laminaire en conditions stériles et donc sur de longues périodes.

Le « shear stress » appliqué est de l'ordre de 2 dynes/cm^2 ($0,2 \text{ Pa}$), correspondant à un flux de perfusion. Ce système de banc est validé avec des cellules matures (HSVECs) et après 48 heures d'un tel « shear stress », nous avons constaté un début d'orientation des cellules dans le sens du flux, comme décrit dans la littérature.

Après isolement, amplification et caractérisation *in vitro* de progéniteurs endothéliaux issus de sang périphérique humain, en conditions statiques, nous les avons soumis à des contraintes de cisaillement de type artériel. Les PDECs ensemencés sur trois types de supports (Collagène I, colle de fibrine, multicouches de polyélectrolytes) dans des systèmes bi-dimensionnels ont été exposés à une contrainte de cisaillement de l'ordre de 12 dynes/cm^2 ($1,2 \text{ Pa}$) correspondant à un flux de type artériel, mimant les contraintes appliquées sur les cellules *in vivo*. Les réponses cellulaires à ces contraintes ont été étudiées au niveau de l'expression des ARNm grâce à des membranes de MacroArray ainsi qu'au niveau de l'expression et fonction protéiques du facteur tissulaire et de la thrombomoduline. De plus, les résultats obtenus en 2D ont permis la poursuite de nos travaux dans des systèmes en trois dimensions, ce travail ayant pour but le développement d'un substitut vasculaire bioartificiel colonisé par des cellules endothéliales issues de progéniteurs autologues. Nous avons réalisé l'endothélialisation de prothèses InterGard (prothèse vasculaire commerciale en polyester tricoté enduit de collagène) avec des PDECs de sang périphérique humain. Après culture en conditions statiques, la prothèse a été exposée à un shear stress de 12 dynes/cm^2 (flux de type artériel identique à celui déjà appliqué sur les PDECs ensemencés en 2D) pendant 6 heures.

Ce travail a fait l'objet des **deuxième et troisième** publications.

Les résultats obtenus dans le cadre de ces recherches portant sur l'ingénierie vasculaire nous ont conduits à nous intéresser aux recherches effectuées au laboratoire en ingénierie du tissu osseux. En effet la formation osseuse nécessite un processus actif d'angiogenèse qui fait intervenir une coopération entre cellules ostéoblastiques et cellules endothéliales. Différents travaux réalisés au laboratoire sur des modèles de co-culture entre ostéoprogéniteurs humains (HOP) et cellules endothéliales de la veine de cordon ombilicale (HUVECs) ont montré, d'une part, une communication par l'intermédiaire du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) entre ces deux types cellulaires et d'autre part, une migration des HUVECs le long des HOPs, induisant la formation de structures

spécifiques « tubular like ». Ces systèmes de co-cultures permettent de favoriser l'angiogenèse et la différenciation ostéoblastique, laissant envisager de nouvelles stratégies d'ingénierie du tissu osseux vascularisé. Aussi, avons-nous mis en place des systèmes de co-cultures entre PDECs de sang périphérique humain et HOPs ou cellules stromales de moelle osseuse humaine (HBMSCs) afin de déterminer le rôle de la co-culture sur la différenciation ostéoblastique. Ce travail, dont les résultats préliminaires sont présentés ici, devra être complété afin de permettre la soumission d'un **quatrième** article.

RESULTATS

I. PROGENITEURS ENDOTHELIAUX ISSUS DE CELLULES SOUCHES DE MOELLE OSSEUSE.

A. INTRODUCTION

Notre premier objectif a été d'obtenir des progéniteurs endothéliaux et des cellules endothéliales issues de ces progéniteurs, à partir de moelle osseuse humaine. Nous avons choisi dans un premier temps cette source en lien avec les travaux effectués au laboratoire concernant l'ingénierie du tissu osseux. En effet, les travaux menés dans l'unité U577 sur le tissu osseux se font avec des cellules ostéoprogénitrices isolées à partir de cellules mésenchymateuses issues de moelle osseuse humaine (appelées HOP pour Human OsteoProgenitors) [Grellier et al., 2009]. Ces cellules ont été utilisées pour mettre au point des modèles de co-culture de cellules humaines endothéliales et ostéoblastiques, en vue:

- d'élaborer *in vitro* des matériaux hybrides de comblement osseux et d'étudier la réponse de ces cellules vis-à-vis de supports, en conditions statiques et dynamiques ;
- d'étudier la communication ostéo-endothéliale à l'aide de co-cultures de cellules souches issues de la moelle osseuse orientées vers le lignage ostéoblastique et de cellules endothéliales humaines.

Aussi l'objectif était-il d'obtenir cette double population ostéoblastique et endothéliale à partir d'une source unique : les progéniteurs endothéliaux et les CEs matures qui en dérivent pouvant être utilisés à la fois pour l'ingénierie des macro-vaisseaux (endothélialisation de substituts vasculaires) et pour l'ingénierie des micro-vaisseaux (ingénierie du tissu osseux vascularisé).

Les EPCs ont été isolés à partir des cellules mononucléées de moelle osseuse humaine. Une sélection grâce à des billes magnétiques couplées à un anti CD133+ ont permis un tri sélectif des cellules progénitrices, mises en culture dans un milieu fortement supplémenté en VEGF. Les EPCs ont été utilisés après 4 jours ou 30 jours de mise en culture, caractérisés puis ensemencés sur des hydrogels de polysaccharides. Ces hydrogels, préparés par l'équipe de D. Letourneur (Inserm U698), par réticulation de pullulane,

dextrane et fucoïdane, ont montré des propriétés mécaniques et une biocompatibilité permettant d'envisager leur utilisation en ingénierie vasculaire. Aussi, avons-nous souhaité évaluer leur capacité à permettre l'attachement de progéniteurs endothéliaux (issus de moelle osseuse humaine ou de sang de cordon ombilical) par rapport à celui de cellules matures issues de veine saphène humaine.

B. ARTICLE

N.B. Thébaud, D.Pierron, R. Bareille, C. LeVisage, D. Letourneur, L. Bordenave: "*Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: a pre-requisite for vascular tissue engineering*". J Mater Sci: Mater Med (2007) 18: 339-345.

C. CONCLUSIONS

Dans ce travail, nous avons montré que les cellules issues de CD133+ de moelle osseuse présentaient après 30 jours de culture dans un milieu de différenciation, un phénotype endothélial (morphologie pavimenteuse, expression de l'ARNm de KDR, CD31 et VE-cadhérine, incorporation de Dil-Ac-LDL et expression du CD31 par immunomarquage *in situ*). De plus, ces cellules (qui sont vraisemblablement des EPCs tardifs) présentent des taux d'adhérence élevés sur les hydrogels étudiés.

Cependant, sur un total de 205 prélèvements médullaires traités, nous n'avons pu obtenir que dans 30% des cas, des EPCs présentant certains marqueurs de CEs (CD31 et KDR en ARNm). Ces EPCs appartenaient, selon les critères admis aujourd'hui, à la catégorie des EPCs précoces puisqu'ils ne possédaient pas la morphologie pavimenteuse typique des CEs matures et ne pouvaient pas être amplifiés. Pour seulement trois prélèvements de moelle osseuse, nous avons pu obtenir des EPCs présentant la morphologie pavimenteuse typique et exprimant CD31, KDR et le facteur de vWF au niveau de l'ARNm. Cependant, dans ces trois cas, nous avons obtenu une population « mixte » avec des cellules de morphologie pavimenteuse et possédant les marqueurs de CEs matures, entourées par des cellules de morphologie fibroblastique sans aucun marqueur endothélial. La séparation de ces deux populations n'a pas été possible, l'amplification des EPCs tardifs obtenus entraînant l'amplification des cellules de type fibroblastique. Ce rendement très faible et la prise en considération d'une publication démontrant que les EPCs tardifs n'étaient pas issus des cellules CD133+ [Timmermans et al., 2007], nous ont conduits à modifier notre technique d'obtention des EPCs et de CEs issues d'EPCs, ainsi que la source des progéniteurs.

II. PROGENITEURS ENDOTHELIAUX ISSUS DE SANG PERIPHERIQUE HUMAIN : obtention et comparaison avec des CEs matures en vue d'une utilisation en ingénierie vasculaire.

A. INTRODUCTION

Notre objectif a donc été d'obtenir des cellules endothéliales issues de progéniteurs de sang périphérique humain, de façon plus reproductible et avec un rendement supérieur à ce que nous avons pu obtenir à partir des prélèvements de moelle osseuse. En effet, afin d'utiliser ces cellules dans le cadre de la conception de substituts vasculaires hybrides, il était nécessaire d'obtenir des cellules capables d'être amplifiées sur de nombreux passages afin d'obtenir le pool de cellules nécessaire à l'endothélialisation complète de la face interne d'une prothèse vasculaire.

L'obtention des EPCs issus de sang périphérique humain puis des cellules issues de ces progéniteurs PDECS (progenitors derived endothelial cells) s'est faite à partir des conseils du Dr S. Fuchs de l'Institute of Pathology de Mainz (Allemagne) dirigé par le Pr C.J. Kirkpatrick. Nous avons ensuite souhaité comparer ces cellules avec des CEs matures (HSVECs et HUVECs) qui sont notre référence au laboratoire. Cette comparaison a été faite d'un point de vue phénotypique et fonctionnel, dans des conditions de culture statique (afin de définir les conditions optimales de culture) puis dans des conditions d'exposition des cellules au shear stress. Cette étude en conditions dynamiques a été réalisée à la fois dans des systèmes en deux dimensions (chambres de flux parallèles) et en trois dimensions (prothèses vasculaires endothélialisées et exposées au « shear stress »). La réponse cellulaire à ces contraintes a été étudiée au niveau de l'expression des ARNm grâce à des membranes de « macroarray » et par PCR quantitative en temps réel.

B. ARTICLE

N.B. Thébaud, R. Bareille, M. Rémy, C. Bourget, R. Daculsi, L. Bordenave: « *Human progenitor derived endothelial cells versus venous endothelial cells for vascular tissue engineering : an in vitro study* ». Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine (Sous presse).

C. CONCLUSIONS

Notre objectif dans ce travail était d'obtenir des progéniteurs endothéliaux à partir de sang périphérique humain et de préciser les connaissances concernant leurs aptitudes à être utilisés en ingénierie vasculaire. Selon Brown [Brown et al., 2009], cinq critères sont requis avant cette utilisation, ils concernent : l'accessibilité de la source, la présence de marqueurs spécifiques endothéliaux, la capacité d'adhérence aux substrats, les propriétés antithrombogènes et l'inhibition de la thrombose et de l'hyperplasie néointimale. Parmi ces cinq critères, nous en avons étudiés quatre et nos résultats semblent répondre à ces préconisations. Nous avons pu obtenir des cellules qui sont vraisemblablement des EPCs tardifs, capables d'être amplifiés et différenciés en cellules présentant de nombreux marqueurs de CEs matures.

D'un point de vue quantitatif, sur 128 prélèvements de sang périphérique total traités, nous avons pu obtenir des EPCs précoces pour presque tous les prélèvements. Parmi les 128, 91 ont été traités selon la méthode observée au sein du laboratoire du Pr Kirkpatrick et sur ce total, 33 prélèvements nous ont permis d'obtenir des clones d'EPCs tardifs. Aucun clone n'avait été obtenu par la méthode utilisée pour les 37 premiers prélèvements. Les deux techniques ne diffèrent pourtant que par peu d'éléments. Après une séparation des cellules mononucléées par centrifugation sur Ficoll, notre technique initiale se poursuivait par une lyse des hématies. Les CMNs obtenues étaient ensemencées sur de la fibronectine sur laquelle nous n'avons obtenu aucun clone de type EPCs tardif. Celle-ci a été remplacée par du collagène de type I. Depuis, nous avons apporté quelques modifications au protocole développé par le Dr S. Fuchs, la densité initiale d'ensemencement est passée de $2,5 \cdot 10^6$ à $5 \cdot 10^6$ CMN/cm² et l'élimination des cellules non adhérentes se fait le lendemain de l'ensemencement et non quatre jours plus tard. Sur ces 33 prélèvements ayant permis d'obtenir des EPCs tardifs, la majorité des cellules s'arrêtent de proliférer au bout de 5 passages en moyenne. Une lignée (SP 44.07) a été amenée jusqu'au passage 30 et congelée à différents passages dans l'azote liquide. Les cellules peuvent être décongelées et amplifiées de nouveau comme des cellules matures. Les temps de doublement de population sont de 4 jours en moyenne, avec une augmentation à partir des passages 18-19. Une autre lignée (SP 43.07) a été amplifiée jusqu'au passage 12 mais présente des temps de doublement de population beaucoup plus longs. Deux autres lignées

(SP 15.08) et (SP 01.09) ont pu être amplifiées, respectivement jusqu'aux passages P10 et P9, et sont maintenues dans notre banque. En moyenne, il est possible d'obtenir dès le troisième passage, environ un million de cellules. Nous n'avons pas observé de différences dans le nombre de clones obtenus en fonction du sexe et de l'âge des donneurs qui est généralement de plus de 45 ans. Une constante se dégage de ces chiffres : les clones qui peuvent être amplifiés sur de nombreux passages sont ceux qui apparaissent au bout de 18 à 21 jours de culture alors que les clones qui apparaissent plus tardivement (plus de 25 jours) ne pourront pas être amplifiés sur plus de quelques passages.

Les cellules de type EPCs tardifs, bien que présentant de nombreux marqueurs de CEs matures, ne peuvent pas être amplifiées dans un milieu de culture pour CEs matures, c'est à dire ne contenant pas de VEGF. Ces PDECs sont capables de résister à un shear stress de 12 dynes/cm² pendant six heures que ce soit sur collagène ou colle de fibrine, deux revêtements classiquement utilisés en ingénierie vasculaire, période à l'issue de laquelle ils commencent à s'aligner dans la direction du flux. Cette exposition au « shear stress » entraîne, selon les supports, des différences d'expression des ARNm du facteur tissulaire, du t-PA, de l'u-PA et de la thrombomoduline et ce beaucoup plus que dans le cas des CEs matures. Ceci nous permet de supposer que les PDECs présentent un phénotype antithrombogène sur le collagène, même si l'analyse au niveau de l'expression protéique reste à faire. De plus, les PDECs montrent une moins grande accumulation intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ROS), indiquant une meilleure résistance au stress oxydatif que les CEs matures. Ceci peut être expliqué par l'expression élevée de l'ARNm de la super oxyde dismutase (SOD) à l'état basal dans les PDECs, alors que la SOD n'est pas exprimée par les CEs matures. La SOD est régulée par le flux uniquement dans les CEs matures. Les PDECs ont été utilisés pour endothélialiser une prothèse vasculaire en PET enduit de collagène et nous avons pu observer que la monocouche formée résistait au shear stress.

En déterminant les conditions de culture optimales, en mettant en évidence une meilleure résistance au stress oxydatif que les CEs matures et en montrant qu'ils étaient capables de résister à une exposition au shear stress et d'être régulés au niveau de l'expression de nombreux gènes, aussi bien dans des systèmes en deux dimensions qu'à l'intérieur d'une prothèse (3D), cette étude nous a permis de compléter la caractérisation des EPCs.

III. PROGENITEURS ENDOTHELIAUX ISSUS DE SANG PERIPHERIQUE HUMAIN : IMPACTS DU SUPPORT ET DU SHEAR STRESS.

A. INTRODUCTION

Le but de cette étude a été d'explorer la capacité de films multicouches de polyélectrolytes (MPEs) à constituer des revêtements adéquats pour l'ensemencement de CEs issues de progéniteurs de sang périphérique humain. En effet, nous avons déjà exposé dans le chapitre sur les modifications de surface des matériaux (p 61-63), que ces films de macromolécules consistant en une alternance de charges positives et négatives, offrent de nombreuses possibilités de variations physico-chimiques. Des films alternant des couches PSS/PAH (poly(styrène) sulfonate/ poly(allilamine hydrochloride)) et terminés par une couche positive (PAH), préparés selon la technique fournie par le Pr P. Menu (CNRS 7563) ont permis une bonne adhérence des CEs matures. Poursuivant la caractérisation des PDECs, nous avons souhaité définir leur comportement sur MPEs, en vue d'utiliser ces deux composants en ingénierie vasculaire puisqu'un endothélium recouvrant un biomatériau requiert d'être fonctionnel et doit répondre aux stimuli mécaniques, comme l'endothélium natif peut le faire.

Des PDECs ont été ensemencés sur des lames de verre revêtues de films multicouches de polyélectrolytes puis exposés à une contrainte de cisaillement de 12 dynes/cm² pendant 6 heures. L'étude de la réponse cellulaire dans ces conditions s'est faite au niveau de l'expression de l'ARNm et des protéines (thrombomoduline et facteur tissulaire), comparativement à la réponse cellulaire de PDECs ensemencés sur des revêtements déjà étudiés (collagène I et colle de fibrine).

B. ARTICLE

NB. Thébaud, R. Bareille, R. Daculsi M. Rémy, C. Bourget, H. Kerdjoudj, P. Menu, L. Bordenave: "*Polyelectrolyte multilayer films allow seeded human progenitor derived endothelial cells to remain functional under shear stress in vitro*". Acta Biomaterialia (sous presse).

C. CONCLUSIONS

Après exposition au « shear stress », les PDECs sont capables de rester fermement adhérents aux différents revêtements testés : MPEs, collagène I et colle de fibrine. L'analyse de 113 gènes, reflétant la biologie de l'endothélium, a montré des modifications, selon les substrats, de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, dans l'expression de molécules d'adhérence et de molécules interagissant avec la MEC, dans la balance hémostatique et l'activité antiapoptotique. En particulier, concernant l'expression de gènes impliqués dans la cascade de la coagulation et le système fibrinolytique, il apparaît que l'expression au niveau des ARNm de la thrombomoduline sur MPEs est comparable à l'expression sur collagène I mais significativement plus élevée que sur colle de fibrine. L'expression du facteur tissulaire est comparable sur les trois supports alors que le t-PA montre une expression plus importante sur MPEs que sur colle de fibrine mais moins que sur collagène.

Au niveau de l'expression protéique, nous avons mesuré l'activité du facteur tissulaire (TF) et de la thrombomoduline (THBD). La génération de facteur X activé (mesurant l'activité du FT) est significativement augmentée par le « shear stress » sur MPEs et sur collagène. La génération de protéine C activée (mesurant l'activité de la thrombomoduline) est augmentée de façon significative par le « shear stress » seulement sur collagène I. Cependant, le niveau basal de protéine C activée produite en condition statique est beaucoup plus élevé sur MPEs que sur les autres substrats.

Cette étude nous a permis de démontrer que :

- les MPEs peuvent être endothélialisées avec des PDECs ;
- les PDECs sur MPEs sont capables de former une monocouche résistante à un « shear stress » laminaire de type artériel et de répondre aux niveaux de l'ARNm et des protéines afin de maintenir une expression fonctionnelle de facteurs favorisant un phénotype antithrombogène.

IV. PROGENITEURS ENDOTHELIAUX DANS L'INGENIERIE DU TISSU OSSEUX VASCULARISE

A. INTRODUCTION

Si l'ingénierie tissulaire constitue aujourd'hui un domaine de recherche actif, les applications cliniques restent cependant limitées, en particulier en raison d'une vascularisation insuffisante au cours des premières phases d'implantation. Pendant les phases de culture *in vitro*, la construction issue de l'ingénierie peut être perfusée, comme nous l'avons décrit, par l'intermédiaire d'un bioréacteur. Cependant, après implantation, l'apport en oxygène et en nutriments du tissu issu de l'ingénierie est souvent limité puisque les processus de diffusion ne permettent d'atteindre que les cellules situées au maximum à 100-200 μm du plus proche capillaire. Après implantation, les vaisseaux du receveur envahissent l'implant, principalement en réponse aux signaux d'hypoxie sécrétés par les cellules de la construction. Mais cette angiogenèse spontanée est limitée et lente (quelques microns par jour), ce qui signifie qu'il faudra des semaines pour vasculariser complètement un implant de quelques millimètres [Rouwkema et al., 2008]. Ceci peut conduire à une mauvaise intégration, voire à la mort des cellules de la construction. Aussi, les succès cliniques de l'ingénierie tissulaire sont souvent retrouvés dans le cas de tissus peu ou pas vascularisés comme la peau et le cartilage pour lesquels la néovascularisation post implantaire provenant de l'hôte, est suffisante pour assurer la croissance cellulaire [Jain et al., 2005]. Afin de permettre le succès clinique de l'implantation de tissus de grande taille, le problème de leur vascularisation doit donc être résolu.

Plusieurs stratégies permettant de favoriser la vascularisation d'un produit d'ingénierie tissulaire ont été envisagées (Figure 35), pour revues voir [Rouwkema et al., 2008] [Santos and Reis, 2009]:

1- L'architecture de l'échaffaudage :

L'architecture de la matrice a un fort impact dans le taux de vascularisation après implantation, en particulier, la taille des pores et leur interconnectivité [Druecke et al., 2004] [Karageorgiou and Kaplan, 2005]. Narayan et al. ont montré *in vitro* que la croissance des CEs était favorisée par des pores de faible taille avec une distance inter-pores réduite [Narayan and Venkatraman, 2008]. Des résultats similaires ont

été rapportés pour des ostéoblastes où de faibles porosités stimulent l'ostéogenèse en supprimant la prolifération cellulaire *in vitro* [Karageorgiou and Kaplan, 2005]. Cependant, le scénario *in vivo* semble totalement différent puisque des porosités importantes et des distances élevées entre les pores entraînent une meilleure croissance des cellules osseuses et une meilleure vascularisation. Ceci s'explique par le fait qu'une fois implanté, le « scaffold » avec des pores de faible taille se trouve en condition d'hypoxie, ceci favorisant la chondrogenèse, alors que des pores de taille importante permettent une oxygénation plus élevée qui favorise la différenciation des CSMs vers le lignage ostéoblastique [Bonfield, 2006]. L'équipe de RL. Reis a montré que des échaffaudages en polycaprolactone combinant des nanofibres capables de donner le support mécanique à la reconstruction osseuse et des microfibres mimant la MEC, sont particulièrement pertinents pour une revascularisation [Tuzlakoglu et al., 2005].

2- La libération de facteurs de croissance angiogènes :

La formation de nouveaux vaisseaux dans une construction peut être favorisée par des facteurs de croissance, tels le VEGF et le bFGF, capables de stimuler la mobilisation et le recrutement des EPCs et de ce fait favoriser l'angiogenèse [Jain et al., 2005]. Cependant, les vaisseaux ainsi formés sont souvent désorganisés et doivent être stabilisés. La stabilisation du réseau vasculaire formé peut se faire par la libération de facteurs tels que le platelet-derived growth factor (PDGF) responsable du recrutement des CMLs et des péricytes ; le transforming growth factor β (TGF- β) ayant un rôle dans la production de matrice extracellulaire et d'angiopoïétine-1 [Carmeliet, 2000; Hirschi et al., 2002]. La libération combinée de VEGF et PDGF a montré la formation d'un plus grand nombre de vaisseaux matures dans des matrices en poly(lactide-co-glycolide) (PLG) implantées chez la souris [Chen et al., 2007]. En plus du type de facteur, un aspect important est la dose délivrée. En effet, une exposition à des doses très élevées de VEGF entraîne la formation de vaisseaux poreux d'architecture anarchique [Zisch et al., 2003]. Ainsi, une thérapie proangiogène efficace et sûre dépend de la combinaison des facteurs mais aussi du contrôle dose/durée de leur sécrétion.

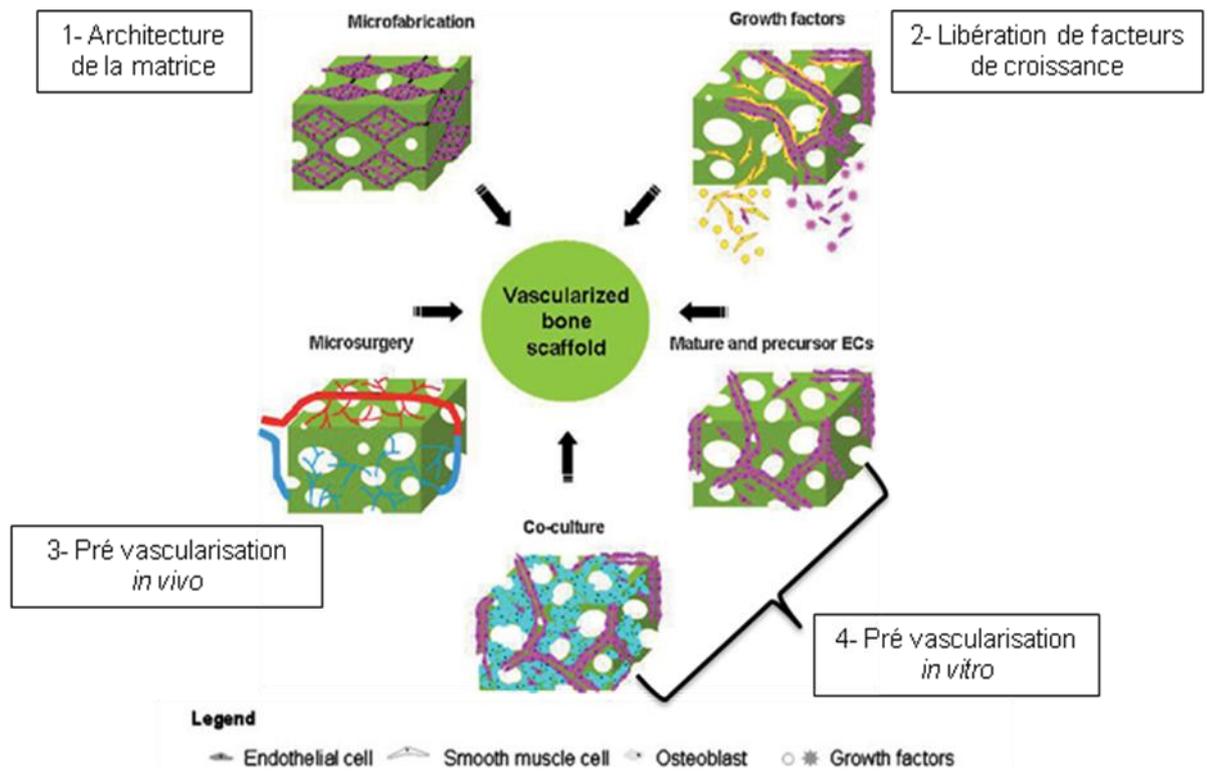


Figure 35 : Les stratégies de vascularisation d'un produit d'ingénierie tissulaire
[Santos and Reis, 2009]

3- La prévascularisation *in vivo* :

La construction est implantée dans un premier temps à proximité d'un site très vascularisé (boucle artério-veineuse), généralement un muscle [Scheufler et al., 2008]. Les capillaires issus du receveur se développent dans la matrice. Dans un deuxième temps, la construction avec le réseau capillaire qui s'est développé, est collectée et réimplantée au niveau du site receveur avec anastomoses microchirurgicales entre le pédicule vasculaire et les vaisseaux du receveur. Après implantation dans le site final, le produit d'ingénierie tissulaire est immédiatement perfusé, cependant, deux étapes chirurgicales sont requises et le muscle du site donneur doit souvent être sacrifié [Ren et al., 2008] [Kneser et al., 2006b] [Kneser et al., 2006a]. Warnke *et al.* ont rapporté grâce à ce principe, un essai clinique de reconstruction mandibulaire par une matrice contenant des facteurs de croissance et des cellules souches de la moelle osseuse du patient, implanté dans le muscle grand dorsal puis transféré en position mandibulaire [Warnke et al., 2004] [Warnke et al., 2006].

4- La prévascularisation *in vitro*

Cette stratégie est basée sur la constatation que les CE sont capables de former des structures pré-vasculaires *in vitro* quand elles sont cultivées dans de bonnes conditions. L'ajout *in vitro* de CE dans une matrice entraîne la formation d'un réseau prévasculaire capable de s'anastomoser spontanément avec le réseau vasculaire de l'hôte après implantation [Levenberg et al., 2005] [Tremblay et al., 2005]. Grâce à cette approche, les vaisseaux de l'hôte n'ont pas besoin de se développer à l'intérieur de la construction mais simplement au niveau périphérique. Cette stratégie a été utilisée par plusieurs équipes pour favoriser la revascularisation *in vitro* de peau, de muscle squelettique et cardiaque, et d'os. Pour revue voir [Rouwkema et al., 2008]. Dans la plupart des cas, des CE sont co-cultivées dans une matrice avec les cellules du type de tissu que l'on souhaite former. Il est donc fondamental de trouver les conditions de culture adéquates permettant à la fois le développement d'un réseau vasculaire et le développement du tissu issu de l'ingénierie. L'utilisation de facteurs de croissances doit être minimisée car ils peuvent influencer la différenciation cellulaire vers un autre type que celui attendu. Ainsi, l'utilisation de VEGF peut entraîner une différenciation de CSMs (classiquement utilisées en ingénierie du tissu osseux comme précurseurs des cellules osseuses) vers un phénotype endothélial au lieu d'induire un phénotype ostéoblastique [Oswald et al., 2004].

En ce qui concerne l'ingénierie du tissu osseux, il a été montré que la co-culture entre des HUVECs et des CSMs humaines entraînent la formation de structures pré-vasculaires capables de s'organiser en structures stables après implantation chez la souris, même si les anastomoses avec les capillaires de l'hôte restent limitées [Rouwkema et al., 2006]. *In vitro*, des CE en co-culture avec des ostéoblastes sont capables de former dans des « scaffolds », des structures de type « capillaire-like » qui peuvent rester stables au moins 42 jours en culture. De plus, la complexité des structures formées est confirmée par la présence d'une lumière vasculaire et par l'expression dans la région périvasculaire de collagène de type IV, un des constituants majeurs de la MEC [Santos et al., 2008] [Unger et al., 2007] [Hofmann et al., 2008]. Concernant le type de communication entre ces deux types cellulaires, il a été montré que les ostéoblastes, en co-culture, secrètent des taux plus élevés de VEGF que lorsqu'ils sont en monoculture [Santos et al., 2009]. Un des avantages

de cette technique est que les deux types cellulaires sont capables de re-créer l'environnement physique et chimique favorable à la formation des structures capillaires-like, sans ajout de stimuli angiogènes exogènes.

Un autre aspect crucial de ces co-cultures pour la prévascularisation de produits d'ingénierie tissulaire, est le choix de la source de CEs : des cellules totalement différenciées [Unger et al., 2007] [Hofmann et al., 2008] ou des cellules progénitrices provenant de différentes sources [Mifune et al., 2008].

Si généralement les sources de CEs et de cellules ost  blastiques diff  rent, d'un point de vue clinique, il serait plus intéressant d'utiliser des cellules provenant de la même source comme cela a été décrit pour la moelle osseuse et le tissu adipeux [Yu et al., 2008] [Scherberich et al., 2007].

Aujourd'hui, aucune de ces quatre méthodes ne présente de supériorité évidente. Afin d'augmenter les chances de succès de revascularisation du tissu issu de l'ingénierie tissulaire, la solution est certainement d'associer plusieurs de ces stratégies. Car, le but n'est pas tant d'obtenir un réseau vasculaire qu'un réseau vasculaire fonctionnel et capable de maturation.

Les travaux réalisés au sein de l'unité Inserm U577 concernant l'ingénierie du tissu osseux vascularisé tendent à utiliser les stratégies 1, 2 et 4 et principalement la méthode de prévascularisation *in vitro*. Différentes études menées au laboratoire ont montré que la co-culture directe entre des CEs de type HUVEC et des ost  prog  niteurs issus de la moelle osseuse (HOPs), entraine une régulation du phénotype ost  blastique avec une augmentation des marqueurs ost  blastiques : phosphatase alcaline (PAL) et collagène de type I [Guillotini et al., 2004] [Villars et al., 2000]. De plus, les HUVECs et les HOPs en co-culture sont capables d'établir des jonctions communicantes entre elles et ceci principalement grâce aux connexines 43 [Villars et al., 2002] [Guillotini et al., 2004]. Le réarrangement observé entre ces deux types cellulaires n'a été obtenu que lorsque les cellules ost  prog  nitrices sont en co-culture avec des cellules de type endothélial (HSVECs ou HUVECs) [Guillotini et al., 2004]. Notre groupe a aussi montré que dans des co-cultures HUVECs-HOPs, les CEs étaient capables de migrer le long des HOPs et que le gène du VEGF était surexprimé dans les co-cultures [Grellier et al., 2009].

Concernant les travaux intégrant des EPCs à des co-cultures, différents groupes, dont celui du Pr Kirkpatrick, ont utilisé des EPCs tardifs et des ostéoblastes primaires humains en co-cultures *in vitro* dans des « scaffolds » de fibres de fibroïne de soie afin d'étudier la dynamique temporelle de la formation de structures de type vasculaire ainsi que l'apparition de marqueurs endothéliaux et ostéoblastiques. Ils ont constaté une diminution (au niveau des ARN) des marqueurs endothéliaux (PECAM, vWF), une diminution des marqueurs ostéoblastiques précoces (phosphatase alcaline, collagène de type I et ostéonectine) et une augmentation des marqueurs tardifs (ostéocalcine et ostéopontine) après 4 semaines de co-culture [Fuchs et al., 2009]. Récemment, Rouwkema *et al.* ont montré que dans des sphéroïdes d'HUVECs et de CSMh, l'ajout de progéniteurs endothéliaux de sang de cordon favorisait la formation de structures prévasculaires. Cependant, le pourcentage d'ensemencement ainsi que le degré de différenciation des EPCs étaient des éléments fondamentaux, les structures de type prévasculaire, caractérisées par l'expression du CD31 ne se formant pas avec des EPCs peu différenciés [Rouwkema et al., 2009].

Dans la poursuite des travaux réalisés au laboratoire concernant les co-cultures ostéo-endothéliales et pour compléter notre travail sur les PDECs, nous avons souhaité étudier si les PDECs pourraient être des acteurs pertinents pour l'ingénierie des microvaisseaux et la revascularisation de tissu osseux. Le travail que nous présentons est pour l'instant préliminaire et demande quelques confirmations avant soumission.

B. ARTICLE

NB. Thébaud, R. Siadous, R. Bareille, J. Amédée, L. Bordenave: « *Human progenitor derived endothelial cells are not suitable for inducing osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells* ». En préparation.

C. CONCLUSIONS

Le but de ces travaux préliminaires a été de déterminer l'impact des PDECs sur la différenciation de cellules souches du stroma médullaire (HBMSCs) et d'ostéoprogéniteurs humains (HOP) après 7 et 21 jours de co-culture. L'observation du marqueur de différenciation ostéoblastique précoce PAL (phosphatase alcaline) ne nous a pas permis de définir un impact des PDECs sur la différenciation des HBMSCs. En effet, la PAL est beaucoup plus exprimée sur des HBMSCs dans leur milieu de différenciation qu'en co-culture avec des PDECs. La confrontation à 7 jours entre les marquages de la PAL et du vWF permet d'observer une organisation des PDECs en « clusters » situés sur les HOPs. Après 14 et 21 jours de culture, la morphologie des PDECs est modifiée. Ils ne forment plus une monocouche pavimenteuse mais des structures de type « tubular-like » qui semblent s'organiser en réseaux. A l'issue de ces 21 jours de co-culture, la minéralisation n'est observée que dans les co-cultures HOPs/PDECs.

Au niveau de l'expression des ARNm, les PDECs sont capables d'exprimer le facteur de Willebrand en co-culture, dans un milieu non supplémenté en VEGF. Cependant, l'expression des deux autres marqueurs endothéliaux (CD31 et VE-cadhérine) est totalement inhibée après 7 et 21 jours de co-culture aussi bien avec les HOPs qu'avec les HBMSCs. Ceci peut correspondre aux résultats que nous avons obtenus concernant la caractérisation des PDECs (articles 2 et 3), puisque la VE-cadhérine n'était exprimée (au niveau de l'ARNm et des protéines) qu'en présence d'une monocouche parfaitement confluente de PDECs. Le seul marqueur ostéoblastique à être régulé après 21 jours de co-culture est l'ostéocalcine. Une surexpression de la connexine 43 est observée après 48h et 7 jours de co-culture entre des HOPs et des PDECs.

D'autres études doivent être menées, en particulier pour déterminer l'expression de la connexine 43 après 21 jours de co-culture. En effet, ce paramètre est intéressant puisque la communication ostéo-endothéliale est essentielle pour permettre une réponse cellulaire coordonnée et la mise en place d'un réseau entre ces deux types cellulaires, favorisant le développement et le remodelage osseux. De plus, dans les co-cultures, le ratio d'ensemencement HOP/PDECs et HBMSCs/PDECs était de 1/2, il est nécessaire de l'augmenter pour déterminer si un impact des PDECs sur la différenciation des HBMSCs pourrait être obtenu avec davantage de cellules.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail de thèse était de déterminer si les cellules endothéliales issues de progéniteurs endothéliaux humains pouvaient être des acteurs pertinents en ingénierie vasculaire. Ce travail s'inscrit dans une optique thérapeutique afin de réduire, grâce à leur endothélialisation, le caractère thrombogène des prothèses actuellement utilisées en clinique comme substituts vasculaires.

Par ce travail, nous avons obtenu des cellules à phénotype endothélial mature à partir de progéniteurs endothéliaux de différentes origines (moelle osseuse et sang périphérique), présentant des marqueurs de CEs matures, capables de résister et de répondre à des contraintes mécaniques de type shear stress, par une régulation de l'expression des gènes et des protéines, sur différents revêtements. Après de longs mois de recherche pour obtenir des CEs issues de progéniteurs endothéliaux à partir de prélèvements de moelle osseuse, malgré quelques succès (1,5%), nous avons été contraints d'abandonner cette source, le taux d'échec étant beaucoup trop élevé. A l'issue d'un séjour à l'Institute of Pathology de Mainz en Allemagne, nous avons mis au point au laboratoire une technique nous permettant d'obtenir une différenciation de progéniteurs endothéliaux, issus de sang périphérique humain, en CEs de type mature (PDECs). Les marqueurs nous autorisant à définir ces cellules comme étant des cellules endothéliales issues de progéniteurs ont été étudiés en immunofluorescence *in situ*, en cytométrie en flux, ainsi qu'au niveau de l'expression des ARNm par des techniques de MacroArray complétées par des PCR quantitatives en temps réel. Ces PDECs présentent tous les marqueurs classiquement utilisés pour définir ce type cellulaire : vWF, CD31 (PECAM), VE-cadhérine, capacité à former des tubes dans du matrigel. Ce caractère phénotypique est maintenu jusqu'au passage 30, sans modification en conditions statiques ou sous contraintes de cisaillement. Ces PDECs qui possèdent les caractéristiques de CEs matures, ne peuvent cependant pas être amplifiées dans les conditions de culture de cellules matures de type HSVECs puisque le VEGF est indispensable à leur croissance. Sur des revêtements utilisés en chirurgie vasculaire pour l'induction de prothèses, tels le collagène I et la colle de fibrine, ainsi que sur un revêtement plus expérimental (Multicouches de PolyElectrolytes), ces PDECs sont capables de former une monocouche confluyente et de résister à des contraintes de cisaillement de type artériel. L'analyse de gènes reflétant la biologie de l'endothélium nous a permis de montrer des modifications, en fonction des revêtements, de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, l'activité des

cytokines, la balance hémostatique, l'expression de molécules d'adhérence, de molécules interagissant avec la MEC, et de molécules antiapoptotiques. Il apparaît que la majorité des gènes modifiés par la contrainte de cisaillement choisie, appartient à la catégorie des gènes impliqués dans la régulation de la balance hémostatique. Concernant l'expression de ces gènes impliqués dans la cascade de la coagulation et le système fibrinolytique, l'expression de l'ARNm de la thrombomoduline est plus élevée sur collagène et MPEs que sur colle de fibrine. L'expression de l'ARNm du tPA est la plus élevée sur le collagène de type I. La surexpression, induite par le « shear stress », du facteur tissulaire est comparable sur les trois supports. D'un point de vue général, ces contraintes modifient davantage l'expression des gènes des PDECs que celle des gènes des CEs matures (HSVECs). Parmi les exceptions, nous pouvons noter que la surexpression de la SOD (super oxyde dismutase) induite par les contraintes concerne les CEs matures et non les PDECs. Ce résultat peut sembler en contradiction avec nos résultats ayant montré en conditions statiques, que les PDECs résistent mieux au stress oxydatif que les HSVECs. Cependant, en conditions statiques, l'ARNm de la SOD n'est exprimé que dans les PDECs alors qu'il est fortement surexprimé après exposition au flux dans les cellules matures.

Pour permettre l'utilisation des ces PDECs dans le cadre de l'ingénierie des macrovaisseaux, comme par exemple l'endothélisation de prothèses vasculaires, leurs propriétés antithrombogènes sont fondamentales. L'activité de deux protéines anti-(thrombomoduline) et pro-coagulantes (facteur tissulaire) est régulée à la fois par le support sur lequel les PDECs ont étéensemencés et par l'exposition à des contraintes de cisaillement. L'activité de la thrombomoduline et du facteur tissulaire est plus importante après exposition au flux sur collagène. L'activité de la thrombomoduline sur MPEs n'est pas modifiée par la contrainte de cisaillement mais son activité basale y est trois fois plus élevée que sur collagène et sur colle de fibrine. De plus, les PDECs sont capables de former, sur des prothèses vasculaires enduites de collagène (InterGard) utilisées cliniquement, une monocouche confluyente qui résiste à une contrainte de cisaillement de type artériel.

Ce modèle de CEs issues de progéniteurs de sang périphérique humain est maintenant disponible au laboratoire, avec la constitution d'une banque de cellules mise à disposition pour d'autres travaux et projets portant à la fois sur l'ingénierie des substituts vasculaires hybrides et sur l'ingénierie du tissu osseux vascularisé. Concernant ce dernier

domaine, les premiers résultats obtenus à partir des co-cultures HBMSCs/PDECs ne nous permettent pas actuellement de définir les PDECs comme étant des cellules capables de favoriser la différenciation ostéoblastique. Cependant, les co-cultures HOPs/PDECs permettent de maintenir, après trois semaines, des PDECs qui expriment toujours le facteur de Willebrand dans un milieu qui, a priori, ne leur est pas favorable puisque nous avons présenté dans le deuxième article que ces cellules perdaient tous les marqueurs endothéliaux au bout de quelques jours dans un milieu sans VEGF.

Aujourd'hui, si peu des essais mis en place ont atteint le stade de l'application clinique, des progrès encourageants ont cependant été réalisés dans le domaine de l'ingénierie vasculaire permettant d'envisager le développement du substitut vasculaire idéal. Pourtant « le chemin est encore long jusqu'au sommet » [Aper et al., 2009]. En effet, l'endothélialisation de prothèses vasculaires requiert un nombre très élevé de cellules (qu'elles soient matures ou issues de progéniteurs) et l'obtention des PDECs reste aléatoire. Nos travaux, à ce jour, ne nous permettent pas d'obtenir des CEs issues de progéniteurs endothéliaux pour tous les prélèvements sanguins effectués. De plus, dans le cas de prélèvements où nous en obtenons, l'amplification des PDECs ne serait pas toujours suffisante pour permettre une utilisation clinique.

Mais ces difficultés d'obtention et d'amplification ne sont pas les seules que ces cellules soulèvent. Découvertes il y a un peu plus de 10 ans, leur identité reste encore imprécise. Comme nous l'avons constaté à plusieurs reprises, aujourd'hui encore, la dénomination « EPC » peut finalement recouvrir des réalités cellulaires différentes, en raison des multiples termes sous lesquels ces cellules apparaissent dans la littérature (Tableau 11, page 93). D'après les définitions admises actuellement, les cellules que nous avons étudiées et caractérisées seraient des EPCs tardifs encore dénommées cellules dérivées de progéniteurs endothéliaux, le terme souvent employé de CEs issues ou dérivées de progéniteurs endothéliaux serait donc peut-être un peu abusif, ces cellules ne pouvant pas être considérées avec certitude comme des CEs matures. Si ces EPCs restent difficiles à définir, c'est probablement en raison de l'absence de marqueur de surface spécifique et unique ou de déterminants moléculaires permettant un isolement prospectif de ces cellules progénitrices [Yoder, 2009]. Possédant à la fois des marqueurs de CSH, de CSM et de CE, les EPCs sont hétérogènes [Riha et al., 2005]. De plus leurs caractéristiques sont différentes en fonction de leur source d'isolement [Au et al., 2008] (sang périphérique,

sang de cordon ombilical, moelle osseuse...). Ces problématiques freinent sans doute l'utilisation des conclusions rapportées dans la littérature actuelle concernant ces EPCs. Une meilleure caractérisation de ces cellules faciliterait l'isolement des cellules progénitrices les plus propices à une utilisation en ingénierie. En effet, une définition exacte du phénotype EPC est fondamentale dans le cadre de la médecine régénératrice car les résultats incertains obtenus dans les essais cliniques réalisés pourraient dépendre de la sélection et de la « préparation » approximative des EPCs utilisés [Rosenzweig, 2006]. Chez l'homme, les progrès permettant de mieux définir le rôle des EPCs chez un sujet sain ou atteint de pathologie, nécessiteront une amélioration des protocoles de cytométrie en flux rendant possibles la quantification de ces cellules rares, une meilleure validation du type cellulaire et la poursuite des recherches afin de définir « le » marqueur de surface de ces rares progéniteurs endothéliaux circulants, capables *in vivo* de former des vaisseaux [Yoder and Ingram, 2009].

Le temps est peut-être venu soit de redéfinir, soit d'abandonner cette terminologie d'« EPC », tant que le ou les marqueurs spécifiques permettant de définir ces cellules n'auront pas été mis en évidence [Hirschi et al., 2008][Yoder and Ingram, 2009]. Comme l'écrivaient déjà en 2006, Leor *et al.* : « Le manque de consensus méthodologique concernant les EPCs nous empêche de partager le même langage sans lequel nous courons le risque de continuer à bâtir une structure scientifique ayant la fragilité de la Tour de Babel » [Leor and Marber, 2006].

Concernant nos perspectives, les travaux initiés sur les co-cultures vont bien sûr être poursuivis afin de déterminer si les CEs issues de progéniteurs endothéliaux associées à des cellules de type ostéoprogénitrices, pourraient favoriser le développement d'un réseau vasculaire dans le cadre de l'ingénierie de l'os vascularisé. En effet, nos résultats actuels montrent une organisation en réseaux des PDECs quand ils sont cultivés avec des HOPs. Les rôles biologiques précis des différents EPCs (précoces, tardifs) seuls ou en co-culture devront être clairement définis afin d'ouvrir des nouvelles voies à la thérapie par ingénierie tissulaire. Aussi, souhaitons-nous poursuivre la caractérisation des PDECs en vue de leur utilisation en ingénierie des macrovaisseaux. En effet, la réponse rapide de l'hôte face à l'implantation d'un biomatériau est une inflammation qui peut conduire, si elle est chronique, à la dysfonction et à la dégradation du biomatériau. L'activation du

complément est une des causes majeures d'initiation d'une réaction inflammatoire délétère à la surface d'un biomatériau (Figure 36).

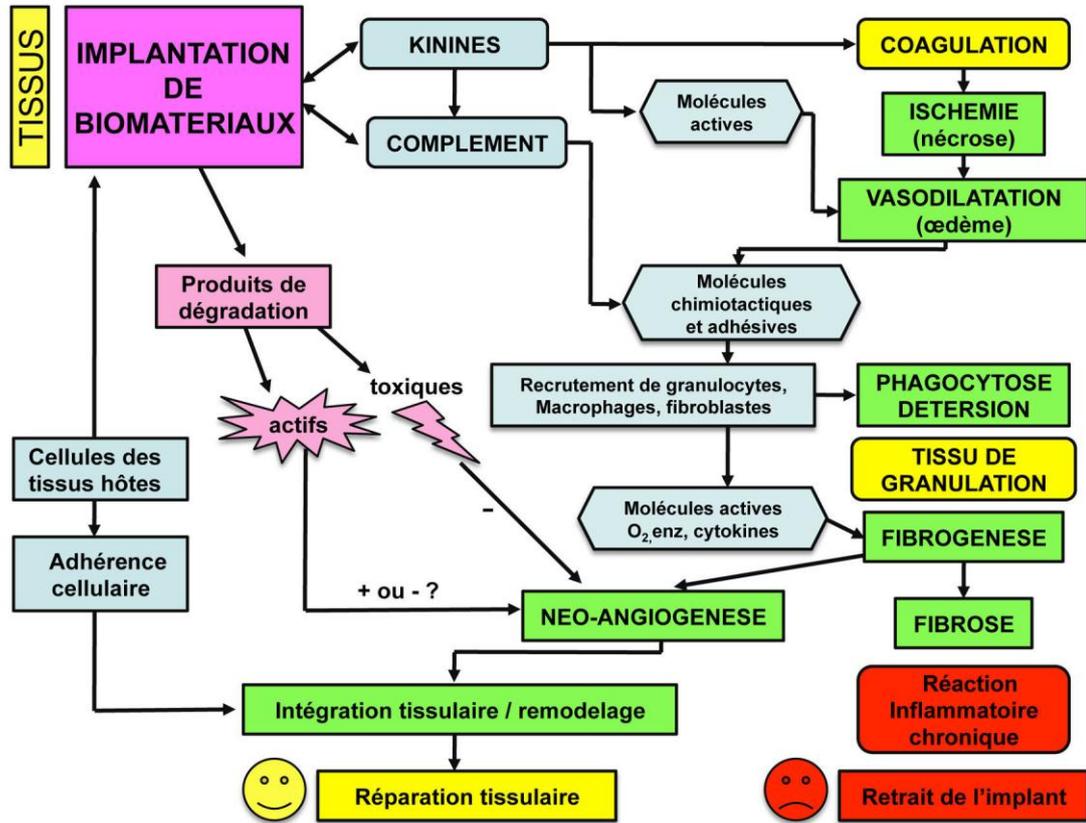


Figure 36 : Mécanismes sollicités dans la réparation tissulaire après lésion tissulaire ou implantation de biomatériaux (d'après C. Baquey, données personnelles).

Après implantation d'un biomatériau, se produit une étape de coagulation avec la création d'un hématome. La sécrétion de kinines va activer la synthèse de molécules actives comme le NO qui va agir sur le tonus vasculaire. La réponse inflammatoire en réponse à la lésion tissulaire intervient après activation du système du complément et la sécrétion de molécules chimiotactiques permettant la mobilisation de cellules souches au site de lésion. Des cellules phagocytaires (macrophages, granulocytes...) sont recrutées et permettent l'étape de détertion. La synthèse de collagène par les fibroblastes donne naissance à un tissu de granulation ou tissu fibreux. Ce tissu n'est pas permanent et doit être remodelé. Des enzymes telles que les MMPs et des cytokines comme les interleukines sont libérées et stimulent la dégradation de ce tissu fibreux. Deux processus peuvent alors intervenir, la néo-angiogenèse du tissu ou une persistance de la fibrogenèse conduisant à une fibrose et à une réaction inflammatoire chronique (qui implique le retrait de l'implant). Le biomatériau doit interagir avec le microenvironnement du tissu hôte, il doit influencer la néo-angiogenèse par la libération de molécules actives et sa colonisation par les cellules du tissu hôte doit être favorisée, afin de permettre la biointégration du substitut.

Il est donc nécessaire d'étudier de quelle façon les substituts vasculaires endothélialisés avec des PDECs sont capables d'activer les plaquettes et le système du complément dans le processus d'initiation de l'inflammation. L'activation potentielle du complément par des substituts vasculaires, endothélialisés avec des CEs matures ou issues de progéniteurs de sang périphérique humain, sera étudiée à l'intérieur de chambres de flux en trois dimensions (Oligene®) disponibles au laboratoire. Ce travail constitue l'un des projets du laboratoire dans le futur plan quadriennal.

Aussi, à l'issue de ce travail, reste-t-il difficile de répondre de façon précise à la question initialement posée, en particulier en raison des problèmes de définitions soulevés. Cependant, si les CEs issues de progéniteurs ne sont peut-être pas, encore aujourd'hui, des acteurs pertinents dans le cadre clinique de l'ingénierie vasculaire et plus précisément de l'endothélialisation des substituts vasculaires, elles sont assurément des acteurs pertinents dans le cadre de la recherche en ingénierie tissulaire et médecine régénérative.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

Human Endothelial Progenitor cells attachment to polysaccharide-based hydrogels: a pre-requisite for vascular tissue engineering. NB. Thébaud, D. Pierron, R. Bareille, C. Le Visage, D. Letourneur, L. Bordenave. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2007, Feb, 18 (2):339-45.

Polyelectrolyte multilayer films allow seeded human progenitor derived endothelial cell to remain functional under shear stress in vitro. NB. Thébaud, R. Bareille, R. Daculsi M. Rémy, Ch. Bourget, H. Kerdjoudj, P. Menu, L. Bordenave. Acta Biomaterialia (sous presse).

Human progenitor derived endothelial cells versus venous endothelial cells for vascular tissue engineering: an in vitro study. NB. Thébaud, R. Bareille, M. Rémy, Ch. Bourget, R. Daculsi, L. Bordenave. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine (sous presse).

Human progenitor derived endothelial cells are not suitable for inducing osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. NB. Thébaud, R. Siadous, R. Bareille, J. Amédée, L. Bordenave. En préparation.

Communications orales

Human progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels : a pre-requisite for vascular tissue engineering. NB. Thébaud, D. Pierron, R. Bareille, C. Le Visage, D. Letourneur, L. Bordenave. 20^{ème} congrès de l'European Society of Biomaterials (ESB). Nantes, septembre 2006.

Cellules progénitrices endothéliales issues de sang périphérique humain : applications à l'ingénierie vasculaire. NB. Thébaud, M. Remy, R. Bareille, C. Bourget, R. Daculsi, L. Bordenave. 9^{ème} Forum de jeunes chercheurs en Odontologie, Nantes 2008.

Gene expression profiling of human EPCs lining polyelectrolyte films and exposed to pulsatile laminar flow. NB. Thébaud, R. Bareille, Ch. Bourget, H. Kerdjoudj, M. Rémy-Zolghadri, R. Daculsi, P. Menu, L. Bordenave. 24^{ème} congrès de l'European Society of Biomaterials (ESB), Lausanne, septembre 2009.

Progéniteurs endothéliaux issus de sang périphérique humain : applications à l'ingénierie tissulaire. NB. Thébaud, M. Remy, R. Bareille, C. Bourget, R. Daculsi, L. Bordenave. Congrès ADF 2009.

Communication affichée

“Human peripheral blood Progenitor Derived Endothelial Cells in Response to Shear Stress Conditions : Sensitivity at mRNA Level”. NB. Thébaud, R. Bareille, C. Bourget, M. Rémy, S. Fuchs, L. Bordenave. 11th Biennial Meeting ISACB (International Society for Applied Cardiovascular Biology), Bordeaux 2008.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, W. M., R. M. Green, T. Matsumoto, J. R. Wheeler, N. Miller, F. J. Veith, W. D. Suggs, L. Hollier, S. Money, and H. E. Garrett, 1997, Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: results of a multicenter randomized prospective trial. Above-Knee Femoropopliteal Study Group: *J Vasc Surg*, v. 25, p. 19-28.
- Abbott, W. M., J. Megerman, J. E. Hasson, G. L'Italien, and D. F. Warnock, 1987, Effect of compliance mismatch on vascular graft patency: *J Vasc Surg*, v. 5, p. 376-82.
- Ahmed, T. A., M. Griffith, and M. Hincke, 2007, Characterization and inhibition of fibrin hydrogel-degrading enzymes during development of tissue engineering scaffolds: *Tissue Eng*, v. 13, p. 1469-77.
- Aicher, A., M. Rentsch, K. Sasaki, J. W. Ellwart, F. Fandrich, R. Siebert, J. P. Cooke, S. Dimmeler, and C. Heeschen, 2007, Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia: *Circ Res*, v. 100, p. 581-9.
- Aird, W. C., 2007, Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms: *Circ Res*, v. 100, p. 158-73.
- Ait-Oufella, H., E. Maury, B. Guidet, and G. Offenstadt, 2008, The endothelium: A new organ: *Réanimation*, v. 17, p. 126-136.
- Akimaru, K., M. Onda, T. Tajiri, H. Yoshida, Y. Mamada, N. Tani, M. Yoshioka, and S. Mineta, 2000, Reconstruction of the vena cava with the peritoneum: *Am J Surg*, v. 179, p. 289-93.
- Allaire, E., and A. W. Clowes, 1997, Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the intimal hyperplastic response: *Ann Thorac Surg*, v. 63, p. 582-91.
- Allen, B. T., C. J. Mathias, G. A. Sicard, M. J. Welch, and R. E. Clark, 1986, Platelet deposition on vascular grafts. The accuracy of in vivo quantitation and the significance of in vivo platelet reactivity: *Ann Surg*, v. 203, p. 318-28.
- Aoki, J., P. W. Serruys, H. van Beusekom, A. T. Ong, E. P. McFadden, G. Sianos, W. J. van der Giessen, E. Regar, P. J. de Feyter, H. R. Davis, S. Rowland, and M. J. Kutryk, 2005, 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*, v. 45, p. 1574-9.
- Aper, T., A. Haverich, and O. Teebken, 2009, New developments in tissue engineering of vascular prosthetic grafts: *Vasa*, v. 38, p. 99-122.
- Aper, T., A. Schmidt, M. Duchrow, and H. P. Bruch, 2007, Autologous blood vessels engineered from peripheral blood sample: *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v. 33, p. 33-9.
- Arnulf, G., 1987, [Long-term results of Jean Kunlin's first venous autograft. Apropos of the report of M. J. Descotes et al.]: *Chirurgie*, v. 113, p. 751-2.
- Asahara, T., and A. Kawamoto, 2004, Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis: *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 287, p. C572-9.
- Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner, and J. M. Isner, 1999a, Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization: *Circ Res*, v. 85, p. 221-8.
- Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzgenbichler, G. Schatteman, and J. M. Isner, 1997, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis: *Science*, v. 275, p. 964-7.
- Asahara, T., T. Takahashi, H. Masuda, C. Kalka, D. Chen, H. Iwaguro, Y. Inai, M. Silver, and J. M. Isner, 1999b, VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells: *Embo J*, v. 18, p. 3964-72.
- Assmus, B., J. Honold, V. Schachinger, M. B. Britten, U. Fischer-Rasokat, R. Lehmann, C. Teupe, K. Pistorius, H. Martin, N. D. Abolmaali, T. Tonn, S. Dimmeler, and A. M. Zeiher, 2006, Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction: *N Engl J Med*, v. 355, p. 1222-32.

- Astrof, S., and R. O. Hynes, 2009, Fibronectins in vascular morphogenesis: *Angiogenesis*, v. 12, p. 165-75.
- Au, P., L.M. Daheron, D.G. Duda, K.S. Cohen, J.A. Tyrrell, R.M. Lanning, D. Fukumura, D.T. Scadden, R.J. Jain, 2008, Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels: *Blood*, v.111, p. 1302-5.
- Avci-Adali, M., A. Paul, G. Ziemer, and H. P. Wendel, 2008, New strategies for in vivo tissue engineering by mimicry of homing factors for self-endothelialisation of blood contacting materials: *Biomaterials*, v. 29, p. 3936-45.
- Bailey, A. S., and W. H. Fleming, 2003, Converging roads: evidence for an adult hemangioblast: *Exp Hematol*, v. 31, p. 987-93.
- Ballyk, P. D., C. Walsh, J. Butany, and M. Ojha, 1998, Compliance mismatch may promote graft-artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses: *J Biomech*, v. 31, p. 229-37.
- Bartling, B., H. Tostlebe, D. Darmer, J. Holtz, R. E. Silber, and H. Morawietz, 2000, Shear stress-dependent expression of apoptosis-regulating genes in endothelial cells: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 278, p. 740-6.
- Bellon, J. M., J. Bujan, N. G. Honduvilla, A. Hernando, and J. Navlet, 1993, Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular prostheses coated with a fibroblastic matrix: *Ann Vasc Surg*, v. 7, p. 549-55.
- Beltrami, A. P., L. Barlucchi, D. Torella, M. Baker, F. Limana, S. Chimenti, H. Kasahara, M. Rota, E. Musso, K. Urbanek, A. Leri, J. Kajstura, B. Nadal-Ginard, and P. Anversa, 2003, Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration: *Cell*, v. 114, p. 763-76.
- Berard, X., M. Remy-Zolghadri, C. Bourget, N. Turner, R. Bareille, R. Daculsi, and L. Bordenave, 2009, Capability of human umbilical cord blood progenitor-derived endothelial cells to form an efficient lining on a polyester vascular graft in vitro: *Acta Biomater*, v. 5, p. 1147-57.
- Berger, K., L. R. Sauvage, A. M. Rao, and S. J. Wood, 1972, Healing of arterial prostheses in man: its incompleteness: *Ann Surg*, v. 175, p. 118-27.
- Bilodeau, K., and D. Mantovani, 2006, Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A comparative review: *Tissue Eng*, v. 12, p. 2367-83.
- Blann, A. D., A. Woywodt, F. Bertolini, T. M. Bull, J. P. Buyon, R. M. Clancy, M. Haubitz, R. P. Heibel, G. Y. Lip, P. Mancuso, J. Sampol, A. Solovey, and F. Dignat-George, 2005, Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease: *Thromb Haemost*, v. 93, p. 228-35.
- Bleiziffer, O., E. Eriksson, F. Yao, R. E. Horch, and U. Kneser, 2007, Gene transfer strategies in tissue engineering: *J Cell Mol Med*, v. 11, p. 206-23.
- Boccafoschi, F., J. Habermehl, S. Vesentini, and D. Mantovani, 2005, Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering: *Biomaterials*, v. 26, p. 7410-7.
- Bondar, B., S. Fuchs, A. Motta, C. Migliaresi, and C. J. Kirkpatrick, 2008, Functionality of endothelial cells on silk fibroin nets: comparative study of micro- and nanometric fibre size: *Biomaterials*, v. 29, p. 561-72.
- Bonello, L., A. Basire, F. Sabatier, F. Paganelli, and F. Dignat-George, 2006a, Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease: *J Thromb Haemost*, v. 4, p. 979-81.
- Bonello, L., F. Sabatier, A. Basire, F. Paganelli, and F. Dignat-George, 2006b, The imbalance between circulating endothelial cells and progenitors in cardiovascular diseases: a mirror of disrupted endothelial integrity: *Arch Mal Coeur Vaiss*, v. 99, p. 607-13.
- Boneu, B. C., J.P., 1997, Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose. , Boehringer Ingelheim France, p. 8-15.

- Bonfield, W., 2006, Designing porous scaffolds for tissue engineering: *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*, v. 364, p. 227-32.
- Bordenave, L., P. Fernandez, M. Remy-Zolghadri, S. Villars, R. Daculsi, and D. Midy, 2005, In vitro endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization: *Clin Hemorheol Microcirc*, v. 33, p. 227-34.
- Bordenave, L., P. Menu, and C. Baquey, 2008, Developments towards tissue-engineered, small-diameter arterial substitutes: *Expert Rev Med Devices*, v. 5, p. 337-47.
- Boura, C., P. Menu, E. Payan, C. Picart, J. C. Voegel, S. Muller, and J. F. Stoltz, 2003, Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification: *Biomaterials*, v. 24, p. 3521-30.
- Bowers, S. L., I. Banerjee, and T. A. Baudino, 2009, The extracellular matrix: At the center of it all: *J Mol Cell Cardiol*.
- Britten, M. B., N. D. Abolmaali, B. Assmus, R. Lehmann, J. Honold, J. Schmitt, T. J. Vogl, H. Martin, V. Schachinger, S. Dimmeler, and A. M. Zeiher, 2003, Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging: *Circulation*, v. 108, p. 2212-8.
- Brown, M. A., C. S. Wallace, M. Angelos, and G. A. Truskey, 2009, Characterization of Umbilical Cord Blood Derived Late Outgrowth Endothelial Progenitor Cells Exposed to Laminar Shear Stress: *Tissue Eng Part A*, v.15, p. 3575-87.
- Butler, D. L., S. A. Goldstein, and F. Guilak, 2000, Functional tissue engineering: the role of biomechanics: *J Biomech Eng*, v. 122, p. 570-5.
- Campbell, J. B., J. L. Glover, and B. Herring, 1988, The influence of endothelial seeding and platelet inhibition on the patency of ePTFE grafts used to replace small arteries--an experimental study: *Eur J Vasc Surg*, v. 2, p. 365-70.
- Campbell, J. H., J. L. Efendy, and G. R. Campbell, 1999, Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity: *Circ Res*, v. 85, p. 1173-8.
- Canver, C. C., 1995, Conduit options in coronary artery bypass surgery: *Chest*, v. 108, p. 1150-5.
- Capoccia, B. J., A. D. Gregory, and D. C. Link, 2008, Recruitment of the inflammatory subset of monocytes to sites of ischemia induces angiogenesis in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent fashion: *J Leukoc Biol*, v. 84, p. 760-8.
- Carmeliet, P., 2000, Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis: *Nat Med*, v. 6, p. 389-95.
- Case, J., L. E. Mead, W. K. Bessler, D. Prater, H. A. White, M. R. Saadatzadeh, J. R. Bhavsar, M. C. Yoder, L. S. Haneline, and D. A. Ingram, 2007, Human CD34(+)AC133(+)VEGFR-2(+) cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors: *Exp Hematol*, v. 35, p. 1109-18.
- Cebotari, S., A. Lichtenberg, I. Tudorache, A. Hilfiker, H. Mertsching, R. Leyh, T. Breymann, K. Kallenbach, L. Maniuc, A. Batrinac, O. Repin, O. Maliga, A. Ciubotaru, and A. Haverich, 2006, Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells: *Circulation*, v. 114, p. 1132-7.
- Chakfe, N., F. Dieval, F. Thaveau, S. Rinckenbach, O. Hassani, G. Camelot, B. Durand, and J. G. Kretz, 2004, [Vascular graft prosthesis]: *Ann Chir*, v. 129, p. 301-9.
- Chan-Park, M. B., J. Y. Shen, Y. Cao, Y. Xiong, Y. Liu, S. Rayatpisheh, G. C. Kang, and H. P. Greisler, 2009, Biomimetic control of vascular smooth muscle cell morphology and phenotype for functional tissue-engineered small-diameter blood vessels: *J Biomed Mater Res A*, v. 88, p. 1104-21.
- Chaouat, M., C. Le Visage, A. Autissier, F. Chaubet, and D. Letourneur, 2006, The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats: *Biomaterials*, v. 27, p. 5546-53.

- Chaouat, m., C. Le Visage, W. E. Baille, B. Escoubet, F. Chaubet, M. A. Mateescu, and D. Letourneur, 2008, A novel cross-linked poly(vinyl alcohol) (PVA) for vascular grafts.: *Advanced Functional Materials*, v. 18, p. 2855-61.
- Chatzizisis, Y. S., A. U. Coskun, M. Jonas, E. R. Edelman, C. L. Feldman, and P. H. Stone, 2007, Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior: *J Am Coll Cardiol*, v. 49, p. 2379-93.
- Chen, R. R., E. A. Silva, W. W. Yuen, and D. J. Mooney, 2007, Spatio-temporal VEGF and PDGF delivery patterns blood vessel formation and maturation: *Pharm Res*, v. 24, p. 258-64.
- Chien, S., 2007, Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell: *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 292, p. H1209-24.
- Chien, S., 2008a, Effects of disturbed flow on endothelial cells: *Ann Biomed Eng*, v. 36, p. 554-62.
- Chien, S., 2008b, Role of shear stress direction in endothelial mechanotransduction: *Mol Cell Biomech*, v. 5, p. 1-8.
- Chien, S., S. Li, and Y. J. Shyy, 1998, Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells: *Hypertension*, v. 31, p. 162-9.
- Cho, S. W., 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, 2005, Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells: *Ann Surg*, v. 241, p. 506-15.
- Chollet, C., 2007, Intérêt de la maîtrise de la microtopochimie superficielle pour contrôler les interactions matériaux-tissus, Université Bordeaux 1 Bordeaux, 138 p.
- Chung, T. W., D. Z. Liu, S. Y. Wang, and S. S. Wang, 2003, Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale: *Biomaterials*, v. 24, p. 4655-61.
- Chupa, J. M., A. M. Foster, S. R. Sumner, S. V. Madhally, and H. W. Matthew, 2000, Vascular cell responses to polysaccharide materials: in vitro and in vivo evaluations: *Biomaterials*, v. 21, p. 2315-22.
- Clark, P., P. Connolly, A. S. Curtis, J. A. Dow, and C. D. Wilkinson, 1991, Cell guidance by ultrafine topography in vitro: *J Cell Sci*, v. 99 (Pt 1), p. 73-7.
- Couet, F., N. Rajan, and D. Mantovani, 2007, Macromolecular biomaterials for scaffold-based vascular tissue engineering: *Macromol Biosci*, v. 7, p. 701-18.
- Coultas, L., K. Chawengsaksophak, and J. Rossant, 2005, Endothelial cells and VEGF in vascular development: *Nature*, v. 438, p. 937-45.
- Cross, M. J., J. Dixelius, T. Matsumoto, and L. Claesson-Welsh, 2003, VEGF-receptor signal transduction: *Trends Biochem Sci*, v. 28, p. 488-94.
- Daamen, W. F., H. T. van Moerkerk, T. Hafmans, L. Buttafoco, A. A. Poot, J. H. Veerkamp, and T. H. van Kuppevelt, 2003, Preparation and evaluation of molecularly-defined collagen-elastin-glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering: *Biomaterials*, v. 24, p. 4001-9.
- Dahl, S. L., J. Koh, V. Prabhakar, and L. E. Niklason, 2003, Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation: *Cell Transplant*, v. 12, p. 659-66.
- Dahl, S. L., C. Rhim, Y. C. Song, and L. E. Niklason, 2007, Mechanical properties and compositions of tissue engineered and native arteries: *Ann Biomed Eng*, v. 35, p. 348-55.
- Dardik, H., 1995, The second decade of experience with the umbilical vein graft for lower-limb revascularization: *Cardiovasc Surg*, v. 3, p. 265-9.
- Davidovic, L., D. Vasic, R. Maksimovic, D. Kostic, D. Markovic, and M. Markovic, 2004, Aortobifemoral grafting: factors influencing long-term results: *Vascular*, v. 12, p. 171-8.
- Davies, M. G., and P. O. Hagen, 1994, Pathobiology of intimal hyperplasia: *Br J Surg*, v. 81, p. 1254-69.
- Davies, P. F., 1995, Flow-mediated endothelial mechanotransduction: *Physiol Rev*, v. 75, p. 519-60.

- Davies, P. F., 2009, Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology: *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, v. 6, p. 16-26.
- Davis, G. E., K. A. Pintar Allen, R. Salazar, and S. A. Maxwell, 2001, Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices: *J Cell Sci*, v. 114, p. 917-30.
- Davis, G. E., and D. R. Senger, 2005, Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization: *Circ Res*, v. 97, p. 1093-107.
- de Mel, A., G. Jell, M. M. Stevens, and A. M. Seifalian, 2008, Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review: *Biomacromolecules*, v. 9, p. 2969-79.
- De Palma, M., M. A. Venneri, C. Roca, and L. Naldini, 2003, Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells: *Nat Med*, v. 9, p. 789-95.
- Decher, G., 1997, Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites.: *Science*, v. 277, p. 1232-1237.
- Dejana, E., M. Corada, and M. G. Lampugnani, 1995, Endothelial cell-to-cell junctions: *Faseb J*, v. 9, p. 910-8.
- Dela Paz, N. G., and P. A. D'Amore, 2008, Arterial versus venous endothelial cells: *Cell Tissue Res*, v.335, p. 5-16.
- Delorme, B., A. Basire, C. Gentile, F. Sabatier, F. Monsonis, C. Desouches, M. Blot-Chabaud, G. Uzan, J. Sampol, and F. Dignat-George, 2005, Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells: *Thromb Haemost*, v. 94, p. 1270-9.
- Dernbach, E., C. Urbich, R. P. Brandes, W. K. Hofmann, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler, 2004, Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress: *Blood*, v. 104, p. 3591-7.
- Deutsch, M., J. Meinhart, T. Fischlein, P. Preiss, and P. Zilla, 1999, Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience: *Surgery*, v. 126, p. 847-55.
- Deutsch, M., J. Meinhart, P. Zilla, N. Howanietz, M. Gorlitzer, A. Froeschl, A. Stuempflen, D. Bezuidenhout, and M. Grabenwoeger, 2009, Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts: *J Vasc Surg*, v. 49, p. 352-62; discussion 362.
- Dichek, D. A., J. Anderson, A. B. Kelly, S. R. Hanson, and L. A. Harker, 1996, Enhanced in vivo antithrombotic effects of endothelial cells expressing recombinant plasminogen activators transduced with retroviral vectors: *Circulation*, v. 93, p. 301-9.
- Dimmeler, S., A. Aicher, M. Vasa, C. Mildner-Rihm, K. Adler, M. Tiemann, H. Rutten, S. Fichtlscherer, H. Martin, and A. M. Zeiher, 2001, HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway: *J Clin Invest*, v. 108, p. 391-7.
- Divya, P., P. R. Sreerekha, and L. K. Krishnan, 2007, Growth factors upregulate deposition and remodeling of ECM by endothelial cells cultured for tissue-engineering applications: *Biomol Eng*, v. 24, p. 593-602.
- Donaldson, M. C., J. A. Mannick, and A. D. Whittemore, 1991, Femoral-distal bypass with in situ greater saphenous vein. Long-term results using the Mills valvulotome: *Ann Surg*, v. 213, p. 457-64; discussion 464-5.

- Druecke, D., S. Langer, E. Lamme, J. Pieper, M. Ugarkovic, H. U. Steinau, and H. H. Homann, 2004, Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy: *J Biomed Mater Res A*, v. 68, p. 10-8.
- Drury, J. L., and D. J. Mooney, 2003, Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications: *Biomaterials*, v. 24, p. 4337-51.
- Dunn, P. F., K. D. Newman, M. Jones, I. Yamada, V. Shayani, R. Virmani, and D. A. Dichek, 1996, Seeding of vascular grafts with genetically modified endothelial cells. Secretion of recombinant TPA results in decreased seeded cell retention in vitro and in vivo: *Circulation*, v. 93, p. 1439-46.
- Eguchi, M., H. Masuda, and T. Asahara, 2007, Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis: *Clin Exp Nephrol*, v. 11, p. 18-25.
- Engler, A. J., F. Rehfeldt, S. Sen, and D. E. Discher, 2007, Microtissue elasticity: measurements by atomic force microscopy and its influence on cell differentiation: *Methods Cell Biol*, v. 83, p. 521-45.
- Erbs, S., A. Linke, V. Adams, K. Lenk, H. Thiele, K. W. Diederich, F. Emmrich, R. Kluge, K. Kendziorra, O. Sabri, G. Schuler, and R. Hambrecht, 2005, Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study: *Circ Res*, v. 97, p. 756-62.
- Ergun, S., and U. M. Gehling, 2007, Non-bone-marrow-derived endothelial progenitor cells: what is their exact location?: *Circ Res*, v. 101, p. e31.
- Fadini, G. P., I. Baesso, M. Albiero, S. Sartore, C. Agostini, and A. Avogaro, 2008, Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau: *Atherosclerosis*, v. 197, p. 496-503.
- Fernandez, P., A. Deguet, L. Pothuau, G. Belleanne, P. Coste, and L. Bordenave, 2005, Quality control assessment of ePTFE precoating procedure for in vitro endothelial cell seeding: *Biomaterials*, v. 26, p. 5042-7.
- Feugier, P., R. A. Black, J. A. Hunt, and T. V. How, 2005, Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress: *Biomaterials*, v. 26, p. 1457-66.
- Fields, R. C., A. Solan, K. T. McDonagh, L. E. Niklason, and J. H. Lawson, 2003, Gene therapy in tissue-engineered blood vessels: *Tissue Eng*, v. 9, p. 1281-7.
- Filip, S., D. English, and J. Mokry, 2004, Issues in stem cell plasticity: *J Cell Mol Med*, v. 8, p. 572-7.
- Fittkau, M. H., P. Zilla, D. Bezuidenhout, M. P. Lutolf, P. Human, J. A. Hubbell, and N. Davies, 2005, The selective modulation of endothelial cell mobility on RGD peptide containing surfaces by YIGSR peptides: *Biomaterials*, v. 26, p. 167-74.
- Flomenberg, N., S. M. Devine, J. F. Dipersio, J. L. Liesveld, J. M. McCarty, S. D. Rowley, D. H. Vesole, K. Badel, and G. Calandra, 2005, The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone: *Blood*, v. 106, p. 1867-74.
- Flugelman, M. Y., 1995, Inhibition of intravascular thrombosis and vascular smooth muscle cell proliferation by gene therapy: *Thromb Haemost*, v. 74, p. 406-10.
- Folkman, J., 1984, What is the role of endothelial cells in angiogenesis?: *Lab Invest*, v. 51, p. 601-4.
- Fraser, J. R., T. C. Laurent, and U. B. Laurent, 1997, Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover: *J Intern Med*, v. 242, p. 27-33.
- Freed, L. E., F. Guilak, X. E. Guo, M. L. Gray, R. Tranquillo, J. W. Holmes, M. Radisic, M. V. Sefton, D. Kaplan, and G. Vunjak-Novakovic, 2006, Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling: *Tissue Eng*, v. 12, p. 3285-305.
- Friedenstein, A. J., S. Piatetzky, II, and K. V. Petrakova, 1966, Osteogenesis in transplants of bone marrow cells: *J Embryol Exp Morphol*, v. 16, p. 381-90.

- Friedrich, E. B., K. Walenta, J. Scharlau, G. Nickenig, and N. Werner, 2006, CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities: *Circ Res*, v. 98, p. e20-5.
- Fuchs, S., M. I. Hermanns, and C. J. Kirkpatrick, 2006, Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures: *Cell Tissue Res*, v. 326, p. 79-92.
- Fuchs, S., X. Jiang, H. Schmidt, E. Dohle, S. Ghanaati, C. Orth, A. Hofmann, A. Motta, C. Migliaresi, and C. J. Kirkpatrick, 2009, Dynamic processes involved in the pre-vascularization of silk fibroin constructs for bone regeneration using outgrowth endothelial cells: *Biomaterials*, v. 30, p. 1329-38.
- Gabbieri, D., P. M. Dohmen, C. Koch, A. Lembcke, W. Rutsch, and W. Konertz, 2007, Aortocoronary endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene graft: 9-year patency: *Ann Thorac Surg*, v. 83, p. 1166-8.
- Gagne, L., G. Rivera, and G. Laroche, 2006, Micropatterning with aerosols: application for biomaterials: *Biomaterials*, v. 27, p. 5430-9.
- Galley, H. F., and N. R. Webster, 2004, Physiology of the endothelium: *Br J Anaesth*, v. 93, p. 105-13.
- Garlanda, C., and E. Dejana, 1997, Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 17, p. 1193-202.
- Gauvreau, V., and G. Laroche, 2005, Micropattern printing of adhesion, spreading, and migration peptides on poly(tetrafluoroethylene) films to promote endothelialization: *Bioconjug Chem*, v. 16, p. 1088-97.
- Gavard, J., and J. S. Gutkind, 2006, VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin: *Nat Cell Biol*, v. 8, p. 1223-34.
- Gehling, U. M., S. Ergun, U. Schumacher, C. Wagener, K. Pantel, M. Otte, G. Schuch, P. Schafhausen, T. Mende, N. Kilic, K. Kluge, B. Schafer, D. K. Hossfeld, and W. Fiedler, 2000, In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells: *Blood*, v. 95, p. 3106-12.
- Gelse, K., E. Poschl, and T. Aigner, 2003, Collagens--structure, function, and biosynthesis: *Adv Drug Deliv Rev*, v. 55, p. 1531-46.
- Goettsch, W., H. G. Augustin, and H. Morawietz, 2004, Down-regulation of endothelial ephrinB2 expression by laminar shear stress: *Endothelium*, v. 11, p. 259-65.
- Goldman, S., K. Zadina, T. Moritz, T. Ovitt, G. Sethi, J. G. Copeland, L. Thottapurathu, B. Krasnicka, N. Ellis, R. J. Anderson, and W. Henderson, 2004, Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study: *J Am Coll Cardiol*, v. 44, p. 2149-56.
- Goligorsky, M. S., D. Patschan, and M. C. Kuo, 2009, Weibel-Palade bodies--sentinels of acute stress: *Nat Rev Nephrol*, v. 5, p. 423-6.
- Gong, Z., and L. E. Niklason, 2008, Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs): *Faseb J*, v. 22, p. 1635-48.
- Gorbet, M. B., and M. V. Sefton, 2004, Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes: *Biomaterials*, v. 25, p. 5681-703.
- Grellier, M., N. Ferreira-Tojais, C. Bourget, R. Bareille, F. Guillemot, and J. Amedee, 2009, Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells: *J Cell Biochem*, v. 106, p. 390-8.
- Grenier, G., M. Remy-Zolghadri, D. Larouche, R. Gauvin, K. Baker, F. Bergeron, D. Dupuis, E. Langelier, D. Rancourt, F. A. Auger, and L. Germain, 2005, Tissue reorganization in response to mechanical load increases functionality: *Tissue Eng*, v. 11, p. 90-100.

- Grisar, J., D. Aletaha, C. W. Steiner, T. Kapral, S. Steiner, D. Seidinger, G. Weigel, I. Schwarzwinger, W. Wolozczuk, G. Steiner, and J. S. Smolen, 2005, Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: *Circulation*, v. 111, p. 204-11.
- Groegler FM, K. x., Meichelboeck W, 2002 April 7-11, Does carbone improve PTFE bypass material? : Proceedings of the 20th World Congress of the International Union of Angiology.
- Groenendijk, B. C., K. Van der Heiden, B. P. Hierck, and R. E. Poelmann, 2007, The role of shear stress on ET-1, KLF2, and NOS-3 expression in the developing cardiovascular system of chicken embryos in a venous ligation model: *Physiology (Bethesda)*, v. 22, p. 380-9.
- Grunewald, M., I. Avraham, Y. Dor, E. Bachar-Lustig, A. Itin, S. Jung, S. Chimenti, L. Landsman, R. Abramovitch, and E. Keshet, 2006, VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells: *Cell*, v. 124, p. 175-89.
- Gui, L., A. Muto, S. A. Chan, C. K. Breuer, and L. E. Niklason, 2009, Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts: *Tissue Eng Part A*, v. 15, p. 2665-76.
- Guillin, M. C., M. Jandot-Perrus, and A. Bezeaud, 1993, La thrombine: molécule multifonctionnelle: *STV*, v. 9, p. 587-97.
- Guillotin, B., C. Bourget, M. Remy-Zolgardri, R. Bareille, P. Fernandez, V. Conrad, and J. Amedee-Vilamitjana, 2004, Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation: *Cell Physiol Biochem*, v. 14, p. 325-32.
- Gulati, R., D. Jevremovic, T. E. Peterson, S. Chatterjee, V. Shah, R. G. Vile, and R. D. Simari, 2003, Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood: *Circ Res*, v. 93, p. 1023-5.
- Guo, Y., M. Lubbert, and M. Engelhardt, 2003, CD34- hematopoietic stem cells: current concepts and controversies: *Stem Cells*, v. 21, p. 15-20.
- Hahn, C., and M. A. Schwartz, 2009, Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 10, p. 53-62.
- Hamada, Y., K. Nokihara, M. Okazaki, W. Fujitani, T. Matsumoto, M. Matsuo, Y. Umakoshi, J. Takahashi, and N. Matsuura, 2003, Angiogenic activity of osteopontin-derived peptide SVVYGLR: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 310, p. 153-7.
- Hamilton, D. W., T. M. Maul, and D. A. Vorp, 2004, Characterization of the response of bone marrow-derived progenitor cells to cyclic strain: implications for vascular tissue-engineering applications: *Tissue Eng*, v. 10, p. 361-9.
- Hanjaya-Putra, D., and S. Gerecht, 2009, Vascular engineering using human embryonic stem cells: *Biotechnol Prog*, v. 25, p. 2-9.
- Hattori, K., S. Dias, B. Heissig, N. R. Hackett, D. Lyden, M. Tateno, D. J. Hicklin, Z. Zhu, L. Witte, R. G. Crystal, M. A. Moore, and S. Rafii, 2001, Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells: *J Exp Med*, v. 193, p. 1005-14.
- Heeschen, C., A. Aicher, R. Lehmann, S. Fichtlscherer, M. Vasa, C. Urbich, C. Mildner-Rihm, H. Martin, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler, 2003, Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization: *Blood*, v. 102, p. 1340-6.
- Herring, M., A. Gardner, and J. Glover, 1978, A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium: *Surgery*, v. 84, p. 498-504.
- Herring, M., J. Smith, M. Dalsing, J. Glover, R. Compton, K. Etchberger, and T. Zollinger, 1994, Endothelial seeding of polytetrafluoroethylene femoral popliteal bypasses: the failure of low-density seeding to improve patency: *J Vasc Surg*, v. 20, p. 650-5.
- Hersel, U., C. Dahmen, and H. Kessler, 2003, RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond: *Biomaterials*, v. 24, p. 4385-415.

- Hess, F., 1985, History of (micro) vascular surgery and the development of small-caliber blood vessel prostheses (with some notes on patency rates and re-endothelialization): *Microsurgery*, v. 6, p. 59-69.
- Hierck, B. P., K. Van der Heiden, F. E. Alkemade, S. Van de Pas, J. V. Van Thienen, B. C. Groenendijk, W. H. Bax, A. Van der Laarse, M. C. Deruiter, A. J. Horrevoets, and R. E. Poelmann, 2008, Primary cilia sensitize endothelial cells for fluid shear stress: *Dev Dyn*, v. 237, p. 725-35.
- Higgins, S. P., A. K. Solan, and L. E. Niklason, 2003, Effects of polyglycolic acid on porcine smooth muscle cell growth and differentiation: *J Biomed Mater Res A*, v. 67, p. 295-302.
- Hill, J. M., G. Zalos, J. P. Halcox, W. H. Schenke, M. A. Waclawiw, A. A. Quyyumi, and T. Finkel, 2003, Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk: *N Engl J Med*, v. 348, p. 593-600.
- Hirschi, K. K., D. A. Ingram, and M. C. Yoder, 2008, Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 28, p. 1584-95.
- Hirschi, K. K., T. C. Skalak, S. M. Peirce, and C. D. Little, 2002, Vascular assembly in natural and engineered tissues: *Ann N Y Acad Sci*, v. 961, p. 223-42.
- Ho, M., E. Yang, G. Matcuk, D. Deng, N. Sampas, A. Tsalenko, R. Tabibiazar, Y. Zhang, M. Chen, S. Talbi, Y. D. Ho, J. Wang, P. S. Tsao, A. Ben-Dor, Z. Yakhini, L. Bruhn, and T. Quertermous, 2003, Identification of endothelial cell genes by combined database mining and microarray analysis: *Physiol Genomics*, v. 13, p. 249-62.
- Hoerstrup, S. P., G. Zund, R. Sodian, A. M. Schnell, J. Grunenfelder, and M. I. Turina, 2001, Tissue engineering of small caliber vascular grafts: *Eur J Cardiothorac Surg*, v. 20, p. 164-9.
- Hofmann, A., U. Ritz, S. Verrier, D. Eglin, M. Alini, S. Fuchs, C. J. Kirkpatrick, and P. M. Rommens, 2008, The effect of human osteoblasts on proliferation and neo-vessel formation of human umbilical vein endothelial cells in a long-term 3D co-culture on polyurethane scaffolds: *Biomaterials*, v. 29, p. 4217-26.
- Hofmann, M., K. C. Wollert, G. P. Meyer, A. Menke, L. Arseniev, B. Hertenstein, A. Ganser, W. H. Knapp, and H. Drexler, 2005, Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium: *Circulation*, v. 111, p. 2198-202.
- Hombach-Klonisch, S., S. Panigrahi, I. Rashedi, A. Seifert, E. Alberti, P. Pocar, M. Kurpisz, K. Schulze-Osthoff, A. Mackiewicz, and M. Los, 2008, Adult stem cells and their trans-differentiation potential-perspectives and therapeutic applications: *J Mol Med*, v. 86, p. 1301-14.
- Hristov, M., W. Erl, and P. C. Weber, 2003a, Endothelial progenitor cells: isolation and characterization: *Trends Cardiovasc Med*, v. 13, p. 201-6.
- Hristov, M., W. Erl, and P. C. Weber, 2003b, Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 23, p. 1185-9.
- Hristov, M., and C. Weber, 2004, Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance: *J Cell Mol Med*, v. 8, p. 498-508.
- Huang, Y., S. Onyeri, M. Siewe, A. Moshfeghian, and S. V. Madhally, 2005, In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering: *Biomaterials*, v. 26, p. 7616-27.
- Hur, J., C. H. Yoon, H. S. Kim, J. H. Choi, H. J. Kang, K. K. Hwang, B. H. Oh, M. M. Lee, and Y. B. Park, 2004, Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 24, p. 288-93.
- Hutmacher, D. W., 2001, Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives: *J Biomater Sci Polym Ed*, v. 12, p. 107-24.
- Ingram, D. A., N. M. Caplice, and M. C. Yoder, 2005a, Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells: *Blood*, v. 106, p. 1525-31.

- Ingram, D. A., L. E. Mead, D. B. Moore, W. Woodard, A. Fenoglio, and M. C. Yoder, 2005b, Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells: *Blood*, v. 105, p. 2783-6.
- Ingram, D. A., L. E. Mead, H. Tanaka, V. Meade, A. Fenoglio, K. Mortell, K. Pollok, M. J. Ferkowicz, D. Gilley, and M. C. Yoder, 2004, Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood: *Blood*, v. 104, p. 2752-60.
- Iohara, K., L. Zheng, H. Wake, M. Ito, J. Nabekura, H. Wakita, H. Nakamura, T. Into, K. Matsusita, and M. Nakashima, 2008, A Novel Stem Cell Source for Vasculogenesis in Ischemia: Subfraction of Side Population Cells from Dental Pulp: *Stem Cells*, v. 26, p. 2408-18.
- Ishida, T., H. Kurosawa, H. Nishida, S. Aomi, and M. Endo, 2003, Sequential bypass using the right gastroepiploic artery for coronary artery bypass grafting: *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg*, v. 51, p. 277-81.
- Ito, S., S. Ishimaru, and S. E. Wilson, 1997, Inhibitory effect of type 1 collagen gel containing alpha-elastin on proliferation and migration of vascular smooth muscle and endothelial cells: *Cardiovasc Surg*, v. 5, p. 176-83.
- Ito, Y., H. Hasuda, H. Terai, and T. Kitajima, 2005, Culture of human umbilical vein endothelial cells on immobilized vascular endothelial growth factor: *J Biomed Mater Res A*, v. 74, p. 659-65.
- Iwasaki, K., K. Kojima, S. Kodama, A. C. Paz, M. Chambers, M. Umezumi, and C. A. Vacanti, 2008, Bioengineered three-layered robust and elastic artery using hemodynamically-equivalent pulsatile bioreactor: *Circulation*, v. 118, p. S52-7.
- Jackson, M. R., A. T. Ali, C. Bell, J. G. Modrall, M. B. Welborn, 3rd, E. Scoggins, R. J. Valentine, V. J. D'Addio, and G. P. Clagett, 2004, Aortofemoral bypass in young patients with premature atherosclerosis: is superficial femoral vein superior to Dacron?: *J Vasc Surg*, v. 40, p. 17-23.
- Jain, R. K., P. Au, J. Tam, D. G. Duda, and D. Fukumura, 2005, Engineering vascularized tissue: *Nat Biotechnol*, v. 23, p. 821-3.
- Jakab, K., A. Neagu, V. Mironov, R. R. Markwald, and G. Forgacs, 2004, Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, p. 2864-9.
- Jakab, K., C. Norotte, B. Damon, F. Marga, A. Neagu, C. L. Besch-Williford, A. Kachurin, K. H. Church, H. Park, V. Mironov, R. Markwald, G. Vunjak-Novakovic, and G. Forgacs, 2008, Tissue engineering by self-assembly of cells printed into topologically defined structures: *Tissue Eng Part A*, v. 14, p. 413-21.
- Jensen, L. P., M. Lepantalo, J. E. Fossdal, O. C. Roder, B. S. Jensen, M. S. Madsen, O. Grenager, H. Fasting, H. O. Myhre, N. Baekgaard, O. M. Nielsen, U. Helgstrand, and T. V. Schroeder, 2007, Dacron or PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. a multicenter randomised study: *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v. 34, p. 44-9.
- Kaehler, J., P. Zilla, R. Fasol, M. Deutsch, and M. Kadletz, 1989, Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts: *J Vasc Surg*, v. 9, p. 535-41.
- Kakisic, J. D., C. D. Liapis, C. Breuer, and B. E. Sumpio, 2005, Artificial blood vessel: the Holy Grail of peripheral vascular surgery: *J Vasc Surg*, v. 41, p. 349-54.
- Kalka, C., H. Masuda, T. Takahashi, R. Gordon, O. Tepper, E. Gravereaux, A. Pieczek, H. Iwaguro, S. I. Hayashi, J. M. Isner, and T. Asahara, 2000a, Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects: *Circ Res*, v. 86, p. 1198-202.

- Kalka, C., H. Masuda, T. Takahashi, W. M. Kalka-Moll, M. Silver, M. Kearney, T. Li, J. M. Isner, and T. Asahara, 2000b, Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 3422-7.
- Kannan, R. Y., H. J. Salacinski, P. E. Butler, G. Hamilton, and A. M. Seifalian, 2005, Current status of prosthetic bypass grafts: a review: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, v. 74, p. 570-81.
- Karageorgiou, V., and D. Kaplan, 2005, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis: *Biomaterials*, v. 26, p. 5474-91.
- Kasemo, B., and J. Gold, 1999, Implant surfaces and interface processes: *Adv Dent Res*, v. 13, p. 8-20.
- Kaushal, S., 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., 2001, Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo: *Nat Med*, v. 7, p. 1035-40.
- Kawamoto, A., H. C. Gwon, H. Iwaguro, J. I. Yamaguchi, S. Uchida, H. Masuda, M. Silver, H. Ma, M. Kearney, J. M. Isner, and T. Asahara, 2001, Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia: *Circulation*, v. 103, p. 634-7.
- Kawamoto, A., and D. W. Losordo, 2008, Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration: *Trends Cardiovasc Med*, v. 18, p. 33-7.
- Kerdjoudj, H., Modification de la surface luminale artérielle par film de polyélectrolytes en vue d'obtenir un substitut vasculaire non thrombotique, 161 p. Thèse : Nancy 1, 2007.
- Kerdjoudj, H., N. Berthelemy, S. Rinckenbach, A. Kearney-Schwartz, K. Montagne, P. Schaaf, P. Lacolley, J. F. Stoltz, J. C. Voegel, and P. Menu, 2008, Small vessel replacement by human umbilical arteries with polyelectrolyte film-treated arteries: in vivo behavior: *J Am Coll Cardiol*, v. 52, p. 1589-97.
- Kerdjoudj, H., C. Boura, L. Marchal, D. Dumas, P. Schaff, J. C. Voegel, J. F. Stoltz, and P. Menu, 2006, Decellularized umbilical artery treated with thin polyelectrolyte multilayer films: potential use in vascular engineering: *Biomed Mater Eng*, v. 16, p. S123-9.
- Kerker, J. T., A. J. Leo, and N. A. Sgaglione, 2008, Cartilage repair: synthetics and scaffolds: basic science, surgical techniques, and clinical outcomes: *Sports Med Arthrosc*, v. 16, p. 208-16.
- Khan, S. S., M. A. Solomon, and J. P. McCoy, Jr., 2005, Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry: *Cytometry B Clin Cytom*, v. 64, p. 1-8.
- Khoo, C. P., P. Pozzilli, and M. R. Alison, 2008, Endothelial progenitor cells and their potential therapeutic applications: *Regen Med*, v. 3, p. 863-76.
- Kim, D. K., Y. Fujiki, T. Fukushima, H. Ema, A. Shibuya, and H. Nakauchi, 1999, Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells: *Stem Cells*, v. 17, p. 286-94.
- Kim, M. S., Y. N. Shin, M. H. Cho, S. H. Kim, S. K. Kim, Y. H. Cho, G. Khang, I. W. Lee, and H. B. Lee, 2007, Adhesion behavior of human bone marrow stromal cells on differentially wettable polymer surfaces: *Tissue Eng*, v. 13, p. 2095-103.
- Kim, S., and H. von Recum, 2008, Endothelial stem cells and precursors for tissue engineering: cell source, differentiation, selection, and application: *Tissue Eng Part B Rev*, v. 14, p. 133-47.
- Kim, S. H., J. H. Kwon, M. S. Chung, E. Chung, Y. Jung, S. H. Kim, and Y. H. Kim, 2006, Fabrication of a new tubular fibrous PLCL scaffold for vascular tissue engineering: *J Biomater Sci Polym Ed*, v. 17, p. 1359-74.
- Kindler, V., 2005, Postnatal stem cell survival: does the niche, a rare harbor where to resist the ebb tide of differentiation, also provide lineage-specific instructions?: *J Leukoc Biol*, v. 78, p. 836-44.

- Kneser, U., E. Polykandriotis, J. Ohnolz, K. Heidner, L. Grabinger, S. Euler, K. U. Amann, A. Hess, K. Brune, P. Greil, M. Sturzl, and R. E. Horch, 2006a, Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop: *Tissue Eng*, v. 12, p. 1721-31.
- Kneser, U., D. J. Schaefer, E. Polykandriotis, and R. E. Horch, 2006b, Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view: *J Cell Mol Med*, v. 10, p. 7-19.
- Kocher, A. A., M. D. Schuster, M. J. Szabolcs, S. Takuma, D. Burkhoff, J. Wang, S. Homma, N. M. Edwards, and S. Itescu, 2001, Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function: *Nat Med*, v. 7, p. 430-6.
- Konig, G., T. N. McAllister, N. Dusserre, S. A. Garrido, C. Iyican, A. Marini, A. Fiorillo, H. Avila, W. Wystrychowski, K. Zagalski, M. Maruszewski, A. L. Jones, L. Cierpka, L. M. de la Fuente, and N. L'Heureux, 2009, Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery: *Biomaterials*, v. 30, p. 1542-50.
- Koob, T. J., 2004, *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*: New York 2004, Marcel Dekker.
- Krenning, G., P. Y. Dankers, D. Jovanovic, M. J. van Luyn, and M. C. Harmsen, 2007, Efficient differentiation of CD14+ monocytic cells into endothelial cells on degradable biomaterials: *Biomaterials*, v. 28, p. 1470-9.
- Krenning, G., B. van der Strate, M. Schipper, Y. v. S. X. Gallego, B. Fernandes, M. van Luyn, and M. Harmsen, 2008, CD34(+) Cells Augment Endothelial Cell Differentiation of CD14(+) Endothelial Progenitor Cells in vitro: *J Cell Mol Med*, v. 13, p. 2521-33.
- Krenning, G., M. J. van Luyn, and M. C. Harmsen, 2009, Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy: *Trends Mol Med*, v. 15, p. 180-9.
- Kuramochi, Y., R. Fukazawa, M. Migita, J. Hayakawa, M. Hayashida, Y. Uchikoba, D. Fukumi, T. Shimada, and S. Ogawa, 2003, Cardiomyocyte regeneration from circulating bone marrow cells in mice: *Pediatr Res*, v. 54, p. 319-25.
- Kuznetsov, S. A., M. H. Mankani, S. Gronthos, K. Satomura, P. Bianco, and P. G. Robey, 2001, Circulating skeletal stem cells: *J Cell Biol*, v. 153, p. 1133-40.
- L'Heureux, N., 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, 2006, Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization: *Nat Med*, v. 12, p. 361-5.
- L'Heureux, N., T. N. McAllister, and L. M. de la Fuente, 2007, Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization: *N Engl J Med*, v. 357, p. 1451-3.
- L'Heureux, N., S. Paquet, R. Labbe, L. Germain, and F. A. Auger, 1998, A completely biological tissue-engineered human blood vessel: *Faseb J*, v. 12, p. 47-56.
- L'Heureux, N., J. C. Stoclet, F. A. Auger, G. J. Lagaud, L. Germain, and R. Andriantsitohaina, 2001, A human tissue-engineered vascular media: a new model for pharmacological studies of contractile responses: *Faseb J*, v. 15, p. 515-24.
- Lamm, P., G. Juchem, S. Milz, M. Schuffenhauer, and B. Reichart, 2001, Autologous endothelialized vein allograft: a solution in the search for small-caliber grafts in coronary artery bypass graft operations: *Circulation*, v. 104, p. 1108-14.
- Lanner, F., M. Sohl, and F. Farnebo, 2007, Functional arterial and venous fate is determined by graded VEGF signaling and notch status during embryonic stem cell differentiation: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 27, p. 487-93.
- Lantz, G. C., S. F. Badylak, M. C. Hiles, A. C. Coffey, L. A. Geddes, K. Kokini, G. E. Sandusky, and R. J. Morff, 1993, Small intestinal submucosa as a vascular graft: a review: *J Invest Surg*, v. 6, p. 297-310.

- Laschke, M. W., Y. Harder, M. Amon, I. Martin, J. Farhadi, A. Ring, N. Torio-Padron, R. Schramm, M. Rucker, D. Junker, J. M. Haufel, C. Carvalho, M. Heberer, G. Germann, B. Vollmar, and M. D. Menger, 2006, Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes: *Tissue Eng*, v. 12, p. 2093-104.
- Laube, H. R., J. Duwe, W. Rutsch, and W. Konertz, 2000, Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts: *J Thorac Cardiovasc Surg*, v. 120, p. 134-41.
- Lavik, E., and R. Langer, 2004, Tissue engineering: current state and perspectives: *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 65, p. 1-8.
- Lenk, K., V. Adams, P. Lurz, S. Erbs, A. Linke, S. Gielen, A. Schmidt, D. Scheinert, G. Biamino, F. Emmrich, G. Schuler, and R. Hambrecht, 2005, Therapeutic potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischaemia: *Eur Heart J*, v. 26, p. 1903-9.
- Leone, A. M., M. Valgimigli, M. B. Giannico, V. Zaccone, M. Perfetti, D. D'Amario, A. G. Rebuzzi, and F. Crea, 2009, From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells: *Eur Heart J*, v. 30, p. 890-9.
- Leor, J., and M. Marber, 2006, Endothelial progenitors: a new Tower of Babel?: *J Am Coll Cardiol*, v. 48, p. 1588-90.
- Levenberg, S., 2005, Engineering blood vessels from stem cells: recent advances and applications: *Curr Opin Biotechnol*, v. 16, p. 516-23.
- Levenberg, S., J. Rouwkema, M. Macdonald, E. S. Garfein, D. S. Kohane, D. C. Darland, R. Marini, C. A. van Blitterswijk, R. C. Mulligan, P. A. D'Amore, and R. Langer, 2005, Engineering vascularized skeletal muscle tissue: *Nat Biotechnol*, v. 23, p. 879-84.
- Li, Y., T. Ma, D. A. Kniss, L. C. Lasky, and S. T. Yang, 2001, Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices: *Biotechnol Prog*, v. 17, p. 935-44.
- Li, Y. S., J. H. Haga, and S. Chien, 2005, Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells: *J Biomech*, v. 38, p. 1949-71.
- Lin, Y., D. J. Weisdorf, A. Solovey, and R. P. Hebbel, 2000, Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood: *J Clin Invest*, v. 105, p. 71-7.
- Liu, Y., T. He, and C. Gao, 2005, Surface modification of poly(ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells: *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 46, p. 117-26.
- Locke, M., J. Windsor, and P. R. Dunbar, 2009, Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery: *ANZ J Surg*, v. 79, p. 235-44.
- Loomans, C. J., E. J. de Koning, F. J. Staal, M. B. Rookmaaker, C. Verseyden, H. C. de Boer, M. C. Verhaar, B. Braam, T. J. Rabelink, and A. J. van Zonneveld, 2004, Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes: *Diabetes*, v. 53, p. 195-9.
- Loop, F. D., B. W. Lytle, D. M. Cosgrove, R. W. Stewart, M. Goormastic, G. W. Williams, L. A. Golding, C. C. Gill, P. C. Taylor, W. C. Sheldon, and et al., 1986, Influence of the internal-mammary-artery graft on 10-year survival and other cardiac events: *N Engl J Med*, v. 314, p. 1-6.
- Losordo, D. W., R. A. Schatz, C. J. White, J. E. Udelson, V. Veereshwarayya, M. Durgin, K. K. Poh, R. Weinstein, M. Kearney, M. Chaudhry, A. Burg, L. Eaton, L. Heyd, T. Thorne, L. Shturman, P. Hoffmeister, K. Story, V. Zak, D. Dowling, J. H. Traverse, R. E. Olson, J. Flanagan, D. Sodano, T. Murayama, A. Kawamoto, K. F. Kusano, J. Wollins, F. Welt, P. Shah, P. Soukas, T. Asahara, and T. D. Henry, 2007, Intramyocardial transplantation of autologous CD34+

- stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial: *Circulation*, v. 115, p. 3165-72.
- Lunde, K., S. Solheim, S. Aakhus, H. Arnesen, M. Abdelnoor, T. Egeland, K. Endresen, A. Ilebakk, A. Mangschau, J. G. Fjeld, H. J. Smith, E. Taraldsrud, H. K. Groggaard, R. Bjornerheim, M. Brekke, C. Muller, E. Hopp, A. Ragnarsson, J. E. Brinchmann, and K. Forfang, 2006, Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: *N Engl J Med*, v. 355, p. 1199-209.
- Lusis, A. J., 2000, *Atherosclerosis: Nature*, v. 407, p. 233-41.
- Lv, Q., K. Hu, Q. Feng, and F. Cui, 2008, Fibroin/collagen hybrid hydrogels with crosslinking method: preparation, properties, and cytocompatibility: *J Biomed Mater Res A*, v. 84, p. 198-207.
- Lysaght, M. J., A. Jaklenec, and E. Deweerdt, 2008, Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics: *Tissue Eng Part A*, v. 14, p. 305-15.
- Lytle, B. W., F. D. Loop, D. M. Cosgrove, N. B. Ratliff, K. Easley, and P. C. Taylor, 1985, Long-term (5 to 12 years) serial studies of internal mammary artery and saphenous vein coronary bypass grafts: *J Thorac Cardiovasc Surg*, v. 89, p. 248-58.
- Maharaj, A. S., M. Saint-Geniez, A. E. Maldonado, and P. A. D'Amore, 2006, Vascular endothelial growth factor localization in the adult: *Am J Pathol*, v. 168, p. 639-48.
- Malda, J., T. J. Klein, and Z. Upton, 2007, The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues: *Tissue Eng*, v. 13, p. 2153-62.
- Martin-Rendon, E., S. Brunskill, C. Doree, C. Hyde, S. Watt, A. Mathur, and S. Stanworth, 2008a, Stem cell treatment for acute myocardial infarction: *Cochrane Database Syst Rev*, p. CD006536.
- Martin-Rendon, E., S. J. Brunskill, C. J. Hyde, S. J. Stanworth, A. Mathur, and S. M. Watt, 2008b, Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review: *Eur Heart J*, v. 29, p. 1807-18.
- Martin, I., T. Smith, and D. Wendt, 2009, Bioreactor-based roadmap for the translation of tissue engineering strategies into clinical products: *Trends Biotechnol*, v. 27, p. 495-502.
- Martin, I., D. Wendt, and M. Heberer, 2004, The role of bioreactors in tissue engineering: *Trends Biotechnol*, v. 22, p. 80-6.
- Martin, Y., and P. Vermette, 2005, Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances: *Biomaterials*, v. 26, p. 7481-503.
- Massa, M., V. Rosti, M. Ferrario, R. Campanelli, I. Ramajoli, R. Rosso, G. M. De Ferrari, M. Ferlini, L. Goffredo, A. Bertolotti, C. Klersy, A. Pecci, R. Moratti, and L. Tavazzi, 2005, Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction: *Blood*, v. 105, p. 199-206.
- McAllister, T. N., M. Maruszewski, S. A. Garrido, W. Wystrychowski, N. Dusserre, A. Marini, K. Zagalski, A. Fiorillo, H. Avila, X. Mangano, J. Antonelli, A. Kocher, M. Zembala, L. Cierpka, L. M. de la Fuente, and N. L'Heureux, 2009, Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study: *Lancet*, v. 373, p. 1440-6.
- McGuigan, A. P., and M. V. Sefton, 2007, The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity: *Biomaterials*, v. 28, p. 2547-71.
- Melero-Martin, J. M., Z. A. Khan, A. Picard, X. Wu, S. Paruchuri, and J. Bischoff, 2007, In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells: *Blood*, v. 109, p. 4761-8.
- Menasche, P., 2002, Cell transplantation for the treatment of heart failure: *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, v. 14, p. 157-66.

- Metcalf, D. J., T. D. Nightingale, H. L. Zenner, W. W. Lui-Roberts, and D. F. Cutler, 2008, Formation and function of Weibel-Palade bodies: *J Cell Sci*, v. 121, p. 19-27.
- Mifune, Y., T. Matsumoto, A. Kawamoto, R. Kuroda, T. Shoji, H. Iwasaki, S. M. Kwon, M. Miwa, M. Kurosaka, and T. Asahara, 2008, Local delivery of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34-positive progenitor cells using bioscaffold for modality of unhealing bone fracture: *Stem Cells*, v. 26, p. 1395-405.
- Miranville, A., C. Heeschen, C. Sengenès, C. A. Curat, R. Busse, and A. Bouloumie, 2004, Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells: *Circulation*, v. 110, p. 349-55.
- Monchaux, E., and P. Vermette, 2007, Bioactive microarrays immobilized on low-fouling surfaces to study specific endothelial cell adhesion: *Biomacromolecules*, v. 8, p. 3668-73.
- Moon, J. J., and J. L. West, 2008, Vascularization of engineered tissues: approaches to promote angiogenesis in biomaterials: *Curr Top Med Chem*, v. 8, p. 300-10.
- Murasawa, S., A. Kawamoto, M. Horii, S. Nakamori, and T. Asahara, 2005, Niche-dependent translineage commitment of endothelial progenitor cells, not cell fusion in general, into myocardial lineage cells: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 25, p. 1388-94.
- Murohara, T., H. Ikeda, J. Duan, S. Shintani, K. Sasaki, H. Eguchi, I. Onitsuka, K. Matsui, and T. Imaizumi, 2000, Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization: *J Clin Invest*, v. 105, p. 1527-36.
- Narayan, D., and S. S. Venkatraman, 2008, Effect of pore size and interpore distance on endothelial cell growth on polymers: *J Biomed Mater Res A*, v. 87, p. 710-8.
- Nerem, R. M., 1984, Atherogenesis: hemodynamics, vascular geometry, and the endothelium: *Biorheology*, v. 21, p. 565-9.
- Nerem, R. M., 2006, Tissue engineering: the hope, the hype, and the future: *Tissue Eng*, v. 12, p. 1143-50.
- Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak, 1999, Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors: *Faseb J*, v. 13, p. 9-22.
- Nieponice, A., L. Soletti, J. Guan, B. M. Deasy, J. Huard, W. R. Wagner, and D. A. Vorp, 2008, Development of a tissue-engineered vascular graft combining a biodegradable scaffold, muscle-derived stem cells and a rotational vacuum seeding technique: *Biomaterials*, v. 29, p. 825-33.
- Niklason, L. E., W. Abbott, J. Gao, B. Klagges, K. K. Hirschi, K. Ulubayram, N. Conroy, R. Jones, A. Vasanawala, S. Sanzgiri, and R. Langer, 2001, Morphologic and mechanical characteristics of engineered bovine arteries: *J Vasc Surg*, v. 33, p. 628-38.
- Niklason, L. E., J. Gao, W. M. Abbott, K. K. Hirschi, S. Houser, R. Marini, and R. Langer, 1999, Functional arteries grown in vitro: *Science*, v. 284, p. 489-93.
- Nollert, G., J. Amend, and B. Reichart, 1995, Use of the internal mammary artery as a graft in emergency coronary artery bypass grafting after failed PTCA: *Thorac Cardiovasc Surg*, v. 43, p. 142-7.
- Nomura, H., C. Ishikawa, T. Komatsuda, J. Ando, and A. Kamiya, 1988, A disk-type apparatus for applying fluid shear stress on cultured endothelial cell: *Biorheology*, v. 25, p. 461-70.
- Norotte, C., F. S. Marga, L. E. Niklason, and G. Forgacs, 2009, Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting: *Biomaterials*, v. 30, p. 5910-7.
- Obi, S., K. Yamamoto, N. Shimizu, S. Kumagaya, T. Masumura, T. Sokabe, T. Asahara, and J. Ando, 2009, Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells: *J Appl Physiol*, v. 106, p. 203-11.
- Ohashi, T. S., M., 2005, Remodeling of vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress: experimental and numerical approach: *Fluid Dynamics Research*, v. 37, p. 40-59.
- Ojha, M., 1993, Spatial and temporal variations of wall shear stress within an end-to-side arterial anastomosis model: *J Biomech*, v. 26, p. 1377-88.

- Olsson, A. K., A. Dimberg, J. Kreuger, and L. Claesson-Welsh, 2006, VEGF receptor signalling - in control of vascular function: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 7, p. 359-71.
- Oswald, J., S. Boxberger, B. Jorgensen, S. Feldmann, G. Ehninger, M. Bornhauser, and C. Werner, 2004, Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro: *Stem Cells*, v. 22, p. 377-84.
- Othman-Hassan, K., K. Patel, M. Papoutsis, M. Rodriguez-Niedenfuhr, B. Christ, and J. Wilting, 2001, Arterial identity of endothelial cells is controlled by local cues: *Dev Biol*, v. 237, p. 398-409.
- Palange, P., U. Testa, A. Huertas, L. Calabro, R. Antonucci, E. Petrucci, E. Pelosi, L. Pasquini, A. Satta, G. Morici, M. A. Vignola, and M. R. Bonsignore, 2006, Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD: *Eur Respir J*, v. 27, p. 529-41.
- Pearson, J. D., 2009, Endothelial progenitor cells - hype or hope?: *J Thromb Haemost*, v. 7, p. 255-62.
- Peichev, M., A. J. Naiyer, D. Pereira, Z. Zhu, W. J. Lane, M. Williams, M. C. Oz, D. J. Hicklin, L. Witte, M. A. Moore, and S. Rafii, 2000, Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors: *Blood*, v. 95, p. 952-8.
- Pelosi, E., M. Valtieri, S. Coppola, R. Botta, M. Gabbianelli, V. Lulli, G. Marziali, B. Masella, R. Muller, C. Sgadari, U. Testa, G. Bonanno, and C. Peschle, 2002, Identification of the hemangioblast in postnatal life: *Blood*, v. 100, p. 3203-8.
- Perea, H., J. Aigner, J. T. Heverhagen, U. Hopfner, and E. Wintermantel, 2007, Vascular tissue engineering with magnetic nanoparticles: seeing deeper: *J Tissue Eng Regen Med*, v. 1, p. 318-21.
- Pittenger, M. F., 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, 1999, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells: *Science*, v. 284, p. 143-7.
- Planat-Benard, V., J. S. Silvestre, B. Cousin, M. Andre, M. Nibbelink, R. Tamarat, M. Clergue, C. Manneville, C. Saillan-Barreau, M. Duriez, A. Tedgui, B. Levy, L. Penicaud, and L. Casteilla, 2004, Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives: *Circulation*, v. 109, p. 656-63.
- Post, S., T. Kraus, U. Muller-Reinartz, C. Weiss, H. Kortmann, A. Quentmeier, M. Winkler, K. J. Husfeldt, and J. R. Allenberg, 2001, Dacron vs. polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass: a prospective randomised multicentre trial: *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v. 22, p. 226-31.
- Prasad, C. K., C. V. Muraleedharan, and L. K. Krishnan, 2007, Bio-mimetic composite matrix that promotes endothelial cell growth for modification of biomaterial surface: *J Biomed Mater Res A*, v. 80, p. 644-54.
- Prater, D. N., J. Case, D. A. Ingram, and M. C. Yoder, 2007, Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells: *Leukemia*, v. 21, p. 1141-9.
- Priya, S. G., H. Jungvid, and A. Kumar, 2008, Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration: *Tissue Eng Part B Rev*, v. 14, p. 105-18.
- Quirici, N., D. Soligo, L. Caneva, F. Servida, P. Bossolasco, and G. L. Delilieri, 2001, Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells: *Br J Haematol*, v. 115, p. 186-94.
- Rabkin, E., and F. J. Schoen, 2002, Cardiovascular tissue engineering: *Cardiovasc Pathol*, v. 11, p. 305-17.
- Rada, T., R. L. Reis, and M. E. Gomes, 2009, Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Their Application in Bone and Cartilage Tissue Engineering: *Tissue Eng Part B Rev*.
- Rafii, S., and D. Lyden, 2003, Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration: *Nat Med*, v. 9, p. 702-12.

- Rajantie, I., M. Ilmonen, A. Alminaitė, U. Ozerdem, K. Alitalo, and P. Salven, 2004, Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells: *Blood*, v. 104, p. 2084-6.
- Ramamurthi, A., and I. Vesely, 2002, Smooth muscle cell adhesion on crosslinked hyaluronan gels: *J Biomed Mater Res*, v. 60, p. 195-205.
- Ravi, S., Z. Qu, and E. L. Chaikof, 2009, Polymeric materials for tissue engineering of arterial substitutes: *Vascular*, v. 17 Suppl 1, p. S45-54.
- Rehman, J., J. Li, C. M. Orschell, and K. L. March, 2003, Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors: *Circulation*, v. 107, p. 1164-9.
- Ren, L. L., D. Y. Ma, X. Feng, T. Q. Mao, Y. P. Liu, and Y. Ding, 2008, A novel strategy for prefabrication of large and axially vascularized tissue engineered bone by using an arteriovenous loop: *Med Hypotheses*, v. 71, p. 737-40.
- Reyes, M., A. Dudek, B. Jahagirdar, L. Koodie, P. H. Marker, and C. M. Verfaillie, 2002, Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow: *J Clin Invest*, v. 109, p. 337-46.
- Rezai, N., T. J. Podor, and B. M. McManus, 2004, Bone marrow cells in the repair and modulation of heart and blood vessels: emerging opportunities in native and engineered tissue and biomechanical materials: *Artif Organs*, v. 28, p. 142-51.
- Ribatti, D., 2007, The discovery of endothelial progenitor cells An historical review: *Leuk Res*, v. 31, p. 439-44.
- Riha, G. M., P. H. Lin, A. B. Lumsden, Q. Yao, and C. Chen, 2005, Review: application of stem cells for vascular tissue engineering: *Tissue Eng*, v. 11, p. 1535-52.
- Risau, W., and I. Flamme, 1995, Vasculogenesis: *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 11, p. 73-91.
- Roberts, I., 2004, Mesenchymal stem cells: *Vox Sang*, v. 87 Suppl 2, p. 38-41.
- Roh, J. D., M. P. Brennan, R. I. Lopez-Soler, P. M. Fong, A. Goyal, A. Dardik, and C. K. Breuer, 2007, Construction of an autologous tissue-engineered venous conduit from bone marrow-derived vascular cells: optimization of cell harvest and seeding techniques: *J Pediatr Surg*, v. 42, p. 198-202.
- Roncalli, J. G., J. Tongers, M. A. Renault, and D. W. Losordo, 2008, Endothelial progenitor cells in regenerative medicine and cancer: a decade of research: *Trends Biotechnol*, v. 26, p. 276-83.
- Rosenzweig, A., 2006, Cardiac cell therapy--mixed results from mixed cells: *N Engl J Med*, v. 355, p. 1274-7.
- Rotmans, J. I., J. M. Heyligers, H. J. Verhagen, E. Velema, M. M. Nagtegaal, D. P. de Kleijn, F. G. de Groot, E. S. Stroes, and G. Pasterkamp, 2005, In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts: *Circulation*, v. 112, p. 12-8.
- Rouwkema, J., J. de Boer, and C. A. Van Blitterswijk, 2006, Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct: *Tissue Eng*, v. 12, p. 2685-93.
- Rouwkema, J., N. C. Rivron, and C. A. van Blitterswijk, 2008, Vascularization in tissue engineering: *Trends Biotechnol*, v. 26, p. 434-41.
- Rouwkema, J., P. E. Westerweel, J. de Boer, M. C. Verhaar, and C. A. van Blitterswijk, 2009, The Use of Endothelial Progenitor Cells for Prevascularized Bone Tissue Engineering: *Tissue Eng Part A*, v. 15, p. 2015-27.
- Ruegg, C., O. Dormond, and A. Mariotti, 2004, Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis: *Biochim Biophys Acta*, v. 1654, p. 51-67.

- Sabatier, F., L. Camoin-Jau, F. Anfosso, J. Sampol, and F. Dignat-George, 2009, Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence: *J Cell Mol Med*, v. 13, p. 454-71.
- Sahni, A., C. A. Baker, L. A. Sporn, and C. W. Francis, 2000, Fibrinogen and fibrin protect fibroblast growth factor-2 from proteolytic degradation: *Thromb Haemost*, v. 83, p. 736-41.
- Sahni, A., and C. W. Francis, 2000, Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation: *Blood*, v. 96, p. 3772-8.
- Sank, A., K. Rostami, F. Weaver, D. Ertl, A. Yellin, M. Nimni, and T. L. Tuan, 1992, New evidence and new hope concerning endothelial seeding of vascular grafts: *Am J Surg*, v. 164, p. 199-204.
- Santhosh Kumar, T. R., and L. K. Krishnan, 2001, Endothelial cell growth factor (ECGF) enmeshed with fibrin matrix enhances proliferation of EC in vitro: *Biomaterials*, v. 22, p. 2769-76.
- Santos, M. I., and R. L. Reis, 2009, Vascularization in Bone Tissue Engineering: Physiology, Current Strategies, Major Hurdles and Future Challenges: *Macromol Biosci*.
- Santos, M. I., K. Tuzlakoglu, S. Fuchs, M. E. Gomes, K. Peters, R. E. Unger, E. Piskin, R. L. Reis, and C. J. Kirkpatrick, 2008, Endothelial cell colonization and angiogenic potential of combined nano- and micro-fibrous scaffolds for bone tissue engineering: *Biomaterials*, v. 29, p. 4306-13.
- Santos, M. I., R. E. Unger, R. A. Sousa, R. L. Reis, and C. J. Kirkpatrick, 2009, Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone-starch scaffold and the in vitro development of vascularization: *Biomaterials*, v. 30, p. 4407-15.
- Sarasam, A., and S. V. Madhally, 2005, Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications: *Biomaterials*, v. 26, p. 5500-8.
- Sata, M., 2003, Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling, and lesion formation: *Trends Cardiovasc Med*, v. 13, p. 249-53.
- Sauvage, L. R., K. Berger, L. B. Beilin, J. C. Smith, S. J. Wood, and P. B. Mansfield, 1975, Presence of endothelium in an axillary-femoral graft of knitted Dacron with an external velour surface: *Ann Surg*, v. 182, p. 749-53.
- Schachinger, V., S. Erbs, A. Elsasser, W. Haberbosch, R. Hambrecht, H. Holschermann, J. Yu, R. Corti, D. G. Mathey, C. W. Hamm, T. Suselbeck, B. Assmus, T. Tonn, S. Dimmeler, and A. M. Zeiher, 2006, Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: *N Engl J Med*, v. 355, p. 1210-21.
- Schaefer, A., G. P. Meyer, M. Fuchs, G. Klein, M. Kaplan, K. C. Wollert, and H. Drexler, 2006, Impact of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: results from the BOOST trial: *Eur Heart J*, v. 27, p. 929-35.
- Schatteman, G. C., 2004, Adult bone marrow-derived hemangioblasts, endothelial cell progenitors, and EPCs: *Curr Top Dev Biol*, v. 64, p. 141-80.
- Schatteman, G. C., M. Dunnwald, and C. Jiao, 2007, Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors: *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 292, p. H1-18.
- Scheller, E. L., P. H. Krebsbach, and D. H. Kohn, 2009, Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation: *J Oral Rehabil*, v. 36, p. 368-89.
- Scherberich, A., R. Galli, C. Jaquierey, J. Farhadi, and I. Martin, 2007, Three-dimensional perfusion culture of human adipose tissue-derived endothelial and osteoblastic progenitors generates osteogenic constructs with intrinsic vascularization capacity: *Stem Cells*, v. 25, p. 1823-9.
- Scheufler, O., D. J. Schaefer, C. Jaquierey, A. Braccini, D. J. Wendt, J. A. Gasser, R. Galli, G. Pierer, M. Heberer, and I. Martin, 2008, Spatial and temporal patterns of bone formation in ectopically pre-fabricated, autologous cell-based engineered bone flaps in rabbits: *J Cell Mol Med*, v. 12, p. 1238-49.

- Schmidt, C. E., and J. M. Baier, 2000, Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering: *Biomaterials*, v. 21, p. 2215-31.
- Schneider, A., R. N. Melmed, H. Schwalb, M. Karck, I. Vlodaysky, and G. Uretzky, 1992, An improved method for endothelial cell seeding on polytetrafluoroethylene small caliber vascular grafts: *J Vasc Surg*, v. 15, p. 649-56.
- Schonhoff, M., 2003, Self-assembled polyelectrolyte multilayers.: *Curr Opin Colloid Interface Sci.*, v. 8, p. 86-96.
- Seifalian, A. M., A. Tiwari, G. Hamilton, and H. J. Salacinski, 2002, Improving the clinical patency of prosthetic vascular and coronary bypass grafts: the role of seeding and tissue engineering: *Artif Organs*, v. 26, p. 307-20.
- Seiler, C., T. Pohl, K. Wustmann, D. Hutter, P. A. Nicolet, S. Windecker, F. R. Eberli, and B. Meier, 2001, Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study: *Circulation*, v. 104, p. 2012-7.
- Seliktar, D., R. M. Nerem, and Z. S. Galis, 2001, The role of matrix metalloproteinase-2 in the remodeling of cell-seeded vascular constructs subjected to cyclic strain: *Ann Biomed Eng*, v. 29, p. 923-34.
- Semenza, G. L., L. A. Shimoda, and N. R. Prabhakar, 2006, Regulation of gene expression by HIF-1: *Novartis Found Symp*, v. 272, p. 2-8; discussion 8-14, 33-6.
- Shah, R., 2007, Endothelins in health and disease: *Eur J Intern Med*, v. 18, p. 272-82.
- Shaikh, F. M., A. Callanan, E. G. Kavanagh, P. E. Burke, P. A. Grace, and T. M. McGloughlin, 2008, Fibrin: a natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering: *Cells Tissues Organs*, v. 188, p. 333-46.
- Shantsila, E., T. Watson, H. F. Tse, and G. Y. Lip, 2008, New insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties: *J Am Coll Cardiol*, v. 51, p. 669-71.
- Shepard, A. D., J. A. Gelfand, A. D. Callow, and T. F. O'Donnell, Jr., 1984, Complement activation by synthetic vascular prostheses: *J Vasc Surg*, v. 1, p. 829-38.
- Shi, Q., S. Rafii, M. H. Wu, E. S. Wijelath, C. Yu, A. Ishida, Y. Fujita, S. Kothari, R. Mohle, L. R. Sauvage, M. A. Moore, R. F. Storb, and W. P. Hammond, 1998, Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells: *Blood*, v. 92, p. 362-7.
- Shin'oka, T., G. Matsumura, N. Hibino, Y. Naito, M. Watanabe, T. Konuma, T. Sakamoto, M. Nagatsu, and H. Kurosawa, 2005, Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells: *J Thorac Cardiovasc Surg*, v. 129, p. 1330-8.
- Shin, H., S. Jo, and A. G. Mikos, 2003, Biomimetic materials for tissue engineering: *Biomaterials*, v. 24, p. 4353-64.
- Shintani, S., T. Murohara, H. Ikeda, T. Ueno, T. Honma, A. Katoh, K. Sasaki, T. Shimada, Y. Oike, and T. Imaizumi, 2001, Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: *Circulation*, v. 103, p. 2776-9.
- Shireman, P. K., and W. H. Pearce, 1996, Endothelial cell function: biologic and physiologic functions in health and disease: *AJR Am J Roentgenol*, v. 166, p. 7-13.
- Shirota, T., H. He, H. Yasui, and T. Matsuda, 2003, Human endothelial progenitor cell-seeded hybrid graft: proliferative and antithrombogenic potentials in vitro and fabrication processing: *Tissue Eng*, v. 9, p. 127-36.
- Sieveking, D. P., A. Buckle, D. S. Celermajer, and M. K. Ng, 2008, Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay: *J Am Coll Cardiol*, v. 51, p. 660-8.
- Sloan, A. J., and R. J. Waddington, 2009, Dental pulp stem cells: what, where, how?: *Int J Paediatr Dent*, v. 19, p. 61-70.

- Smadja, D. M., A. Basire, A. Amelot, A. Conte, I. Bieche, B. F. Le Bonniec, M. Aiach, and P. Gaussem, 2008, Thrombin bound to a fibrin clot confers angiogenic and haemostatic properties on endothelial progenitor cells: *J Cell Mol Med*, v. 12, p. 975-86.
- Smadja, D. M., A. Cornet, J. Emmerich, M. Aiach, and P. Gaussem, 2007, Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy: *Cell Biol Toxicol*, v. 23, p. 223-39.
- Smadja, D. M., and P. Gaussem, 2009, [Characterization of endothelial progenitor cells and putative strategies to improve their expansion.]: *J Soc Biol*, v. 203, p. 197-207.
- Stevens, M. M., R. P. Marini, D. Schaefer, J. Aronson, R. Langer, and V. P. Shastri, 2005, In vivo engineering of organs: the bone bioreactor: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, p. 11450-5.
- Stoclet, J. C., K. Laflamme, F. A. Auger, and L. Germain, 2004, [Human blood vessels created with tissue engineering]: *Med Sci (Paris)*, v. 20, p. 675-8.
- Sung, H. J., C. Meredith, C. Johnson, and Z. S. Galis, 2004, The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis: *Biomaterials*, v. 25, p. 5735-42.
- Szmitko, P. E., P. W. Fedak, R. D. Weisel, D. J. Stewart, M. J. Kutryk, and S. Verma, 2003, Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart: *Circulation*, v. 107, p. 3093-100.
- Tada, S., and J. M. Tarbell, 2002, Flow through internal elastic lamina affects shear stress on smooth muscle cells (3D simulations): *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 282, p. H576-84.
- Tai, N. R., H. J. Salacinski, A. Edwards, G. Hamilton, and A. M. Seifalian, 2000, Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction: *Br J Surg*, v. 87, p. 1516-24.
- Taite, L. J., P. Yang, H. W. Jun, and J. L. West, 2007, Nitric Oxide-Releasing Polyurethane-PEG Copolymer Containing the YIGSR Peptide Promotes Endothelialization With Decreased Platelet Adhesion: *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomaterials*.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka, 2007, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors: *Cell*, v. 131, p. 861-72.
- Takahashi, T., C. Kalka, H. Masuda, D. Chen, M. Silver, M. Kearney, M. Magner, J. M. Isner, and T. Asahara, 1999, Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization: *Nat Med*, v. 5, p. 434-8.
- Tamura, N., T. Nakamura, H. Terai, A. Iwakura, S. Nomura, Y. Shimizu, and M. Komeda, 2003, A new acellular vascular prosthesis as a scaffold for host tissue regeneration: *Int J Artif Organs*, v. 26, p. 783-92.
- Tao, J., Z. Yang, J. M. Wang, C. Tu, and S. R. Pan, 2006, Effects of fluid shear stress on eNOS mRNA expression and NO production in human endothelial progenitor cells: *Cardiology*, v. 106, p. 82-8.
- Tateishi-Yuyama, E., H. Matsubara, T. Murohara, U. Ikeda, S. Shintani, H. Masaki, K. Amano, Y. Kishimoto, K. Yoshimoto, H. Akashi, K. Shimada, T. Iwasaka, and T. Imaizumi, 2002, Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial: *Lancet*, v. 360, p. 427-35.
- Taura, D., M. Sone, K. Homma, N. Oyamada, K. Takahashi, N. Tamura, S. Yamanaka, and K. Nakao, 2009, Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells-
-brief report: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 29, p. 1100-3.
- Taylor, L. M., Jr., J. M. Edwards, and J. M. Porter, 1990, Present status of reversed vein bypass grafting: five-year results of a modern series: *J Vasc Surg*, v. 11, p. 193-205; discussion 205-6.
- Teebken, O. E., A. M. Pichlmaier, and A. Haverich, 2001, Cell seeded decellularised allogeneic matrix grafts and biodegradable polydioxanone-prostheses compared with arterial autografts in a porcine model: *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v. 22, p. 139-45.

- Thierry, B., F. M. Winnik, Y. Merhi, J. Silver, and M. Tabrizian, 2003a, Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers: *Biomacromolecules*, v. 4, p. 1564-71.
- Thierry, B., F. M. Winnik, Y. Merhi, and M. Tabrizian, 2003b, Nanocoatings onto arteries via layer-by-layer deposition: toward the in vivo repair of damaged blood vessels: *J Am Chem Soc*, v. 125, p. 7494-5.
- Thomas, A. C., G. R. Campbell, and J. H. Campbell, 2003, Advances in vascular tissue engineering: *Cardiovasc Pathol*, v. 12, p. 271-6.
- Timmermans, F., F. Van Hauwermeiren, M. De Smedt, R. Raedt, F. Plasschaert, M. L. De Buyzere, T. C. Gillebert, J. Plum, and B. Vandekerckhove, 2007, Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 27, p. 1572-9.
- Tiwari, A., A. Kidane, H. Salacinski, G. Punshon, G. Hamilton, and A. M. Seifalian, 2003, Improving endothelial cell retention for single stage seeding of prosthetic grafts: use of polymer sequences of arginine-glycine-aspartate: *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v. 25, p. 325-9.
- Tiwari, A., H. J. Salacinski, G. Punshon, G. Hamilton, and A. M. Seifalian, 2002, Development of a hybrid cardiovascular graft using a tissue engineering approach: *Faseb J*, v. 16, p. 791-6.
- Torres-Vazquez, J., M. Kamei, and B. M. Weinstein, 2003, Molecular distinction between arteries and veins: *Cell Tissue Res*, v. 314, p. 43-59.
- Tremblay, P. L., V. Hudon, F. Berthod, L. Germain, and F. A. Auger, 2005, Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice: *Am J Transplant*, v. 5, p. 1002-10.
- Tuzlakoglu, K., N. Bolgen, A. J. Salgado, M. E. Gomes, E. Piskin, and R. L. Reis, 2005, Nano- and micro-fiber combined scaffolds: a new architecture for bone tissue engineering: *J Mater Sci Mater Med*, v. 16, p. 1099-104.
- Tzima, E., M. Irani-Tehrani, W. B. Kiosses, E. Dejana, D. A. Schultz, B. Engelhardt, G. Cao, H. DeLisser, and M. A. Schwartz, 2005, A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress: *Nature*, v. 437, p. 426-31.
- Unger, R. E., A. Sartoris, K. Peters, A. Motta, C. Migliaresi, M. Kunkel, U. Bulnheim, J. Rychly, and C. J. Kirkpatrick, 2007, Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials: *Biomaterials*, v. 28, p. 3965-76.
- Urbich, C., and S. Dimmeler, 2004a, Endothelial progenitor cells functional characterization: *Trends Cardiovasc Med*, v. 14, p. 318-22.
- Urbich, C., and S. Dimmeler, 2004b, Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology: *Circ Res*, v. 95, p. 343-53.
- Valgimigli, M., G. M. Rigolin, A. Fucili, M. D. Porta, O. Soukhomovskaia, P. Malagutti, A. M. Bugli, L. Z. Bragotti, G. Francolini, E. Mauro, G. Castoldi, and R. Ferrari, 2004, CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure: *Circulation*, v. 110, p. 1209-12.
- Van Blitterswijk, C. A., 2008, *Tissue Engineering*, Joseph Bronzino series Editor: Hartford, Connecticut, USA.
- van der Strate, B. W., E. R. Popa, M. Schipper, L. A. Brouwer, M. Hendriks, M. C. Harmsen, and M. J. van Luyn, 2007, Circulating human CD34+ progenitor cells modulate neovascularization and inflammation in a nude mouse model: *J Mol Cell Cardiol*, v. 42, p. 1086-97.
- Van Huyen, J. P., D. M. Smadja, P. Bruneval, P. Gaussem, L. Dal-Cortivo, P. Julia, J. N. Fiessinger, M. Cavazzana-Calvo, M. Aiach, and J. Emmerich, 2008, Bone marrow-derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia: *Mod Pathol*, v. 21, p. 837-46.

- van Wachem, P. B., J. W. Stronck, R. Koers-Zuideveld, F. Dijk, and C. R. Wildevuur, 1990, Vacuum cell seeding: a new method for the fast application of an evenly distributed cell layer on porous vascular grafts: *Biomaterials*, v. 11, p. 602-6.
- Vara, D. S., H. J. Salacinski, R. Y. Kannan, L. Bordenave, G. Hamilton, and A. M. Seifalian, 2005, Cardiovascular tissue engineering: state of the art: *Pathol Biol (Paris)*, v. 53, p. 599-612.
- Vasa, M., S. Fichtlscherer, A. Aicher, K. Adler, C. Urbich, H. Martin, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler, 2001, Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease: *Circ Res*, v. 89, p. E1-7.
- Venkatraman, S. B., F. Lao, 2008, Implanted cardiovascular polymers: natural, synthetic and bio-inspired: *Progress in Polymer Science*, v. 33, p. 853-874.
- Vestweber, D., 2008, VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 28, p. 223-32.
- Villars, F., L. Bordenave, R. Bareille, and J. Amedee, 2000, Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF?: *J Cell Biochem*, v. 79, p. 672-85.
- Villars, F., B. Guillotin, T. Amedee, S. Dutoya, L. Bordenave, R. Bareille, and J. Amedee, 2002, Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication: *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 282, p. C775-85.
- Vinard, E., G. Leseche, B. Andreassian, and D. Costagliola, 1999, In vitro endothelialization of PTFE vascular grafts: A comparison of various substrates, cell densities, and incubation times: *Ann Vasc Surg*, v. 13, p. 141-50.
- Walpoth, B. H., R. Rogulenko, E. Tikhvinskaia, S. Gogolewski, T. Schaffner, O. M. Hess, and U. Althaus, 1998, Improvement of patency rate in heparin-coated small synthetic vascular grafts: *Circulation*, v. 98, p. II319-23; discussion II324.
- Wang, H., G. M. Riha, S. Yan, M. Li, H. Chai, H. Yang, Q. Yao, and C. Chen, 2005a, Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 25, p. 1817-23.
- Wang, Y., H. J. Kim, G. Vunjak-Novakovic, and D. L. Kaplan, 2006, Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials: *Biomaterials*, v. 27, p. 6064-82.
- Wang, Z., S. Wang, Y. Marois, R. Guidoin, and Z. Zhang, 2005b, Evaluation of biodegradable synthetic scaffold coated on arterial prostheses implanted in rat subcutaneous tissue: *Biomaterials*, v. 26, p. 7387-401.
- Ward, M. R., D. J. Stewart, and M. J. Kutryk, 2007, Endothelial progenitor cell therapy for the treatment of coronary disease, acute MI, and pulmonary arterial hypertension: current perspectives: *Catheter Cardiovasc Interv*, v. 70, p. 983-98.
- Warnke, P. H., I. N. Springer, J. Wiltfang, Y. Acil, H. Eufinger, M. Wehmoller, P. A. Russo, H. Bolte, E. Sherry, E. Behrens, and H. Terheyden, 2004, Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man: *Lancet*, v. 364, p. 766-70.
- Warnke, P. H., J. Wiltfang, I. Springer, Y. Acil, H. Bolte, M. Kosmahl, P. A. Russo, E. Sherry, U. Lutzen, S. Wolfart, and H. Terheyden, 2006, Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible: *Biomaterials*, v. 27, p. 3163-7.
- Weinberg, C. B., and E. Bell, 1986, A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells: *Science*, v. 231, p. 397-400.
- Werner, N., and G. Nickenig, 2007, Endothelial progenitor cells in health and atherosclerotic disease: *Ann Med*, v. 39, p. 82-90.
- Wexler, S. A., C. Donaldson, P. Denning-Kendall, C. Rice, B. Bradley, and J. M. Hows, 2003, Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not: *Br J Haematol*, v. 121, p. 368-74.

- Widner, B., R. Behr, S. Von Dollen, M. Tang, T. Heu, A. Sloma, D. Sternberg, P. L. Deangelis, P. H. Weigel, and S. Brown, 2005, Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*: *Appl Environ Microbiol*, v. 71, p. 3747-52.
- Wijelath, E. S., S. Rahman, J. Murray, Y. Patel, G. Savidge, and M. Sobel, 2004, Fibronectin promotes VEGF-induced CD34 cell differentiation into endothelial cells: *J Vasc Surg*, v. 39, p. 655-60.
- Williams, C., and T. M. Wick, 2004, Perfusion bioreactor for small diameter tissue-engineered arteries: *Tissue Eng*, v. 10, p. 930-41.
- Williams, S. K., B. E. Jarrell, D. G. Rose, J. Pontell, B. A. Kapelan, P. K. Park, and T. L. Carter, 1989, Human microvessel endothelial cell isolation and vascular graft sodding in the operating room: *Ann Vasc Surg*, v. 3, p. 146-52.
- Woywodt, A., A. D. Blann, T. Kirsch, U. Erdbruegger, N. Banzet, M. Haubitz, and F. Dignat-George, 2006, Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol: *J Thromb Haemost*, v. 4, p. 671-7.
- Wurmser, A. E., K. Nakashima, R. G. Summers, N. Toni, K. A. D'Amour, D. C. Lie, and F. H. Gage, 2004, Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage: *Nature*, v. 430, p. 350-6.
- Xu, W., F. Zhou, C. Ouyang, W. Ye, M. Yao, and B. Xu, 2009, Mechanical properties of small-diameter polyurethane vascular grafts reinforced by weft-knitted tubular fabric: *J Biomed Mater Res A*, v. 92, p. 1-8.
- Xue, L., and H. P. Greisler, 2003, Biomaterials in the development and future of vascular grafts: *J Vasc Surg*, v. 37, p. 472-80.
- Yaginuma, G., K. Abe, M. Ottomo, Y. Okada, K. Ota, S. Fujimori, T. Araki, and K. Okuyama, 1998, [Use of the radial artery graft in coronary artery bypass grafting: harvesting technique and spasm prevention]: *Kyobu Geka*, v. 51, p. 823-8.
- Yamamoto, K., T. Sokabe, T. Watabe, K. Miyazono, J. K. Yamashita, S. Obi, N. Ohura, A. Matsushita, A. Kamiya, and J. Ando, 2005, Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro: *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 288, p. H1915-24.
- Yamamoto, K., T. Takahashi, T. Asahara, N. Ohura, T. Sokabe, A. Kamiya, and J. Ando, 2003, Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress: *J Appl Physiol*, v. 95, p. 2081-8.
- Yang, Z., J. Tao, J. M. Wang, C. Tu, M. G. Xu, Y. Wang, and S. R. Pan, 2006, Shear stress contributes to t-PA mRNA expression in human endothelial progenitor cells and nonthrombogenic potential of small diameter artificial vessels: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 342, p. 577-84.
- Yavuz, K., S. Geyik, D. Pavcnik, B. T. Uchida, C. L. Corless, D. E. Hartley, A. Goktay, L. O. Correa, H. Timmermans, J. P. Hodde, J. A. Kaufman, F. S. Keller, and J. Rosch, 2006, Comparison of the endothelialization of small intestinal submucosa, dacron, and expanded polytetrafluoroethylene suspended in the thoracoabdominal aorta in sheep: *J Vasc Interv Radiol*, v. 17, p. 873-82.
- Ye, C., L. Bai, Z. Q. Yan, Y. H. Wang, and Z. L. Jiang, 2008, Shear stress and vascular smooth muscle cells promote endothelial differentiation of endothelial progenitor cells via activation of Akt: *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, v. 23, p. S118-24.
- Yeung, T., P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver, and P. A. Janmey, 2005, Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion: *Cell Motil Cytoskeleton*, v. 60, p. 24-34.

- Yin, A. H., S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney, and D. W. Buck, 1997, AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells: *Blood*, v. 90, p. 5002-12.
- Yoder, M. C., 2009, Defining human endothelial progenitor cells: *J Thromb Haemost*, v. 7 Suppl 1, p. 49-52.
- Yoder, M. C., and D. A. Ingram, 2009, The definition of EPCs and other bone marrow cells contributing to neoangiogenesis and tumor growth: is there common ground for understanding the roles of numerous marrow-derived cells in the neoangiogenic process?: *Biochim Biophys Acta*, v. 1796, p. 50-4.
- Yoder, M. C., L. E. Mead, D. Prater, T. R. Krier, K. N. Mroueh, F. Li, R. Krasich, C. J. Temm, J. T. Prchal, and D. A. Ingram, 2007, Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals: *Blood*, v. 109, p. 1801-9.
- Yoo, H. S., E. A. Lee, J. J. Yoon, and T. G. Park, 2005, Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering: *Biomaterials*, v. 26, p. 1925-33.
- Yoon, C. H., J. Hur, K. W. Park, J. H. Kim, C. S. Lee, I. Y. Oh, T. Y. Kim, H. J. Cho, H. J. Kang, I. H. Chae, H. K. Yang, B. H. Oh, Y. B. Park, and H. S. Kim, 2005, Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases: *Circulation*, v. 112, p. 1618-27.
- Yow, K. H., J. Ingram, S. A. Korossis, E. Ingham, and S. Homer-Vanniasinkam, 2006, Tissue engineering of vascular conduits: *Br J Surg*, v. 93, p. 652-61.
- Yu, H., P. J. Vandevord, W. Gong, B. Wu, Z. Song, H. W. Matthew, P. H. Wooley, and S. Y. Yang, 2008, Promotion of osteogenesis in tissue-engineered bone by pre-seeding endothelial progenitor cells-derived endothelial cells: *J Orthop Res*, v. 26, p. 1147-52.
- Zarbiv, G., M. Preis, Y. Ben-Yosef, and M. Y. Flugelman, 2007, Engineering blood vessels by gene and cell therapy: *Expert Opin Biol Ther*, v. 7, p. 1183-91.
- Zhang, H., N. Zhang, M. Li, H. Feng, W. Jin, H. Zhao, X. Chen, and L. Tian, 2008, Therapeutic angiogenesis of bone marrow mononuclear cells (MNCs) and peripheral blood MNCs: transplantation for ischemic hindlimb: *Ann Vasc Surg*, v. 22, p. 238-47.
- Zhang, S. J., H. Zhang, M. Hou, Z. Zheng, J. Zhou, W. Su, Y. Wei, and S. Hu, 2007, Is it possible to obtain "true endothelial progenitor cells" by in vitro culture of bone marrow mononuclear cells?: *Stem Cells Dev*, v. 16, p. 683-90.
- Zhang, S. J., H. Zhang, Y. J. Wei, W. J. Su, Z. K. Liao, M. Hou, J. Y. Zhou, and S. S. Hu, 2006a, Adult endothelial progenitor cells from human peripheral blood maintain monocyte/macrophage function throughout in vitro culture: *Cell Res*, v. 16, p. 577-84.
- Zhang, W., G. Zhang, H. Jin, and R. Hu, 2006b, Characteristics of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in aged mice: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 348, p. 1018-23.
- Zhang, Z., Y. Marois, R. G. Guidoin, P. Bull, M. Marois, T. How, G. Laroche, and M. W. King, 1997, Vascugraft polyurethane arterial prosthesis as femoro-popliteal and femoro-peroneal bypasses in humans: pathological, structural and chemical analyses of four excised grafts: *Biomaterials*, v. 18, p. 113-24.
- Zhang, Z., Z. Wang, S. Liu, and M. Kodama, 2004, Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small-diameter microporous polyurethane vascular prostheses: *Biomaterials*, v. 25, p. 177-87.
- Zidi, M., and M. Cheref, 2003, Mechanical analysis of a prototype of small diameter vascular prosthesis: numerical simulations: *Comput Biol Med*, v. 33, p. 65-75.
- Ziegler, B. L., M. Valtieri, G. A. Porada, R. De Maria, R. Muller, B. Masella, M. Gabbianelli, I. Casella, E. Pelosi, T. Bock, E. D. Zanjani, and C. Peschle, 1999, KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells: *Science*, v. 285, p. 1553-8.

- Zilla, P., D. Bezuidenhout, and P. Human, 2007, Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing: *Biomaterials*, v. 28, p. 5009-27.
- Zilla, P., R. Fasol, M. Deutsch, T. Fischlein, E. Minar, A. Hammerle, O. Krupicka, and M. Kadletz, 1987, Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report: *J Vasc Surg*, v. 6, p. 535-41.
- Zisch, A. H., M. P. Lutolf, and J. A. Hubbell, 2003, Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors: *Cardiovasc Pathol*, v. 12, p. 295-310.
- Zvaifler, N. J., L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams, C. J. Edwards, J. Moss, J. A. Burger, and R. N. Maini, 2000, Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals: *Arthritis Res*, v. 2, p. 477-88.