



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

Ecole doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

THESE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : "Sciences de la vie et de la santé"

Présentée

Par

Hassan RAMMAL

Le 14 Février 2014

**COMPARAISON DE LA CAPACITE DE DIFFERENCIATION EN CELLULES
ENDOTHELIALES, DE DEUX TYPES DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES
ISSUES DE LA GELEE DE WHARTON ET DE LA MOELLE OSSEUSE**

Directeur de thèse : Pr. Patrick MENU

JURY

Rapporteurs :

Catherine LE VISAGE	DR, Inserm-U791, UnivNantes, Nantes
Dominique VAUTIER	IR, Inserm-U1121 UdS, Strasbourg

Examineurs :

Halima KERDJOUDJ	MCU, EA-4691 BIOS-URCA, Reims
Patrick MENU	PU, UMR 7365 IMoPA-UL, Nancy

Membres invités :

Caroline GAUCHER	MCU, EA-3452 CITHEFOR-UL, Nancy
Cédric BOURA	MCU, UMR-7039 CRAN-UL, Nancy

UMR 7365-CNRS-Université de Lorraine. Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie
Articulaire (IMoPA)

Avant Propos

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique entre le laboratoire d'ingénierie Moléculaire et physiopathologie articulaire IMoPA-UMR CNRS 7365 Nancy, le laboratoire de Biomatériaux et Inflammation en site osseux EA 4691 Reims et le laboratoire de Biomatériaux et Bioingénierie INSERM S 1121 Strasbourg

Remerciements

A ma famille

A Mes parents Kamel et Elham

A Rachad, Mirna et mes adorables neveux Kamel et Jude

A Racha, Karim et ma mignonne nièce Amar

A mon cher frère Ali

A Alice que j'aime...

*Pour votre soutien et vos encouragements, puisse cette thèse être à la
hauteur de tout ce qu'ils ont fait pour moi...*

Madame **Catherine LE VISAGE**, Directeur de Recherche à l'INSERM de Nantes et Monsieur **Dominique VAUTIER**, Ingénieur de Recherche à l'INSERM de Strasbourg ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Leurs commentaires et leurs remarques constitueront sans doute un précieux concours. Je les remercie vivement.

Mes travaux ont été effectués au Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA) l'UMR-CNRS- 7365 de l'Université de Lorraine. Je tiens à exprimer à Monsieur le Professeur **Patrick MENU**, professeur à la Faculté de Pharmacie et directeur de ma thèse, ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et proposé ce thème de recherche. Sa grande disponibilité a permis un suivi permanent du déroulement des travaux et la confiance qu'il m'a accordée et ses encouragements m'ont beaucoup aidé à mener à terme ce travail.

J'exprime ma gratitude à Madame **Halima KERDJOU DJ**, Maître de Conférences à la faculté de chirurgie dentaire de Reims, pour son rôle majeur au cours de ces années. Je la remercie plus spécialement pour les nombreuses discussions et suggestions précieuses concernant ma thèse et pour ses encouragements pour rédiger mes articles.

J'exprime également ma reconnaissance à Madame **Caroline GAUCHER**, Maître de Conférences à la faculté de pharmacie de Nancy, pour ses conseils précieux et pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et mis à ma disposition tous les équipements nécessaires au dosage de NO. Votre présence au sein de ce jury est un honneur et je vous en remercie.

Je remercie vivement Monsieur **Cédric BOURA**, Maître de Conférences à la faculté de pharmacie de Nancy, qui a bien souvent trouvé une réponse à mes questions et a accepté d'être dans mon comité de thèse. Il a, par son implication, assuré le bon déroulement de mes années de recherche.

Je souhaiterais aussi remercier Monsieur **Jean Yves JOUZEAU**, directeur de l'UMR CNRS 7365, ainsi à Monsieur **Jacques MAGDALOU**, ancien directeur de l'unité, pour m'avoir accepté dans l'unité de recherche et pour leurs gentillesse.

Je remercie très sincèrement Monsieur **Pierre LABRUDE**, Professeur à la faculté de pharmacie de Nancy pour les conseils et l'aide qu'il m'a apporté dans la correction de mes papiers, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Monsieur **Jean-Claude VOEGEL**, directeur de recherche à l'INSERM-Strasbourg ainsi que Madame **Fouzia BOULMEDAIS**, chargée de recherche au CNRS, ont joué un rôle particulièrement important au cours de ces trois années. Nos nombreuses réunions m'ont permis de découvrir leur riche expérience dans le domaine de la physico-chimie et comment l'appliquer sur le vivant. Merci à vous.....

Je tiens également à remercier **Monique GENTILS**, assistante ingénieur au laboratoire, qui m'a aidé dans la construction des films multicouches de polyélectrolytes. Je la remercie plus spécialement pour les nombreuses discussions tant au niveau professionnel que personnel.

Je remercie également Madame **Ghislaine CAUCHOIS** et **Brigitte GUERBER** pour leur gentillesse à mon égard et leur soutien constant. Je leur exprime ma profonde reconnaissance.

A tout le personnel du laboratoire ainsi à mes collègues **Talar, Fatima, Arnaud, Jessica, Loïc, Nasser, Lina, Victor, Reine (ma sœur), Fabien, Menhem, Yueying, Gabriel (Amigo), Steve (akhi), Chaza, Emilie, Jacqueline (Imm Lyam), Pan (Panos), Léonore, Mathew (Le Sarsour), Irfan (Hard work), Caroline (à la mode), Meriem, David (le vrai ami) et Melissa** pour m'avoir encouragés et supportés durant ces années. Vous allez me manquer....

Un grand merci à nos secrétaires **Nadia, Valérie, Ghislaine, Karine, Olinda, Aline, Christine, Hélène** et **Merryl** pour leur disponibilité et leur patience.

Chaza Harmouch, collègue de bureau, voisine de paillasse, une vraie sœur sur qui on peut compter. J'ai beaucoup apprécié ces 3 années passées avec elle. Je lui souhaite évidemment beaucoup de réussite et beaucoup de bonheur dans la vie.

Un grand merci à tous mes ami(e)s **Steve, Hassan, Ali, Rasha, Rose, Hania, Mohammad, Abboudi, Kim, Rafic, Hakam, Mona J, Hussein, Charbel, Reine, Chaza, Hadia, Fatima, Narimane, Mariam, Sara Z, Bilal, Mona F, Anji et nada** pour leur soutien et les rires aux éclats de ces années. C'est vrai qu'avec vous on sent toujours la paix.....

La meilleure pour la fin, **Alice** tu es toujours là pour moi. Merci pour ton soutien, tes encouragements, ta sagesse, ton aide et surtout pour les petits mots doux d'amour.... Avec toi la vie est facile, rien n'est impossible à condition que tout soit en ordre !!!!!

Liste des publications et communications

- Publications :

H. RAMMAL, J. Beroud, M. Gentils, P. Labrude, P. Menu, H. Kerdjoudj and E. Velot. Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films. *Bio-Medical Materials and Engineering*, (2013); 23:209-309.

H. RAMMAL, C. Harmoush, M. Gentils, F. Boulmedais, P. Schaaf, J.C. Voegel, C. Gaucher, P. Menu and H. Kerdjoudj. Synergetic effect of polyelectrolyte multilayers and angiogenic culture media on endothelial differentiation of Wharton's jelly derived cell towards tissue vascularization. (Article *en soumission*)

H. RAMMAL, C. Harmoush, J.J. Lataillade, D. Laurent-Maquin, P. Labrude, P. Menu and H. Kerdjoudj. Stem cells: A promising source for vascular regenerative medicine. (Revue soumise dans *Cardiovascular research*)

- Présentations orales :

H. RAMMAL, C. Harmoush, M. Gentils, F. Boulmedais, H. Kerdjoudj et P. Menu. "Comparaison de la capacité de différenciation en cellules endothéliales, de deux types de cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton et de la moelle osseuse". Journée des doctorants en biologie et santé, Nancy, 22 Mai 2013 (Prix de l'école doctoral 1^{er} place).

C. Harmoush, **H. RAMMAL**, F. Draux, D.L. Maquin, F. Boulmedais, B. Frish, P. Menu, P. Labrude et H. Kerdjoudj. "Evaluation of the endothelial differentiation of human mesenchymal stem cells on functionalized Chitosan/Hyaluronan polyelectrolytes multilayer films in vascular engineering". 25th European conference on biomaterials, Madrid, Espagne, 8-12 Septembre 2013.

H. RAMMAL, C. Harmoush, M. Gentils, F. Boulmedais, C. Gaucher, H. Kerdjoudj and P. Menu. “Mesenchymal stem cells as a promising source for endothelial cells in vascular tissue engineering”. 23rd European Tissue Repair Society Meeting, Reims, France, 23-25 Octobre 2013.

- Présentations affichées :

C. Harmoush, **H. RAMMAL**, F. Draux, B. Frish, D.L. Maquin, F. Boulmedais, P. Menu, P. Labrude and H. Kerdjoudj. “Evaluation of cellular adhesion and endothelial differentiation of hMSC seeded on functionalized chitosan and hyaluronan”. The international Young researchers in life science (15th meeting), Paris, 14-16 Mai 2012.

H. RAMMAL, C. Harmoush, J. Beroud, M. Gentils, F. Boulmedais, E. Velot, H. Kerdjoudj and P. Menu. “Wharton’s jelly derived stem cells and vascular tissue engineering”. The international Young researchers in life science (15th meeting), Paris, 14-16 Mai 2012.

H. RAMMAL, J. Beroud, M. Gentils, P. Labrude, P. Menu, H. Kerdjoudj and E. Velot. “Reversing Charges or how to improve Wharton’s jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films”. 7^e journées scientifiques du Pôle Lorraine d’ingénierie du cartilage, Nancy, 18-19 Octobre 2012.

C. Harmoush, **H. RAMMAL**, F. Draux, D.L. Maquin, F. Boulmedais, B. Frish, P. Menu, P. Labrude and H. Kerdjoudj. “Différenciation endothéliale des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical humain sur des films multicouches de Chitosane/Hyaluronane pour l’ingénierie vasculaire”. 8^{ème} Journée de Recherche Biomédicale, Nancy (CHU de Nancy), 24 Mai 2013.

C. Harmoush, **H. RAMMAL**, F. Draux, D.L. Maquin, F. Boulmedais, B. Frish, P. Menu, P. Labrude and H. Kerdjoudj. “Endothelial differentiation of hMSCs on Chitosan/Hyaluronan polyelectrolyte multilayer films for vascular engineering”. First symposium on Vascular tissue engineering, Leiden-Pays Bas, 27-29 Mai 2013.

H. RAMMAL, C. Harmoush, M. Gentils, F. Boulmedais, C. Gaucher, H. Kerdjoudj and P.Menu. “Mesenchymal stem cells: A route for a promising vascular tissue engineering field”. First symposium on Vascular tissue engineering, Leiden-Pays Bas, 27-29 Mai 2013.

H. RAMMAL, C. Harmoush, M. Gentils, F. Boulmedais, C. Gaucher, H. Kerdjoudj and P.Menu. “Wharton’s jelly–derived Mesenchymal stem cells and vascular tissue engineering”. 25th European conference on biomaterials, Madrid-Espagne, 8-12 Septembre 2013.

Abréviations

Ac-LDL	Lipoprotéines acétylées
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament
AVC	Accident vasculaire cérébral
BSA	Albumine de sérum bovin
CD31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
CE	Cellule endothéliale
CHI	Chitosane
CL	Caprolactone
CML	Cellule musculaire lisse
CSM	Cellule souche mésenchymateuse
DMSO	Diméthylsulfoxyde
eNOS	<i>Endothelial NO synthase</i>
ET	Endothéline
FDA	<i>Foods and Drugs administration</i>
GW	Gelée de Wharton
HA	Hyaluronane
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryle coenzyme A
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
kDa	Kilo Dalton
KDR	<i>Kinase domain containing receptor</i>
LA	L-lactide
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MO	Moelle osseuse
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	Monoxyde d'azote
OLED	Diodes organiques électroluminescentes
P4HB	Poly-4-hydroxybutyrate
PAA	Poly(acide acrylique)

PAH	Hydrochlorure de poly(allylamine)
PBS	Tampon phosphate salin
PCL	Poly(caprolactone)
PDO	Polydioxanone
PECAM	Molécule d'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales
PEG	Polyéthylène glycol
PEM	film multicouche de polyélectrolytes
PET	Polytéréphtalate d'éthylène
PGA	Acide poly(glycolique)
PGI2	Prostaglandine
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PHRC	Programme hospitalier de recherche clinique
PLA	Acide poly(lactique)
PLGA	Poly(lactique-co-glycolique)
PLL	Poly(L-lysine)
PMA	Poly(acide méthacrylique)
PPV	Poly(p-phénylènevinylène)
PLLA	Acide poly(L-lactique)
PSS	Poly(styrène-4-sulfonate) de sodium
PTFEe	Polytétrafluoroéthylène expansé
PU	Polyuréthane
SIS	Sous muqueuse intestinal
TBST	<i>Tris-Buffered saline and tween</i>
Tie2	<i>Endothelium-specific receptor tyrosine kinase</i>
t-PA	Activateur tissulaire de plasminogène
TXA2	Thromboxane 2
VE-cadherin	<i>Vascular endothelial cadherin</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
vWF	<i>von Willebrand factor</i>

Table des illustrations

Figure 1 : Répartition des principales causes de mortalité en France (*p.6*)

Figure 2 : Genèse de la plaque d'athérome : de l'artère saine vers la formation d'une plaque d'athérome (*p.7*)

Figure 3 : Les différentes stratégies thérapeutiques chirurgicales (*p.9*)

Figure 4 : Principe général de l'ingénierie tissulaire vasculaire (*p.16*)

Figure 5 : Facteurs synthétisés par les CEs (*p.19*)

Figure 6 : Exemples de techniques de modification de surface favorisant l'endothélialisation (*p.69*)

Figure 7 : Principe de construction de film multicouche de polyélectrolytes (*p.72*)

Figure 8 : Améliorations des constructions de vaisseaux sanguins humains formés par autoassemblage (*p.79*)

Figure 9 : Représentation de la structure chimique des différents polyélectrolytes utilisés (*p.88*)

Figure 10 : Effet du pourcentage de SVF sur le comportement des CSM-GWs cultivées dans le milieu (EGM-2[®]) sur verre (a-b) et (PAH-PSS)₄ (c-d) (*p.105*)

Figure 11 : Effet du pourcentage de SVF sur le comportement des CSM-GWs cultivées dans le milieu (EGM-2[®]) sur verre (a-b) et (PAH-PSS)₄ (c-d) (*p.106*)

Tableaux

Tableau I : Principaux domaines d'application des biomatériaux (p.64)

Tableau II : Séquences peptidiques utilisées pour favoriser l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules (p.70)

Tableau III : Synthèse des applications expérimentales et cliniques de différents types de conduit vasculaire (synthétique, biosynthétique et totalement construit par ingénierie) décrits dans la littérature (p.75)

Tableau IV : Résultats cliniques obtenus après transplantation d'un vaisseau sanguin synthétique dégradable à base de PGA ou PLA dans le but de remplacer une artère pulmonaire sténosée chez des patients jeunes (p.76)

Tableau V : Composition des solutions tampons employées pour la culture cellulaire (p.82)

Tableau VI : Composition du milieu pour la culture des cellules endothéliales matures (p.83)

Tableau VII : Composition du milieu de culture des cellules souches mésenchymateuses (p.83)

Tableau VIII : Composition du milieu de différenciation des cellules souches mésenchymateuses (p.84)

Tableau IX : Marqueurs employés en cytométrie en flux (p.85)

Tableau X : Séquence des amorces utilisées en qRT-PCR (p.85)

Tableau XI : Anticorps primaires utilisés en Western blot (p.86)

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	- 1 -
PARTIE I : BIBLIOGRAPHIE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	- 5 -
I. Les maladies cardiovasculaires	- 6 -
II. L'Athérosclérose	- 6 -
1. Définition	- 6 -
2. Manifestations cliniques.....	- 8 -
3. Traitement de l'athérosclérose	- 8 -
3.1. Traitements classiques	- 8 -
3.2. Traitements chirurgicaux	- 9 -
3.2.1. Angioplastie et pose d'endoprothèses	- 9 -
3.2.2. Le pontage vasculaire	- 10 -
- Les autogreffes	- 11 -
- Les allogreffes	- 12 -
- Les xélogreffes	- 13 -
- Les prothèses synthétiques	- 13 -
III. Ingénierie tissulaire vasculaire	- 14 -
1. Les Cellules	- 16 -
1.1. Les cellules musculaires lisses	- 17 -
1.2. Les cellules endothéliales	- 17 -
1.3. Caractérisation des cellules endothéliales.....	- 19 -
1.3.1. Marqueurs membranaires des cellules endothéliales.....	- 20 -
1.3.2. Marqueurs intracellulaires des cellules endothéliales	- 21 -
1.4. Sources de cellules endothéliales	- 21 -

1.4.1.	Cellules endothéliales matures	- 22 -
1.4.2.	Les cellules souches.....	- 22 -
2.	Les biomatériaux	- 63 -
2.1.	Biomatériaux synthétiques dégradables.....	- 65 -
2.2.	Les matrices biologiques.....	- 66 -
2.2.1.	Les conduits vasculaires décellularisés ou désendothélialisés	- 66 -
2.2.2.	Les conduits avasculaires décellularisés.....	- 66 -
2.2.3.	Les conduits à base de composants de la matrice extra cellulaire.....	- 67 -
2.3.	Les modifications de surface.....	- 67 -
2.3.1.	Les modifications topographiques.....	- 68 -
2.3.2.	Les modifications physico-chimiques	- 69 -
2.3.3.	Les modifications biologiques.....	- 69 -
2.3.4.	Modification des matériaux par films multicouches de polyélectrolytes ..	- 70 -
-	Propriétés physico-chimiques et biologiques des films	- 72 -
-	Le film (PAH-PSS) ₃ -PAH et l'expertise de notre laboratoire.....	- 73 -
3.	Les applications cliniques de la bioingénierie vasculaire	- 74 -
	OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	- 79 -
	PARTIE II : MATERIELS ET METHODES	- 80 -
I.	Culture cellulaire.....	- 81 -
1.	Réactifs et matériels	- 81 -
1.1.	Tampons.....	- 81 -
1.2.	Solution de digestion (Enzymes)	- 82 -
1.3.	Milieu de culture	- 82 -
2.	Méthodes de caractérisation et d'investigation	- 84 -
2.1.	Evaluation de l'étalement cellulaire après culture sur les différentes surfaces. -	84 -
2.2.	Caractérisation phénotypique des cellules	- 85 -
2.3.	Evaluation de la fonctionnalité cellulaire.....	- 86 -

3. Préparation des surfaces de culture	- 86 -
PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	- 88 -
I. Influence de la charge de surface sur la culture de cellules souches mésenchymateuses....	- 89 -
1. Introduction	- 89 -
2. Article.....	- 90 -
3. Conclusion.....	- 106 -
II. Influence du pourcentage de sérum sur la culture et le comportement des cellules souches mésenchymateuses	- 107 -
1. Introduction	- 107 -
2. Résultats	- 108 -
3. Discussion et Conclusion	- 109 -
III. Comparaison de la capacité de différenciation en cellules endothéliales de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse et de la gelée de Wharton.....	- 110 -
1. Introduction	- 110 -
2. Article.....	- 111 -
3. Conclusion.....	- 134 -
PARTIE IV : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	- 136 -
Références	- 139 -
Annexes	- 154 -
Résumé	- 156 -

INTRODUCTION GENERALE

Les pathologies vasculaires coronariennes et périphériques constituent l'une des principales causes de décès dans le monde. L'athérosclérose, notamment, se traduit par la formation d'une plaque d'athérome sur la paroi vasculaire, pouvant aller jusqu'à l'obstruction du vaisseau qui peut avoir des conséquences fatales. En clinique, quand la désobstruction des vaisseaux s'avère inopérante, leur remplacement devient nécessaire. Le matériau utilisé en première intention est le vaisseau autologue. Malheureusement, un tiers des patients n'a pas de vaisseaux autologues disponibles du fait d'une utilisation antérieure, d'une taille inadéquate ou de leur qualité médiocre, et les chirurgiens aimeraient disposer de substituts vasculaires cellularisés, en particulier pour de faible diamètre. La recherche actuelle dans ce domaine s'est orientée vers la construction de vaisseaux cellularisés fonctionnels capables de s'adapter aux contraintes homéostasiques.

A ce jour, avec l'avènement des biomatériaux, le recours à des matrices artificielles s'est imposé pour la fabrication de substituts artériels. En effet, de nombreux matériaux, le plus souvent des polymères tels que le Téflon[®] ou le Dacron[®], ont suscité un intérêt certain dans la chirurgie vasculaire. Ces prothèses sont utilisées avec succès pour le traitement de pathologies touchant des artères de gros diamètre. Le remplacement des vaisseaux d'un diamètre interne inférieur à 6 mm pose problème : il peut survenir la formation de caillot à court terme et une hyperplasie intinale à plus long terme, à proximité de l'anastomose. En effet, le développement d'une surface physiologiquement hémocompatible est encore un challenge en chirurgie vasculaire. Pour remédier à ces limites, la recherche en ingénierie vasculaire tente de mettre au point un substitut vasculaire dont les caractéristiques se rapprochent le plus possible du vaisseau natif et donc présentent une surface luminale hémocompatible et similaire à celle retrouvée *in vivo*.

Les cellules endothéliales (CEs) représentent un composant de choix pour tapisser la surface luminale des substituts vasculaires, douées, entre autre, d'une capacité anti-thrombotique. Cependant, la majorité des cellules colonisant cette surface se détachent, lors de l'implantation du greffon, sous l'influence du flux sanguin (1–3). Une modification de la surface luminale est donc indispensable pour améliorer l'ancrage et la croissance des cellules sur le biomatériau. Cette technique doit favoriser la formation d'un néo-endothélium stable, capable de résister aux contraintes exercées par le flux sanguin. Depuis quelques années, une nouvelle méthode de modification de surface, reposant sur la construction d'un film multicouche de polyelectrolytes

(PEMs), tend à se développer dans différents domaines médicaux. C'est une technique simple, de faible coût et biocompatible, mis au point au début des années 1990, construite par un dépôt alterné de solutions de polycations et de polyanions (4). Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont montré l'intérêt de ces films en ingénierie vasculaire (thèse C. Boura, H. Kerdjoudj, V. Moby et N. Berthelemy), en particulier en terme d'adhérence cellulaire, de prolifération et de stabilité lors de l'implantation *in vivo* en comparaison à des revêtements naturels tels que la fibronectine.

Les CEs matures utilisées pour tapisser la lumière des substituts vasculaires peuvent être isolées à partir d'artères humaines, mais elles présentent une capacité de prolifération limitée doublée d'une dédifférenciation progressive au cours de leur expansion *in vitro*. Le besoin de trouver une source non traumatisante de CEs capables de proliférer rapidement, nous a conduit à nous intéresser aux cellules souches mésenchymateuses (CSMs), et parmi elles, les CSMs issues de la gelée de Wharton (GW) entourant le cordon ombilical. Ces cellules présentent de nombreux avantages : une technique d'extraction simple et non invasive, une capacité de prolifération élevée et un temps de différenciation accéléré (5). Depuis quelques années, différents facteurs ont été identifiés, capables d'influencer la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en une lignée cellulaire spécifique telle que la lignée endothéliale. Parmi ces facteurs, nous pouvons citer : le milieu de culture et son contenu (facteurs de croissance, sérum...), la densité d'ensemencement cellulaire, les caractéristiques de la surface de culture, la fraction en oxygène, les contraintes mécaniques... (6–8).

Notre travail vise à concevoir, à partir de cellules souches mésenchymateuses, un néo-endothélium fonctionnel destiné à tapisser la lumière interne des substituts vasculaires. Ainsi, l'idée a été de favoriser la différenciation, en cellules endothéliales, de CSMs issues de la gelée de Wharton (GWs) et de comparer leur potentiel de différenciation à celui des CSMs provenant de la moelle osseuse (MO). Pour ce faire, nous avons cherché à optimiser notre protocole de différenciation *via* le choix de l'architecture formant les PEMs, la densité d'ensemencement des cellules, le pourcentage de sérum dans le milieu et enfin les facteurs de croissance. Les résultats de la mise au point du protocole seront détaillés dans la partie résultats I et II. La différenciation cellulaire a été vérifiée en étudiant le phénotype de cellules différenciées et leur fonctionnalité au

cours du temps et en fonction des conditions expérimentales, les données obtenues seront détaillées dans la partie III des résultats.

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre des activités du groupe d'ingénierie vasculaire de l'équipe 5 " Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Vectorisation " de l'UMR CNRS 7365 dont l'un des objectifs est de développer des substituts vasculaires de petits calibres. Ce mémoire de thèse se présente en quatre parties :

- une introduction 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 de la littérature portant sur la différenciation des cellules souches en cellules endothéliales, puisqu'elles sont au centre de notre travail.

- Après présentation des objectifs, une partie des méthodes sera détaillée et le reste sera donné au travers d'articles figurants dans ce manuscrit.

- La troisième partie présente l'ensemble des résultats sous forme d'articles (un paru et le 2ème en soumission), et de résultats complémentaires qui n'ont pas fait l'objet d'articles. Chaque chapitre de résultats est accompagné d'une courte introduction et d'une conclusion.

- La dernière partie concerne la conclusion générale et les limites de ces travaux et sera l'occasion de définir des perspectives envisagées à la suite de cette thèse.

PARTIE I : BIBLIOGRAPHIE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

I. Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins, dont les principales sont l'athérosclérose, la formation d'anévrismes et la thrombose. Elles présentent, aujourd'hui, la première cause de mortalité mondiale, et le nombre de décès qui leur est imputable a été estimé à 17,3 millions en 2008, soit 30% de la mortalité mondiale totale (9). Ces pathologies cardiovasculaires représentent 4 millions de décès par an en Europe, soit 47% de la mortalité totale ; elle est mise en cause dans 52% des décès chez la femme contre 42% chez l'homme (10). En France, les maladies cardiovasculaires arrivent en deuxième position derrière le cancer, et sont responsables du tiers de la mortalité totale (fig. 1) (11).

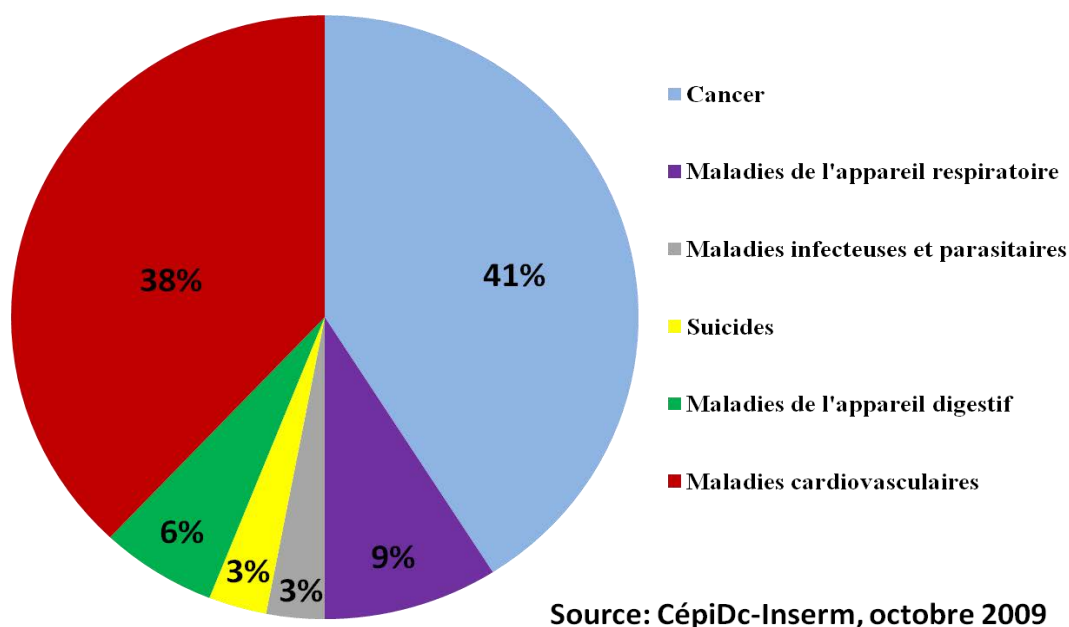


Figure 1 : Répartition des principales causes de mortalité en France.

II. L'Athérosclérose

1. Définition

L'athérosclérose est à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires. Cette pathologie n'est pas issue des temps modernes ; en effet, c'est en 1833 à Strasbourg que le terme « artériosclérose » est défini pour la première fois par le Dr. Jean Frédéric Martin Lobstein. Ce dernier définit ces

altérations artérielles comme un durcissement et un épaississement de la paroi des artères indépendant d'une inflammation (12). Aujourd'hui, l'artériosclérose est principalement causée par un vieillissement vasculaire. En 1904, le terme « Athérosclérose » est proposé par Felix Marchand (13). Ce terme reflète l'effet athéromateux et scléreux de la maladie.

L'athérosclérose serait la forme la plus grave de l'artériosclérose. Elle se caractérise par une atteinte chronique de la paroi vasculaire des artères de moyen et de gros calibre, due à l'accumulation de lipides amorphes (triglycérides, cholestérols) et de nombreux éléments sanguins dans l'espace sous endothélial conduisant ainsi à la formation d'une plaque d'athérome (fig. 2) (14).

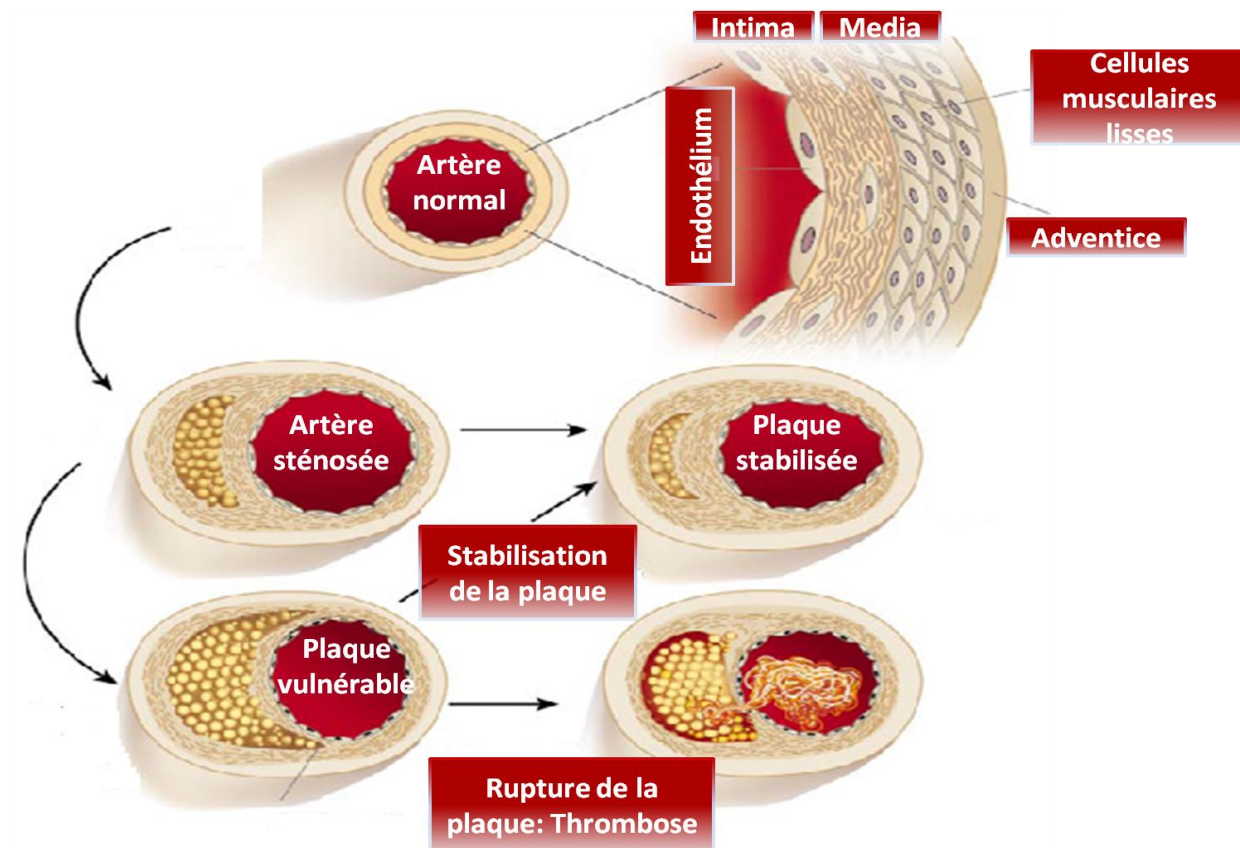


Figure 2 : Genèse de la plaque d'athérome : de l'artère saine vers la formation d'une thrombose (14).

C'est un processus pathologique lent et complexe, distinct du vieillissement vasculaire, qui débute dès le jeune âge et évolue en diminuant progressivement la lumière vasculaire, pouvant à terme aboutir à son obstruction totale. La fréquence et l'étendue des lésions augmentent fortement avec les

facteurs de risques tels que l'âge, les dyslipidémies héréditaires, les anomalies des facteurs hémostatiques, mais également ceux d'origine environnementaux tels que la sédentarité, l'obésité et le tabagisme (15). L'athérosclérose représente un enjeu majeur en santé publique. Toutefois, maladie discrète mais progressive, les symptômes ne se révèlent généralement que tardivement après l'apparition des premières lésions anatomiques, retardant ainsi le dépistage et la prise en charge thérapeutique.

2. Manifestations cliniques

La gravité de l'athérosclérose dépend de l'endroit où se forme la plaque d'athérome et de sa stabilité. Elle est responsable d'affections aiguës comme :

- Coronaropathies de type ischémique.
- Accidents vasculaires cérébraux (AVC).
- Artérites dans 90% des cas, en particulier dues à l'athérosclérose des membres inférieurs.

Ces accidents, lorsqu'ils ne sont pas fatals, sont à l'origine de séquelles fonctionnelles sévères : paralysie, trouble sensitifs, trouble du langage dans le cas des AVC, apparition d'une insuffisance cardiaque...

3. Traitement de l'athérosclérose

3.1. Traitements classiques

Les études épidémiologiques ont mis en évidence une étroite relation entre le niveau du cholestérol sanguin et la fréquence des complications cardiovasculaires. Les traitements hypolipémiant ont montré une grande efficacité dans la prévention de cette maladie. Les hypolipémiants principaux sont les résines échangeuses d'ions (16,17), les fibrates (18,19), les inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase (20,21) et autres composés tels que les inhibiteurs de l'absorption intestinale du cholestérol (22), les huiles de poissons (23) et enfin les antioxydants (24). Il faut préciser que le traitement principal reste la prévention telle que l'arrêt du tabagisme, la pratique d'une activité physique régulière, le contrôle de la tension artérielle, la

correction de la dyslipidémie, l'équilibre du diabète et l'adaptation diététique pour lutter contre l'excès de masse pondérale.

3.2. Traitements chirurgicaux

Lorsque les traitements pharmacologiques sont incapables de réduire la progression de la pathologie et que le rétrécissement de l'artère est supérieur à 70%, la pratique chirurgicale est nécessaire pour aider à prévenir les complications de l'athérosclérose. Ceci peut être fait soit par des techniques endovasculaires telles que l'angioplastie suivie par la pose d'endoprothèses, soit par des méthodes chirurgicales conventionnelles comme les pontages qui représentent la méthode de référence (fig. 3).

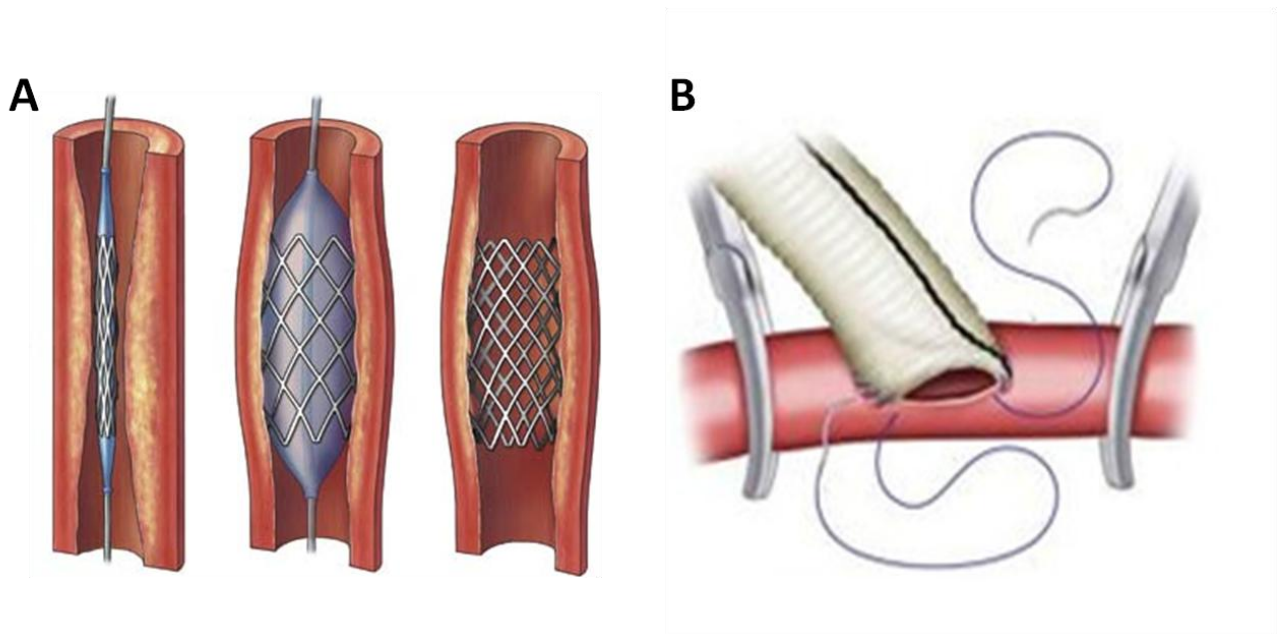


Figure 3 : Les différentes stratégies thérapeutiques chirurgicales. (A) Angioplastie et pose d'endoprothèses (25). (B) Pontage vasculaire (26).

3.2.1. Angioplastie et pose d'endoprothèses

L'angioplastie consiste à rétablir le diamètre de l'artère, favorable *de novo* à la circulation sanguine. Cette technique consiste à écraser, à l'aide d'un ballonnet gonflable, les plaques d'athérome formées. Généralement, l'angioplastie par ballonnets est complétée par la pose d'une endoprothèse, sorte de petit tube ajouré métallique expansible qui retarde l'apparition de nouvelles obstructions ou

d'un rétrécissement de l'artère. Ceci représente donc une armature étayant la paroi de l'artère à titre permanent. Toutefois, la mise en place d'un stent métallique dans la lumière des artères peut être responsable d'une resténose, conséquence d'une prolifération cellulaire excessive et formation de neo-intima suite au traumatisme provoqué par l'action mécanique du ballonnet au niveau de la paroi de l'artère. Afin d'éviter toute thrombose précoce sur la surface des endoprothèses, des anticoagulants tels que la warfarine (inhibiteur du facteur IX), l'aspirine (inhibiteur de la cyclooxygénase-1) ou le clopidogrel (antagoniste des récepteurs plaquettaires de l'adénosine diphosphate) sont administrés dans la circulation sanguine (27). Pour inhiber la prolifération cellulaire excessive locale, les endoprothèses peuvent être recouverts d'un polymère capable de libérer une molécule antiproliférative telle que le paclitaxel et sirolimus (28, 29). Néanmoins, des cas de thromboses tardives ont été rapportées (30), nécessitant de diversifier le choix des polymères et molécules contenus sur les endoprothèses.

3.2.2. Le pontage vasculaire

Malgré le développement de techniques curatives endovasculaires (angioplastie et stent), le pontage vasculaire reste nécessaire chez un nombre élevé de patients. Le cahier des charges de ce greffon doit répondre à plusieurs critères, que l'on peut plus précisément énumérer : durabilité suffisante, biocompatibilité, perméabilité, résistance à la suture, non thrombogénique, souple mais ne s'oblitérant pas lorsqu'elle est fléchie, résistante aux infections, stérilisable et disponible en plusieurs dimensions (31). Le pontage vasculaire peut se faire en utilisant une veine ou parfois une artère (autogreffes), une veine provenant de la même espèce (allogreffes) ou une prothèse synthétique. Quatre dates importantes marquent le début de l'ère chirurgicale vasculaire moderne :

- 1906, Jose Goyannes réalise la première interposition d'une greffe veineuse à la place d'un segment anévrysmal artériel chez l'Homme (32).
- 1949, le chirurgien français Jean Kunlin est le premier à utiliser une veine saphène pour le traitement chirurgical d'une carotide présentant des lésions athérosclérotiques (33).
- 1951, première utilisation d'un substitut artériel en chirurgie vasculaire chez l'homme par Oudot. Il s'agissait alors de l'implantation d'une allogreffe artérielle thoracique (34).
- 1952, premier pontage vasculaire synthétique effectué par Voohrees par implantation d'une prothèse textile poreuse (35).

- *Les autogreffes*

Ce sont des substituts provenant du patient et prélevés extemporainement, ne subissant aucun traitement avant leur mise en place. La veine saphène est l'autogreffe le plus utilisé pour la chirurgie vasculaire périphérique, notamment pour les pontages de type fémoro-poplitée ou fémorodistal. Elle peut aussi être employée pour un pontage aorto-coronaire. Ces autogreffes veineuses présentent 80 à 90% de réussite un an après leur mise en place, succès principalement attribué à leur facilité d'emploi, leur stabilité dans le temps et leur perméabilité. Cette dernière est essentiellement attribuée à la persistance d'une interface optimale avec le flux sanguin, due à la persistance de l'endothélialisation du greffon natif (36). Cependant, les occlusions d'un pontage veineux autologue surviennent régulièrement, et sont essentiellement dues à un développement hyperplasique de l'intima, en particulier au niveau des zones à risques que représentent les lignes de sutures des anastomoses, et également sur d'éventuels autres segments du greffon, potentiellement traumatisés lors du prélèvement ou lors des manipulations per-opératoires (dévalvulation, clampage, rinçage sous pression) (37). Les techniques de prélèvement requièrent donc un soin particulier afin de minimiser l'agression du greffon (38).

Les autres substituts autologues comme l'autogreffe artérielle, malgré leur avantage intuitivement supérieur (propriétés mécaniques et biochimiques), ont une utilisation extrêmement restreinte en raison du nombre très limité de sites de prélèvement possibles car sont généralement sujet à la formation d'athérome. Cependant, l'artère thoracique interne (ou mammaire interne) est la plus employée car elle est peu sujette à la formation d'athérome. Loop *et al.* ont montré, dans la revascularisation du myocarde par ces artères, que 90% des greffons restent fonctionnels au-delà de dix ans (39). Dans une étude consacrée au pontage chirurgical à l'aide d'une artère mammaire, Cameron *et al.* (40) ont mis en évidence une différence significative de la perméabilité entre les substituts artériels et les substituts veineux. Ce sont les propriétés mécaniques de la paroi artérielle ainsi que les propriétés biochimiques de l'endothélium artériel qui sont responsables d'une meilleure efficacité du substitut artériel et de sa survie à long terme.

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. 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 s'avère nécessaire : allogreffes, xélogreffes ou substituts synthétiques (41).

- *Les allogreffes*

L'utilisation des allogreffes fraîches (conservées à 4°C) ou cryoconservées (prélevées sur un donneur en mort clinique) constitue, depuis le début des années 1950, une alternative utilisée dans les remplacements des conduits vasculaires. Cette technique a été abandonnée au début des années 1960 à cause d'une difficulté concernant le moyen de conservation, d'une détérioration tardive du greffon, de la formation d'anévrisme et de l'apparition prometteuse, à cette époque, de prothèses synthétiques. Plus tard dans les années 1970, les allogreffes ont été réutilisées et des banques de tissus ont été créées pour assurer leur disponibilité (42). Ces greffons d'origine humaine, sont soumis à des pré-requis réglementairement opposables définis dans les articles L. 1243-02, L. 1243-5 et L. 1245-5 du code de la santé publique.

Beaucoup d'efforts ont été faits pour le développement de méthodes de conservation afin d'obtenir une stabilité et une innocuité biologique optimales des allogreffes vasculaires (43, 44). La conservation en milieu nutritif à 4°C peut fournir des allogreffes riches en cellules vivantes, présentant une faible thrombogénicité et une bonne résistance à l'infection, mais le délai d'utilisation est limité à 45 jours, bien que BioProtec, une banque de tissus fournissant des allogreffes veineux, propose un protocole de conservation allant jusqu'à 8 mois dans un sérum physiologique à 4°C. Malgré des résultats prometteurs (45), une perte des cellules endothéliales peut être à l'origine d'une thrombogénicité précoce. Afin de conserver les greffons plus longtemps, la cryoconservation est utilisée mais nécessite la mise en application de précautions indispensables telles que la descente progressive en température et l'emploi de cryoprotecteurs tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO), le glycérol ou l'éthylène glycol. Cependant, les allogreffes cryoconservées présentent plusieurs désavantages tels que la perte de l'endothélium engendrant une thrombogénicité précoce (46), une diminution de la résistance de la paroi aux pressions (47) et enfin le coût élevé de leur conservation.

- *Les xénogreffes*

En 1970, Rosenberg utilise pour la première fois des greffons vasculaires d'origine animale, appelés xénogreffes, obtenues par préparation d'artères carotides bovines. Ces xénogreffes sont d'abord dépourvues des couches musculo-élastiques par réaction enzymatique jusqu'à l'obtention d'une structure contenant essentiellement du collagène. Cette structure est ensuite réticulée afin d'assurer au substitut une rigidité suffisante (48). D'autres méthodes de décellularisation ont été décrites. L'utilisation d'un détergent (Triton X-100/NH₄OH) seul ou en association avec une enzyme de digestion dans le traitement des xénogreffes a montré son efficacité dans l'élimination des cellules et la préservation de la matrice extracellulaire (MEC) (49, 50). Afin de diminuer tout risque de thrombogénicité, l'héparine a été utilisée et liée par liaisons covalentes avec le collagène de la MEC des xénogreffes (51). Malgré des modifications telles que la réticulation de la matrice, la méthode de décellularisation et l'utilisation d'un antithrombotique, l'implantation des xénogreffes s'est soldée par de nombreuses thromboses, ruptures et infections, annihilant leur application en thérapeutique (49, 52).

Il n'est d'ailleurs pas surprenant que toutes ces options de xénogreffes vasculaires n'aient pu résister au développement parallèle des prothèses synthétiques plus performantes, dont l'utilisation pour des vaisseaux de gros diamètre se montre particulièrement performante.

- *Les prothèses synthétiques*

Les prothèses vasculaires synthétiques comme le polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe), le polyéthylène téréphtalate (Dacron®) ou polyuréthane sont utilisées avec succès lors de remplacements de vaisseaux de gros calibre (53, 54). Ils sont l'objet de développements permanents visant à augmenter leurs performances cliniques en optimisant leurs propriétés thrombogéniques et leur biostabilité. Actuellement, seuls le Dacron® et le PTFEe sont utilisés en chirurgie vasculaire. Malgré leurs caractéristiques prometteuses (disponibilité, biocompatibilité), les résultats ne sont pas favorables pour les remplacements artériels de vaisseaux de petit calibre, inférieur à 6 mm de diamètre, ou pour les remplacements veineux, car la diminution du flux vasculaire et la réponse hyperplasique intinale péri-anastomotique contribuent à leur occlusion (55, 56). En effet, cette occlusion peut se produire durant différentes périodes post-implantatoires. Il est possible de distinguer :

- l'occlusion précoce (30 jours) due à des problèmes techniques liés au faible flux sanguin et à une thrombose aigüe provoquée par l'activation de la cascade de la coagulation ;
- l'occlusion moyenne (3 mois à 2 ans), principalement au niveau distal de l'anastomose, due à un rétrécissement de la lumière du substitut consécutivement à une hyperplasie intimale ;
- l'occlusion tardive (supérieure à 2 ans) due à la dégénérescence de lésions athérosclérotiques sous-jacentes.

Devant ces problèmes, de nombreuses modifications ont été faites sur le Dacron® et PTFE afin d'améliorer leurs fonctions (57). Néanmoins, certaines limites subsistent surtout pour les faibles diamètres. Il est donc d'un intérêt majeur de s'intéresser au moyen de remplacer de tels vaisseaux lésés par des vaisseaux compatibles et durablement fonctionnels.

Beaucoup de progrès ont été faits dans la détermination des facteurs de réussite éventuelle d'un greffon vasculaire. Des facteurs mécaniques telles que : (i) une résistance suffisante pour supporter des pressions internes considérables et permettre aux sutures de résister à des tensions importantes, (ii) une qualité de paroi appropriée : perméabilité et compliance, (iii) des propriétés physiologiques appropriées (réponse vasoconstriction /relaxation) et (iv) une élasticité proche de celle du vaisseau adjacent. Des facteurs biologiques telles que : (i) biocompatibilité (non thrombogène et non immunogène), (ii) durabilité, (iii) résistance aux infections et (iv) comportement *in vivo*. Enfin, des facteurs cliniques concernant le temps de fabrication des greffons vasculaires, leur coût, leur disponibilité et leurs caractéristiques (diamètre, longueur, structure...) (58). D'ailleurs, grâce aux progrès scientifiques et technologiques réalisés dans les sciences du vivant, de la médecine et des sciences de l'ingénieur, l'obtention d'un substitut artificiel possédant toutes les caractéristiques citées ci-dessus semble réalisable grâce à l'apparition d'une discipline appelée l'ingénierie tissulaire des vaisseaux.

III. Ingénierie tissulaire vasculaire

L'émergence des concepts comme le génie tissulaire ou la bioingénierie ouvre de très larges perspectives pour la conception et la mise au point de tissus qui permettront de faire face au déficit d'organes devant une demande toujours croissante. Ces concepts sont fondés sur l'association de

cellules et d'une matrice, naturelle ou synthétique, dont le devenir, *in vivo*, sera fortement influencé par des signaux locaux, physiques et chimiques. Ces facteurs interviennent largement dans la perméabilité et les propriétés mécaniques des néo-tissus (59). Les différents progrès acquis dans ce domaine ont déjà ouvert une nouvelle voie offrant un grand potentiel dans le domaine de la transplantation d'organes. De nombreuses prothèses humaines construites par génie tissulaire sont ainsi disponibles et commercialisées, dont les vaisseaux sanguins (Cytograft[®]), les ligaments (Lars[®]), le cartilage (DeNovo NT[®]), les os (ChronOs[®]), etc. De plus, cette approche par génie tissulaire permet d'envisager la régénération d'organes déficients comme les muscles, le tissu nerveux central et périphérique, la vessie, les sphincters, le foie, le pancréas, etc... (60).

Dans cette étude, nous nous intéresserons à l'application de l'ingénierie tissulaire dans le domaine vasculaire. Le développement de prothèses vasculaires sanguines durables et fonctionnelles pose un énorme défi. Dans la littérature, différentes stratégies ont ainsi été étudiées, dont 5 approches majoritaires, utilisées dans la construction d'un vaisseau par bioingénierie, sont à retenir (61) :

- Endothélialisation de la surface luminale des substituts vasculaires dans le but d'obtenir une surface non thrombogène et éviter la resténose (2) ;
- Construction des vaisseaux à base de collagène (62) ;
- Utilisation de polymères synthétiques et biodégradables tels que : l'acide polyglycoliques, le poly-4-hydroxybutyrate, l'acide poly L-lactique, le polyéthylène glycol, ou le polycaprolactone (63, 64, 65) ;
- Auto-assemblage de feuillets cellulaires (66) ;
- Utilisation de vaisseaux naturels décellularisés dans le but de favoriser leur recouvrement cellulaire par recrutement cellulaire *in vivo* après implantation (67).

Toutes ces préparations font intervenir diverses matrices et cellules (musculaires et/ou endothéliales), des systèmes de maturation, des modèles animaux et enfin le transfert de ces constructions du laboratoire vers la clinique (fig. 4).

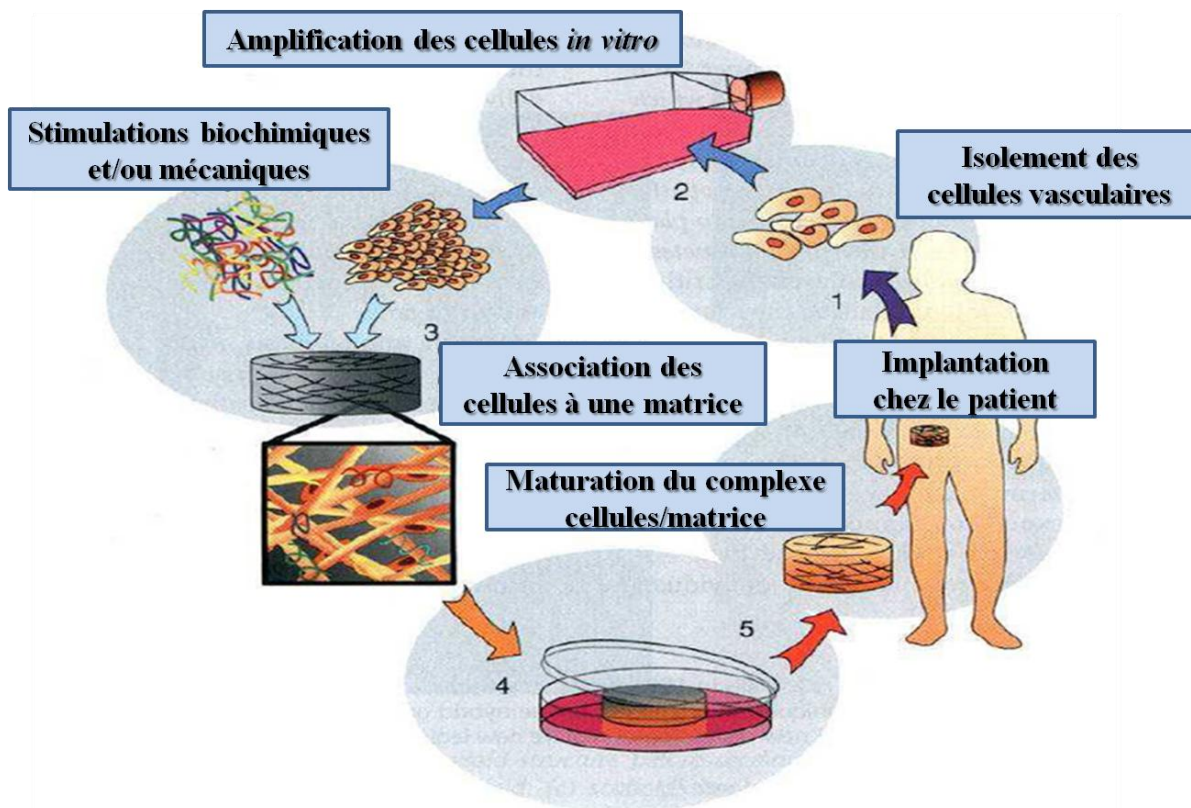


Figure 4 : Principe général de l'ingénierie tissulaire vasculaire (68). Les cellules peuvent être prélevées chez le patient, amplifiées et/ou différenciées *in vitro* puis associées à une matrice ainsi qu'à des molécules actives. Cette structure est alors cultivée sous contraintes dynamiques et/ou biochimiques pour permettre la synthèse d'une matrice extracellulaire par les cellules elles-mêmes. Enfin, ce produit d'ingénierie tissulaire est réimplanté chez le patient.

1. Les Cellules

Les cellules endothéliales (CEs), cellules musculaires lisses (CMLs) et/ou autres types cellulaires capables de les remplacer, peuvent potentiellement être utilisés pour créer un substitut vasculaire. Ces cellules peuvent être allogéniques, xénogéniques ou autologues.

Le choix de la source cellulaire utilisée se fait en fonction de plusieurs critères, l'objectif étant de les optimiser :

- **L'absence d'immunogénicité** ;
- **La disponibilité** : le prélèvement cellulaire doit être facile, et les cellules disponibles en grande quantité et/ou facilement amplifiables ;

- **La fonctionnalité** : les cellules doivent adhérer correctement au support utilisé, posséder une bonne viabilité, une bonne capacité de prolifération (au cours des passages) et un phénotype stable et fonctionnel, notamment la production de monoxyde d'azote (NO) par les CEs, et de matrice extracellulaire (MEC) par les CMLs.

1.1. Les cellules musculaires lisses

Les CMLs sont des cellules allongées (20-50 µm de long et 5 µm de diamètre) mononucléées (noyau central et allongé) et entourées d'une membrane péricellulaire qu'elles synthétisent, constituée majoritairement de collagène de type IV, étroitement associé à la membrane de la cellule. Les CMLs présentes dans la media des vaisseaux sanguins jouent un rôle très important dans : (i) la synthèse des composants de la paroi vasculaire (collagène, élastine et protéoglycane), (ii) le maintien de l'hémostase vasculaire, le remodelage vasculaire en condition pathologique, (iii) l'élasticité de la paroi grâce à leurs propriétés contractiles et (iv) la stabilité de l'intima médiée par les CEs (69, 70). Les CMLs peuvent interagir avec la MEC par l'intermédiaire de protéines membranaires assurant la jonction cellules/matrice. Des jonctions gaps permettent des échanges intercellulaires. La structure de l'organe contractile de la paroi vasculaire est différenciée du muscle strié par l'absence de stries, d'où le terme de lisse. Les CMLs ont été utilisées dans beaucoup d'approches (71). Récemment, Dahl *et al.*, ont démontré le potentiel des CMLs matures humaines dans la bioingénierie vasculaire. Ces auteurs ont réussi à fabriquer un substitut vasculaire, à base d'une matrice synthétique et de CMLs, dont les propriétés mécaniques miment les conditions naturelles et ce même après 12 mois de conservation à 4°C. Un pourcentage élevé de fonctionnalité (> 87%) est également observé après 6 mois d'implantation chez l'animal (72). Cependant, l'utilisation des CMLs matures dans la bioingénierie peut être limitée par plusieurs facteurs : les procédures de récupération invasive, la culture à long terme et enfin la perte progressive du phénotype contractile et du potentiel de prolifération (73).

1.2. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales constituent la barrière entre le sang qui circule dans les vaisseaux sanguins et les parois de ces vaisseaux en formant ce qu'on appelle l'endothélium vasculaire. Ce

dernier se comporte comme une barrière de perméabilité sélective qui autorise et régule les échanges de gaz et de molécules de tailles variables, eau, sels, protéines, entre le sang et les tissus ainsi que les échanges entre cellules (74). Les modes et mécanismes de transport au travers de la barrière endothéliale varient selon leur localisation artérielle, veineuse ou microcirculatoire. Les cellules endothéliales mesurent entre 0,3 et 0,5 μm d'épaisseur, 25 et 50 μm de long et 15 μm de large. Elles ont une forme polygonale et sont orientées dans la direction du flux sanguin (75). Ces cellules forment une monocouche continue en mosaïque et occupe une position anatomique stratégique dans la paroi vasculaire. Leur nombre est estimé à 6×10^{13} cellules couvrant une surface de 7 m^2 chez un être humain adulte.

L'activité antithrombotique de l'endothélium est une de ses fonctions essentielles, et c'est cette propriété qui fait de la cellule endothéliale une cellule d'intérêt pour les applications cliniques. Le principal mécanisme par lequel les CE exercent leur effet anticoagulant est dû à l'inhibition électrostatique de l'attachement de cellules circulantes à la paroi vasculaire en raison de la forte charge négative, conférée par le glycocalyx, présente à sa surface (76). De plus, les CE sont capables de synthétiser de puissantes molécules telles que l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), la prostaglandine I₂ (PGI₂), l'antithrombine III, l' α 2-macroglobuline ou le monoxyde d'azote (NO), connues pour assurer la fluidité du sang en empêchant l'agrégation et l'adhésion leucocytaire, principaux facteurs responsables de la formation d'un thrombus (77).

Les CE synthétisent et sécrètent de nombreuses substances qui diffusent et influencent la fonction des cellules musculaires lisses (CMLs), des plaquettes et des leucocytes circulants (fig. 5) (78). En agissant sur la contraction des CMLs, elles peuvent réguler le tonus vasculaire grâce à la libération de plusieurs agents de vasodilatation tels que NO et PGI₂ et de vasoconstriction tels que l'endothéline (ET) et thromboxane A₂ (TXA₂). Enfin, elles peuvent aussi contrôler le remodelage vasculaire par la sécrétion de différents facteurs de croissance et cytokines (79).

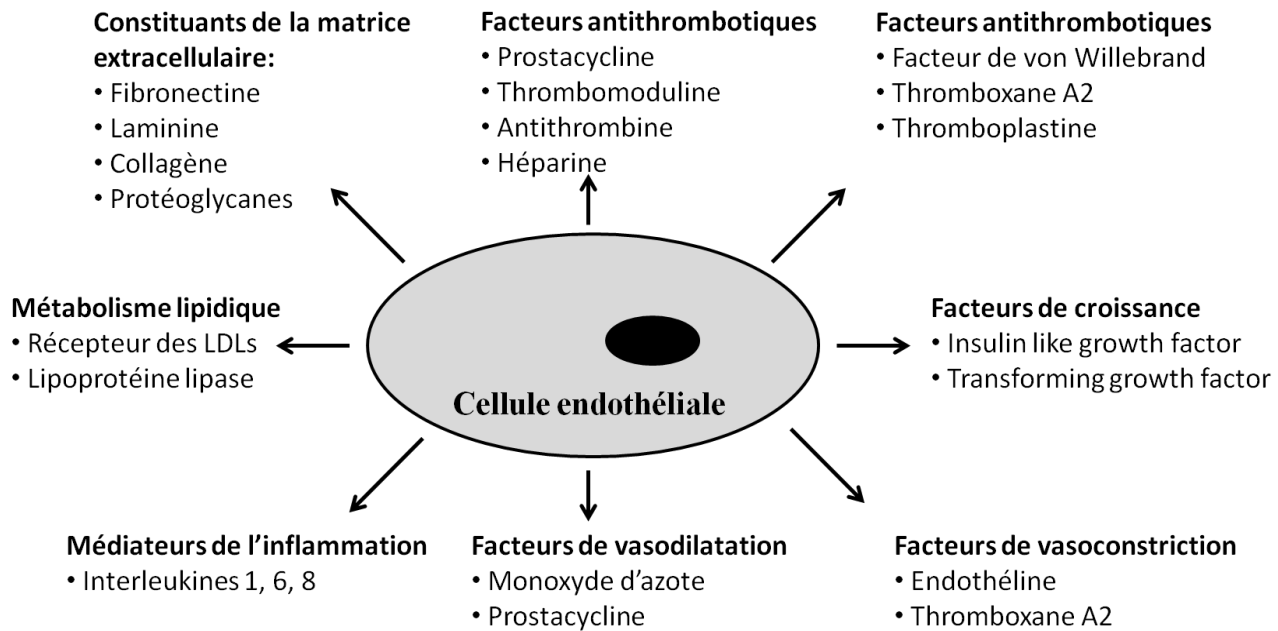


Figure 5 : Facteurs synthétisés par les CEs (71). *Médiateurs sécrétés par les CEs et capables d'influencer les fonctions cellulaires dans tout l'organisme.*

1.3. Caractérisation des cellules endothéliales

Les CEs, issues de différentes sources ou tissus, présentent une grande variation phénotypique (80, 81). Cette variation peut influencer le comportement de ces cellules en termes d'angiogenèse, de perméabilité moléculaire, d'hémostase, de tonus vasculaire et de tolérance immunitaire (82) ; d'où l'intérêt du choix de la source de cellules utilisée pour la construction des vaisseaux.

Les CEs, comme toutes autres cellules, disposent des mêmes constituants intercellulaires habituels : mitochondries, réticulums endoplasmiques lisses et rugueux, cytosquelette....etc. Cependant, elles se distinguent par la présence d'une structure qu'elles partagent avec les mégacaryocytes, appelée corps de Weibel Palade (83). Ces corps sont des lieux de stockage du facteur de von Willebrand (vWF) (84), impliqué dans les phénomènes d'hémostase. La capacité des CEs à digérer ou incorporer les lipoprotéines acétylées (Ac-LDLs) constitue un autre facteur qui les distingue des autres types cellulaires (85). Ces cellules, au cours du développement, acquièrent des marqueurs plus ou moins spécifiques et c'est *via* ces marqueurs que nous évaluerons les qualités et fonctions spécifiques des CEs.

1.3.1. Marqueurs membranaires des cellules endothéliales

CD31 (*Cluster of differentiation 31*) ou PECAM-1 (molécule d'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales - 1), est une protéine transmembranaire d'une masse moléculaire d'environ 135 kDa, appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Le CD31 est exprimé à la surface plaquettes, monocytes, macrophages, neutrophiles et au niveau des jonctions intracellulaires des cellules endothéliales. Il joue un rôle dans les interactions adhésives entre les cellules endothéliales adjacentes et également entre lymphocytes, monocytes et cellules endothéliales (implication dans le diapédèse/migration de ces cellules). Il est également connu pour son rôle régulateur de l'angiogenèse (86, 87).

VEGFR-2 (*Vascular endothelial growth factor receptor 2*) ou KDR (*Kinase Domain containing Receptor*), est un récepteur de type tyrosine kinase dont la masse moléculaire est comprise entre 210 et 230 kDa. Il joue un rôle important dans l'induction de la réponse proliférative des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (88, 89). Il est également impliqué dans la régulation de l'angiogenèse et la vasculogenèse suite à la stimulation médiée par son ligand (VEGF) (90). VEGFR-2 est exprimé principalement à la surface des CEs des vaisseaux sanguins et lymphatiques (91), mais également à celle des cellules tumorales (92).

VE-Cadhérine (*Vascular endothelial Cadherin*) est une protéine de 120 kDa, spécifique de l'endothélium vasculaire, et appartenant à la famille des cadhérines. La VE-Cadhérine est exprimée de façon constitutive et participe à de nombreuses fonctions endothéliales telles que le maintien de l'intégrité vasculaire, l'angiogenèse, la migration et la survie cellulaire (93).

Tie2 (*Endothelium-specific receptor tyrosine kinase*) est un récepteur de type tyrosine kinase d'une masse moléculaire comprise entre 135 et 150 kDa. Il est exprimé à la surface des cellules hématopoïétiques, tumorales, endothéliales vasculaires et lymphatiques (94). L'activation de ce récepteur par l'Angiopoïétine-1, ligand agoniste, interfère fortement dans la maturation des vaisseaux durant l'angiogenèse physiologique et pathologique (95). Elle peut aussi jouer le rôle de médiatrice dans la migration, l'adhésion et la survie des cellules endothéliales (96).

1.3.2. Marqueurs intracellulaires des cellules endothéliales

vWF (*Von Willebrand factor*) est une glycoprotéine importante de structure multimérique, dont la masse moléculaire peut aller de 500 kDa à plus de 10 000 kDa. Le vWF semble être exclusivement exprimé dans les cellules endothéliales, mais il peut être également présent dans le cytoplasme des mégacaryocytes, ainsi que dans la matrice subendothéliale de la paroi des vaisseaux (97, 98). Il joue un rôle de médiateur dans l'adhésion plaquettaire et la formation du caillot sur les sites de lésion vasculaire, et sert de transporteur plasmatique pour le facteur VIII (99, 100).

e-NOS (*endothelial nitric oxide synthase*), est une enzyme exprimée de façon constitutive dans les CEs (101). Cette dernière possède un poids moléculaire de 135 kDa. Chaque monomère présente plusieurs domaines : (i) un domaine réductase, fixant le Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), (ii) un petit domaine de fixation de la calmoduline, indispensable à la dimérisation de l'enzyme et à son activité et (iii) un domaine oxygénase impliqué dans la formation de NO. L'activité et l'expression de e-NOS peuvent être régulées par plusieurs facteurs biochimiques tels la calmoduline, la concentration de calcium intracellulaire ou les hormones, et par des facteurs non biochimiques comme la contrainte de cisaillement (102). En ce qui nous concerne, NO synthétisé par cette enzyme, a une action vasodilatatrice au niveau des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle.

1.4. Sources de cellules endothéliales

Malgré la difficulté de leur obtention, les cellules vasculaires autologues restent une priorité pour l'ingénierie vasculaire. Contrairement aux autres sources cellulaires (allogénique, xénogénique), l'utilisation de cellules autologues permet d'éviter toute réaction immunologique. De nombreuses études décrivent les différentes sources d'isolement ou de génération de CEs (77). Dans le but d'endothélialiser les prothèses vasculaires, deux catégories de CEs se distinguent : les cellules matures et les cellules souches.

1.4.1. Cellules endothéliales matures

Les CEs provenant de la veine ombilical (HUVECs) ont été fréquemment utilisées dans l'étude de l'angiogenèse et la construction de tissus vasculaires (103). Ces cellules présentent l'avantage d'être facilement isolées d'une source abondante longtemps considérée comme déchet biologique. Le faible nombre de donneurs ainsi que les risques de rejets ou de contaminations possibles ont orienté les recherches vers les cellules autologues. Celles-ci peuvent être isolées à partir de vaisseaux prélevés au niveau de différents sites, tels que la veine saphène, la veine céphalique et les microvaisseaux (104, 105). En raison du faible nombre cellulaire initialement récupéré, les CEs récoltées doivent être cultivées et amplifiées *in vitro* avant d'êtreensemencées dans la matrice vasculaire. Ceci peut conduire à la perte progressive du phénotype, de fonction et du potentiel de régénération des CEs, sans oublier l'augmentation du risque de contamination et d'infection (106, 107, 108). Cette approche présente d'autres inconvénients comme la nécessité d'une expertise technique opérationnelle importante de la part du chirurgien, de sacrifier des structures vasculaires intactes du donneur ce qui augmente le traumatisme du patient, et d'une disponibilité de vaisseaux en bon état, chez un patient dont la santé est déjà compromise par des pathologies vasculaires (3).

Pour remédier à ces limites, le recours à d'autres CEs autologues matures a été entrepris. Les cellules microvasculaires provenant de tissus adipeux (*omentum*) se présentent comme un candidat particulièrement prometteur (109, 110). Leur isolement fait appel à une liposuction suivie d'une digestion enzymatique et purification cellulaire. Malgré l'hétérogénéité cellulaire dans la population isolée, l'utilisation de ces cellules comme source endothéliale autologue présente à ce jour un grand intérêt dans l'ingénierie des vaisseaux (111).

1.4.2. Les cellules souches

Une autre voie de génération de CEs peut se faire par l'isolement et la prolifération de CEs matures obtenues à partir de cellules souches. En effet, le corps humain possède une source très importante de cellules souches qui peuvent être isolées et ensemencées directement sur une matrice, soit directement, soit après une période de culture *in vitro* visant à les différencier en CEs. Le terme de « cellule souche » est utilisé pour désigner une cellule qui, lorsqu'elle est placée dans un environnement tissulaire approprié, est capable de proliférer et produire des cellules spécialisées,

avec la morphologie et les fonctions spécifiques du tissu hôte. Les cellules souches peuvent être classées en trois types : cellules souches embryonnaires, cellules souches fœtales et cellules souches adultes. Elles peuvent également être classées en quatre grandes catégories selon leurs capacités à s'auto-renouveler et à produire des cellules différenciées : i) les cellules totipotentes peuvent conduire à tout type cellulaire puisqu'elles sont à elles seules à l'origine de l'individu complet; ii) les cellules pluripotentes ont la capacité de former tous les tissus de l'organisme mais ne peuvent pas à elles seules, aboutir à un être complet; iii) les cellules multipotentes peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules, mais sont déjà engagées dans une certaine lignée et enfin iv) les cellules souches unipotentes ne peuvent produire qu'un seul type cellulaire (tout en s'auto-renouvelant), comme par exemple la peau (kératinocytes) ou le foie (hépatocytes) (112).

Par leur facilité de manipulation et d'expansion, et leur fort potentiel de différenciation, les cellules souches suscitent un intérêt considérable dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative (113). Deux fonctions principales doivent être distinguées : une première est sécrétoire ou trophique, y compris la sécrétion d'un large spectre de molécules immunomodulatrices, anti-inflammatoires, anti-apoptotiques, pro-angiogéniques et prolifératives (114). La deuxième est leur capacité à guider, après administration, leur processus de différenciation en présence des cellules résidentes différenciées (115).

En ce qui nous concerne, on s'est intéressé aux applications des cellules souches humaines dans la régénération vasculaire et les différentes stratégies utilisées pour leur différenciation en cellules vasculaires (CEs et CMLs). Cette partie sera présentée sous forme d'une revue scientifique qui est actuellement soumise à **Cardiovascular research**.

STEM CELLS: A PROMISING SOURCE FOR VASCULAR REGENERATIVE MEDECINE

**H. Rammal^{1*}, C. Harmouch^{1*}, J.J. Lataillade², D. Laurent-Maquin³, P. Labrude¹, P. Menu^{1□}
and H. Kerdjoudj³**

¹ UMR 7365, CNRS-Université de Lorraine, Biopôle, Faculté de Médecine, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

² Centre de transfusion sanguine des Armées Jean Julliard, Clamart, France.

³ UFR Odontologie, EA 4691 BIOS, SFR-CAP Santé, URCA, Reims, France.

□ [Corresponding Author : patrick.menu@univ-lorraine.fr](mailto:patrick.menu@univ-lorraine.fr)

(*) Both authors contributed equally to this work

Abstract

The rising and diversity of many human vascular diseases pose urgent needs for the development of novel therapeutics. Stem cell therapy represents a challenge in the medicine of the 21st century, an area where tissue engineering and regenerative medicine gather to provide promising treatments for a wide variety of diseases. Indeed, with their extensive regeneration potential and functional multilineage differentiation capacity, stem cells are now highlighted as promising cell sources for regenerative medicine. Their multilineage differentiation involves environmental factors such as biochemical, extracellular matrix coating, oxygen tension and mechanical forces. In this review, we will focus on human stem cell sources and their applications in vascular regeneration. We will also discuss the different strategies used for their differentiation into both mature and functional smooth muscle and endothelial cells.

Key Words: stem cells differentiation, endothelial cells, smooth muscle cells, vascular tissue engineering

Introduction

Despite changes in lifestyle and the use of new pharmacological approaches to increase life expectancy, vascular diseases continue to be the principal cause of death around the world (1). They are a broad term encompassing any condition that affects the vascular system such as hypertension and atherosclerosis. Atherosclerosis is a slowly progressing and multifactorial disease in which endothelial dysfunction and damage play an initial role. Indeed, a healthy endothelium is crucial to create an anti-thrombogenic surface essential to interact with the circulating blood in order to prevent the thrombus formation. In charge of the secretion of specific metabolites and regulation of vascular homeostasis, the impairment of endothelial cell (ECs) layer leads to the initiation and progression of pathophysiological mechanisms leading to abnormal smooth muscle cells (SMCs) migration and proliferation causing intimal hyperplasia. Therefore, ECs and SMCs are both unequivocally crucial for the development of a healthy and durable vasculature. Cardiovascular devices such as stents and vascular grafts used to restore or to replace damaged site have found a limited success in the area of small caliber vessels, due to restenosis, thrombus and neointima formation on the device surface. Several reviews in the broader field of cardiovascular devices have been published in recent years (2–4); readers interested in these approaches are referred to these papers. In view of the above limitations and the increasing demand for vascular substitutes, vascular surgeons are looking for a better approach to establish new grafts.

Cell cultures and tissue engineering field, chime with intensive efforts based on stem cells in order to develop suitable and patent grafts. Indeed, stem cell therapy is an exciting area of research that promises future treatment of many diseases and presents a potential key for tissue repair and regenerative medicine. Depending on their specific properties,—stem cells are being intensively

invested as a cell-based therapy for vascular tissue engineering. Two main inherent functions of stem cells should be distinguished: (i) the first one is secretory or "trophic" factors, including the secretion of a wide spectrum of molecules with immunomodulatory, anti-inflammatory, anti-apoptotic, proangiogenic, proliferative, or chemoattractive capacities (5), (ii) the second one is their ability to orchestrate, after administration, their differentiation process together with differentiated resident cells for tissue restoration (6). In this review, we will focus on the applications of human stem cells in vascular regeneration and discuss the different strategies used for their differentiation into both functional smooth muscle and endothelial cells.

What are stem cells?

Stem cells have been defined in many different ways. However, the main principles include (i) self-renewal, or the ability to generate at least one daughter cell with characteristics similar to the initiating cell ; (ii) multi-lineage differentiation of a single cell ; and (iii) *in vivo* functional reconstitution of a given tissue. Commonly, stem cells come from three main sources: embryonic, fetal and adult tissues.

I. EMBRYONIC STEM CELLS

When a sperm cell and an egg cell unite, they form a fertilized egg. These are called totipotent cells that have the potential to give rise to an entire functional organism. More totipotent cells are produced in the first few cell divisions during the embryonic development. After four days of human embryonic cell division, cells begin to specialize into pluripotent stem cells. This type of cells can give rise to all tissue types but not to an entire organism.

I.1. Isolation, culture and characterization of human pluripotent ESCs:

Pluripotent stem cells (ESCs) have been derived *in vitro* either from inner cell masses of blastocysts (7) or primordial germ cells (8). Since the establishment of the first embryonic stem cells (ESCs) lines by Thomson and co-workers (9) and Reubinoff and colleagues (10), the development in derivation and culturing of ESCs has progressed rapidly as described in several articles which a none exhaustive list was summarized in the Table 1. Most of the present ESCs have been isolated after trophoectoderm removal using pronase enzymatic digestion and trophoblastic cell destruction by immunosurgery. Maintenance of isolated ESCs to undifferentiated stage during serial passages requires culture on mouse embryonic fibroblast (MEF) feeders. MEF presumably supply cell-to-cell and paracrine interactions that more closely mimic the *in vivo* niche of the cell type attempting to be grown *in vitro* (11). Moreover, ESCs self renewal is primarily controlled through leukemia inhibitory factor/signal transducer and activator of transcription (*LIF/STAT*) pathway signaling. So the addition of LIF in culture medium seemed to be required. Unfortunately LIF is just able to maintain the undifferentiated growth state of mouse ESCs (9) but not of human ESCs (12).

Human pluripotent ESCs express specific cell surface markers such as stage-specific embryonic antigens 3 and 4 (SSEA-3 and 4), tumor rejection antigen-1 (TRA1-60, TRA1-81) and alkaline phosphatase. Other proteins and genes appear to be enriched or exclusively expressed in undifferentiated human ESCs such as Tetracarcoma derived growth factor 1 (TDGF1), *Telomerase associated genes* (*TERT*, *TERFs*), cluster of differentiation 133 and 9 (CD133, CD9) and *it1-Octamer-Unc* (*POU*) *transcription factors* (*Oct-3/4*) (13).

I.2. Differentiation ability of human pluripotent ESCs:

Human ESCs have the potential to differentiate into nearly all cell types of the human body. Nevertheless, growth and remodeling of vascular system are regulated by various cues, including growth factors, extracellular matrix (ECM) proteins, oxygen tension and hydrodynamic shear. In this part, we are going to focus on the vascular cells derived from human ESCs and their applications in tissue engineering field. Up to now, three approaches have been described to differentiate human ESCs into ECs and SMCs: either tridimensional embryoid bodies (EBs) or 2D monolayer-directed differentiation, with or without feeder cell layers. EBs, a physiological model for the early stage of embryogenesis, are generated from spontaneous ESCs aggregation in semi-solid culture conditions. Maintained in basal condition culture, human EBs showed a spontaneously differentiation toward endothelial lineage and they were highly positive to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGF-R2), platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and vascular endothelial (VE)-cadherin, but negative for endothelium-specific receptor tyrosine kinase (Tie-2) (14). The induction of PECAM-1 and VE-Cadherin expression was obtained after 15 days of stimulation using endothelial growth medium-2 (EGM-2) culture medium with a preferentially development of PECAM-1+ cells at the center of EBs (15). PECAM-1 or von Willebrand Factor (vWF) sorting cells incorporated into mouse vessels in a model of ischemia showed fully functional differentiated cells (16–18). Endothelialization of vascular scaffolds with EBs-ECs like sorting cells has been investigated (19–21). Although the enthusiastic findings were related, 3D method by EBs differentiation into ECs remained inefficient, with low ECs differentiation efficiency (1% to 3%) (17,22). Moreover, bioluminescence imaging of transplanted ESC-ECs showed that less than 1.5% of transplanted cells remained alive after four weeks (22).

Hypoxia is a low oxygen (O₂) tension that can be an important determinant for the differentiation and development of many cells and tissues. In this context, Shin *et al.*, have cultured EBs under hypoxic conditions, and reported a uniform distribution of PECAM-1+ and vWF+ cells throughout the whole body, including the outgrowth region whereas under normoxic condition, PECAM-1+ and vWF+ cells remained restricted to the central region (23,24).

Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) is a signaling molecule with critical functions in embryonic vasculogenesis and angiogenesis. Indeed, *Flk-1*, a gene encoding for VEGF-R2, is expressed by a common progenitor that gives rise to SMCs and/or ECs. VEGF treatment for 14 days at 50 ng/mL resulted in a 4.7-fold increase in the number of EB-ECs like positive for PECAM-1 and VE-Cadherin (20). Another growth factor combining to cytokines was suggested to boost ECs differentiation from EBs. Bone morphogenic protein (BMP) -4, member of the transforming growth factor-beta (TGF- β) superfamily, plays a crucial role in the commitment of pluripotent stem cells into mesoderm lineage and following that to the hematopoietic and endothelial lineages. Exposing human EBs for 24-hour to BMP-4 treatment at 50 ng/mL induced 12% ECs-like cells expressing PECAM-1 on the surface and vWF in the cytoplasm (25,26). Insulin growth factor (IGF) -1 and -2 also increase the generation of ECs, by only 7.6% and 3.7% with IGF-1 and IGF-2 respectively, in a spontaneously differentiating EBs by seven days (27). Vascular SMCs arise from diverse embryonic origins and this topic has been reviewed in detail by Majesky (28). Culture of EBs in platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) (19) and transforming growth factor-beta (TGF- β) (21) supplemented media promotes SMCs differentiation. Resulting spindle-shaped cells, displayed smooth muscle (SM)-myosin heavy chain (SM-MHC) and SM- α -actin (α -SMA) expression at respectively $96.81 \pm 2.07\%$ and $55.26 \pm 8.02\%$ after five days of culture (29). SMCs-specific genes expression determined by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction

(qRT-PCR) showed an up-regulation of *myocardin*, α -SMA, *calponin*, *smoothelin*, *SM-MHC*, *SM22 α* and *Telokin*. Moreover, carbachol and KCl treatment showed that a large proportion of EBs-SMCs react and change shape (29). Despite the reproducibility of vascular cell's generation using EBs based protocol, there is still a great degree of variability in EBs formation and differentiation efficiency. Certainly, differentiated EBs are composed of ECs and SMCs adding to cardiomyocytes and fibroblasts by 28 days (30,31).

Avoiding cell aggregation and development of EBs free system was investigated by co-culturing ESCs with mitotically inactivated feeder cell layer such as mouse embryonic fibroblasts (32) before isolation of subculture of progenitor or mature vascular cells. Recent work reported a decreasing of *Oct3/4* after day 4 of differentiation, and cell migration onto the genetically modified- ECs from human umbilical cells used as feeder layer. Compared with non-EC stromal cells, genetically modified-ECs induced a larger proportion of VEGF-R2+ cells (32). After the induction of differentiation on OP9 fibroblast feeder cells, VEGF-R2+/TRA-1- cells appeared at day eight. Stimulation with VEGF and PDGF-BB induced two of differentiation pathways for ECs and SMCs in this cell population (33). These cells could be differentiated into VE-Cadherin+ cells under VEGF stimulation and α -SMA+ cells under PDGF-BB stimulation, signature of respectively ECs and SMCs differentiation. Despite their regenerative potential, instability of the phenotype was reported. Indeed, at sixth passage of VEGF-R2+/VE-Cadherin+ 20~40% reminded VE-Cadherin+/CD31+ and 70% were extensively positive for α -SMA and weakly positive for calponin and SM-MHC-1 and 2 (18). Using both mouse bone marrow derived stromal cell lines (M2-10B4) and *Wnt1*-expressing M2-10B4 as cell feeder, Hill *et al.*, generated CD34+ cell population after 15 days of culture with an increasing rate for *Wnt1* and *Wnt5* over expressing M210 stromal cells. CD34+, magnetically separated cells, were able to generate both ECs and SMCs (34).

The use of feeder cell layer limits stem cell research design and human clinical trials, since experimental data may result from a combined ESCs and feeder cell response to various stimuli (35). In this respect, some studies described the system for feeder-free culture of ESCs. Indeed, considered for a long-time as passive, it has become apparent that the ECM proteins play an important role in governing many aspects of cellular behavior, including cell proliferation and differentiation. Therefore, coating the conventional culture support with different proteins such as type IV collagen, fibronectin and Matrigel® (36,37) increases the yield, the quality and the differentiation state of ESCs, when combined with specific growth factor in animal serum and feeder free system, into functional SMCs and CEs.

Kane *et al.*, have recently reported an efficient and directed differentiation protocol for the derivation of ECs from ESCs using a serum and feeder-free system. They observed a down regulation of *Nanog*, *oct-4* and *homeobox domain transcription factor (Sox-2)* pluripotency genes after the fourth day of stimulation. This decrease was concomitant with induction of *FLT-1*, *VEGF-R2*, *PECAM-1*, *VE-Cadherin* mRNAs and PECAM-1, VE-Cadherin proteins. Moreover, the differentiated cells were able to respond to nitric oxide, migrate, and spontaneously produce tube-like structures (38). In addition, combining ECM coating to hypoxia was found to promote expression of PECAM-1 and vWF endothelial markers after five days of culture (39).

Numerous researchers attempted to differentiate ESCs into SMCs in a serum and feeder-free system. In their study, Park *et al.* showed that ESC-derived CD34+ could differentiate into SMCs when they are cultured in EGM-2 medium supplemented with PDGF-BB/bFGF for 15 to 21 days. These cells presented spindle-like morphology and co-expressed SMA and Calponin. They also expressed SMC genes markers as *SM22*, *PDGF-R* and *Caldesmon* and contracted after 30 minutes of carbachol treatment (37). Others like Vo *et al.* used a combination of growth factors/cytokines

such as PDGF-BB/TGF- β 1 to differentiate ESCs into SMCs. *In vitro*, the resulted population expressed α -SMA, SM22 α , MHC and Calponin and was capable of producing collagen and fibronectin. In addition, there was an up-regulation of SMC's genes markers such as *PDGFR-B*, *SMA* and *angiopoietin-1* and a down-regulation of EC's specific genes *Flk-1* and *VE-Cadherin*. These cells also responded to carbachol stimulation and interacted with cultured endothelial progenitor cells to support and augment capillary-like structures, demonstrating the potential of ESCs as a cell source for therapeutic vascular tissue engineering (40).

I.3. Advantages and disadvantages of human pluripotent ESCs:

Human ESCs could be an unlimited source of vascular cells for treatment of cardiovascular diseases. Indeed, they are characterized by a good proliferative growth, a high and consistent telomerase activity, and a late apoptosis (9). Despite the promising characteristics, there are significant obstacles that need to be overcome before clinical applications. These include ethically problems concerning the destruction of blastocyst and egg donation. Although the first promising animal experiments, there are still limitations for the human regenerative applications. Indeed, the spontaneous EBs differentiation, the low efficiency of differentiation into progenitor vascular cells and the use of allogenic or xenogenic sources such as animal serum and feeder cells, presents a risk of contamination which impairs the translation from experimental and pre-clinical studies to human clinical therapies. Another reported risk involving the use of ESCs is the possibility of cell misbehavior such as teratomas formation and immune-compatibility following transplantation (22). In addition, ESCs expansion and their maintaining *in vitro* for a prolonged time tend to accrue genetic and epigenetic alterations observed commonly in human cancers (41). This implies that for therapeutic use ESCs should be cultured for as short as possible. In view of these disadvantages a

new type of cells, called induced pluripotent stem cell (iPS) has been recently engineered by Shinya Yamanaka's team at Kyoto University in Japan in 2006 (42).

I.4. Induced pluripotent stem cells:

Induced pluripotent stem cells are adult somatic cells that acquire ESCs potential after genetic modifications. Four key pluripotency genes (*Oct-3/4*, *SOX2*, *c-Myc*, and *Klf4*) were specifically chosen and retrovirally transduced in mouse first then human fibroblasts (42,43). Simultaneously, Thomson and colleagues reported the generation of iPS cells from human fibroblasts using a different gene combination (*Oct-3/4*, *SOX2*, *NANOG*, and *LIN28*) than the one used by Yamanaka and colleagues (44). In both cases, the resulting cells were shown to be remarkably similar to ESCs in terms of morphology, gene expression, and differentiation potential *in vitro* and *in vivo* (45–47).

As for ESC-ECs, human iPSCs-ECs were successfully obtained from EBs (48), on OP9 feeder layer (49) or on free feeder layer (50). Using OP29 feeder layer, Taura *et al.* induced for the first time human iPSCs differentiation into ECs and showed that 1% to 5% of cells were positive to VEGF-R2 and VE-Cadherin. Cultured with VEGF, sorting cells exhibited cobblestone morphology on type IV collagen coated dishes and formed a network-like structure on Matrigel® (49). In addition, ECs differentiated from human iPSCs-EBs were able to enhance capillary and improve reperfusion in limb ischemia mouse model (51). Recently, these authors showed that these cells display arterial, venous or lymphatic markers, signature of a high heterogeneity (48). Human iPSCs-SMCs were successfully generated and characterized (52,53). Resulting cells possessed not only global gene expression patterns similar to vascular SMCs but also possessed SMC- specific functionalities such as the calcium influx and subsequent contraction in response to vasoconstrictors (54). TGF- β treated human iPSCs, expressed SMC markers such as SMA, SM22, and SM-MHC with an incorporation of both SMA and SM22 into the stress fibers in 20% of the cells (53). Finally, Margariti *et al.* seeded

iPS cells on decellularized vessel scaffolds and reported that tissue-engineered vessels, in bioreactor (shear stress 1 Pa for 12 h then 3.5 Pa for 4 days), showed a native-vessel architecture, with multiple layers of SMCs and one ECs layer (55).

The work cited above is a proof of concept for the use of human iPSCs-ECs/SMCs in the vascular regeneration field, and presents a first step toward regenerative medicine. However, many issues must be overcome before their clinical applications. Indeed, human iPSCs share the same advantages and disadvantages of ESCs with the exception of their major ethical concern since they are from adult patients and the fact that these cells may be genetically matched to the patient. Nevertheless, other potential drawback is likely the presence of inherited or accumulated mutations in the genome from older adult cells that would predispose them to senescence or cancer. There are currently two additional problems with the iPSC technology: the weak efficiency of human iPSCs (less than 0.1% of fibroblasts become iPSCs) and the use of virus as a vector, resulting in a random integration of viral DNA into the host-cell's genome. A variety of non-integrating approaches [reviewed in Tiscornia *et al.* (2011)] were related (56). The clear advantages of non-integrating methods are still limited by their relatively low efficiencies, high cost and labor intensity. In addition, general transfection methods require relatively large numbers of somatic cells.

II. FETAL STEM CELLS

Fetal tissues, sustaining natal development, are typically discarded as medical post-delivery waste. Therefore, harvesting fetal stem cells (FSCs) represents a safe and non-invasive way for reaching therapeutically beneficial stem cells. These tissues include amnion/amniotic fluid (57,58), umbilical cord blood (59), placenta (60) and the Wharton's jelly contained within the

umbilical cord sometimes referred as umbilical cord tissue (61,62). For more physiological information about fetal tissue, readers are pleased to refer cited references (63–65).

II.1. Isolation, culture and characterization of human multipotent FSCs:

Great attention has been given to the identification and characterization of FSCs that can be used as allogenic cells for tissue engineering and regenerative medicine. There are few methods concerning the isolation of stem cells from perinatal tissues. Density gradient centrifugation is commonly used for umbilical cord blood, whereas cell adhesion and migration from the amniotic fluid and the explants or two-step enzymatic digestion were used for soft tissues as Wharton's jelly, placenta and amnion. Table II summarizes a non-exhaustive list of usually described protocols. Currently there is no standard operating procedure for FSCs harvesting from perinatal tissues. Therefore, isolation methods may differ in their ability to release stem cells from their niche and in the number of cells found at initial isolation. Thus, isolated cell populations may vary from group to group. Following cell harvesting and expansion for several times, FSCs seem to maintain their differentiation properties *in vitro* (66). However, FSCs quality can be affected by the length of culture time and cell seeding density. We should mention that the ability to expand FSCs from placenta and amniotic membrane is related to gestational age as they tend to be fewer towards the end of pregnancy. The term perinatal includes the time from the 20th week of gestation to the first 28 days of life. Gestational age however does not affect their differentiation potential (67). FSCs are considered more proliferative and even therapeutically active than adult stem cells. They express also HLA-G marker, which make them more immunosuppressive as compared to adult MSC. In addition, FSCs broadly meet the basic criteria for multipotent phenotype established by the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy (68). They are plastic adherent cells, expressing CD73, CD90, and CD105 and lacking expression of CD45, CD34 and

HLA-DR surface molecules. FSCs have also the capacity to differentiate into osteoblasts and chondroblasts under standard *in vitro* differentiating conditions (Table II). However, exceptions were reported in their adipogenic differentiation (69). Recent studies revealed that FSCs weakly express some pluripotent markers such as *Oct-4*, *Nanog*, *Sox2* and *Lin28* (70), and that *Oct-4* is only found in 0.1-0.5% of amniotic fluid derived cells (71). Based on these findings, the most appropriate conclusion at this stage would be that FSCs most likely are not pluripotent cells.

II.2. Vascular differentiation of fetal stem cells:

Many different approaches have been employed to differentiate, *in vitro*, vascular cells from FSCs and to form, *in vivo*, organized vascular structures (72–74). In monolayer culture, undifferentiated FSCs from the umbilical cord showed positive staining of α -SMA and vimentin with the deposition of type I and III collagens after two weeks in a basic culture (75). Interestingly, a subpopulation of FSCs from amnion and placenta expressed both early: *Flk1*, *Tie2*, *Fms-related tyrosine kinase 4* (*Flt4*) and *Angiopoietin 1* (*Ang1*) and lately *vWF* mRNA and VEGF-R2. Thus, these cells exhibit restricted plasticity and are preferentially directed toward the endothelial lineage (76,77).

VEGF and/or bFGF or EGF fetal stem cells treatment has been shown to trigger production of proteins constitutively expressed by ECs, such as vWF, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), CD31, VE-cadherin and VEGF-R2 (73, 76, 78, 79). These potent growth factors allowed the acquisition of functional markers characteristics of ECs, such as ac-LDL (76–79) and network formation when plated on Matrigel® (73, 76, 78, 80, 81). Transplanted into the hind limb ischemia model of nude mice, the differentiated ECs became involved in the vessel network (73, 74). Moreover, despite acute hypoxia-induced cell damage, Li *et al.*, have recently reported that FSCs from Wharton's jelly acquire both ECs phenotype and properties (82). Transplantation of ECs

derived from Wharton's jelly accelerates re-endothelialization and inhibits neointimal hyperplasia after vascular injury suggesting an efficient therapeutic strategy for the prevention of restenosis after revascularization procedures (83). Undifferentiated FSCs express smooth muscle-specific actin, h-caldesmon, desmin, and vimentin (84–86). In addition, they shared ultrastructural features with SMCs and myofibroblastic cells such as a spindle-shaped morphology, prominent rough endoplasmic reticulum, modestly developed Golgi's apparatus, well-developed mitochondria, myofilaments with focal densities frequently peripherally located, and gap junctions (84). Embedded into collagen scaffold, FSCs showed a reversible contraction following PDGF- and TGF- β 1- stimuli and relaxation following IL-10 stimulus (84).

II.3. Advantages and disadvantages of fetal stem cells:

Although, their degree of "stemness" is still not clear probably due to the absence of a standard protocol for cell harvesting, FSCs represent an available source for regenerative medicine and tissue engineering. These cells are easily accessible, multipotent, do not acquire invasive and expensive harvesting procedures, ethically benign, exhibit no immune reaction or tumors formation after transplantation, expandable *in vitro* for several passages and having a great differentiation capacity. Indeed, discarded as a waste of the birth delivery, fetus-associated tissues known as perinatal (or extraembryonic) tissues overcome several limitations by lacking donor site morbidity, offering highly available deciduous tissue sources. Despite all these blessings, umbilical cord blood stem cells were shown to present low frequency cell isolation with existing of heterogeneous cells, a low proliferation and some ethical concerns about their banking. In addition, a lack of information concerning chorion-derived MSCs (isolation, characterization, plasticity potential...) was noticed (87). Amniotic fluid stem cells are widely used in routine prenatal diagnosis. However, the

presence of undifferentiated and differentiated cells of varying origins (amniotic epithelium, fetal skin and fetal urogenital, respiratory, and gastrointestinal systems) and lineages has been supported by several reports (88,89). Therefore and before reaching the clinical stage, the differentiation capacities of fetal membrane derived stem cells *in vivo*, their long-term safety and efficiency needs critical assessment.

III. ADULT STEM CELLS

During the adult life, stem cells are still present and reside in a special microenvironment called the "niche", which provides the homeostasis of stem cells, control their proliferative activity and the maintaining of stem cell populations. Bone marrow (BM), site of adult hematopoiesis in mammals, is comprised of hematopoietic stem cell (HSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) (90–92). HSCs can differentiate into all blood cells of the myeloid and lymphoid cell lineages where MSCs possess therapeutic potential for the repair and regeneration of damaged tissues of mesenchymal origin. In this part of the review we focused on MSCs and their use in vascular tissue engineering.

III.1. Isolation and culture of human adult stem cells:

In addition to BM, MSCs have been found in different tissues including periosteum, trabecular and cortical bone, synovial membranes, adipose tissue, tendons, skeletal muscle, peripheral blood, skin, dental tissues and nervous system. Table III presents a non exhaustive list of the most explored adult MSCs culture protocols. Traditionally, MSCs plastic adherent cells appear as spindle-shaped cells that form colonies (i.e., CFU-Fs). The multi-lineage potential of these colonies is then examined after a culture period in defined media that induces cell differentiation. Additionally, phenotypic analysis of MSCs is determined by their culture conditions. Although conventionally cultured MSCs are not characterized by unique markers and probably denote some heterogeneous population, there is a

consensus among the scientific community that they do not express hematopoietic markers. The Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy thus proposed a set of minimum criteria that define human MSCs (93) as follows. When cultured under standard conditions, these cells must be positive for CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 and HLA-ABC and negative for CD3, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD31, CD33, CD34, CD45, CD71, CD117, CD184, VEGF-R2 and HLA-DR.

III.2. Vascular differentiation ability of human adult stem cells:

As related above, VEGF (a potent angiogenic factor) has been widely used to differentiate adult MSCs into ECs. VEGF in many forms (i) soluble (94–96), (ii) released from a surface over time (97) or bound to a surface (98), (iii) overexpressed through retroviral transduction of the VEGF gene (99), (iv) conjugated with IGF-1, EGF and hydrocortisone (100,101) or (v) combined to mechanical stimulation (102), were previously described. Controlled by Rho/MRTF-A signaling pathway, a substantial increase of expression of arterial ECs-specific markers on MSCs after differentiation with VEGF was related (103). VEGF/IGF-1-induced endothelial differentiation was shown to be more controlled through PI3K pathway. However, the resulting cells were mildly thrombogenic *in vivo* due to lack of eNOS expression (96,104). TGF- β 1, a potent multifunctional cytokine that coordinately up-regulates a variety of SMCs differentiation markers (105), has been shown to increase SMA and calponin expression but not SM-MHC and smoothelin, late SMCs markers (106,107). Thus, TGF- β 1 induced a partial conversion of human MSCs into SMCs phenotype. Vascular cells are continuously submitted to mechanical forces such as shear and tensile stress due to blood flow and compliance effects in the body, suggesting that these unique environmental factors could enhance stem cells differentiation when they are cultured *in vitro*

(108,109). Few studies have revealed some degree of vascular cell differentiation from adult stem cells as a result of tension and cyclic stretch (106,110,111), shear stress and pressure (112) or combined shear, stretch, and pressure (113). Despite the morphological evolution from fibroblastic to ovoid shape, a change of their phenotypic profile depending on force amplitude was reported (102,112). Indeed, under higher shear stress (1 Pa) some typical markers for SMCs were observed whereas those for ECs were seen under lower shear stress (0.25 Pa) (112,114). Others found that SMCs protein expression was restricted to MSCs exposed to cyclic stretch and was strongly dependent on the magnitude and frequency of applied cyclic stretch while, apart from VEGF-R2, none of other ECs markers have been seen (111).

III.3. Advantages and disadvantages of adult stem cells

Throughout these recent years multipotent adult stem cells have seen many advances toward clinical uses and cell therapy. Their rapid proliferation, great plasticity and long term cryopreservation have not only optimized many tissues engineering development, but also rendered feasible some applications which would otherwise be unattainable with other cells. Adding to this, these cells demonstrated the ability to differentiate into mesodermal lineage and unlike ESCs, the isolation and the use of these cells are not limited by ethical issues. Adult stem cells present an immunoprivileged status and could be isolated from the patient's own tissue. Therefore, virtually limitless conceptual viability of autologous and allogenic approaches to tissue engineering is one of the most direct consequences of this very exciting principle. A variety of adult stem cells have been identified and isolated for clinical use, bone marrow transplantation is probably the best known example for stem cell-related therapy. However, with the exception of bone marrow transplant, adult stem cells use is largely limited and rarely approved by the FDA or other agencies for clinical trials.

In addition, adult stem cells isolation may be painful due to invasive procedures and cells could retain some damaging genetic alterations when isolated from person with genetic disorder. Also, culturing these cells *in vitro* is very difficult and has not been possible for some patients. Indeed, MSCs have emerged as a reliable stem cell source. Unfortunately, the fervor over stem cells is mitigated by several lines of evidence suggesting that their efficiency is limited by natural aging. Another potential problem is the presence of xenogenic products in the growth medium required for the expansion of these cells, which must be replaced for clinical use.

IV. VASCULAR CLINICAL APPLICATIONS OF STEM CELLS

From bench to bedside, stem cells based clinical trials have been conducted for at least 12 different pathological conditions including bone, heart, cartilage, vascular, skin, neurodegenerative and graft-*versus*-host-diseases (GVHD) (115,116). These clinical applications were mainly attributed to stem cells ability : i) to home to sites of inflammation following tissue injury when injected intravenously ; ii) to differentiate into various cell types ; iii) to secrete bioactive molecules capable of stimulating the recovery of injured cells and inhibiting the inflammation and iv) to perform immunomodulatory functions. Different studies have reported beneficial effects of human stem cells on vascular regeneration, as discussed by Bajpai *et al.* (117). In a pioneering study, Hibino *et al.*, aimed to replace ECs as a cell source for graft seeding and evaluated stem cell-seeded grafts as venous conduits for congenital heart surgery. To this date, 25 children have been implanted with such seeded grafts with no evidence of graft-related mortality or stenosis, after a mean follow-up time of 5.8 years (118). Based on their angiogenic properties, the efficiency of stem cells transplantation to treat chronic critical limb ischemia is already in clinical trial, results are expected to be published in 2014 (www.clinicaltrials.gov). Adult stem cells were also shown to be an attractive

therapeutic tool to heal skin wounds (119) and ischemia-reperfusion injuries following organ transplantation (120).

The success of early stem cell clinical trials may lead to additional complications. Perhaps the most pressing need will be obtaining sufficient cells with a high therapeutic benefit. Another variable to consider is the cell culture support system (FBS *versus* human platelet lysate *versus* serum-free media). All of these conditions are able to improve stem cell growth. However, the use of FBS may lead to immunologic reactions in patients (121). The use of patient plasma-derived serum (122) or a serum free support system (123) may provide an appropriate solution to these risks. Nevertheless, *in vitro* upscaling of clinical grade cell products essentially free of xenogenic products in compliance with good manufacturing practice (GMP) remains a significant hurdle (124).

In summary, considerable therapeutic potential of stem cells has generated markedly increasing interest in a wide variety of biomedical disciplines. However, there is still much work to be done. It is notable that while data are accumulating from basic to translational work, the mechanisms involved in stem cell therapy remain unclear and much preclinical work has not been transposed into humans. Adding to this, the source of donor stem cells, autologous *versus* allogenic sources, cell types or lineages, remain critically important considerations. With further advances, stem cells are thought to play an important role in managing many disorders that lack effective standard treatment.

Table Legends:

Table 1: Non exhaustive list of published derivation and culture methods for human embryonic stem cells. bFGF : Basic fibroblast growth factor ; BL : Blastocyst ; BRL : Buffalo rat liver ; ECM : Extracellular matrix ; FBS : Fetal bovine serum ; FCS : Fetal calf serum ; GABA : γ - aminobutyric acid ; HA : Hyaluronic acid ; HS : Human serum ; ISR : Immunosurgery for removal of trophoectoderm cells ; LIF : Leukemia inhibitor factor ; Mech : Mechanical removal of trophoectodermal cells ; MEF : Mouse embryonic fibroblast ; NA : Information not available from published source ; Pro : Pronase used for removal of zona pellucida ; SR : Serum replacement ; TGF- β : Transforming growth factor- β ; Tyr : Tyrode's acid used for removal of zona.

Table 2: Cell isolation and phenotype characterization differences between fetal stem cell sources.

Table 3: Adult stem cells isolation and characterization

Table 1

Derivation procedure	Stage of embryos	Feeder cell type	Cell feeder culture medium	hESC culture medium	Ref.
TYR/ISR	BL	MEF	FCS	FBS,LIF	(125)
PRO/ISR	BL	• Fetal muscle • Fetal skin • Adult fallopian tube	HS	FBS	(126)
PRO/ISR	BL	Human Foreskin	FBS	FBS, LIF	(127)
PRO/ISR	BL	MEF	FCS	FBS, LIF, bFGF	(128)
PRO/ISR	BL	MEF	FCS	Vitro HES, bFGF, HA	(129)
PRO/ISR	BL	Uterine endometrium	FBS	SR, bFGF	(130)
PRO/ISR	BL	Human Foreskin	FBS	SR, bFGF	(131)
TYR/Mech	BL	Placenta	FBS	SR, bFGF	(132)
RO/Mech	BL	hESC-derived fibroblast	HS/FBS	SR, bFGF	(133)
PRO/ISR	BL	MEF	FBS	FBS/SR, bFGF	(134)

Table 2

Fetal stem cell sources	Cell isolation technique	Phenotype characterization
Amnion termed fetal membrane	• Mechanically stripped from choriodecidua (to minimize maternal cells), then washed and incubated with Trypsine (to eliminate amnion epithelial cells), finally cut into small pieces then : – Enzymatically digested using DNase/collagenase (135), pronase/collagenase (136) or Dispase/Collagenase (137), or – Plated on culture flask allowing cells migration from explants to the flask (77).	• Plastic adherent with a fibroblastic morphology; • Highly positive for CD44, CD73, CD166, CD90, CD13, HLA-A, B, C and positive for CD9 - Negative for CD105, CD34, CD45, CD117, CD31 and HLA-DR, DP, DQ cell surface markers (137); • Express <i>Oct-3/4</i>, <i>Sox-2</i>, <i>Nanog3</i> pluripotency markers (138) with a decrease in mRNA with passages.
Chorion termed fetal membrane	• After removing enzymatically the trophoblastic layer, the chorion, as far away from the maternal side as possible, is cut into small pieces then : – Enzymatically treated with collagenase with (139) or without DNase (140), or – Plated on culture flask allowing cells migration from explants to the flask (141).	• Plastic adherent with a fibroblastic morphology, simple cytoplasmic organization with dispersed mitochondria and glycogen lakes (142); • Highly positive for CD105, CD90, CD73, CD44, CD166, CD10, CD13, CD49, CD54 and a low expression of CD271, HLA-A, B and C (143); • Negative for CD34, CD45, CD133, CD117, CD14 and HLA-DR cell surface markers (144); • Expressing pluripotency markers such as <i>SSEA3</i>, <i>SSEA4</i>, <i>Oct-3/4</i>, <i>Nanog3</i>, <i>Tra-1-60</i> and <i>Tra-1-8</i> (145).

umbilical cord blood	Stem cells, obtained from the distal end of the umbilical vein blood, are separated by density gradient centrifugation using Percoll gradient; followed by selective depletion of CD34-positive cells (146).	- Plastic adherent, fibroblastic morphology; - Highly positive for CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 and HLA-ABC; - Negative for CD14, CD31, CD45, CD271, CD34 and HLA-DR (147,148); - Expressing pluripotency markers <i>Oct4</i>, <i>Sox2</i> and <i>Nanog</i> (146).
Umbilical cord Wharton's jelly	- After discarding umbilical cord's epithelium and blood vessels, the Wharton's jelly is segmented into small pieces (1-5 mm³) then : 1) Enzymatically digested with collagenase followed by Trypsine (149), or 2) Plated on culture flask allowing cells migration from the explants to the flask (150,151).	- Plastic adherent with a fibroblastic morphology; - Highly positive for CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD51, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD166 and HLA-1/HLA-ABC; - Negative for CD14, CD31, CD34, CD38, CD45 and HLA-DR (61); - Expressing pluripotent markers as <i>SSEA-3</i>, <i>SSEA-4</i>, <i>Tra-1-60</i>, <i>Tra-1-81</i>, <i>Oct3/4</i>, <i>Nanog</i>, <i>Sox2</i> and <i>Lin28</i> (152).
Amniotic fluid	Obtained during scheduled normal pregnancy amniocentesis between the 15th and 18th week of gestation. Stem cells are then isolated using the adherence method, following one step (88) or two step culture protocol (89).	- Plastic adherent with a fibroblastic morphology; - Positive for CD29, CD44, CD49e, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166 and HLA-1/HLA-ABC; - Negative for CD10, CD11, CD14, CD25, CD31, CD34, CD40, CD45, CD50, CD62, CD80, CD86, CD106, CD127 and HLA-DR (89); - Expressing pluripotent markers as <i>SSEA-4</i>, <i>Oct4</i>, <i>Nanog3</i> and <i>Sox2</i> (88).

Table 3

Adult stem cell sources	Cell isolation technique	Morphological and Phenotypical characterization
Bone marrow (BM-MSCs)	Aspirated from tibia and femur, BM-MSCs are cultured from mononuclear cells using the standard Ficoll-Plaques density gradient centrifugation method (153,154), or by culturing the whole BM for four days followed by extensive washes to eliminate non adherent cells (155,156).	- Plastic adherent with a spindle shape morphology; - Highly positive for CD13, CD44, CD49e, CD62, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD126, HLA-ABC and several integrins like $\alpha 4\beta 1$; - Negative for CD3, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD31, CD33, CD34, CD45, CD71, CD133, CD144, CD184 and HLA-DR (154); - Expression of <i>SSEA4</i> (157,158), <i>Nanog</i> (159,160) and <i>Oct-4</i> (159); - Able to differentiate into adipogenic, osteogenic, chondrogenic and myogenic lineages (158).
Adipose tissue (ADSCs)	- The lipoaspirated or dissected fat lobules are mostly digested with collagenase. Stromal cell fraction is obtained after centrifugation, incubated with NH₄CL in order to lyse red blood and then filtered through a 100-mm nylon mesh to remove cellular debris. Terminal collected cells are finally resuspended in culture plate (161,162). - Approximately 5000 ADSCs are obtained from 1g of adipose tissue (163).	- Plastic adherent with a fibroblastic morphology; - Presenting an extensive proliferative capacity; - Highly positive for CD13, CD44, CD49e, CD62, CD73, CD90, CD105, CD117 and HLA-ABC; - Negative for CD3, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD31, CD33, CD34, CD45, CD71, CD133, CD144, CD184 and HLA-DR (154); - Expression of pluripotent cells associated genes <i>Oct-4</i>, <i>Nanog</i>, <i>Sox2</i> and <i>SSEA4</i> (164,165); - Able to differentiate into adipogenic, osteogenic, chondrogenic and myogenic lineages.

Dental pulp (DPSCs)	- Teeth (third molars) are mechanically fractured in order to reveal the pulp chamber, the pulp tissue is then minced into small fragments (1-2mm³) then : - Enzymatically digested with Dispase or Collagenase (166), or - Plated on culture flask allowing cells migration from explants to the culture surface (166).	- Plastic adherent with a fibroblastic morphology; - Highly positive for CD13, CD29, CD44, CD49b, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD146, CD166, CD271 and HLA-ABC; - Negative for CD3, CD7, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD31, CD34, CD45, CD71, CD133, CD195 and HLA-DR (167,168); - Expression of pluripotent cells associated genes <i>SSEA-4</i>, <i>Oct3/4</i>, <i>Nanog</i> and <i>Sox2</i> (167,168); - Able to differentiate into adipogenic, osteogenic, chondrogenic and myogenic lineages.
Gingival tissue (GSCs)	Gingival connective tissue samples are deepithelialized, leaving only connective tissue. After removing the gingival epithelium, tissue samples (sized approx. 10 mm x 4 mm x 2 mm) are obtained from the gingival lamina propria. The explants are then minced and cultured on tissue culture dishes (169).	- Plastic adherent with fibroblastic morphology; - Highly positive for CD146, CD105, CD90, CD29, CD73, CD44, CD166, CD13 and STRO-1 (169–172); - Negative for CD34, CD38, CD45, CD54 and CD31 (169,171); - Able to differentiate into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages (171).

V. REFERENCES

1. Deedwania P. Diabetes, cardiovascular disease, and ethnicity. *J Am Coll Cardiol* 2013;**61**:1787-1789.
2. Li S, Henry JJD. Nonthrombogenic approaches to cardiovascular bioengineering. *Annu Rev Biomed Eng* 2011;**13**:451-475.
3. Klopsch C, Steinhoff G. Tissue-engineered devices in cardiovascular surgery. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur* 2012;**49**:44-52.
4. Menu P, Stoltz JF, Kerdjoudj H. Progress in vascular graft substitute. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013;**53**:117-129.
5. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006;**98**:1076-1084.
6. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 2007;**9**:204.
7. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;**78**:7634-7638.
8. Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa Si, Williams D, Zsebo K, Hogan BLM. Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 1991;**353**:750-752.
9. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones, JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;**282**:1145-1147.
10. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000;**18**:399-404.
11. Talbot NC, Sparks WO, Powell AM, Kahl S, Caperna TJ. Quantitative and semiquantitative immunoassay of growth factors and cytokines in the conditioned medium of STO and CF-1 mouse feeder cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2012;**48**:1-11.
12. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong Gg, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988;**336**:688-690.
13. Bhattacharya B, Miura T, Brandenberger R, Mejido J, Luo YQ, Yang AX, Joshi BH, Ginis I, Thies RS, Amit M, Lyons I, Condie BG, Itskovitz-Eldor J, Rao MS, Puri RK. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood* 2004;**103**:2956-2964.
14. Iida M, Heike T, Yoshimoto M, Baba S, Doi H, Nakahata T. Identification of cardiac stem cells with FLK1, CD31, and VE-cadherin expression during embryonic stem cell differentiation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2005;**19**:371-378.
15. Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:4391-4396.

16. Wang ZZ, Au P, Chen T, Shao Y, Daheron LM, Bai H, Arzigian M, Fukumura D, Jain RK, Scadden DT. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells form durable blood vessels in vivo. *Nat Biotechnol* 2007;**25**:317-318.
17. Cho S-W, Moon S-H, Lee S-H, Kang SW, Kim JM, Kim HS, Kim BS, Chung HM. Improvement of postnatal neovascularization by human embryonic stem cell derived endothelial-like cell transplantation in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* 2007;**116**:2409-2419.
18. Yamahara K, Sone M, Itoh H, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Homma K, Chao TH, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Fukunaga Y, Tamura N, Nakao K. Augmentation of neovascularization [corrected] in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PloS One* 2008;**3**:e1666.
19. Levenberg S, Ferreira LS, Chen-Konak L, Kraehenbuehl TP, Langer R. Isolation, differentiation and characterization of vascular cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Protoc* 2010;**5**:1115-1126.
20. Nourse MB, Halpin DE, Scatena M, Mortisen DJ, Tulloch NL, Hauch KD, Torok-Storb B, Ratner BD, Pabon L, Murry CE. VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;**30**:80-89.
21. Han Y, Li N, Tian X, Kang J, Yan C, Qi Y. Endogenous transforming growth factor (TGF) beta1 promotes differentiation of smooth muscle cells from embryonic stem cells: stable plasmid-based siRNA silencing of TGF beta1 gene expression. *J Physiol Sci* 2010;**60**:35-41.
22. Li Z, Suzuki Y, Huang M, Cao F, Xie X, Connolly AJ, Yang PC, Wu JC. Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects. *Stem Cells* 2008;**26**:864-873.
23. Shin JM, Kim J, Kim HE, Lee MJ, Lee KI, Yoo EG, Jeon YJ, Kim DW, Chae JI, Chung HM. Enhancement of differentiation efficiency of hESCs into vascular lineage cells in hypoxia via a paracrine mechanism. *Stem Cell Res* 2011;**7**:173-185.
24. Han Y, Kuang SZ, Gomer A, Ramirez-Bergeron DL. Hypoxia influences the vascular expansion and differentiation of embryonic stem cell cultures through the temporal expression of vascular endothelial growth factor receptors in an ARNT-dependent manner. *Stem Cells* 2010;**28**:799-809.
25. Goldman O, Feraud O, Boyer-Di Ponio J, Driancourt C, Clay D, Le Bousse-Kerdiles MC, Bennaceur-Griscelli A, Uzan G. A boost of BMP4 accelerates the commitment of human embryonic stem cells to the endothelial lineage. *Stem Cells* 2009;**27**:1750-1759.
26. James D, Nam HS, Seandel M, Nolan D, Janovitz T, Tomishima M, Studer L, Lee G, Lyden D, Benezra R, Zaninovic N, Rosenwaks Z, Rabbany SY, Rafii S. Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFbeta inhibition is Id1 dependent. *Nat Biotechnol* 2010;**28**:161-166.
27. Pieciewicz SM, Pandey A, Roy B, Xiang SH, Zetter BR, Sengupta S. Insulin-like growth factors promote vasculogenesis in embryonic stem cells. *PloS One* 2012;**7**:e32191.

28. Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;**27**:1248-1258.
29. Xie CQ, Zhang J, Villacorta L, Cui T, Huang H, Chen YE. A highly efficient method to differentiate smooth muscle cells from human embryonic stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;**27**:e311-312.
30. Lu SJ, Ivanova Y, Feng Q, Luo C, Lanza R. Hemangioblasts from human embryonic stem cells generate multilayered blood vessels with functional smooth muscle cells. *Regen Med* 2009;**4**:37-47.
31. El-Mounayri O, Mihic A, Shikatani EA, Gagliardi M, Steinbach SK, Dubois N, Dacosta R, Li RK, Keller G, Husain M. Serum-free differentiation of functional human coronary-like vascular smooth muscle cells from embryonic stem cells. *Cardiovasc Res.* 2013;**98**:125-135.
32. Rafii S, Kloss CC, Butler JM, Ginsberg M, Gars E, Lis R, Zhan Q, Josipovic P, Ding BS, Xiang J, Elemento O, Zaninovic N, Rosenwaks Z, Sadelain M, Rafii JA, James D. Human ESC-derived hemogenic endothelial cells undergo distinct waves of endothelial to hematopoietic transition. *Blood* 2013;**121**:770-780.
33. Sone M, Itoh H, Yamahara K, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Nonoguchi A, Suzuki Y, Chao TH, Sawada N, Fukunaga Y, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Kondo Y, Nito S, Suemori H, Nakatsuji N, Nishikawa S, Nakao K. Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;**27**:2127-2134.
34. Hill KL, Obrtlíkova P, Alvarez DF, King JA, Keirstead SA, Allred JR, Kaufman DS. Human embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells capable of endothelial and smooth muscle cell function. *Exp Hematol* 2010;**38**:246-257.e1.
35. Li Z, Barron MR, Lough J, Zhao M. Rapid single-step separation of pluripotent mouse embryonic stem cells from mouse feeder fibroblasts. *Stem Cells Dev* 2008;**17**:383-387.
36. Blancas AA, Shih AJ, Lauer NE, McCloskey KE. Endothelial cells from embryonic stem cells in a chemically defined medium. *Stem Cells Dev* 2011;**20**:2153-2161.
37. Park SW, Jun Koh Y, Jeon J, Cho YH, Jang MJ, Kang Y, Kim MJ, Choi C, Sook Cho Y, Chung HM, Koh GY, Han YM. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into functional CD34+ progenitor cells by combined modulation of the MEK/ERK and BMP4 signaling pathways. *Blood* 2010;**116**:5762-5772.
38. Kane NM, Howard L, Descamps B, Meloni M, McClure J, Lu R, McCahill A, Breen C, Mackenzie RM, Delles C, Mountford JC, Milligan G, Emanuelli C, Baker AH. Role of microRNAs 99b, 181a, and 181b in the differentiation of human embryonic stem cells to vascular endothelial cells. *Stem Cells* 2012;**30**:643-654.
39. Prado-Lopez S, Conesa A, Armiñán A, Martínez-Losa M, Escobedo-Lucea C, Gandia C, Tarazona S, Melguizo D, Blesa D, Montaner D, Sanz-González S, Sepúlveda P, Götz S, O'Connor JE, Moreno R, Dopazo J, Burks DJ, Stojkovic M. Hypoxia promotes efficient differentiation of human embryonic stem cells to functional endothelium. *Stem Cells* 2010;**28**:407-418.

40. Vo E, Hanjaya-Putra D, Zha Y, Kusuma S, Gerecht S. Smooth-muscle-like cells derived from human embryonic stem cells support and augment cord-like structures in vitro. *Stem Cell Rev* 2010;**6**:237-247.
41. Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, Ikeda M, Stastny V, Kassaei K, Sui G, Cutler DJ, Liu Y, Brimble SN, Noaksson K, Hyllner J, Schulz TC, Zeng X, Freed WJ, Crook J, Abraham S, Colman A, Sartipy P, Matsui S, Carpenter M, Gazdar AF, Rao M, Chakravarti A. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet* 2005;**37**:1099-1103.
42. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;**126**:663-676.
43. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;**131**:861-872.
44. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;**318**:1917-1920.
45. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, Clark AT, Plath K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:2883-2888.
46. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007;**1**:55-70.
47. Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2007;**25**:1177-1181.
48. Rufaihah AJ, Huang NF, Kim J, Herold J, Volz KS, Park TS, Lee JC, Zambidis ET, Reijo-Pera R, Cooke JP. Human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells exhibit functional heterogeneity. *Am J Transl Res* 2013;**5**:21-35.
49. Taura D, Sone M, Homma K, Oyamada N, Takahashi K, Tamura N, Yamanaka S, Nakao K. Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;**29**:1100-1103.
50. Azhdari M, Baghaban-Eslaminejad M, Baharvand H, Aghdami N. Therapeutic potential of human-induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells in a bleomycin-induced scleroderma mouse model. *Stem Cell Res* 2013;**10**:288-300.
51. Rufaihah AJ, Huang NF, Jamé S, Lee JC, Nguyen HN, Byers B, De A, Okogbaa J, Rollins M, Reijo-Pera R, Gambhir SS, Cooke JP. Endothelial cells derived from human iPSCs increase capillary density and improve perfusion in a mouse model of peripheral arterial disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;**31**:e72-79.
52. Karamariti E, Margariti A, Winkler B, Wang X, Hong X, Baban D, Ragoussis J, Huang Y, Han JD, Wong MM, Sag CM, Shah AM, Hu Y, Xu Q. Smooth muscle cells differentiated from reprogrammed embryonic lung fibroblasts through DKK3 signaling are potent for tissue engineering of vascular grafts. *Circ Res* 2013;**112**:1433-1443.

53. Wang A, Tang Z, Li X, Jiang Y, Tsou DA, Li S. Derivation of smooth muscle cells with neural crest origin from human induced pluripotent stem cells. *Cells Tissues Organs* 2012;**195**:5-14.
54. Lee TH, Song SH, Kim KL, Yi JY, Shin GH, Kim JY, Kim J, Han YM, Lee SH, Lee SH, Shim SH, Suh W. Functional recapitulation of smooth muscle cells via induced pluripotent stem cells from human aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 2010;**106**:120-128.
55. Margariti A, Winkler B, Karamariti E, Zampetaki A, Tsai TN, Baban D, Ragoussis J, Huang Y, Han JD, Zeng L, Hu Y, Xu Q. Direct reprogramming of fibroblasts into endothelial cells capable of angiogenesis and reendothelialization in tissue-engineered vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;**109**:13793-13798.
56. Tiscornia G, Vivas EL, Izpisua Belmonte JC. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nat Med* 2011;**17**:1570-1576.
57. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 2005;**23**:1549-1559.
58. Witkowska-Zimny M, Wrobel E. Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion. *Cell Mol Biol Lett* 2011;**16**:493-514.
59. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;**109**:235-242.
60. Matikainen T, Laine J. Placenta--an alternative source of stem cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;**207**:544-549.
61. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D, Can A. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 2007;**25**:319-331.
62. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 2008;**26**:591-599.
63. Spurway J, Logan P, Pak S. The development, structure and blood flow within the umbilical cord with particular reference to the venous system. *AJUM* 2012;**15**:97-102.
64. Roura S, Pujal J-M, Bayes-Genis A. Umbilical cord blood for cardiovascular cell therapy: from promise to fact. *Ann N Y Acad Sci* 2012;**1254**:66-70.
65. Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 2002;**23**:3-19.
66. Zhu SF, Zhong ZN, Fu XF, Peng DX, Lu GH, Li WH, Xu HY, Hu HB, He JM, Su WY, He YL. Comparison of cell proliferation, apoptosis, cellular morphology and ultrastructure between human umbilical cord and placenta-derived mesenchymal stem cells. *Neurosci Lett* 2013;**541**:77-82.
67. Gucciardo L, Lories R, Ochsenbein-Kölble N, Done' E, Zwijsen A, Deprest J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 2009;**116**:166-172.

68. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;**8**:315-317.
69. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006;**24**:1294-1301.
70. Yoon DS, Kim YH, Jung HS, Paik S, Lee JW. Importance of Sox2 in maintenance of cell proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells in low-density culture. *Cell Prolif* 2011;**44**:428-440.
71. Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatitot S, Soligo D, Bosari S, Silani V, Deliliers GL, Rebulla P, Lazzari L. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res* 2006;**16**:329-336.
72. Kim HG, Choi OH. Neovascularization in a mouse model via stem cells derived from human fetal amniotic membranes. *Heart Vessels* 2011;**26**:196-205.
73. Kim SW, Zhang HZ, Kim CE, An HS, Kim JM, Kim MH. Amniotic mesenchymal stem cells have robust angiogenic properties and are effective in treating hindlimb ischaemia. *Cardiovasc Res* 2012;**93**:525-534.
74. Kim SW, Zhang HZ, Kim CE, Kim JM, Kim MH. Amniotic mesenchymal stem cells with robust chemotactic properties are effective in the treatment of a myocardial infarction model. *Int J Cardiol* 2013;**168**:1062-1069.
75. Breyman C, Schmidt D, Hoerstrup SP. Umbilical cord cells as a source of cardiovascular tissue engineering. *Stem Cell Rev* 2006;**2**:87-92.
76. Meraviglia V, Vecellio M, Grasselli A, Baccarin M, Farsetti A, Capogrossi MC, Pompilio G, Coviello DA, Gaetano C, Di Segni M, Rossini A. Human chorionic villus mesenchymal stromal cells reveal strong endothelial conversion properties. *Differ Res Biol Divers* 2012;**83**:260-270.
77. Warriar S, Haridas N, Bhonde R. Inherent propensity of amnion-derived mesenchymal stem cells towards endothelial lineage: vascularization from an avascular tissue. *Placenta* 2012;**33**:850-858.
78. Roura S, Bagó JR, Soler-Botija C, Pujal JM, Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Lluçà-Valldeperas A, Blanco J, Bayes-Genis A. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells promote vascular growth in vivo. *PloS One* 2012;**7**:e49447.
79. Chen MY, Lie PC, Li ZL, Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2009;**37**:629-640.
80. Benavides OM, Petsche JJ, Moise KJ Jr, Johnson A, Jacot JG. Evaluation of endothelial cells differentiated from amniotic fluid-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 2012;**18**:1123-1131.
81. Nur Fariha MM, Chua KH, Tan GC, Lim YH, Hayati AR. Endogenous and induced angiogenic characteristics of human chorion-derived stem cells. *Cell Biol Int* 2012;**36**:1145-1153.

82. Li P, Zhou C, Yin L, Meng X, Zhang L. Role of hypoxia in viability and endothelial differentiation potential of UC-MSCs and VEGF interference. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2013;**38**:329-340.
83. Wang SH, Lin SJ, Chen YH, Lin FY, Shih JC, Wu CC, Wu HL, Chen YL. Late Outgrowth Endothelial Cells Derived From Wharton Jelly in Human Umbilical Cord Reduce Neointimal Formation After Vascular Injury: Involvement of Pigment Epithelium-Derived Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;**29**:816-822.
84. Farias VA, Linares-Fernández JL, Peñalver JL, Payá Colmenero JA, Ferrón GO, Duran EL, Fernández RM, Olivares EG, O'Valle F, Puertas A, Oliver FJ, Ruiz de Almodóvar JM. Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties. *Placenta* 2011;**32**:86-95.
85. Hayward CJ, Fradette J, Galbraith T, Rémy M, Guignard R, Gauvin R, Germain L, Auger FA. Harvesting the potential of the human umbilical cord: isolation and characterisation of four cell types for tissue engineering applications. *Cells Tissues Organs* 2013;**197**:37-54.
86. Choi M, Lee HS, Naidansaren P, Kim HK, O E, Cha JH, Ahn HY, Yang PI, Shin JC, Joe YA. Proangiogenic features of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;**45**:560-570.
87. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom SC. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* 2008;**26**:300-311.
88. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007;**25**:100-106.
89. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod Oxf Engl* 2004;**19**:1450-1456.
90. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970;**3**:393-403.
91. Mikkola HKA, Orkin SH. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Dev Camb Engl* 2006;**133**:3733-3744.
92. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 1991;**9**:641-650.
93. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* 2007;**25**:2886-2895.
94. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004;**22**:377-384.

95. Pankajakshan D, Kansal V, Agrawal DK. In vitro differentiation of bone marrow derived porcine mesenchymal stem cells to endothelial cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2012;**7**:911-920
96. Zhang P, Moudgill N, Hager E, Tarola N, Dimatteo C, McIlhenny S, Tulenko T, DiMuzio PJ. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells from elderly patients with cardiovascular disease. *Stem Cells Dev* 2011;**20**:977-988.
97. Lim TY, Poh CK, Wang W. Poly (lactic-co-glycolic acid) as a controlled release delivery device. *J Mater Sci Mater Med* 2009;**20**:1669-1675.
98. Poh CK, Shi Z, Lim TY, Neoh KG, Wang W. The effect of VEGF functionalization of titanium on endothelial cells in vitro. *Biomaterials* 2010;**31**:1578-1585.
99. Shevchenko EK, Makarevich PI, Tsokolaeva ZI, Boldyreva MA, Sysoeva VY, Tkachuk VA, Parfyonova YV. Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle. *J Transl Med* 2013;**11**:138.
100. Wosnitza M, Hemmrich K, Groger A, Gräber S, Pallua N. Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation. *Differ Res Biol Divers* 2007;**75**:12-23.
101. Colazzo F, Chester AH, Taylor PM, Yacoub MH. Induction of mesenchymal to endothelial transformation of adipose-derived stem cells. *J Heart Valve Dis* 2010;**19**:736-744.
102. Bai K, Huang Y, Jia X, Fan Y, Wang W. Endothelium oriented differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under chemical and mechanical stimulations. *J Biomech* 2010;**43**:1176-1181.
103. Wang N, Zhang R, Wang SJ, Zhang CL, Mao LB, Zhuang CY, Tang YY, Luo XG, Zhou H, Zhang TC. Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial differentiation from mesenchymal stem cells via Rho/myocardin-related transcription factor--a signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;**45**:1447-1456.
104. Fischer LJ, McIlhenny S, Tulenko T, Golesorkhi N, Zhang P, Larson R, Lombardi J, Shapiro I, DiMuzio PJ. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *J Surg Res* 2009;**152**:157-166.
105. Zhao L, Hantash BM. TGF- β 1 regulates differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Vitam Horm* 2011;**87**:127-141.
106. Gong Z, Niklason LE. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2008;**22**:1635-1648.
107. Narita Y, Yamawaki A, Kagami H, Ueda M, Ueda Y. Effects of transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage. *Cell Tissue Res* 2008;**333**:449-459.
108. Adamo L, García-Cardena G. Directed stem cell differentiation by fluid mechanical forces. *Antioxid Redox Signal* 2011;**15**:1463-1473.
109. Wang JH-C, Thampatty BP. Mechanobiology of adult and stem cells. *Int Rev Cell Mol Biol* 2008;**271**:301-346.

110. Gong Z, Niklason LE. Use of human mesenchymal stem cells as alternative source of smooth muscle cells in vessel engineering. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2011;**698**:279-294.
111. Maul TM, Chew DW, Nieponice A, Vorp DA. Mechanical stimuli differentially control stem cell behavior: morphology, proliferation, and differentiation. *Biomech Model Mechanobiol* 2011;**10**:939-953.
112. Kim DH, Heo SJ, Kim SH, Shin JW, Park SH, Shin JW. Shear stress magnitude is critical in regulating the differentiation of mesenchymal stem cells even with endothelial growth medium. *Biotechnol Lett* 2011;**33**:2351-2359.
113. O'Cearbhaill ED, Punchard MA, Murphy M, Barry FP, McHugh PE, Barron V. Response of mesenchymal stem cells to the biomechanical environment of the endothelium on a flexible tubular silicone substrate. *Biomaterials* 2008;**29**:1610-1619.
114. Bassaneze V, Barauna VG, Lavini-Ramos C, Kalil J, Schettert IT, Miyakawa AA, Krieger JE. Shear stress induces nitric oxide-mediated vascular endothelial growth factor production in human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2010;**19**:371-378.
115. Wang S, Qu X, Zhao R. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol/Hematol Oncol* **2012**;5:19.
116. Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D. Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med* 2011;**9**:52.
117. Bajpai VK, Andreadis ST. Stem cell sources for vascular tissue engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2012;**18**:405-425.
118. Hibino N, McGillicuddy E, Matsumura G, Ichihara Y, Naito Y, Breuer C, Shinoka T. Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;**139**:431-436, 436.e1-2.
119. Chen JS, Wong VW, Gurtner GC. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cutaneous wound healing. *Front Immunol* 2012;**s**:192.
120. Souidi N, Stolk M, Seifert M. Ischemia-reperfusion injury: beneficial effects of mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Organ Transplant* 2013;**18**:34-43.
121. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:8932-8937.
122. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, Lataillade JJ. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* 2005;**205**:228-236.
123. Stehlík D, Pytlík R, Rychtrmocová H, Kideryová L, Veselá R, Kopečný Z, Trč T, Trněný M. Xenogeneic protein-free cultivation of mesenchymal stromal cells - towards clinical applications. *Folia Biol (Praha)* 2012;**58**:106-114.

124. Unger C, Skottman H, Blomberg P, Dilber MS, Hovatta O. Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. *Hum Mol Genet* 2008;**17**:R48-53.
125. Lanzendorf SE, Boyd CA, Wright DL, Muasher S, Oehninger S, Hodgen GD. Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cell lines. *Fertil Steril* 2001;**76**:132-137.
126. Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2002;**20**:933-936.
127. Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Strömberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, Rozell B, Blennow E, Andäng M, Ahrlund-Richter L. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod Oxf Engl* 2003;**18**:1404-1409.
128. Mitalipova M, Calhoun J, Shin S, Wininger D, Schulz T, Noggle S, Venable A, Lyons I, Robins A, Stice S. Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. *Stem Cells* 2003;**21**:521-526.
129. Heins N, Englund MC, Sjöblom C, Dahl U, Tønning A, Bergh C, Lindahl A, Hanson C, Semb H. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004;**22**:367-376.
130. Lee JB, Lee JE, Park JH, Kim SJ, Kim MK, Roh SI, Yoon HS. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. *Biol Reprod* 2005;**72**:42-49.
131. Inzunza J, Gertow K, Strömberg MA, Matilainen E, Blennow E, Skottman H, Wolbank S, Ahrlund-Richter L, Hovatta O. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* 2005;**23**:544-549.
132. Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T, Brunette E, Powell S, Nath A, Caceres E, McMaster M, McDonagh S, Li Y, Mandalam R, Lebkowski J, Fisher SJ. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil Steril* 2005;**83**:1517-1529.
133. Wang Q, Fang ZF, Jin F, Lu Y, Gai H, Sheng HZ. Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders derived from themselves. *Stem Cells* 2005;**23**:1221-1227.
134. Hong-mei P, Gui-an C. Serum-free medium cultivation to improve efficacy in establishment of human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod Oxf Engl* 2006;**21**:217-222.
135. Fatimah SS, Tan GC, Chua K, Fariha MM, Tan AE, Hayati AR. Stemness and angiogenic gene expression changes of serial-passage human amnion mesenchymal cells. *Microvasc Res* 2013;**86**:21-29.
136. Rossi D, Pianta S, Magatti M, Sedlmayr P, Parolini O. Characterization of the conditioned medium from amniotic membrane cells: prostaglandins as key effectors of its immunomodulatory activity. *PLoS One* 2012;**7**:e46956.

137. Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M, Hennerbichler S, van Griensven M, Stadler G, Redl H, Gabriel C. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng* 2007;**13**:1173-1183.
138. Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 2005;**79**:528-535.
139. Vellasamy S, Sandrasaigaran P, Vidyadaran S, George E, Ramasamy R. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue. *World J Stem Cells* 2012;**4**:53-61.
140. Rus Ciucă D, Sorițău O, Sușman S, Pop VI, Miha CM. Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stem cells from the placenta. *Romanian J Morphol Embryol Rev Roum Morphol Embryol* 2011;**52**:803-808.
141. Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S, Takahashi TA. Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**340**:944-952.
142. Pasquinelli G, Tazzari P, Ricci F, Vaselli C, Buzzi M, Conte R, Orrico C, Foroni L, Stella A, Alviano F, Bagnara GP, Lucarelli E. Ultrastructural characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta. *Ultrastruct Pathol* 2007;**31**:23-31.
143. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Albertini A, Wengler GS, Parolini O. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;**1**:296-305.
144. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, Surbek DV. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol* 2006;**194**:664-673.
145. Battula VL, Bareiss PM, Trembl S, Conrad S, Albert I, Hojak S, Abele H, Schewe B, Just L, Skutella T, Bühring HJ. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differ Res Biol Divers* 2007;**75**:279-291.
146. Divya MS, Roshin GE, Divya TS, Rasheed VA, Santhoshkumar TR, Elizabeth KE, James J, Pillai RM. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells consist of a unique population of progenitors co-expressing mesenchymal stem cell and neuronal markers capable of instantaneous neuronal differentiation. *Stem Cell Res Ther* 2012;**3**:57.
147. Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, Schlenke P. Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology? *Transfus Med Hemotherapy Off Organ Dtsch Ges Transfusionsmedizin Immunhamatologie* 2010;**37**:75-83.
148. Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, Igura K, Satoh H, Yokomi I, Nishimura T, Yamaguchi S, Yoshimura K, Rubinstein P, Takahashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2011;**112**:1206-1218.

149. Schneider RK, Püllen A, Kramann R, Bornemann J, Knüchel R, Neuss S, Perez-Bouza A. Long-term survival and characterisation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on dermal equivalents. *Differ Res Biol Divers* 2010;**79**:182-193.
150. De Bruyn C, Najar M, Raicevic G, Meuleman N, Pieters K, Stamatopoulos B, Delforge A, Bron D, Lagneaux L. A rapid, simple, and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment. *Stem Cells Dev* 2011;**20**:547-557.
151. La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo Iacono M, Di Stefano A, Giannuzzi P, Marasà L, Cappello F, Zummo G, Farina F. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol* 2009;**131**:267-282.
152. LLu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 2006;**91**:1017-1026.
153. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;**284**:143-147.
154. Zhu X, Shi W, Tai W, Liu F. The comparison of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived Mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 2012;**350**:277-287.
155. Peter S, Scutt AM, Wright PC, Biggs CA. Comparative study of in vitro expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett* 2013;**35**:463-469.
156. Peptanariu D, Zlei M, Negură A, Carasevici E. Optimization of culture conditions for bone marrow stromal cells in RPMI-1640 medium. *Rev Medico-Chir Soc Medici Şi Nat Din Iaşi* 2012;**116**:222-227.
157. Noort WA, Oerlemans MI, Rozemuller H, Feyen D, Jaksani S, Stecher D, Naaijken B, Martens AC, Bühring HJ, Doevendans PA, Sluijter JP. Human versus porcine mesenchymal stromal cells: phenotype, differentiation potential, immunomodulation and cardiac improvement after transplantation. *J Cell Mol Med* 2012;**16**:1827-1839.
158. Boxall SA, Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int* 2012;**10**:1155.
159. Lee MW, Kim DS, Yoo KH, Kim HR, Jang IK, Lee JH, Kim SY, Son MH, Lee SH, Jung HL, Sung KW, Koo HH. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell gene expression patterns vary with culture conditions. *Blood Res* 2013;**48**:107-114.
160. Pierantozzi E, Gava B, Manini I, Roviello F, Marotta G, Chiavarelli M, Sorrentino V. Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells Dev* 2011;**20**:915-923.
161. Martínez-Lorenzo MJ, Royo-Cañas M, Alegre-Aguarón E, Desportes P, Castiella T, García-Alvarez F, Larrad L. Phenotype and chondrogenic differentiation of mesenchymal cells from adipose tissue of different species. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 2009;**27**:1499-1507.

162. González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 2009;**136**:978-989.
163. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;**24**:150-154.
164. Sachs PC, Francis MP, Zhao M, Brumelle J, Rao RR, Elmore LW, Holt SE. Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites. *Cell Tissue Res* 2012;**349**:505-515.
165. Wan Safwani WK, Makpol S, Sathapan S, Chua KH. The changes of stemness biomarkers expression in human adipose-derived stem cells during long-term manipulation. *Biotechnol Appl Biochem* 2011;**58**:261-270.
166. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, Politis C, Lambrichts I, Bronckaers A. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res* 2013;**353**:65-78.
167. Ferro F, Spelat R, Beltrami AP, Cesselli D, Curcio F. Isolation and characterization of human dental pulp derived stem cells by using media containing low human serum percentage as clinical grade substitutes for bovine serum. *PLoS One* 2012;**7**:e48945.
168. Kerkis I, Caplan AI. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Eng Part B Rev* 2012;**18**:129-138.
169. Fournier BP, Ferre FC, Couty L, Lataillade JJ, Gourven M, Naveau A, Coulomb B, Lafont A, Gogly B. Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Eng Part A* 2010;**16**:2891-2899.
170. Tang L, Li N, Xie H, Jin Y. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *J Cell Physiol* 2011;**226**:832-842.
171. Ge S, Mrozik KM, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell-like cells from healthy and inflamed gingival tissue: potential use for clinical therapy. *Regen Med* 2012;**7**:819-832.
172. Naveau A, Lataillade JJ, Fournier BP, Couty L, Prat M, Ferre FC, Gourven M, Durand E, Coulomb B, Lafont A, Gogly B. Phenotypic study of human gingival fibroblasts in a medium enriched with platelet lysate. *J Periodontol* 2011;**82**:632-641.

2. Les biomatériaux

La Conférence de Chester de la Société Européenne des Biomatériaux en 1986 a défini les biomatériaux : « matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical, destinés à interagir avec les systèmes biologiques ». Plus récemment, à Sorrento (Italie) en 2005, un biomatériau était défini un comme « un matériau conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qui participe à la constitution d'un dispositif à visée diagnostic ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle ». La notion de biocompatibilité, soit la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse de l'hôte appropriée dans une application spécifique, peut y être associée.

Pour que le biomatériau corresponde à ces critères, il est généralement admis que la durée de contact avec les tissus vivants dépasse quelques heures. La définition du terme « biomatériaux » reste large et englobe de nombreux domaines (tableau I).

Les biomatériaux doivent favoriser l'organisation, la croissance et la différenciation des cellules, en apportant un support physique plus ou moins labile. Toutefois, ces qualités paraissent insuffisantes pour assurer le passage à la clinique, d'où la nécessité de rappeler les principaux critères auxquels ces matériaux doivent satisfaire avant toute évaluation clinique (116) :

- Absence de thrombogénicité et processus de fabrication relativement simples ;
- Dégradation contrôlée et reproductible, en éléments non toxiques facilement métabolisables et/ou éliminables ;
- Assurant le transport/transfert de gaz et des biomolécules ;
- Résistance à la rupture similaire à celle supportée par les veines saphènes (>1 700 mmHg) ;
- Résistance garantissant la perméabilité et la stabilité du diamètre dans le temps ;
- Maniabilité du conduit et persistance à la suture ;
- Capacité à incorporer et de libérer progressivement des facteurs inductifs afin d'améliorer la croissance du tissu néoformé (117).

Domaines	Applications
Cardiovasculaire	Valves cardiaques, cœur artificiel, stimulateur cardiaque, prothèse et endoprothèses vasculaire, cathéters....
Chirurgie plastique et reconstructive	Implant pour chirurgie esthétique, drains de chirurgie, peau artificielle, sutures résorbables.....
Chirurgie orthopédique	Prothèses articulaires, orthèses, ligaments et tendons artificiels, cartilage.....
Endocrinologie	Pancréas artificiel, pompes portables et implantables....
Odontologie et stomatologie	Comblement dentaire et osseux, implants, matériaux de restauration....
ophtalmologie	Implants, lentilles, coussinet de récupération,.....
Radiologie et imagerie	Produits de contraste, produits pour embolisation.....
Urologie et néphrologie	Poches, cathéters et tubulaire pour dialyse, rein artificiel
Autre domaines	Biocapteurs, systèmes de libération contrôlée de médicaments ou de gènes....

Tableau I : Principaux domaines d’application des biomatériaux (113).

Les travaux actuels visent à optimiser principalement :

- i) La biocompatibilité ;
- ii) La cinétique de dégradation (le but étant qu’elle se produise au fur et à mesure de la production d’une matrice extracellulaire et de la réhabilitation par les cellules de l’hôte) ;
- iii) Les propriétés mécaniques (l’objectif étant une compliance proche de celle des vaisseaux natifs).

De nombreuses variables doivent être prises en compte pour satisfaire à ces impératifs, et notamment le poids moléculaire des molécules constituant le biomatériau : un matériau de poids moléculaire élevé est bien toléré alors que le même matériau de poids moléculaire plus faible peut induire une réaction inflammatoire (118). Sa porosité et son module d’élasticité (impliqué dans les processus d’adhésion et de différenciation cellulaires) ainsi que la nature du matériel sont également à prendre en considération (119). Les nanotechnologies pourraient trouver ici une application intéressante grâce à la création contrôlée à l’échelle nanométrique d’une architecture reproduisant au mieux celle de la matrice extracellulaire, véritable niche favorable à la colonisation de cellules et aux interactions avec les cellules circulantes (120, 121).

Deux types de biomatériaux, biologiques (ou naturels) et synthétiques sont principalement utilisés.

2.1. Biomatériaux synthétiques dégradables

Le but de l'utilisation des matrices biodégradables est de servir de support permettant la formation d'une structure suffisamment stable et comparable à celle d'une paroi vasculaire. Approuvées par les agences d'autorités du médicament tels que Food and Drugs Administration (FDA) et l'agence nationale de sécurité du médicament (ANSM), les matrices les plus couramment utilisées en ingénierie vasculaire sont : i) les acides poly(glycoliques) (PGA), ii) les acides poly(lactiques) (PLA), les poly(L-lactiques) (PLLA) et leur copolymères, iii) les polyhydroxyalkanoates (PHA) et iv) le polydioxanone (PDO).

Dans les années 80, ces matrices ont été utilisées pour la première fois sans cellules, « *cell free* », dans le but d'être cellularisées par recrutement des cellules du patient. Ces approches n'ont pas atteint la phase clinique de par la faiblesses de structure conduisant à la formation d'anévrismes (122).

Comme alternative au système « *cell free* », Niklason *et al.* (63, 123), ont développé une nouvelle prothèse associant un tube polymère biodégradable élaboré à partir de PGA cellularisé avec des CMLs d'aorte bovine. Après huit semaines de culture dans un bioréacteur mimant les contraintes d'un vaisseau sanguin natif, ces prothèses ont été totalement endothélialisées. Leur résistance à des pressions de rupture est de l'ordre de 2000 mmHg (63). 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 (124). Des essais réalisés sur le babouin ont révélé une bonne perméabilité à un mois (72).

Cependant, la dégradation rapide de ce polymère peut diminuer fortement la résistance du vaisseau à la pression systémique. De plus, les produits de dégradation de ces polymères peuvent entraîner des inflammations (125) et des réactions immunologiques conduisant à la détérioration du vaisseau (126) ainsi qu'une dédifférenciation des cellules implantées (127). Ces limites pourraient être contournées par l'utilisation de combinaisons de différents polymères (128). L'association de PGA avec d'autres polymères, présentant un temps de dégradation lent, a permis d'améliorer les caractéristiques mécaniques du PGA. Parmi ces polymères il est possible de citer : le PLLA (129), le PDO (130), le poly-4-hydroxybutyrate (P4HB) (131), le polyéthylène glycol (PEG) (132) ou le poly(caprolactone) (PCL) (133).

En définitive, les propriétés physiques et biologiques médiocres de ces matériaux peuvent limiter leur application clinique à long terme. C'est pourquoi de nombreuses équipes se sont intéressées aux matrices d'origine biologique dérivées de tissus humain ou animal.

2.2. Les matrices biologiques

Alternatives aux matrices synthétiques, les matrices naturelles offrent une meilleure surface pour l'adhésion, la migration, la prolifération et enfin la différenciation cellulaire (67). Ces matrices peuvent être dérivées de tissus humain ou animal. Elles comprennent actuellement : les conduits vasculaires ou avasculaires décellularisés d'origine allogéniques ou xénogéniques et les conduits construits, par recouvrement de la surface luminale, par des composants purifiés de la MEC native tels le collagène, la fibrine ou l'élastine.

2.2.1. Les conduits vasculaires décellularisés ou désendothélialisés

La décellularisation des conduits vasculaires est réalisée dans le but de diminuer les risques d'antigénécité et de calcification qui sont tous deux majorés par la présence de cellules et de leurs débris. L'objectif étant que des cellules préensemencées ou endogènes circulantes recolonisent ces supports. De plus, l'utilisation d'une telle matrice tissulaire décellularisée d'origine allogénique ou xénogénique pourrait permettre de conserver de nombreuses propriétés structurelles et mécaniques du tissu natif par le maintien de la composition de sa MEC. Ces conduits vasculaires, généralement congelés à -180°C puis décellularisés, présentent l'avantage d'être disponibles et d'avoir un faible pouvoir antigénique (134). 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 (135). Cependant, ces matrices ont un fort potentiel thrombogène lors de la mise en contact avec le flux sanguin (136).

2.2.2. Les conduits avasculaires décellularisés

Plusieurs types de conduits avasculaires décellularisés ont été utilisés. La sous muqueuse intestinale (SIS : *Small Intestinal submucosa*), dérivée de la sous-muqueuse du jéjunum de porc, est un biomatériau acellulaire naturel préconisé pour les pontages vasculaires (137, 138). Cette dernière et après décellularisation, présente une MEC composée à plus de 90% de

collagène avec prédominance de collagène de type I, de fibronectine, de glycoaminoglycanes et de glycoprotéines. Les essais expérimentaux effectués sur le chien ont montré que 75% des SIS restaient perméables après 34 mois (139). Des études faites chez le rat ont montré que les SIS présentent également des propriétés mécaniques meilleures que les PTFEe (140). Clarke *et al.* ont totalement décellularisé des uretères de bœuf dans le but de remplacer l'aorte chez un chien. Dix mois après implantation, la greffe montre une perméabilité de 100%, sans formation d'anévrisme (141). Cependant, malgré les résultats encourageants, l'utilisation des conduits avasculaires décellularisés pour le remplacement de vaisseaux de petit diamètre est limitée, en particulier par l'absence de cellules endothéliales qui réduit le potentiel thrombogénique de la matrice (67, 138).

2.2.3. Les conduits à base de composants de la matrice extra cellulaire

Le recouvrement de la surface luminale des substituts vasculaires peut se faire avec des composants de la MEC, en particulier le collagène, l'élastine et la fibronectine. La MEC est plus qu'une simple matrice qui permet l'adhésion des cellules, elle joue aussi un rôle fondamentale dans la communication intercellulaire (142), elle sert de guide à la morphogenèse des capillaires, à la maturation et la stabilité des néovaisseaux (143). De plus, différents facteurs de croissance peuvent facilement être ajoutés à ces préparations protéiques pour stimuler de façon spécifique les cellulesensemencées (144). 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 (145).

2.3. Les modifications de surface

Le succès clinique d'une prothèse vasculaire 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 envisagé différentes modifications de surface de biomatériau afin d'accélérer leur endothélialisation (146). Elles peuvent être classées en trois catégories : modifications topographiques, physico-chimiques ou biologiques (fig. 6).

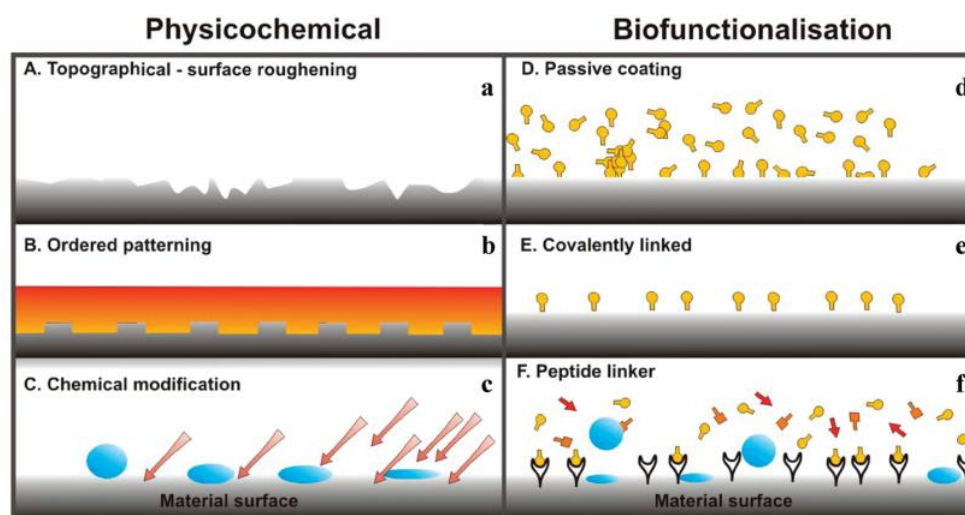


Figure 6 : Exemples de techniques de modifications de surface favorisant l'endothélialisation (146). La topographie du matériau (rugosités aléatoires (a), motifs définis (b), ou modifications chimiques de surface, par traitement plasma ou irradiation UV (c)) influence l'adsorption protéique et donc l'adhérence 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)).

2.3.1. Les modifications topographiques

Les modifications topographiques sont connues et utilisées pour influencer la réponse des cellules et des tissus sur les implants (147). Le contrôle de la porosité, par exemple, est essentiel pour des substituts synthétiques de petit diamètre : une porosité interne est nécessaire à l'ancrage de la néo-intima, et une porosité externe permet la colonisation de la prothèse par les tissus environnants (148). La présence de pores permet également une endothélialisation plus rapide (149).

La rugosité du matériau a également une influence notable sur les cellules, en particulier sur leur adhésion. Chung *et al.* ont comparé l'adhésion et la croissance cellulaire *in vitro* de CEs humaines sur des matériaux en polyuréthanes présentant des rugosités variables. Ils ont ainsi mis en évidence qu'une augmentation de la rugosité de 10 à 100 nm favorisait l'adhésion des CEs (150).

2.3.2. Les modifications physico-chimiques

Contrairement aux modifications précédentes effectuées de manière mécanique, ces techniques font intervenir la structure chimique du matériau. Ce qui a pour effet la modification de la charge ou du caractère hydrophile/hydrophobe du matériau et ses interactions avec les cellules. En utilisant des polymères plus ou moins hydrophiles, Kim *et al.* ont ainsi montré que l'adhésion et l'étalement de cellules souches humaines issues de la moelle osseuse étaient meilleurs sur les surfaces hydrophiles que sur les surfaces hydrophobes (151). La modification de charge des surfaces a également été largement étudiée dans la recherche sur les biomatériaux vasculaires. Les surfaces chargées négativement sont connues pour réduire le phénomène de thrombose (à l'instar de l'endothélium naturellement chargée négativement), tandis que les charges positives ont un effet thrombogène et favorisent l'adhésion et la prolifération des cellules (55).

2.3.3. Les modifications biologiques

Elles ont pour but de contrôler directement les réponses cellulaires et tissulaires en agissant au niveau protéique. Par exemple, afin de contrôler l'adhésion spécifique des cellules, il est possible d'immobiliser, de façon covalente ou par adsorption physico-chimique, des oligopeptides ou des oligosaccharides capables de promouvoir l'attachement cellulaire. La biofonctionnalisation s'effectue par fixation de motifs peptidiques (tableau II) spécifiques susceptibles d'être reconnus par des récepteurs cellulaires (par exemple des intégrines telles que $\alpha v \beta 3$) et favoriser une fixation des cellules sur le support (152). La réponse biologique qui s'ensuit va dépendre de la densité et de la distribution spatiale de ces peptides. Toutefois, ce type de modification a une durée de vie limitée, et il est primordial de pouvoir contrôler de manière optimale la fonctionnalité de ces molécules en fonction du temps.

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

Tableau II : Séquences peptidiques utilisées pour favoriser l’adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules (153).

Dans la partie suivante, nous détaillerons uniquement les modifications de charges des surfaces, par multicouches de polyélectrolytes et leur utilisation dans l’ingénierie vasculaire.

2.3.4. Modification des matériaux par films multicouches de polyélectrolytes

Les méthodes classiques de modification de surfaces assurant l’adhésion et le développement des cellules (adsorption de protéines, greffage chimique de polymères) s’avèrent le plus souvent difficiles à mettre en œuvre et n’est pas adapté à toutes les surfaces, ce qui limite leur utilisation. Une nouvelle voie de recherche a été développée : la formation de films multicouches de polyélectrolytes (PEMs). Ces films constituent un moyen original, simple et efficace de fonctionnaliser rapidement les surfaces des biomatériaux. Les polyélectrolytes possèdent un grand nombre de charges quand ils sont dissous dans des solvants polaires, en particulier l’eau. Dans les années 1990, Decher *et al.* ont développé une méthode d’assemblage de couches de polyélectrolytes (4). Cette méthode est basée sur le principe de dépôt couche par couche, “*Layer-by-Layer*” (fig. 7).

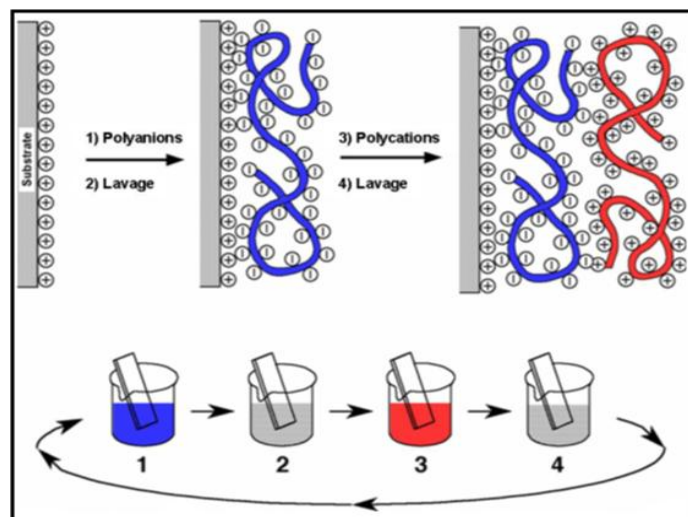


Figure 7 : Principe de construction de film multicouche de polyelectrolytes. Dans le cas illustré, le substrat est chargé positivement en surface. Le premier dépôt consiste à plonger le substrat dans une solution de polyanions (représentée en bleu). Après un lavage, un second dépôt est effectué à l'aide d'une solution de polycations (représentée en rouge) (4).

Un substrat chargé négativement est d'abord mis au contact d'une solution polycationique pendant un temps donné (5 à 20 min) (154). Les polycations s'adsorbent sur la surface et l'excès est éliminé par simple rinçage (155). Après rinçage, la surface n'est pas neutre mais chargée positivement : il y a surcompensation de charges lors de l'adsorption. Lorsque ce substrat est ensuite exposé à une seconde solution, contenant des polyanions, ceux-ci peuvent également interagir électrostatiquement avec la première couche. Cette adsorption est à nouveau suivie d'une étape de rinçage à l'issue de laquelle la surface est chargée négativement en raison d'une surcompensation de charges négatives (156).

La grande variété de polyelectrolytes disponibles permet de nombreuses applications, aux propriétés physico-chimiques modulables. Les films PEMs ont ainsi été adaptés dans de multiples domaines, balayant un champ technologique très large allant des matériaux électroniques aux nanobiotechnologies :

- Le traitement anti-reflet de verres optiques par des films hydrochlorures de poly(allylamine) (PAH) / acide polyacrylique (PAA) pour limiter les phénomènes de réflexion lumineuse sur les lunettes et les écrans d'ordinateurs, ou encore pour augmenter le rendement des cellules photovoltaïques (157) ;

- De nouvelles diodes organiques électroluminescentes (OLED) à base de films poly(p-phénylènevinylène) (PPV) / poly(acide méthacrylique) (PMA) avec des propriétés électro-optiques (caractéristiques courant/tension et luminescence/tension) modulées par la position d'une couche de montmorillonite dans l'édifice (158) ;
- De nouveaux matériaux composites à haute résistance mécanique, constitués de films PDADMA (Chlorure de poly(diallyldiméthylammonium)) / montmorillonite, où des briques d'argile (montmorillonite) de taille nanométrique (« nanobriques ») sont reliées entre elles par des chaînes de PDADMA jouant le rôle de ciment entre les plaquettes minérales (159) ;
- Des procédés de séparation et de nanofiltration avec le développement de nouvelles membranes sélectives aux ions à base de films multicouches de polyélectrolytes (160) ;
- Des films minces alimentaires protecteurs déposés au fond des bacs à légumes pour piéger les traces d'éthylènes gazeux libérés par des fruits et légumes en voie de décomposition. Ces films ont déjà été commercialisés au Japon sous le nom de « Yasa Sheets ».

- Propriétés physico-chimiques et biologiques des films

Le choix des polyélectrolytes est basé sur différentes propriétés : les interactions physico-chimiques entre les couches, la croissance du film (linéaire ou exponentielle), la stabilité, les propriétés mécaniques (rigidité, élasticité, résistance), les interactions hydrophiles / hydrophobes, la biodégradabilité et l'absence de cytotoxicité. D'autres paramètres peuvent être modulables pour l'architecture du film PEM : la concentration des polyélectrolytes, le temps d'adsorption, le nombre de couches, la réticulation... (161). De ce fait, les PEMs offrent une multitude de possibilités et peuvent être adaptés selon les applications visées.

La biodégradabilité des films PEMs est une caractéristique généralement recherchée. Ce critère peut être obtenu pour les films à base de chitosane (CHI) et de hyaluronane (HA), grâce aux enzymes telles que la hyaluronidase, la lysozyme et l' α -amylase (162). De même, certaines architectures peuvent être dégradées de manière pH-dépendante (163), permettant même le relargage contrôlé, par une barrière hydrolysable d'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA), de molécules contenues dans des réservoirs en poly-L-lysine (PLL)/(HA) (164).

La réticulation des polyélectrolytes apporte plusieurs avantages aux propriétés physico-chimiques des PEMs. Ainsi, leur biodégradabilité peut être contrôlée et leurs propriétés mécaniques variables. Ces caractéristiques modulables se répercutent sur le comportement cellulaire, notamment en favorisant la prolifération et l'étalement, de nombreuses cellules (chondrocytes, ostéoblastes, neurones, cellules musculaires lisses) et ce sur différentes architectures telles que (PLL/HA), (CHI/HA) ou (PLL/PGA) (161).

Néanmoins, afin d'optimiser l'adhésion et l'étalement des cellules, il est essentiel que le film PEMs possède une certaine rigidité. A l'heure actuelle, il est généralement reconnu que les films PEMs constitués par des couches alternées d'hydrochlorure de poly(allylamine) (PAH) et de poly(styrène-4-sulfonate) de sodium (PSS) sont suffisamment rigides et fins, ce qui favoriserait l'adhésion cellulaire (165). Depuis une dizaine d'année, le film (PAH-PSS)₃-PAH a été développé au laboratoire et a montré des propriétés intéressantes mises à profit de la réalisation d'un substitut vasculaire de petit calibre (134).

- Le film (PAH-PSS)₃-PAH et l'expertise de notre laboratoire

Parmi différentes associations de polyelectrolytes, Boura *et al.* ont montré que le film (PAH-PSS)₃-PAH était le meilleur en ce qui concerne la prolifération de CEs. Ce type de film semble améliorer l'adhésion et le développement de ces cellules en condition statique et sous flux laminaire (165,166).

Moby *et al.* ont montré que la fonctionnalisation par des film (PAH-PSS)₃-PAH favorisait l'adhésion de CEs sur la surface luminale d'un substitut synthétique en PTFEe (167). L'observation en microscopie confocale de la surface luminale des substituts a confirmé la formation d'une monocouche endothéliale exprimant le facteur intracytoplasmique vWF.

Compte tenu de ces résultats, la surface luminale d'artères ombilicales cryoconservées a été traitée avec ce film dans le but de les implanter chez l'animal. Les observations par microscopie confocale ont révélé un dépôt homogène du film sur toute la surface de l'artère. Ces films recouvrent également les fibres de collagène constituant la matrice extracellulaire.

Ces travaux ont permis de montrer que le dépôt de PEMs permettait de modifier la face interne des artères, favorisant soit l'adhérence et la rétention des CEs lorsque la charge de la

dernière couche est positive (168), soit lorsqu'elle est négative, une bonne perméabilité *in vivo* après trois mois d'implantation chez le lapin (134).

De plus, l'architecture de PEMs favorise également l'adhésion et l'étalement d'autres types cellulaires, notamment les CSMs (169) et les progéniteurs endothéliaux circulants (EPCs) (170). Berthélémy *et al.* ont montré que les films de PEMs réduisent le temps de différenciation des EPCs en CEs par rapport à un support classique de fibronectine (170). Il a également été montré que les PEMs favorisaient la différenciation des EPCs placées en hypoxie en CMLs (171).

La fonctionnalisation de surface de culture par des films de PEMs est au centre de notre thématique, non seulement pour favoriser l'adhésion et la prolifération de CEs, mais également au-delà, par la différenciation de cellules souches. Au vu des résultats prometteurs obtenus ces 10 dernières années par l'équipe vasculaire de l'UMR-CNRS 7365, les films à base de (PSS/PAH) constituent donc l'axe principal des travaux que nous présentons ici.

3. Les applications cliniques de la bioingénierie vasculaire

Le concept d'ingénierie tissulaire, précédemment exposé, peut être appliqué au domaine vasculaire afin d'améliorer les greffons actuellement utilisés. Pour atteindre la phase clinique, l'élaboration des substituts vasculaires doit, toutefois, comprendre : i) une source de cellules fonctionnelles et compatibles avec le patient ; ii) un biomatériau ayant des propriétés mécaniques et chimiques satisfaisantes et iii) une facilité de mise en place chez le patient (172). Dans cette partie, nous évoquerons seulement les applications cliniques des substituts vasculaires synthétiques dégradables ainsi que celles construites par autoassemblage cellulaire.

L'application chirurgicale de ces substituts cardiovasculaires a été mise au point en 1993 par Mayer *et al.* (173). Leurs travaux ont conduit à l'implantation d'une valve cardiaque et d'une artère pulmonaire chez le mouton (176, 177). Après 4 mois, ces implants ont montré une structure proche de l'original, un état physiologique satisfaisant et absence de thrombus. En 2000, Watanabe *et al.* ont tenté de remplacer, sans anticoagulants, la veine cave inférieure d'un chien par un scaffold à base de PGA/L-lactide (LA)/caprolactone (CL). Après 6 mois d'implantation, l'absence d'occlusion ou de formation d'anévrismes était observée au niveau

de la lumière interne du scaffold (64). La réussite de ces conduits vasculaires chez l'animal a conduit à leur autorisation en applications cliniques (tableau III).

	Synthetic grafts	Biosynthetic grafts		Totally engineered blood vessels	
	Clinical	Experimental	Clinical	Experimental	Clinical
Advantages	Reduced compliance mismatch and intimal hyperplasia, improved patency in femoro-distal bypasses	Antithrombogenic, better patency		Responsiveness, non-thrombogenicity, self-repair, growth, metabolically active, potentially cost-effective	
Disadvantages	Technically demanding, prolonged surgery time	No emergency use, cell amplification problems, cell culture contamination risk		Demanding fabrication, time- and cost-consuming, bioreactor cell laboratory, specialized centers only	
Healing	Less intimal hyperplasia	Self-renewing functional endothelium		Complete integration	
First use	Siegman et al., 1979	Herring et al., 1978	Herring et al., 1984	Weindberg et al., 1986	Shinoka et al., 2001
Review e.g.	Moawad et al., 2003	Seifalian et al., 2002	Bordenave et al., 2008	Isenberg et al., 2006	L'Heureux et al., 2007

Tableau III : Synthèse des applications expérimentales et cliniques de différents types de conduit vasculaire (synthétique, biosynthétique et totalement construit par ingénierie) décrites dans la littérature (56). Le tableau présente les avantages et les désavantages de chaque type de conduit vasculaire.

En clinique humaine, Shin 'oka *et al.*, ont été les premiers à remplacer avec succès une artère pulmonaire par un greffon à base de biomatériaux dégradables (PGA/LA/CL) chez 4 jeunes patients en le cellularisant par des cellules vasculaires autologues (178, 179). Au vu de la difficulté de leur isolement, l'utilisation de cellules vasculaires matures a été remplacée par des CSMs autologues de la moelle osseuse et ce même conduit a été implanté cette fois chez un groupe de 25 jeunes patients. Des suivis cliniques ont été effectués à court (178) et long terme (179) ; seuls les résultats obtenus à long terme sont présentés (tableau IV). L'utilisation d'une faible pression veineuse ainsi que la meilleure capacité de réplique et de différenciation des CSM implantées étaient les principaux facteurs de succès de cette approche. En utilisant cette démarche, cette équipe a effectué 200 opérations pendant 10 ans ; aujourd'hui, 500 opérations sont effectuées chaque année (180).

Patient	Age at operation (year)	Graft type	Graft diameter (mm)	Patient status	Graft patency	Graft related complications
1	2	PLA	16	Alive	Patent	None
2	1	PLA	20	Alive	Patent	None
3	7	PLA	18	Alive	Patent	Stenosis
4	21	PLA	24	Alive	Patent	None
5	4	PLA	20	Alive	Patent	None
6	12	PLA	24	Alive	Patent	None
7	17	PLA	24	Alive	Patent	None
8	19	PLA	22	Dead	Patent	None
9	3	PLA	12	Alive	Patent	Stenosis
10	2	PLA	16	Dead	Patent	None
11	2	PGA	20	Dead	Patent	None
12	13	PGA	16	Alive	Patent	Stenosis
13	2	PGA	16	Alive	Patent	Thrombosis
14	2	PGA	18	Alive	Patent	None
15	2	PGA	12	Alive	Patent	None
16	2	PGA	16	Alive	Patent	None
17	24	PGA	18	Alive	Patent	None
18	1	PGA	16	Alive	Patent	Stenosis
19	11	PGA	18	Alive	Patent	None
20	2	PGA	16	Alive	Patent	None
21	3	PGA	16	Alive	Patent	None
22	4	PGA	18	Alive	Patent	None
23	4	PGA	18	Alive	Patent	None
24	13	PGA	16	Alive	Patent	None
25	2	PGA	18	Dead	Patent	None

Tableau IV : Résultats cliniques obtenus après transplantation d'un vaisseau sanguin synthétique dégradable à base de PGA ou PLA dans le but de remplacer une artère pulmonaire sténosée chez des patients jeunes (179). *L'état des patients a été évalué, après un suivi à 5 ans postopératoire, par des techniques d'angiographie et d'imagerie. La cause principale d'échec était la sténose affectant 16% des patients.*

En 1998, l'Heureux *et al.* ont réussi à mettre au point l'ingénierie du premier vaisseau sanguin sans l'utilisation d'un scaffold exogène (66). La technique est basée sur un système d'autoassemblage de feuillets cellulaires constitués de collagène et de cellules.

Dans une première étape, chacun des 3 types cellulaires du vaisseau est récupéré à partir de tissus humains. Les CEs et les CMLs sont isolées de la veine ombilicale humaine et les fibroblastes proviennent du derme. Ces cellules sont cultivées sur plaque et une fois confluentes, les feuillets cellulaires sont détachés. La deuxième étape consiste à les enrouler : le feuillet obtenu avec les CMLs est d'abord enroulé sur plusieurs tours autour d'un mandrin afin de reconstituer la média. Un deuxième feuillet, produit à partir des fibroblastes, est ensuite enroulé autour du rouleau précédent formé afin de constituer l'adventice. A ce stade, seules les 2 couches les plus externes sont construites. Cet assemblage est soumis à maturation afin d'assurer la cohésion des couches cellulaires. La troisième tunique est enfin ajoutée par ensemencement de CEs à l'intérieur de la lumière du tube, pour former l'intima.

Grâce à une forte densité de collagène, la résistance de ces substituts aux pressions de rupture est élevée. D'autres composantes de la MEC sont également présentes, dont l'élastine dans l'adventice. Une étude publiée par cette équipe a montré que l'assemblage du feuillet externe de fibroblastes et du feuillet interne de CEs a permis de reconstituer un nouveau vaisseau avec des propriétés mécaniques proches de celles du vaisseau natif (181). Des études *in vivo* ont été menées pendant 8 mois chez le singe et le chien et présentent des résultats encourageants :

- perméabilité de 86 % des substituts implantés ;
- formations de *vasa vasorum* et de média.

Après les résultats encourageants obtenus chez l'animal, des essais cliniques ont débuté en 2007 (182). Les vaisseaux fabriqués ont été implantés en tant que pontage artériel-veineux à visée de dialyse entre le bras et l'avant-bras de patients. Sur 10 patients ayant bénéficié de ces pontages, 7 ont présenté une perméabilité satisfaisante au terme de 30 mois d'implantation (183). Cependant, le temps de production et de maturation de l'adventice (> 10 semaines) est un facteur limitant. Avec le progrès de la technologie, le temps de production de ces substituts a été diminué de 70% après élimination de la phase de maturation cellulaire de la media et l'adventice (fig. 8). De même, la technique de feuillet cellulaire a été remplacée par une technique d'assemblage de trame cellulaire (184). Très récemment, ces trames cellulaires sont assemblées pour former un complexe 3D qui est mûri durant 8 semaines avant de former un substitut vasculaire. Actuellement, l'utilisation de ces substituts vasculaires est en cours d'essai clinique (185).

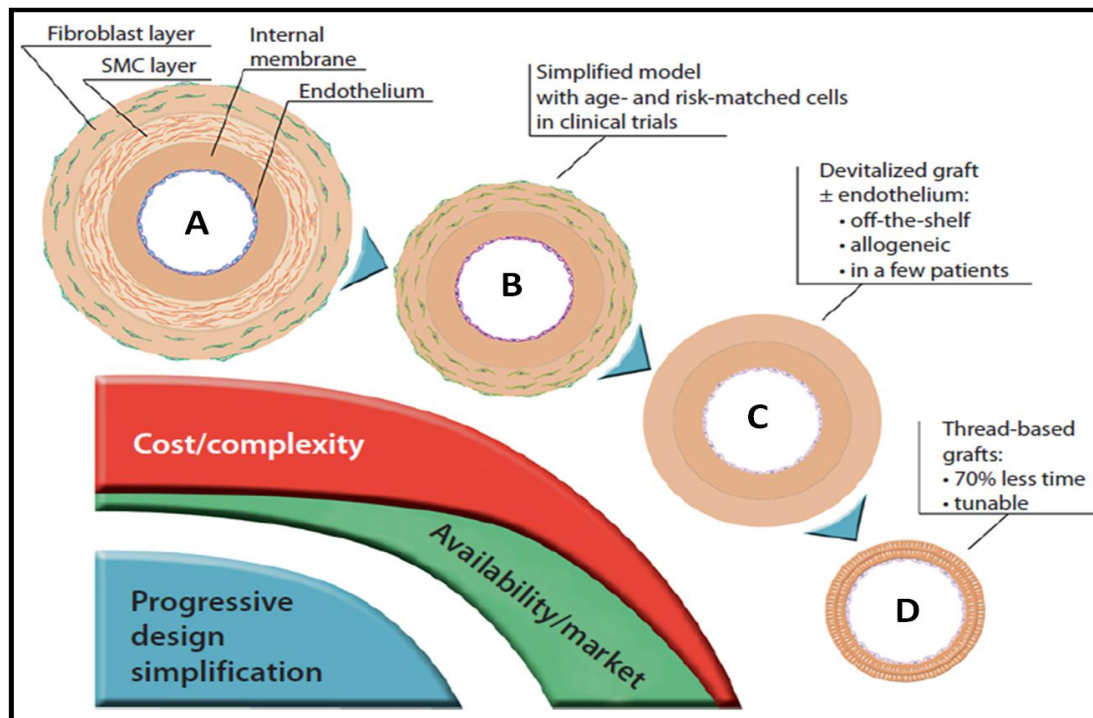


Figure 8 : Améliorations des constructions de vaisseaux sanguins humains formés par autoassemblage. (A) représente le premier vaisseau construit par assemblage de feuillets cellulaires (66). (B) représente un modèle plus simplifié que le précédent avec élimination de la couche de CMLs (181). (C) représente le premier vaisseau construit par autoassemblage (CEs + fibroblastes) et cryoconservé pour être utilisé en cas d'urgence (186). (D) représente le remplacement des feuillets cellulaires par un complexe de trames cellulaires dans le but de minimiser le temps de production (184).

Toutes ces approches plus ou moins sophistiquées de construction de greffons vasculaires cellularisés conduisent vers les premiers essais cliniques très spécifiques. A ce jour, aucune ne répond à l'ensemble des caractéristiques attendues, ce qui en limite leur utilisation. En effet, fondé sur la combinaison variable de cellules et de matériaux, le domaine de l'ingénierie vasculaire a connu une évolution très importante au cours de la dernière décennie (73). Cette évolution a été concentrée, en grande partie, sur l'optimisation du type de biomatériau, d'échaffaudage et du type de cellules ensemencées et de leurs fonctions (187). Grâce aux développements de la biotechnologie, les nouveaux biomatériaux peuvent être ensemencés avec des nanoparticules, contenant des facteurs de croissance, des cytokines et des facteurs favorisant l'angiogenèse, susceptibles d'être libérés au fur et à mesure de la dégradation du biomatériau (188).

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Dans le cadre de la construction d'un néo-vaisseau par l'ingénierie tissulaire, il est nécessaire de disposer à la fois d'une quantité importante de cellules vasculaires et donc d'un environnement favorable à la différenciation et la croissance de cellules souches. Celles mésenchymateuses (CSMs) présentent un potentiel de différenciation multipotent, ce qui en fait des cellules d'intérêt en ingénierie tissulaire. A ce jour, la moelle osseuse (MO) est considérée comme la source principale, bien que leur isolement soit une procédure douloureuse et invasive. D'autres sources de cellules ont été envisagées, en particulier celles issues de cellules périnatales, et plus précisément de la gelée de Wharton (GW), composante du cordon ombilical, et décrites comme très primitives. Cependant, la différenciation cellulaire nécessite la fonctionnalisation de la surface de culture, et notre groupe a démontré l'avantage des films multicouches de polyelectrolytes, constitués de PAH (poly(allylamine hydrochloride)), et de PSS (poly(styrène sulfonate)).

L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'effet de la combinaison des films multicouches et des facteurs de croissance angiogéniques sur la différenciation en phénotype endothéliale des CSMs. La finalité est de s'affranchir de l'utilisation des cellules endothéliales matures dans le domaine de l'ingénierie vasculaire.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'influence de la charge terminale de nos films sur le comportement des cellules en culture. Cela nous a permis de déterminer la meilleure architecture du film pour débiter la différenciation de nos cellules. Le comportement des cellules a été suivi par microscopie à fluorescence et optique.

Dans un second temps, nous avons étudié l'impact du pourcentage de sérum dans le milieu de différenciation sur le comportement de nos cellules. Cela nous a permis d'optimiser efficacement les conditions de mise au point de notre protocole de différenciation.

Dans un troisième temps, nous avons comparé l'effet de la combinaison des facteurs de croissance et des films multicouches sur la différenciation des CSM-GWs et CSM-MOs. La différenciation des cellules a été contrôlée par l'évolution de leur morphologie (microscopie optique), par qRT-PCR et Western blot (pour l'expression des marqueurs spécifiques). La fonctionnalité des cellules a été vérifiée par leur capacité à incorporer des lipoprotéines acétylés, de générer du monoxyde d'azote et d'exprimer le facteur von Willebrand.

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

I. Culture cellulaire

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

- des cellules endothéliales issues de la veine du cordon ombilical (HUVECs),
- des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse (CSM-MOs),
- des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton (CSM-GWs),

Remarque :

- *L'isolement de ces différents types cellulaires est expliqué dans le 1^{er} article.*
- *Tous les prélèvements sont réalisés conformément aux procédures approuvées par les comités éthiques, en accord avec l'unité de thérapie cellulaire et tissus (UTCT, Nancy) et le centre hospitalier de Nancy (CHU, Nancy).*

1. Réactifs et matériels

1.1. Tampons

Isotoniques, de pH compris entre 7,2 et 7,4, ces tampons ne contiennent ni calcium ni magnésium. Ils servent à laver les cellules, à diluer les anticorps, ainsi qu'à maintenir les tissus hydratés à la température requise sans qu'ils se dessèchent. Les deux tampons utilisés sont le PBS et l'HBSS, dont les compositions sont données dans le Tableau V.

Remarques : Après ajustement du pH (7,2-7,4), les solutions sont filtrées sur une membrane de porosité 0,22 μ m (Millipore, France), puis conservées à 4°C.

Tampon	Constituants	Concentration
PBS <i>(Phosphate Buffer Saline)</i>	NaCl	137mM
	KCl	2,7mM
	Na ₂ HPO ₄	10mM
	KH ₂ PO ₄	1,4mM
HBSS <i>(Hank's Balanced Salt Solution)</i>	KCL	0,4g/L
	NaCl	8g/L
	KH ₂ PO ₄	0,06g/L
	Na ₂ HPO ₄	0,047g/L
	D-glucose	1g/L
	Rouge de phénol Indicateur coloré de pH)	0,011g/L

Tableau V : Composition des solutions tampon utilisées pour la culture cellulaire.

1.2. Solution de digestion (Enzymes)

Le détachement des cellules du support de culture est réalisé selon les cas à l'aide de :

- Solution de digestion trypsine-EDTA (Gibco, France) à 0,5 % diluée avec du tampon HBSS. La concentration finale de la solution de trypsine-EDTA est alors de 0,25 %. La trypsine, enzyme protéolytique qui hydrolyse les liaisons peptidiques, est utilisée pour détacher les cellules au cours des différents passages.
- Collagénase de type II (Fisher, France), à une concentration de 1 mg/mL dans du milieu complet dépourvu de sérum, est utilisée afin de récupérer les cellules souches mésenchymateuses provenant de la gelée de Wharton. La collagénase de type II est une enzyme qui coupe la triple hélice de collagène en accélérant la libération des CSMs avec un rendement élevé.

1.3. Milieu de culture

Trois types de milieu de culture ont été utilisés, selon le type de cellules cultivées :

- Un milieu de prolifération des HUVECs (tableau VI) ;
- Un milieu de prolifération CSM-MOs et CSM-GWs (tableau VI) ;
- Un milieu de différenciation endothéliale CSM-MOs et CSM-GWs (tableau VI).

Le milieu de culture des HUVECs (M199 + RPMI 1640) ne contient pas de facteurs de croissance (tableau VI). Il est supplémenté en sérum AB d'origine humaine, fourni par l'Etablissement Français du Sang, préalablement décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C, puis filtré en raison de la présence de particules en suspension pouvant gêner l'observation au microscope. Le sérum AB enrichit le milieu en nutriments et favorise l'amplification des cellules.

Composant	Concentration	Rôle
M199 (Fisher, France)	40% (Milieu de base)	Apports de sels inorganiques et de vitamines
RPMI 1640 (Sigma, France)	40% (Milieu de base)	
Sérum AB humain (EFS)	20% (v/v M199/RPMI)	Apport nutritionnel
Pénicilline (Fisher, France)	2mM	Antibactérien
L-Glutamine (Fisher, France)	100 IU/mL	Apport d'acides aminés
Fungizone (Fisher, France)	2,5µg/mL	Antifongique
HEPES (Sigma, France)	20mM	Tamponne le pH à 7,4

Tableau VI : Composition du milieu pour la culture des cellules endothéliales matures

Le second milieu utilisé pour cultiver les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse et de la gelée de Wharton tout en maintenant leur caractère indifférencié, est normalement composé d'un milieu de base (α -MEM, Lonza, Belgique) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), glutamine, Fungizone[®] et pénicilline (tableau VII).

Composant	Concentration	Rôle
α-MEM (Lonza, Belgique)	Milieu de base	Apports de sels inorganiques et de vitamines
SVF (Sigma, France)	10% (dans α-MEM)	Apport nutritionnel
Pénicilline (Fisher, France)	2mM	Antibactérien
L-Glutamine (Fisher, France)	100 IU/mL	Apport d'acides aminés
Fungizone (Fisher, France)	2,5µg/mL	Antifongique

Tableau VII : Composition du milieu de culture des CSMs

Le dernier milieu, favorable à la différenciation endothéliale des cellules souches et au maintien du phénotype, est le milieu EGM-2 (Lonza, Belgique), qui est une formule commerciale préparée à partir d'un milieu de base (EBM-2) supplémenté par 0,5% de SVF et des facteurs de croissance endothéliaux. Il est favorable à la différenciation endothéliale des cellules souches et au maintien du phénotype (tableau VIII).

Composant	Concentration	Rôle
EGM-2 (Lonza®, France)	Milieu de base	Apports de sels inorganiques et de vitamines
Sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma, France)	0,5% (v/v EBM-2)	Apport nutritionnel
Pénicilline (Fisher, France)	2mM	Antibactérien
L-Glutamine (Fisher, France)	100 IU/mL	Apport d'acides aminés
Fungizone (Fisher, France)	2,5µg/mL	Antifongique
Facteur de croissance: Basic fibroblast growth factor (bFGF)	4µL/mL	Favorise la différenciation endothéliale
Epidermal growth factor (EGF)	1µL/mL	
Insulin-like growth factor (IGF)	1µL/mL	
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	1µL/mL	

Tableau VIII : Composition du milieu de différenciation des CSMs

2. Méthodes de caractérisation et d'investigation

2.1. Evaluation de l'étalement cellulaire après culture sur les différentes surfaces

L'étalement ainsi que le comportement des cellules sur les différentes surfaces de culture ont été évalués par immunomarquage des filaments d'actine. Cette technique utilise la phalloïdine couplée à un fluorochrome vert (Alexa® 488) (Invitrogen, France). Extraite de phallotoxines, la phalloïdine présente une forte affinité pour les filaments d'actine. Cette technique nous a fourni des informations concernant l'étalement ainsi que la forme de nos cellules cultivées.

2.2. Caractérisation phénotypique des cellules

La caractérisation des cellules souches isolées de la moelle osseuse et de la gelée de Wharton a été faite par un examen morphologique préliminaire, puis par une étude phénotypique. La microscopie inversée à contraste de phase a permis d'étudier la morphologie des cellules. Le phénotype des cellules, avant la phase de différenciation, a été caractérisé par cytométrie en flux (annexe I). Cette technique fournit des informations semi-quantitatives sur l'expression de certains marqueurs (membranaires ou intracellulaires) d'une population cellulaire en suspension. Les différents marqueurs employés pour réaliser la caractérisation des cellules sont détaillés dans le Tableau IX.

Phénotype	Anticorps	Espèce cible	Espèce source	Ex/Em	Dilution	Fluorochrome
Mésenchymateux	anti-CD73	Humain	Souris	565nm/578nm	1/50	PE
	anti-CD90	Humain	Souris	565nm/578nm	1/50	PE
	anti-CD105	Humain	Souris	494nm/521nm	1/50	FITC
Hématopoïétique	anti-CD34	Humain	Souris	565nm/578nm	1/50	PE
	anti-CD45	Humain	Souris	494nm/521nm	1/50	FITC
Histocompatibilité	anti-HLA-DR	Humain		494nm/521nm	1/50	FITC
Contrôle isotypique	IgG1-FITC	Humain	Souris	565nm/578nm	1/50	FITC
	IgG1-PE	Humain	Souris	494nm/521nm	1/50	PE

Tableau IX : Marqueurs utilisés en cytométrie en flux (*PE : phycoerythrin ; FITC : fluorescein isothiocyanate*).

Le suivi du phénotype endothelial des cellules, à l'issue de différenciation, est réalisé par la mesure du taux d'expression de certains marqueurs endothéliaux spécifiques tels que CD31, VEGF-R2 et VE-cadhérine, tant au niveau génique, par réaction de transcription inverse de polymérisation en chaîne quantitative (qRT-PCR) (Tableau X), que protéique, par western blot (Tableau XI).

Gènes	Séquences sens	Séquences anti-sens
CD31	5'-ATGATGCCAGTTTGAGGTC-3'	5'-ACGTCTTCAGTGGGGTTGTC-3'
KDR	5'-GTGACCAACATGGAGTCGTG-3'	5'-TGCTTCACAGAAGACCATGC-3'
CDH5	5'-CCTACCAGCCCAAAGTGTGT-3'	5'-GACTTGGCATCCCATTGTCT-3'

Tableau X : Séquence des amorces utilisées en qPCR.

Cibles	Dilutions	Fournisseur
<i>GAPDH</i>	1/1000 BSA/TBST	Santa Cruz
<i>VEGF-R2</i>	1/1000 lait/TBST	Cell Signaling Technology
<i>Ve-Cadhérine</i>	1/1000 BSA/TBST	Abcam
<i>CD31</i>	1/1000 BSA/TBST	Dako

Tableau XI : Anticorps primaires utilisés en western blot. (*BSA : Bovine serum albumin ; TBST : Tris-Buffered saline and tween*).

2.3. *Evaluation de la fonctionnalité cellulaire*

L'évaluation de la fonctionnalité des cellules à l'issue de différenciation a été réalisée par leur capacité à incorporer les LDLs (*low density lipoprotein*)-acétylés, par leur capacité à libérer du monoxyde d'azote (NO) dans le milieu de culture et enfin par l'expression du facteur pro-thrombotique von Willebrand ; ces fonctionnalités ont pour finalité de vérifier si ces cellules différenciées présentent des caractéristiques proches de celles des cellules endothéliales matures, permettant de les apparenter à des CE-like.

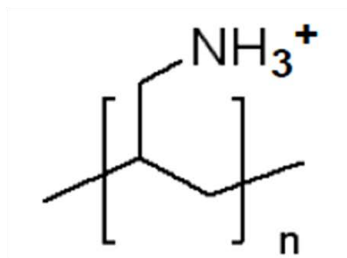
Remarque : la méthodologie et les protocoles des différentes techniques réalisées durant la thèse sont expliqués dans la section « matériels et méthodes » des deux articles figurants dans ce manuscrit.

3. Préparation des surfaces de culture

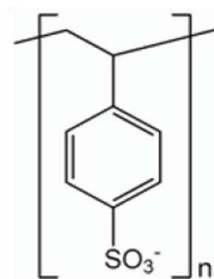
Les cellules ont été cultivées sur des lames de verre recouvertes de :

- Supports témoins : 73,6 µg/mL de collagène de type I d'origine murine (BD Biosciences). Après avoir stérilisé les lames de verres rondes à l'UV, 400 µL de collagène sont déposés sur chaque lame et incubés pendant 30 minutes à 37°C, le surplus de collagène est enfin aspiré.
- Support d'intérêt : Le film multicouche est construit par dépôt successif sur une lame de verre, de trois bicouches et demie de polyélectrolytes constitués de polycations : chlorhydrate de polyallylamine (PAH, Sigma-France) et de polyanions : poly (4-

styrène sulfonate de sodium) (PSS, Sigma-France) (fig. 9). L'architecture est notée (PAH-PSS)₃-PAH.



Hydrochlorure de Polyallylamine
PAH (poids moléculaire ~ 56 kDa)



Poly (sodium-4- styrène sulfonate)
PSS (poids moléculaire ~ 70 kDa)

Figure 9 : Représentation de la structure chimique des deux polyelectrolytes utilisés.
 (PAH : poly (allylamine hydrochloride); PSS : poly (sodium 4-styrène sulfonate)).

Remarque : la procédure utilisée pour la construction du film est décrite dans la section « matériels et méthodes » des deux articles figurants dans ce manuscrit.

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Influence de la charge de surface sur la culture de cellules souches mésenchymateuses

1. Introduction

Notre objectif principal a été de différencier des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) issues de la moelle osseuse (MO) et de la gelée de Wharton (GW) en cellules endothéliales. Dans cette étude et d'après nos résultats préliminaires (189), les CSMs de la GW et de la MO ont été cultivées initialement sur des films (PAH-PSS)₃-PAH, finissant ainsi par une couche de PAH chargée positivement. Le choix de cette construction de film s'est fait à l'instar d'études précédentes dans lesquelles ils sont largement utilisés pour modifier des surfaces telles que le verre, le plastique, les artères décellularisées et le PTFE (189). L'intérêt de leur utilisation est de rendre ces surfaces bioactives et adhésives vis-à-vis de divers types cellulaires comme les cellules endothéliales (CEs), les cellules progénitrices endothéliales (EPCs) et les CSMs de la MO. Notre groupe a précédemment montré que ces films amélioraient l'adhésion et la viabilité des cellules endothéliales (166) et étaient capables de favoriser, *in vitro*, la différenciation des EPCs en cellules endothéliales (166,170).

Malgré leur effet exceptionnel sur des cellules souches ou matures étudiées, les films multicouches terminant par une couche PAH ont montré un résultat décevant quant à l'adhésion des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton (CSM-GWs), suggérant que ces cellules présentent, *in vitro*, un comportement spécifique et différent des autres cellules. En effet, les CSMs-GWs cultivées sur les films (PAH-PSS)₃-PAH tendent à s'organiser après 10 jours de culture, en structures semblables à des nodules ce qui représente un facteur limitant dans l'ingénierie tissulaire vasculaire.

Dans le but de mieux comprendre si ce phénomène est dépendant de la surface ou du type cellulaire, deux approches ont été réalisées :

- La variation du type cellulaire : culture sur des films (PAH-PSS)₃-PAH, de CSM-MOs et de CSM-GWs, en utilisant comme contrôle des cellules matures endothéliales provenant de la veine du cordon ombilical (HUVECs). L'évaluation du comportement cellulaire a été réalisée après 10 jours de culture.

- La variation du type de surface : culture des CSM-GWs sur des films chargés positivement (PAH-PSS)₃-PAH et sur des films chargés négativement (PAH-PSS)₄; une surface recouverte de collagène nous a servi de contrôle positif.

2. Article

H. Rammal, J. Beroud, M. Gentils, P. Labrude, P. Menu, H. Kerdjoudj and E. Velot: *“Reversing charges or how to improve Wharton’s jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films”*. Biomed Mater Eng. (2013); 23:299-309.

Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films

H. RAMMAL^{1*}, J. BEROUD^{1*}, M. GENTILS¹, P. LABRUDE¹, P. MENU¹, H. KERDJOUDJ²

and E. VELOT¹

¹ Université de Lorraine, Biopôle-UMR 7561, CNRS-Faculté de Médecine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

² EA BioS 4691, UFR Odontologie, SFR-Cap santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, France.

patrick.menu@univ-lorraine.fr

(*) Both authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Polyelectrolyte multilayer (PEMs) films made of poly(allylamine hydrochloride) (PAH) as polycation and poly(styrene sulfonate) (PSS) as polyanion, with a PAH ending layer, can be used as antithrombogenic coating in vascular engineering field. They induce strong adhesion of mature endothelial cells on glass, expanded polytetrafluoroethylene and cryopreserved arteries. Despite their outstanding effect on mature and progenitor endothelial cells, PEMs ending with PAH showed a poor outcome on Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) culture. The aim of this work was to examine the influence of the ending charge of PEMs on WJ-MSCs behavior. WJ-MSCs amplified until the 3rd passage were seeded and cultured on (PAH-PSS)₃-PAH and on (PAH-PSS)₄ coated glass for 10 days. Stem cell phenotype was checked by flow cytometry and cell morphology was followed by bright field microscopy. Flow cytometry analysis showed that WJ-MSCs were positive for MSC's markers CD73, CD90 and CD105 and negative for hematopoietic markers CD34 and CD45. Light microscopy showed development of nodule-like structures after 10 days of culture on (PAH-PSS)₃-PAH, which resulted in a disturbance of cell monolayer. Oppositely WJ-MSCs cultured on (PAH-PSS)₄ ending with PSS showed a normal cell growth like on collagen and reached confluence after 10 days. The culture surface seems to have a determining role in WJ-MSC's "spatial" behavior, which could be considered in the field of tissue engineering.

Keywords: mesenchymal stem cells, polyelectrolyte multilayer films, culture surface, stem cells behavior.

1. INTRODUCTION

Vascular diseases are a major challenge for medical science because the use of grafts largely fails due to high immunogenicity and thrombogenicity. Improving graft patency using mature endothelial cells (ECs) enhances the survival of the graft after transplantation [1]. However, these cells present low availability restricting their use [2]. As an alternative, stem cell-based therapies have rapidly risen as a potential strategy for tissue repair and regeneration in regenerative medicine field. Since their discovery [3], bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) have been extensively investigated and their use in clinical trials showed some encouraging results [4]. Nevertheless these cells present several limits. Besides the invasive and painful cell collecting procedure, BM-MSCs are present at very low frequency (approximately 0.001–0.01% [5]) and their quality decreases with the age of the donor [6].

Alternative sources for MSCs isolation have been pursued. Thus, these cells can be obtained from several birth-associated tissues including umbilical cord Wharton's jelly [7]. These cells are multipotent, with an inexpensive harvesting, easily and not invasively isolated, immunocompatible, politically permissible and present a high differentiation potential [8, 9]. Despite their ability to differentiate into several lineages, the majority of transplanted MSCs or mature cells die within the first days following the injection; this death might be due to an inflammatory reaction because of a loss of contact between the cells and the extracellular matrix due to blood flow. Since 2000, our group demonstrated the possibility to use polyelectrolyte multilayer films (PEMs) made of poly(allylamine hydrochloride) (PAH) as polycation and poly(styrene sulfonate) (PSS) as polyanion, with a PAH ending layer, as antithrombogenic coating in vascular engineering field [10].

This surface modification is based on the alternate adsorption of oppositely charged polyelectrolytes [11]. Beside their great simplicity of preparation, this method offers also large possibilities in PEMs properties tuning such as PEMs thickness, surface roughness and wettability [12]. We demonstrated that (PSS/PAH)₃-PAH film deposited on glass improved ECs adhesion and viability [13], increased significantly their adherence under shear stress [14] and also promoted their attachment and proliferation inside small-diameter vascular grafts [15]. Recently, we demonstrated that these PEMs were able to promote *in vitro* the endothelial differentiation of endothelial progenitor cells (EPCs) [16, 17] and of BM-MSCs [18].

Synthetic polyelectrolytes such as PSS (a strong polyelectrolyte), PAH and other polyelectrolytes have been widely used in cell/film studies. Initial cell adhesion is mostly mediated through electrostatic interaction and, more indirectly, *via* serum proteins adsorbed on to the films. The main advantages of using synthetic polymers are the possibility of specifically adjusting certain parameters and how easy they are to modify chemically. The most frequently studied synthetic PEMs are, by far, linearly growing and dense PSS/PAH films. It has been previously reported that different types of cells such as endothelial cells [13], fibroblasts [19, 20], osteoblastic cells [21], hepatocytes [22], rabbit and human EPCs [16,17] and BM-MSCs [18] had a good adhesion and behavior on PSS/PAH films; and that

film terminated with PAH preserved cell shape, attachment, cytoskeleton arrangement and exhibited an excellent cellular biocompatibility [14].

Recently, we found that WJ-MSCs exhibit a special behavior on (PAH-PSS)₃-PAH film. The outer layer of PEMs film and more specifically its terminal charge of PEMs is thought to be responsible for this special behavior. In this study, the behavior of two sources of MSCs (WJ- and BM-MSCs) was evaluated on positively charged outer layer of (PAH-PSS)₃-PAH classical architecture and on negatively charged outer layer of (PAH-PSS)₄ film.

2. Material and methods

2.1. Polyelectrolyte Multilayers Films

All reagents were purchased from Sigma Aldrich (France) unless specified otherwise. Anionic PSS (MW=70 kDa) and cationic PAH (MW=70 kDa) were used to build polyelectrolyte multilayers (PEMs) films from polyelectrolyte solution at 1 mg/mL (PSS and PAH) and dissolved in Tris (10mM)/NaCl (150mM) solution. Each experiment was preceded by a cleaning step of the cover glasses (diameter: 34.7 mm) with 100 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) during 15 min at 100°C. After an intensive ultrapure water (Millipore) rinse, cover glasses were brought in contact with 10 mM hydrochloric acid during 15 min at 100°C and finally rinsed with ultrapure water. Cover glasses were then placed in 6-well plates and PAH solution was incubated for 5 min at room temperature. After an intensive Tris/NaCl solution rinse, polyanion (PSS) was adsorbed for 5 min. Thus, 7 or 8 alternate depositions of polycationic PAH and polyanionic PSS layers were deposited and (PAH-PSS)₃-PAH or (PAH-PSS)₄ films were then built up. Type I rat tail collagen (BD Bioscience) was used as positive control for cell adhesion. Glass slides were coated by 100 µg/mL of collagen I in phosphate buffer saline (PBS, Gibco) for 10 minutes at 37°C and rinsed with PBS solution before cell seeding.

2.2. Cell isolation

2.2.1. HUVECs

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated from fresh umbilical cords according to the method of Jaffe et al. [23]. They were cultured at 37°C at 5% CO₂ and 21% O₂ in 25 cm² tissue-culture-treated flasks in complete medium. The medium consisted of an equal mixture of media M199 (Fisher) and RPMI 1640, supplemented with 20% decompemented human serum, 2 mM L-glutamin (Fisher), 20 mM HEPES, 100 IU/mL penicillin (Fisher) and 2.5 mg/mL fungizone (Fisher). Medium was changed every 2 days.

2.2.2. MSCs from Wharton's Jelly umbilical cord

Fresh human umbilical cords were obtained after full-term births (cesarean section or normal vaginal delivery) with informed consent using the guidelines approved by the university hospital center (CHU) of Nancy. Briefly, after rinsing in Hank's balanced salt solution (HBSS), cords were aseptically stored at 4°C in sterile saline until processing. Umbilical cord vessels were then removed from cord segments, and exposed mesenchymal

tissue was cut into very small pieces or explants (1-2 mm³). For the digestion step, explants were incubated in digestion solution: collagenase type 2 (1 mg/mL, Fisher), in DMEM (Gibco) for 18 hours in 5% CO₂ at 37°C. After incubation, enzyme was inactivated with decompemented fetal bovine serum (FBS). WJ-MSCs were suspended and cultured in alpha Minimal Eagle Medium (α -MEM, Lonza) complete proliferation medium supplemented with 10% FBS, penicillin/streptomycin 100 IU/mL, glutamine 2mM and 2.5 mg/mL fungizone, and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 21% O₂ at 37°C with a medium change every 2 days.

2.2.3. MSCs from human bone marrow (BM-MSCs)

Mesenchymal stem cells from human donors (hMSCs) were kindly provided by the cell and tissue therapy department (CHU, Nancy). Briefly, cells were isolated from total hip or knee replacement surgery according to Friedenstein's procedure [3] with informed consent using the guidelines approved by the CHU of Nancy. Cells were previously characterized (data not shown) and cultured in complete α -MEM proliferation medium such as WJ-MSCs, and maintained in the same culture conditions as previously described.

2.2.4. Cells behavior

Before each experiment, the 6-well plates were irradiated by ultra violet (UV) length during 10 min. All cells were seeded at 3000 cells/cm². HUVECs were used at the 2nd passage, however WJ-MSCs and BM-MSCs were cultured at passage 4 and seeded on (PAH-PSS)₃-PAH and (PAH/PSS)₄ in α -MEM culture medium for 10 days. Collagen-coated glass and glass served both as culture controls. Cell morphology was followed after 5 and 10 days by bright field microscopy (Leica, x10 magnification).

2.2.5. Cytoskeleton staining

Fluorescent dyes were used to stain actin cytoskeleton; phalloidin coupled with an Alexa 488 green fluorophore (Invitrogen, 1/100) was used in the presence of 0.1% Triton X-100 and 0.5% bovine serum albumin (BSA, Euromedex), after permeabilization of cell membranes with 0.5% Triton X-100. A blue DNA labeling was performed using the dye 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI, 1/250000). Observations were made after one week and two weeks of culture. Labeled cells were mounted on glass slides (VWR) to be observed by fluorescence microscopy (Leica, x10 magnification) after using the appropriate excitation and emission filters for Alexa Fluor 488 (Ex485/Em538).

2.3. WJ-MSC's phenotypic characterization

WJ-MSCs were characterized at 3rd passage by flow cytometry (FACSCalibur; BD Bioscience) through the expression of MSC's markers cluster of differentiation (CD)73 (Ecto-5'-nucleotidase), CD90 (Thymocyte differentiation antigen-1) and CD105 (Endoglin), hematopoietic markers CD34 and CD45 (Leukocyte common antigen-5); using mouse anti-human CD45-(HI30) fluorescein isothiocyanate FITC-conjugated antibody (BD Bioscience), phycoerythrin PE-conjugated mouse anti-human CD34-(581), CD73-(AD2), CD90-(5E10) (BD Bioscience) and CD105-(5N6) antibodies (Serotec) and appropriate isotype controls. Briefly, adherents WJ-MSCs were detached using trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid

(EDTA) and incubated for 1 hour at room temperature with appropriate conjugated antibodies. Stained cells were immediately analyzed and at least 10000 events were measured and analysis was performed with the CELLQuestTM software (BD Bioscience).

3. Results

3.1. Phenotypic characterization of WJ-MSCs

The mesenchymal phenotype of the cells from Wharton's jelly umbilical cord was assessed by flow cytometry. Cells exhibited a strong positive surface expression for the MSC's evaluated markers: nearly 100% for CD90, 90% for CD73 and 60% for CD105. In addition, there was no detection of the hematopoietic lineage markers CD34 and CD45 (fig. 1).

3.2. Behavior of WJ-MSCs on (PAH-PSS)₃-PAH and (PAH-PSS)₄ after 10 days

Macroscopic visualization of WJ-MSCs cultured in a 10% FBS proliferation medium at passage 4 on (PAH-PSS)₃-PAH showed the formation of nodule-like shapes after 10 days. These white shapes were clearly observable to the eye and covering all the culture area (fig. 2a). However, WJ-MSCs on (PAH-PSS)₄ film did not develop any nodule-like shapes and this was proved by the clearance of the culture well (fig. 2b).

3.3. Morphology of WJ-MSCs on different culture surfaces after 5 and 10 days

Microscopic evaluation of WJ-MSCs cultured at passage 4 with a normal 10% FBS culture medium (α -MEM, Lonza[®]) on different culture surfaces: uncoated glass (fig. 3a), collagen (fig. 3c), (PAH-PSS)₃-PAH (fig. 3e) and (PSS-PAH)₄ (fig. 3g) showed a similar and typical fibroblast-like morphology in the first 5 days following the plating. Cells cultured on uncoated glass (fig. 3b), collagen (fig. 3d) and on (PAH-PSS)₄ (fig. 3h) displayed a broadened flat morphology and reached confluence after 10 days. Unlike other cells, WJ-MSCs cultured on (PAH-PSS)₃-PAH structure (fig. 3f) developed some nodule-like shapes covering all the culture surface with a disturbance of the cell layer after 10 days.

3.4. Morphology and behavior of HUVECs and BM-MSCs on (PAH-PSS)₃-PAH and on (PAH-PSS)₄ after 5 and 10 days

Microscopic observation of HUVECs cultured on (PAH-PSS)₃-PAH and on (PAH-PSS)₄ showed a normal and basic cobblestone morphology after 5 days: they were homogenous, closely opposed, large and polygonal with indistinct cell borders (fig. 4a and e); these cells formed a confluent monolayer after 10 days (fig. 4b and f). Cultured BM-MSCs on both culture surfaces began after 5 days of culture to display a broadened flat morphology and grew close to one another in parallel arrays forming multiple overlapping layers (fig. 4c and g). These cells conserved their fibroblastic phenotype and reached confluence after 10 days (fig. 4d and h).

3.5. WJ-MSCs behavior on (PAH-PSS)₄ and collagen

WJ-MSCs actin filaments observation on collagen (positive control) and (PAH/PSS)₄ did not show any remarkable difference between these two culture surfaces concerning cell adhesion and behavior. Cells proliferate normally on both culture surface (fig. 5a and b) and expanded on all the culture surface area forming a stable confluent cell monolayer after 2 weeks (fig.5c and d).

4. Discussion

Vascular disease is the leading cause of mortality in today's world, requiring surgical interventions including small diameter (inner diameter <6mm) bypass grafting with autologous veins or arteries [24]. However, adequate autologous vessels for bypass conduits are lacking in many patients [25]. Therefore, the need for patient-compatible tissue-engineered vascular grafts is urgent. However the patency rate of small diameter vascular grafts has been weak due to the formation of thrombus [26, 27], leaving significant space for improvement in this field [28]. A promising method to prevent thrombus formation and improve the performance of small-diameter vascular grafts would be the endothelialization of the luminal surface of scaffold materials in order to form a functional and antithrombogenic surface [29]. However, endothelialization has always been limited because of the low availability of autologous cells and because of the weak coating of ECs, leading to their detachment from the surface upon exposure to blood circulation [30].

To address cell immunogenicity and availability, stem cell-based therapies have rapidly emerged as a potential strategy for tissue repair and regeneration. It was reported that vascular cells smooth muscle cells and ECs could be obtained from MSCs [31, 32, 33]. These cells have multipotent differentiation potential and represent an attractive cell source for regenerative medicine [2]. Today, BM-MSCs are still considered as the standard key for clinical use. Nevertheless these cells present several disadvantages. Besides the invasive and painful cell collecting procedure, BM-MSCs are present at very low frequency approximately 0.001–0.01% [5] and their quality decreases with the age of the donor [6]. For these reasons and depending on their differentiation potential, alternative cell sources like WJ-MSCs have gained more and more attention in vascular tissue engineering field during the last decade [34]. A blessing advantage of these birth-associated cells is their easy availability, their simple and non-invasive isolation procedure and finally the absence of ethical problems. These cells are described as more primitive than the other tissue sources [35, 36] and as one of the leading cell sources used in tissue engineering because they meet all the primary criteria used for this aim: they are multipotent, inexpensive, immunocompatible, politically acceptable and expandable *in vitro* for several passages [9].

To address cell adhesion, our group demonstrated the possibility to use polyelectrolyte multilayer films (PEMs) made of poly(allylamine hydrochloride) (PAH) as polycation and poly(styrene sulfonate) (PSS) as polyanion, with a PAH ending layer, as antithrombogenic coating in vascular engineering field [10]. The use of collagen in surface modification may present some disadvantages, including poor optical characteristics for microscopy,

heterogeneity within the extracted collagen, fragility, poor mechanical strength, and ineffectiveness in the management of infected sites [37, 38]. In our study and based on previous published results, WJ-MSCs were cultivated in a first time on (PAH-PSS)₃-PAH PEMs film. It has been shown that this film is widely used for the modification of surfaces such as glass, plastic, decellularized arteries and PTFE, in order to make them bioactive and adhesive for various cell types such as endothelial cells, fibroblasts, osteoblastic cells, hepatocytes, EPCs and BM-MSCs. Our group previously demonstrated that this film improves initial endothelial-cell adhesion and viability [13] and is able to promote *in vitro* the endothelial differentiation of endothelial human and rabbit progenitor cells (EPCs) [16, 17] and more recently of BM-MSCs [18].

Despite their outstanding effect on mature and stem cells, PEMs ending with PAH showed a poor outcome on Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) culture, suggesting that these cells exhibit *in vitro* a special and different behavior than other cells. These cells obtained from umbilical cord presented MSC's phenotype characteristics, as they were positive for CD73, CD90 and CD105 and negative for hematopoietic markers CD34, CD45 and yet they seemed to have a particular behavior compared to BM-MSCs. WJ-MSCs on (PAH-PSS)₃-PAH developed nodule-like shapes after 10 days of culture whereas on (PAH-PSS)₄ as on collagen and uncoated glass, these cells grown normally and reached confluence after 10 days.

Nodule-like or three dimensioned shapes formation *in vitro* is not a new phenomena, it has always been the goal of many studies in bone or cartilage tissue engineering. Growing cells as three dimensioned architectures has been described in many research fields, many teams aimed to achieve this type of nodules from different cells. Human dermal fibroblasts were at the origin of these nodules as described in the work of Shin et al. [39]. Others like Yoon et al., Cheng et al. and other colleagues stimulated human adipose-derived stem cells to form these spheres [40, 41, 42]. Nowadays, natural cell spheres formation has never been examined without any stimulation factors, the present study is the first to examine natural WJ-MSC's nodule-like shapes formation with a simple modification of culture surface.

Nodule-like shapes formation is more adapted for bone and cartilage field but it presents a limiting factor in vascular tissue engineering. Reversing the charge of the outer layer from a positively charged layer ending with PAH to a negatively charged surface ending with PSS improved WJ-MSC's behavior as they appeared to have normal behavior and similar to BM-MSCs and HUVECs when grown at the same time and under the same conditions. No nodule-like shapes were visible. PEMs seemed to influence the cellular behavior of WJ-MSCs. It has been shown that the outer polyelectrolyte layer constitutes the determinant factor for the properties of the film and seems to define the properties of the whole architecture [43]. Thus, WJ-MSC's specific behavior would not be caused by the intrinsic properties of the PEMs but by the surface chemistry they may present.

5. Conclusion

In conclusion, we showed that HUVECs and BM-MSCs on PEMs ending with a positive layer (PAH) presented a good behavior as described in previous studies. However, WJ-MSCs cultured on (PAH-PSS)₃-PAH twisted in three dimensional shapes after 10 days of culture. Unexpectedly, PEMs ending with a negatively charged layer (PSS) induced a conventional WJ-MSC's culture, like HUVECs and BM-MSCs, into a two dimensional cell layer. Depending on the type of cells, this study shows for the first time that a positive charge ending architecture seems to be more adapted for 3D culture cells such as osteoblasts and chondrocytes whereas a negative charge ending architecture is more appropriate for monolayered growth cells such as endothelial cells. These preliminary results lead us to check in the future whether the special cell behavior is actually caused by the surface charge of PEMs. This would be simply done by replacing PAH by another positively charged compound such as chitosan. In addition, analyzing these nodule-like shapes for bone or cartilage protein or gene expression would be considered in the future. Regarding our observations, we would say that the culture surface seems to have a determining role in WJ-MSC's "spatial" behavior, which could be considered in the field of tissue engineering.

References

- [1] S. Levenberg, J. Rouwkema, M. Macdonald, E.S. Garfein, D.S. Kohane and D.C. Darland, Engineering vascularized skeletal muscle tissue, *Nat. Biotechnol.* **23** (2005), 879-884.
- [2] A. Rodriguez-Morata, I. Garzon, M. Alaminos, N. Garcia-Honduvilla, M.C. Sanchez-Quevedo and J. Bujan, Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells, *Ann. Vasc. Surg.* **22** (2008), 440-448.
- [3] A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhjan and K.S. Lalykina, The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells, *Cell Tissue Kinet.* **3** (1970), 393-403.
- [4] S. Bajada, I. Mazakova, J.B. Richardson and N. Ashammakhi, Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2** (2008), 169-183.
- [5] H. Castro-Malaspina, R.E. Gay, G. Resnick, N. Kapoor, P. Meyers and D. Chiarieri, Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny, *Blood* **56** (1980), 289-301.
- [6] K. Stenderup, J. Justesen, C. Clausen and M. Kassem, Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells, *Bone* **33** (2003), 919-926.
- [7] K.D. McElreavey, A.I. Irvine, K.T. Ennis and W.H. McLean, Isolation, culture and characterization of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord, *Biochem. Soc. Trans.* **19** (1991), 29S.
- [8] M.L. Weiss, S. Medicetty, A.R. Bledsoe, R.S. Rachakatla, M. Choi and S. Merchav, Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease, *Stem Cells* **24** (2006), 781-792.

- [9] S. Karahuseyinoglu, O. Cinar, E. Kilic, F. Kara, G.G. Akay and D.O. Demiralp, Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys, *Stem Cells* **25** (2007), 319-331.
- [10] H. Kerdjoudj, N. Berthelemy, F. Boulmedais, J.F. Stoltz, P. Menu and J.C. Voegel, Multilayered polyelectrolyte films: a tool for arteries and vessel repair, *Soft Matter* **6** (2010), 3722-3734.
- [11] G. Decher, Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites, *Science* **277** (1997), 1232-1237.
- [12] G. Ladam, C. Gergely, B. Senger, G. Decher, J.C. Voegel and P. Schaaf, Protein interactions with polyelectrolyte multilayers: interactions between human serum albumin and polystyrene sulfonate/polyallylamine multilayers, *Biomacromolecules* **1** (2000), 674-687.
- [13] C. Boura, P. Menu, E. Payan, C. Picart, J.C. Voegel and S. Muller, Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification, *Biomaterials* **24** (2003), 3521-3530.
- [14] C. Boura, S. Muller, D. Vautier, D. Dumas, P. Schaaf, J.C. Voegel, J.F. Stoltz and P. Menu, Endothelial cell--interactions with polyelectrolyte multilayer films, *Biomaterials* **26** (2005), 4568-4575.
- [15] V. Moby, C. Boura, H. Kerdjoudj, J.C. Voegel, L. Marchal, D. Dumas, P. Schaaf, J.F. Stoltz and P. Menu, Poly(styrenesulfonate)/poly(allylamine) multilayers: a route to favor endothelial cell growth on expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular grafts, *Biomacromolecules* **8** (2007), 2156-2160.
- [16] N. Salmon, E. Paternotte, V. Decot, J.F. Stoltz, P. Menu and P. Labrude, Polyelectrolyte multilayer films promote human cord blood stem cells differentiation into mature endothelial cells exhibiting a stable phenotype, *Biomed. Mater. Eng.* **19** (2009), 349-354.
- [17] N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, P. Schaaf, C. Prin-Mathieu, P. Lacolley, J.F. Stoltz, J.C. Voegel and P. Menu, O₂ level controls hematopoietic circulating progenitor cells differentiation into endothelial or smooth muscle cells, *PLoS ONE* **4** (2009), e5514.
- [18] V. Moby, P. Labrude, A. Kadi, L. Bordenave, J.F. Stoltz and P. Menu, Polyelectrolyte multilayer film and human mesenchymal stem cells: an attractive alternative in vascular engineering applications, *J. Biomed. Mater. Res. A* **96** (2011), 313-319.
- [19] C. Brunot, B. Grosgeat, C. Picart, C. Lagneau, N. Jaffrezic-Renault and L. Ponsonnet, Response of fibroblast activity and polyelectrolyte multilayer films coating titanium, *Dent. Mater.* **24** (2008), 1025-1035.
- [20] L. Mhamdi, C. Picart, C. Lagneau, A. Othmane, B. Grosgeat, N. Jaffrezic-Renault and L. Ponsonnet, Study of the polyelectrolyte multilayer thin film's properties and correlation with the behavior of the human gingival fibroblasts, *Mat. Sci. Eng. C* **26** (2006), 273-281.
- [21] P. Tryoen-Tóth, D. Vautier, Y. Haikel, J.C. Voegel, P. Schaaf and J. Chluba, Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films, *J. Biomed. Mater. Res.* **60** (2002), 657-667.

- [22] C. R. Wittmer, J. A. Phelps, C. M. Lepus, W. M. Saltzman, M. J. Harding and P. R. Van Tassel, Multilayer Nanofilms as Substrates for Hepatocellular Applications, *Biomaterials* **29** (2008), 4082-4090.
- [23] E.A. Jaffe, R.L. Nachman, C.G. Becker and C.R. Minick, Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria, *J. Clin. Invest.* **52** (1973), 2745-2756.
- [24] G. Soldani, P. Losi, M. Bernabei, S. Burchielli, D. Chiappino and S. Kull, Long term performance of small-diameter vascular grafts made of a poly(ether)urethane-polydimethylsiloxane semi-interpenetrating polymeric network, *Biomaterials* **31** (2010), 2592-2605.
- [25] R.M. Nerem and D. Seliktar, Vascular tissue engineering, *Ann. Rev. Biomed. Eng.* **3** (2001), 225-243.
- [26] F.B. Pomposelli, S. Arora, G.W. Gibbons, R. Frykberg, P. Smakowski and D.R. Campbell, Lower extremity arterial reconstruction in the very elderly: successful outcome preserves not only the limb but also residential status and ambulatory function, *J. Vasc. Surg.* **28** (1998), 215-225.
- [27] W.C. Tarry, D.B. Walsh, N.J. Birkmeyer, M.F. Fillinger, R.M. Zwolak and J.L. Cronenwett, Fate of the contralateral leg after infrainguinal bypass, *J. Vasc. Surg.* **27** (1998), 1039-1047.
- [28] J.M. Heyligers, H.J. Verhagen, J.I. Rotmans, C. Weeterings, P.G. de Groot and F.L. Moll, Heparin immobilization reduces thrombogenicity of small-caliber expanded polytetrafluoroethylene grafts, *J. Vasc. Surg.* **43** (2006), 587-591.
- [29] H. Shin, S. Jo and A.G. Mikos, Biomimetic materials for tissue engineering, *Biomaterials* **24** (2003), 4353-4364.
- [30] J.E. Rosenman, R.F. Kempczinski, W.H. Pearce and E.B. Silberstein, Kinetics of endothelial cell seeding, *J. Vasc. Surg.* **2** (1985), 778-784.
- [31] Z. Gong and L.E. Niklason, Use of human mesenchymal stem cells as alternative source of smooth muscle cells in vessel engineering, *Methods Mol. Biol.* **698** (2011), 279-294.
- [32] S.M. Goerke, J. Plaha, S. Hager, S. Strassburg, N. Torio-Padron and G.B. Stark, Human endothelial progenitor cells induce extracellular signal-Regulated kinase-dependent differentiation of mesenchymal stem cells into smooth muscle cells upon cocultivation, *Tissue Eng. Part A*. (2012).
- [33] O. Vittorio, E. Jacchetti, S. Pacini, M. Cecchini, Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells: when traditional biology meets mechanotransduction, *Integr. Biol.* (2012).
- [34] M.Y. Chen, P.C. Lie, Z.L. Li and X. Wei, Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Exp. Hematol.* **37** (2009), 629-640.
- [35] D.L. Troyer and M. L. Weiss, Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population, *Stem Cells* **26** (2008), 591-599.

- [36] C.Y. Fong, L.L. Chak, A. Biswas, J.H. Tan, K. Gauthaman and W.K. Chan, Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells, *Stem Cell Rev.* **7** (2011), 1-16.
- [37] J.T. Elliott, J.T. Woodward, K.J. Langenbach, A. Tona, P.L. Jones and A.L. Plant, Vascular smooth muscle cell response on thin films of collagen, *Matrix Biology* **24** (2005), 489-502.
- [38] W. Friess, Collagen-biomaterial for drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45** (1998), 113-136.
- [39] J.Y. Shin, J. Park, H.K. Jang, T. J. Lee, W.G. La and S.H. Bhang, Efficient formation of cell spheroids using polymer nanofibers. *Biotechnol. Lett.* **34** (2012), 795-803.
- [40] H.H. Yoon, S.H. Bhang, J.Y. Shin, J. Shin and B. S. Kim, Enhanced cartilage formation via three-dimensional cell engineering of human adipose-derived stem cells, *Tissue Eng Part A.* **18** (2012), 1949-1956.
- [41] N.C. Cheng, S. Wang and T. H. Young, The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities, *Biomaterials* **33** (2012), 1748-1758.
- [42] Z. An, K. Kavanoor, M. L. Choy and L. J. Kaufman, Polyelectrolyte microcapsule interactions with cells in two- and three-dimensional culture, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **70** (2009), 114-123.
- [43] P. Tryoen-Tóth, D. Vautier, Y. Haikel, J.C. Voegel, P. Schaaf and J. Chluba, Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films, *J. Biomed. Mater. Res.* **60** (2002), 657-667.

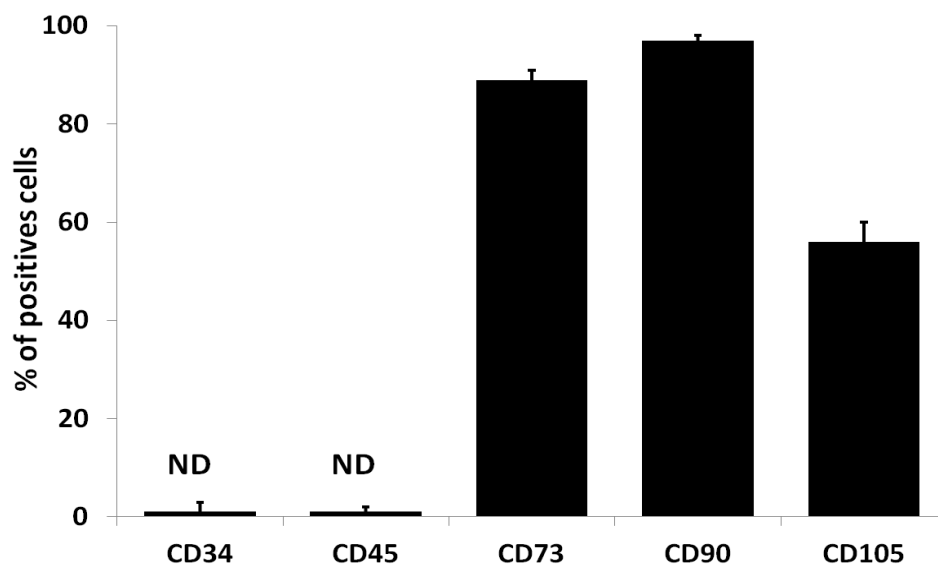


Fig.1

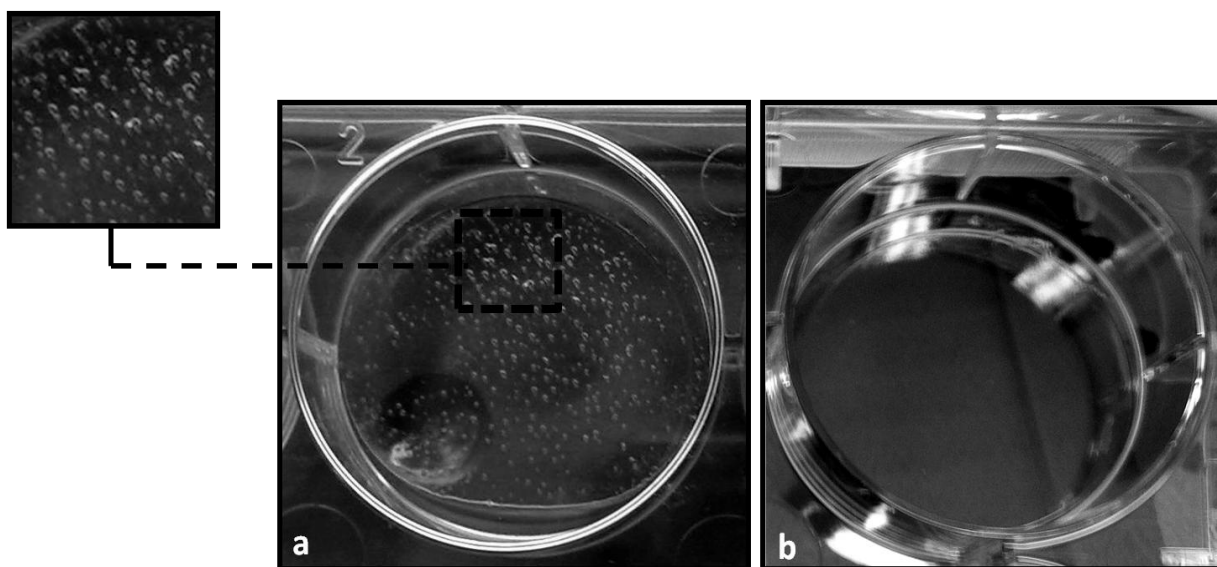


Fig.2

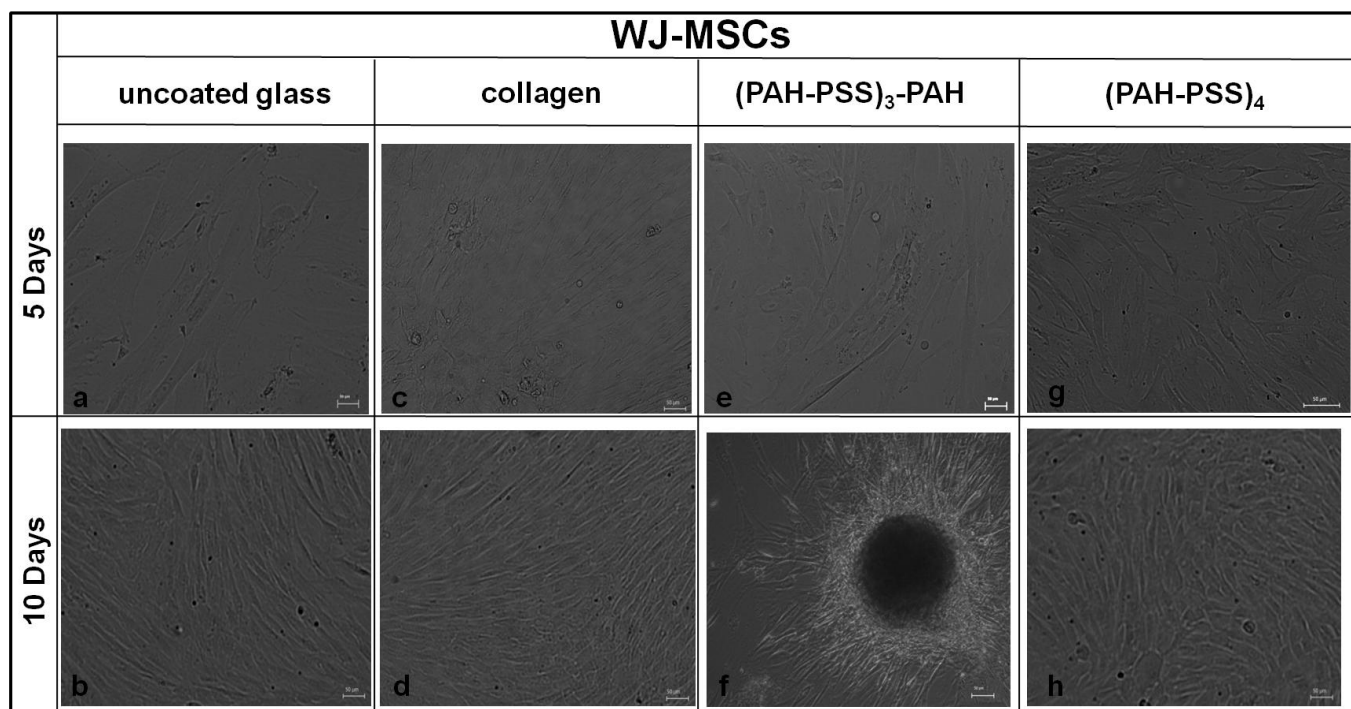


Fig.3

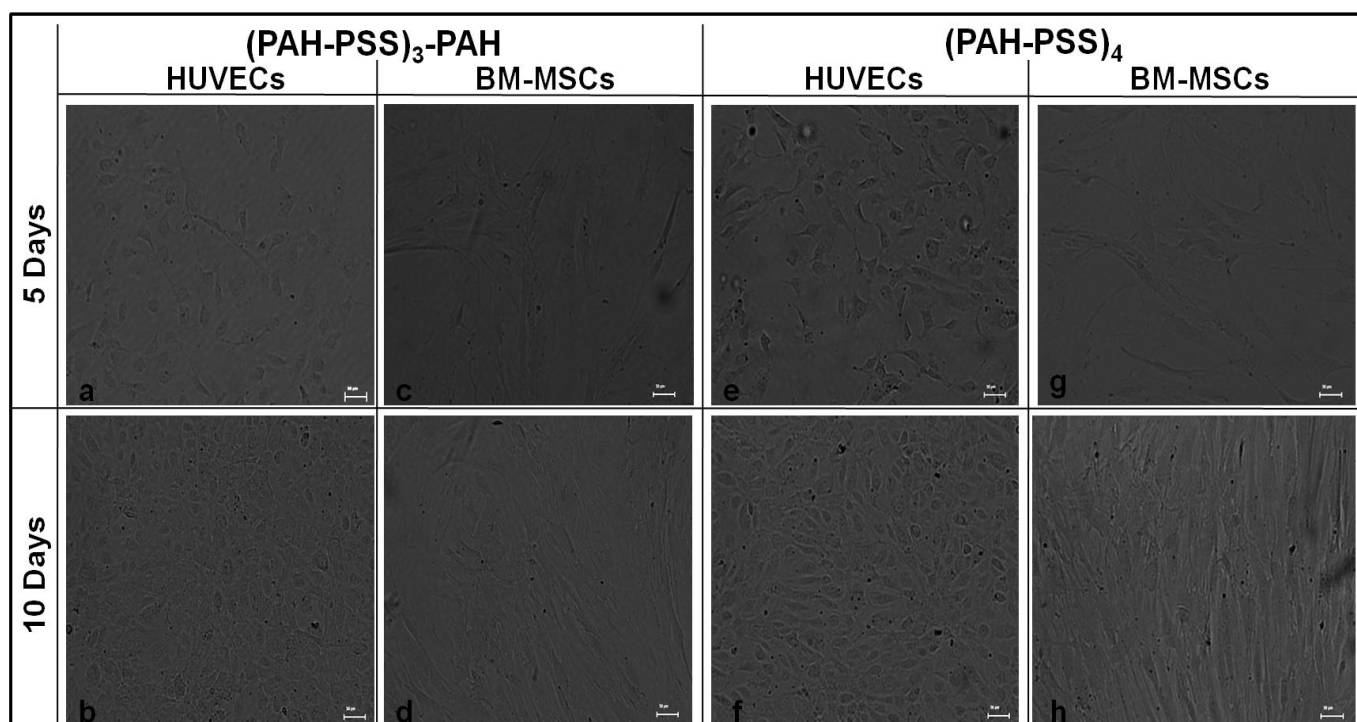


Fig.4

Proliferating WJ-MSCs

Collagen

(PAH/PSS)4

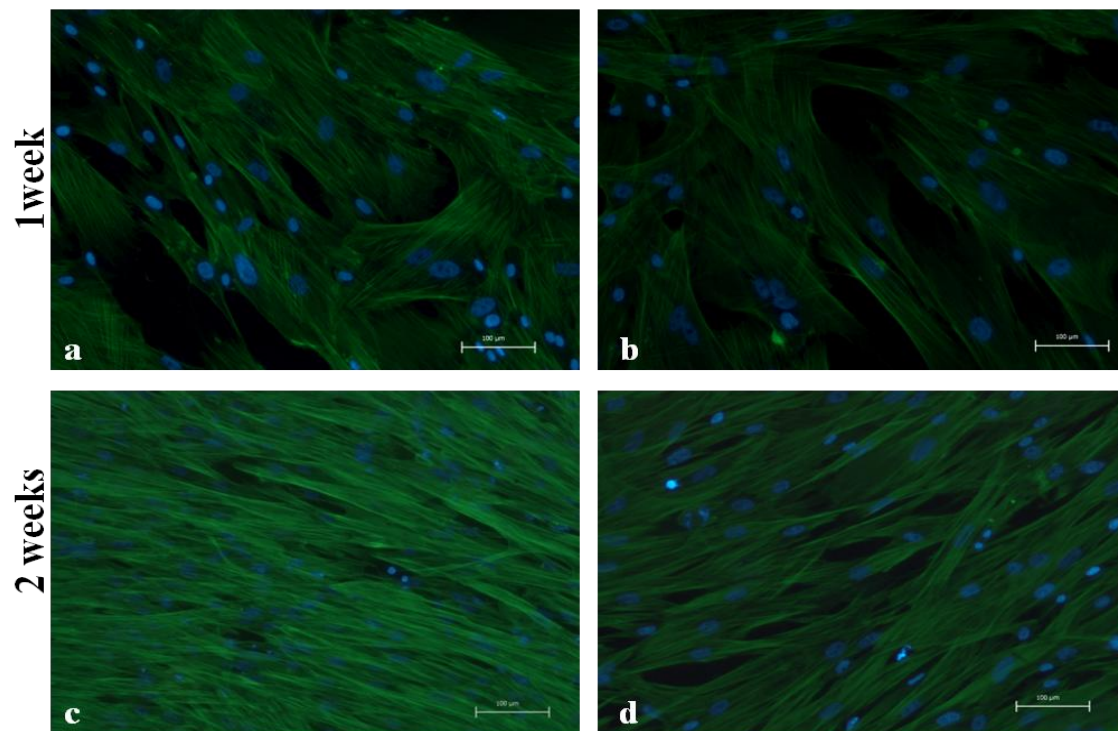


Fig.5

Fig.1 Phenotypic characterization of Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) at passage 3 performed by flow cytometry. The analysis of phenotypic markers shows the percentages of positive cells for hematopoietic stem cells (CD34 and CD45) and MSCs (CD73, CD90 and CD105). Results are expressed as mean $\pm$ SD, n=3.

Fig.2 Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) behavior after 10 days of culture on: (a) (PAH-PSS)₃-PAH and (b) (PAH-PSS)₄ polyelectrolyte multilayers films. Representative picture, taken after medium change, showing the formation of nodule-like shapes in WJ-MSCs cultured for 10 days on (PAH-PSS)₃-PAH structure. Square surrounded by a dashed black line representing a magnification of the nodule-like structures.

Fig.3 Morphology and behavior of Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs). Representative pictures showing the morphology of proliferating WJ-MSCs after 5 (a, c, e and g) and 10 (b, d, f and h) days of culture on: (a-b) uncoated glass, (c-d) collagen coated glass, (e-f) (PAH-PSS)₃-PAH and (g-h) (PAH-PSS)₄ (Leica light microscopy, x10 magnification, scale bar = 50 μ m).

Fig.4 Morphology and behavior of Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs). Representative pictures showing the morphology of proliferating HUVECs on (PAH-PSS)₃-PAH (a-b), on (PAH-PSS)₄ (e-f) and of proliferating BM-MSCs on (PAH-PSS)₃-PAH (c-d) and on (PAH-PSS)₄ (g-h) after 5 and 10 days of culture (Leica light microscopy, x10 magnification, scale bar = 50 μ m).

Fig.5 Behavior analysis of Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) cultivated in proliferation medium (complete alpha MEM) by fluorescent probe staining. Representative pictures showing WJ-MSCs (a-d) actin filaments (green by phalloidin) and nucleus (blue by DAPI) staining after one and two weeks of culture on collagen and (PAH/PSS)₄ surface (Leica fluorescent microscopy, x10 magnification, scale bar= 100 μ m).

3. Conclusion

Dans ce travail, nous avons montré que les HUVECs et les CSM-MOs cultivées sur films multicouches terminant par une charge positive (PAH) présentent un comportement similaire aux études précédentes (167, 192). Cependant, sur un tel support, alors que les CSM-MOs prolifèrent normalement, les CSM-GWs s'organisent en structure tridimensionnelle après 10 jours de culture, ce qui est inadapté à notre problématique. De manière inattendue, les films multicouches finissant par une couche de charge négative (PSS) favorisent une croissance normale et "conventionnelle" des CSM-GWs, qui forment alors un tapis cellulaire en deux dimensions. La polarité des films multicouches de polyélectrolytes semble donc influencer le comportement des CSM-GWs. La dernière couche de polyélectrolytes constitue un facteur déterminant pour les propriétés du film et car elle définirait la polarité de l'ensemble de l'architecture (191). Ceci suggère que la prolifération des CSMs de la GW semble être influencée par la charge globale du film.

La formation de structure similaire à des nodules est davantage adaptée pour le domaine osseux et cartilagineux mais s'avère un facteur limitant dans l'ingénierie vasculaire. Ainsi, selon l'origine des cellules, notre étude montre pour la première fois, qu'une surface de culture de charge positive semble être plus propice à la culture en trois dimensions telle les ostéoblastes et les chondrocytes, alors que pour les mêmes cellules, une charge finale négative est plus appropriée à la croissance cellulaire en monocouche telles que les cellules endothéliales.

Ces résultats préliminaires nous conduisent à considérer, à l'avenir, le comportement spécifique des cellules vis à vis de la charge de surface des films multicouches. Il faudrait en tenir compte si l'on souhaite remplacer, dans des études futures, le PAH par un autre polycation. Dans un autre domaine, l'analyse de ces structures nodulaires par l'expression génique ou protéique des os ou du cartilage pourrait être envisagée si l'on souhaite développer des structures ostéo-chondrocytaires.

Nos observations ont montré que la surface de culture joue un rôle déterminant dans le comportement « spatial » des CSM-GWs. Pour la suite des expérimentations, (PAH-PSS)₃-PAH a été remplacé par (PAH-PSS)₄ comme surface de culture et de différenciation de nos CSMs. L'influence du nombre de couches de PEMs sur le comportement cellulaire sera discutée par la suite.

II. Influence du pourcentage de sérum sur la culture et le comportement des cellules souches mésenchymateuses

1. Introduction

Après avoir déterminé l'architecture finale de la surface de culture, les CSM-GWs ont été amplifiées sur plastique jusqu'au 3^{ème} passage, puis stimulées au 4^{ème} passage, sur films (PAH-PSS)₄. Différentes équipes ont tenté de générer des cellules endothéliales à partir de cellules embryonnaires, progénitrices et CSMs (171, 194, 195), en s'appuyant sur l'importance du rôle joué, pour favoriser cette différenciation, par la surface de culture, la densité d'ensemencement, le pourcentage de sérum de veau fœtal (SVF) et les facteurs de croissance.

Dans notre protocole de différenciation, issu des protocoles généralement utilisés dans la littérature et préconisés par les recommandations commerciales, les cellules ont étéensemencées sur (PAH-PSS)₄ à 3000 cellules/cm² et stimulées dans un milieu de différenciation commercial (EGM-2[®]) enrichie avec un cocktail de facteurs de croissance angiogéniques et supplémenté par 2% de SVF.

Après dix jours de stimulation dans le milieu de différenciation, les CSM-GWs ont formé de nouveau des sphéroïdes tridimensionnels avec un agrégat cellulaire. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer l'orientation tridimensionnelle des cellules. A la lumière de certains résultats issus de la littérature sur d'autres types cellulaires (194), nous avons mis en cause la concentration en SVF et nous avons réduit le pourcentage de sérum de 2% jusqu'à 0,5% et comparé le comportement des cellules cultivées sur les films (PAH-PSS)₄ avec celles cultivées, dans les mêmes conditions, simplement sur des lames de verre. Le comportement des CSM-GWs a été évalué, après 10 jours de culture dans le milieu EGM-2[®] supplémenté de 2% ou 0,5% SVF, par microscopie optique et à fluorescence après marquage du noyau par DAPI.

2. Résultats

Après 10 jours de culture dans le milieu de différenciation EGM-2[®] supplémenté de 2% SVF, les CSM-GWs cultivées sur films ont formé des structures en trois dimensions, peu favorables à la formation d'une monocouche cellulaire (fig. 10c et 11c).

Au contraire, les cellules cultivées sur les lames de verre n'étaient pas influencées par le pourcentage de sérum (0,5 et 2%) et ont formé une monocouche de cellules en deux dimensions (fig. 10a-b et 11a-b). Par contre, sur les films, la réduction du pourcentage du SVF de 2% à 0,5% permet d'obtenir une monocouche cellulaire, à l'instar du contrôle, et donc d'améliorer le comportement des CSM-GWs sur (PAH-PSS)₄ (fig. 10d et 11d).

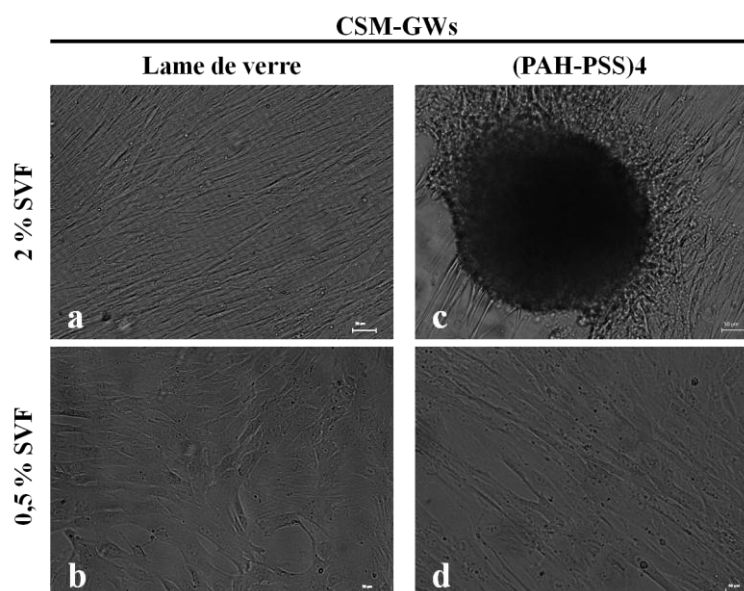


Figure 10 : Effet du pourcentage de SVF sur le comportement des CSM-GWs cultivées dans le milieu (EGM-2[®]) sur verre (a-b) et (PAH-PSS)₄ (c-d). Observations optiques montrant la formation d'une monocouche cellulaire régulière par les CSM-GWs cultivées sur verre quelque soit le pourcentage de SVF (a-b). Formation de structures 3D par les CSM-GWs cultivées sur (PAH-PSS)₄ en présence de 2% de SVF (c) et de structure 2D en une monocouche cellulaire après réduction du pourcentage de SVF à 0,5% (d). (Leica light microscopy, grossissement $\times 20$, échelle 50 μm).

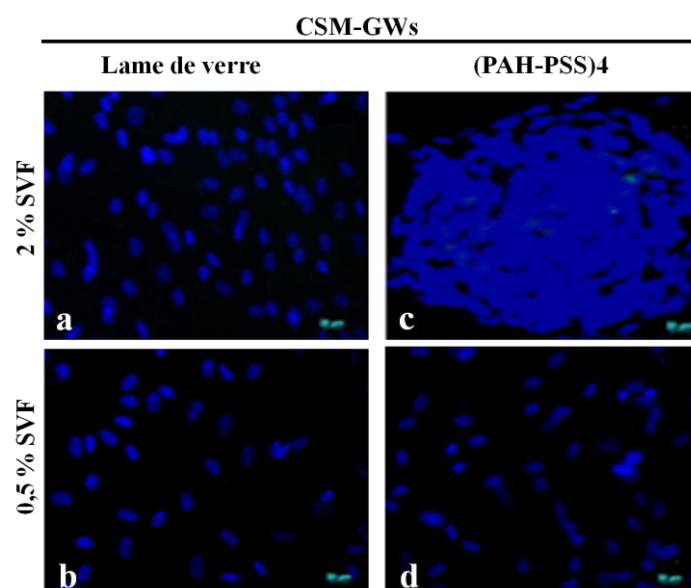


Figure 11 : Effet du pourcentage de SVF sur le comportement des CSM-GWs cultivées dans le milieu (EGM-2[®]) sur verre (a-b) et (PAH-PSS)₄ (c-d). Le marquage des noyaux des CSM-GWs montrent une distribution régulière sur verre quelque soit le pourcentage de SVF (a-b). Il est observé une condensation des noyaux en structures 3D sur (PAH-PSS)₄ en présence de 2% de SVF (c) et en structures en 2D après réduction du pourcentage de SVF à 0,5% (d). (Zeiss fluorescent microscopy, grossissement $\times 20$, échelle 50 μm).

3. Discussion et Conclusion

Dans cette étude, nous avons évalué l'influence du sérum, dans le milieu de différenciation endothéliale, sur le comportement des CSM-GWs. Pour ce faire, les CSM-GWs ont été stimulées avec le milieu de différenciation (EGM-2[®]) supplémenté de 2% SVF, en suivant les recommandations du fournisseur. Après 10 jours de culture, nous avons constaté que les CSM-GWs, sur film (PAH-PSS)₄, tendent à s'organiser selon une architecture tridimensionnelle, ce qui est un facteur limitant en bioingénierie vasculaire. Le fait de réduire le pourcentage de SVF de 2% à 0,5% a rétabli la formation d'une monocouche de cellules fibroblastiques permettant de répondre au cahier des charges

Le comportement des CSMs est très dépendant de la nature de la surface et de la composition du milieu de culture (197, 6). Selon la littérature, différents pourcentages de SVF sont utilisés dans les milieux de différenciation endothéliale. Ce taux de SVF varie fortement en fonction des cellules utilisées. Lorsque les cellules sont des CSMs, le pourcentage en SVF

du milieu de différenciation est très faible : 0% - 2% (192), comme dans notre protocole de différenciation. Pour les EPCs, il est de 5% à 20% (198, 199) contre 10% pour les cellules souches embryonnaires (198).

La formation de structures tridimensionnelles par les CSMs a déjà été décrite (199), les auteurs ont souhaité avoir ces structures. Cependant, aucune étude n'a examiné les raisons de la formation spontanée de ces structures, l'expression de gènes de primitivité associée à ces sphéroïdes, ou leur potentiel chondrogénique ou ostéogénique.

Les résultats obtenus dans ce travail montrent que le pourcentage de SVF dans le milieu de culture est un facteur déterminant du comportement des CSM-GWs sur les films (PAH-PSS)₄. Pour la suite des expérimentations, le pourcentage de SVF sera donc de 0,5% dans le but d'éviter la formation des nodules et d'optimiser notre protocole de différenciation.

III. Comparaison de la capacité de différenciation en cellules endothéliales de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse et de la gelée de Wharton

1. Introduction

Après avoir fixé les différents paramètres de notre protocole de différenciation (surface de culture, pourcentage de SVF, densité d'ensemencement), nous avons voulu comparer le potentiel de différenciation en cellules endothéliales (CE) et leur fonctionnalité, de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) issues de la gelée de Wharton (GW) et de la moelle osseuse (MO). Avant de débiter la différenciation, nous avons vérifié le phénotype mésenchymateux des CSM-GWs et MOs afin de s'assurer de la qualité cellulaire. Ces cellules ont été ensemencées au 4^{ème} passage à une densité de 3000 cellules/cm² soit sur des films multicouches de polyélectrolytes (PAH-PSS)₄, soit sur du collagène, surface témoin. Les cellules ont été amplifiées dans un milieu de prolifération (α -MEM, 10% SVF) jusqu'à 60% de confluence. Le milieu de prolifération a ensuite été remplacé par un milieu de différenciation (EGM-2[®], 0,5% SVF) pendant 15 jours.

Le phénotype endothélial a été suivi par microscopie optique pour évaluer tout changement de morphologie et par l'expression des marqueurs endothéliaux spécifiques tels que CD31, VEGF-R2 et VE-cadhérine, par qRT-PCR pour une approche génique, et par Western blot pour une approche protéique. Pour confirmer la différenciation endothéliale, la fonctionnalité de nos cellules a été vérifiée par leur capacité à incorporer les Ac-LDLs, ainsi que générer du NO et à exprimer vWF.

Cette étude est la première, à notre connaissance, à évaluer et comparer l'effet de la combinaison des facteurs de croissance angiogéniques avec des films multicouches de polyélectrolytes sur la différenciation endothéliale des CSM-GWs et -MOs.

2. Article

H. Rammal, C. Harmoush, M. Gentils, F. Boulmedais, P. Schaaf, J. C. Voegel, C. Gaucher, P. Menu and H. Kerdjoudj: “ *Synergetic effect of polyelectrolyte multilayers and angiogenic culture media on endothelial differentiation of Wharton's jelly derived cell towards tissue vascularization* ”. (Article en soumission)

Synergetic effect of polyelectrolyte multilayers and angiogenic culture media on differentiation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells towards endothelial cells

By H. Rammal^{1*}, C. Harmoush^{1*}, M. Gentils¹, F. Boulmedais^{2,3}, P. Schaaf^{2,4,5,6,7}, J. C. Voegel^{4,5}, C. Gaucher⁸, P. Menu^{1□} and H. Kerdjoudj⁹

Author affiliation:

1- UMR 7365, CNRS-Université de Lorraine, Biopôle, Faculté de Médecine, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

2- Institut Charles Sadron, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Unité Propre de Recherche 22, 23 rue du Loess, BP 84047, 67034, Strasbourg Cedex 2, France.

3- University of Strasbourg Institute for Advanced Study (USIAS), 5, allée du Général Rouvillois 67083 Strasbourg, France Strasbourg, France

4- INSERM, UMR-S 1121, "Biomatériaux et Bioingénierie", 11 rue Humann, F-67085 Strasbourg Cedex, France.

5- Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 place de l'Hôpital, 67000, Strasbourg, France.

6- International Center for Frontier Research in Chemistry, 8 allée Gaspard Monge, 67083, Strasbourg, France.

7- Institut Universitaire de France, 103, boulevard Saint-Michel 75005 Paris, France.

8- EA-3452 CITHEFOR, Drug Targets, Formulation And Preclinical Assessment, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine, Nancy, France.

9- EA 4691 Biomateriaux et Inflammation en site osseux, UFR Odontologie, SFR-CAP Santé (FED 4231), 1 avenue du Maréchal Juin, Université de Reims Champagne Ardenne, France.

□ Corresponding Author : patrick.menu@univ-lorraine.fr

(*) Both authors contributed equally to this work

Abstract:

The ease of harvesting mesenchymal stem cells from Wharton's jelly (WJ-MSCs), their great plasticity and low immunogenicity make them interesting candidates for allogeneic cell therapy. Yet, it is generally accepted that MSCs cannot easily differentiated into endothelial cell (ECs) lineage. In this study, we showed that this paradigm can be solved once WJ-MSCs are cultivated on poly (allylamine hydrochloride): (PAH) and poly (styrene sulfonate): (PSS) multilayer film and stimulated with angiogenic growth factors (Endothelium Growth Media: EGM-2[®]). We compared the expression of ECs key markers of cultured WJ-MSCs versus bone marrow (BM)-MSCs considered as the gold standard for cell therapy. Our study shows that human WJ-MSCs cultivated on PAH/PSS films have a much greater angiogenic lineage potential than BM-MSCs. This makes WJ-MSCs attractive candidates for vascularization of engineered tissues and treatment of vascular-related diseases.

Key Words: mesenchymal stem cells; endothelial differentiation; polyelectrolyte multilayers film; tissue engineering

Introduction

Engineering of tissues *in vitro* has traditionally been challenging for scientists. The use of tissular and cellular therapy approaches brings challenge to reality. Yet many fundamental problems (such as healthy cell source, culture media) remain to be solved before this new technology becomes routine. Despite the success of thin tissue engineering approaches (as skin and bladder), unsatisfactory results were obtained for thick tissues. The *in vivo* survival, maintenance and function of the implanted tissues are still a problem due to insufficient nutrient and oxygen supplies and poor angiogenesis ingrowth (1, 2). Encouraging tissue vascularization and vascular repair using pro-angiogenic growth factors (as heparin, vascular endothelial or basic fibroblast growth factor) have been largely described in the literature (3). The rapid degradation and uncontrolled effect of high concentrations of growth factors led to low efficiency and failure of this approach. Therefore, the presence of pre-vascular networks inside the engineered tissue is essential for getting a faster blood supply through the implant. Co-culturing endothelial cells (ECs) with the cell type of interest has been proposed to provide a starting point for vascularization. But, the low number, poor proliferative rate and dedifferentiation capacity of autologous mature ECs or circulating progenitors make them difficult to use in tissue engineering (4, 5).

Current research is therefore directed towards the use of alternative sources of cells (6). An ideal cell source for tissue engineering should satisfy requirements including ease of access, sufficient cell number and immunocompatibility. Stem cells constitute a major cell source that offers significant potential to treat or even to cure a plethora of diseases with the requirement of their differentiation into specific cell lineages. Bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) are the most intensively studied stem cells (7) and represent today a promising option for regenerative cell-based therapies (8). Yet, besides the invasive and

painful harvesting procedure, BM-MSCs are present at very low frequency and their quality varies with the age and health of the donor (9, 10). Moreover, their unsuccessful differentiation into endothelial lineage has been reported (11–14). Since 2003, much effort has been employed to establish protocols for ECs differentiation, and it is now generally accepted that only small fractions of MSCs, whatever their origin, can differentiate, *in vitro*, into endothelial lineage (12, 15–18).

Recently, several groups demonstrated the existence of a MSC-like stem cell population within the perinatal tissues, such as human umbilical cord, as the Wharton's jelly (WJ) (19). WJ-MSCs are easily accessible, do not acquire invasive and expensive harvesting procedures, are free of ethical concerns, do not exhibit immune reaction and tumors formation after transplantation, are expandable *in vitro* for several passages and have a great differentiation capacity. Using specific culture media, as for BM, MSCs derived from WJ were shown to differentiate into mesodermal lineages (adipogenic, osteogenic and chondrogenic), but expressed only limited and early endothelial gene markers as CD31, VE-Cadherin, whereas a number of markers related to relevant ECs phenotype as vWF (17, 20, 21) and VEGF-R2 (17) were not expressed. Thus, to our knowledge, no successful and satisfactory differentiation of mesenchymal stem cells into endothelial lineage was described so far in the literature.

In addition to growth factors, the nature and the design of the substrate is also a pertinent adjustable parameter that can be adapted to guide stem cell differentiation. In particular, in 2006, Discher and co-workers found that bone marrow-MSCs can be differentiated into different stromal lineage depending on mechanical properties of the substrate (22, 23). Related to tissue elasticity, soft matrices are neurogenic, stiffer ones are myogenic whereas rigid matrices are osteogenic. For a decade, our group developed an angiogenic-like substrate using layer-by-layer technique. It comes out that polyelectrolyte multilayer (PEMs) made of

poly(allylamine hydrochloride) (PAH), and poly(styrene sulfonate) (PSS) have (i) improved initial adhesion, spreading retention of mature ECs (24), (ii) boosted the ECs differentiation from circulating EPCs (25, 26) and (iii) promoted *in vivo* ECs recruitment and then vascular graft endothelialization (27).

Here, we investigate the effect of PAH/PSS multilayers on the differentiation of WJ-MSCs. Interestingly, we found that, in synergy with angiogenic growth factors, WJ-MSCs cultivated on PSS/PAH multilayer films are able to generate functional endothelial-*like* cells. Moreover, when comparing to BM-MSCs or to WJ-MSCs cultivated on a conventional type I collagen substrate, we found that WJ-MSCs on PAH/PSS supplemented with angiogenic growth factors provides a unique system that allows to overcome the paradigm that MSCs cannot express late endothelial markers. Our findings suggest the potential use of WJ-MSCs cultivated on PSS/PAH films to generate endothelial-*like* cells.

Materials and methods

1.1. MSCs from human bone marrow and Wharton's Jelly umbilical cord

Mesenchymal stem cells from human bone marrow (samples harvested from total hip or knee replacement surgery according to Friedenstein's procedure (28)) were kindly provided by the cell and tissue therapy department (University Hospital Center, Nancy, France). Fresh human umbilical cords were obtained from the obstetric department of Nancy maternity hospital after birth delivery. A preliminary mother agreement was produced with informed consent guidelines approved by the university hospital center of Nancy. After rinsing in Hank's balanced salt solution, umbilical cord vessels were removed and harvested mesenchymal tissue explants were incubated with type II collagenase (1 mg/mL, Fisher), in serum free DMEM (Gibco) medium overnight at 37°C. Isolated cells were cultured in alpha Minimal Eagle Medium (α -MEM, Lonza) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin 100 IU/mL, glutamine 2 mM and Fungizone[®] 2.5 μ g/mL and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 21% O₂ at 37°C with a medium change every two days until use.

At 3rd passage, both WJ- and BM-MSCs were characterized by flow cytometry (FACSCalibur; BD Bioscience) through the expression of CD73, CD90, CD44, CD105, CD34, CD45 and HLA-DR and used in our experimental procedure at the 4th passage.

1.2. Human umbilical vein endothelial cells

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated from fresh umbilical cords according to the method of Jaffe *et al.*, (29). HUVECs were cultivated at 37°C in 5% CO₂ on 25 cm² tissue-culture-treated flasks in complete medium. The medium consisted of an equal mixture of media M199 and RPMI 1640 (Sigma, France), supplemented with 20% human

serum AB, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 100 IU/mL penicillin and 2.5 µg/mL Fungizone[®]. Medium was replaced every two days. Cells were used as a control at the second passage.

1.3. Polyelectrolyte multilayers films

Anionic poly(styrene sulfonate) (PSS: MW= 70 kDa) and cationic poly(allylamine hydrochloride) (PAH: MW= 70 kDa) (Sigma Aldrich, France) were used to build polyelectrolyte multilayers (PEMs) films from polyelectrolyte solution at 1 mg/mL and dissolved in Tris (10mM) / NaCl (150mM) solution. Each experiment was preceded by a cleaning step of the cover glasses with sodium dodecyl sulfate (100 mM, Sigma) for 15 min at 100°C. After an intensive ultrapure water (Millipore[®]) rinse, cover glasses were brought in contact with hydrochloric acid (10 mM) for 15 min at 100°C and finally rinsed with ultrapure water. Cover glasses were then incubated with PAH solution for 5 min. After an intensive Tris/NaCl solution rinse, PSS was adsorbed for 5 min. Thus, eight alternate depositions of polycationic PAH and polyanionic PSS layers were deposited and (PAH-PSS)₄ films were then built up according described procedure (30). Type I rat tail collagen (100 µg/mL, BD Bioscience) was used as positive control.

1.4. Induction of the stem cells endothelial phenotype

WJ- and BM-MSCs were seeded at 3000 cells/cm² on (PAH/PSS)₄ or on type I collagen coated glass in α-MEM medium for two days then in endothelial growth medium-2 (EGM-2, Lonza[®]) supplemented with 0.5% FBS for two weeks. As a negative control, cells were cultured on both culture surfaces in endothelial basal medium (EBM-2, Lonza[®]) supplemented with 0.5% FBS but without angiogenic cocktail growth factors. Unstimulated

and stimulated cells on both surfaces (collagen and PAH/PSS) were observed daily by optical microscopy (Leica microscopy) in order to evaluate their morphology.

1.5. Induced endothelial-like cells phenotype

1.5.1. Real-time quantitative polymerase chain reaction

The endothelial gene markers expression of cultured stem cells was evaluated by Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Total RNA from stimulated and unstimulated WJ- and BM-MSCs cultured on both culture surfaces was isolated using the RNeasey Kit (Qiagen®). The first strand cDNA synthesis reaction was performed using 350 ng total RNA with iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad®). qPCR was carried out using iQ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad®) and home designed primers for human CD31, VE-cadherin, VEGF-R2 and the ribosomal protein S29 (Eurogentec) with the use of MyCycler™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad®). Cycling parameters were 3 min at 95°C; 40 cycles of three minutes at 60°C for CD31, VEGF-R2 and RP29 and 62°C for VE-cadherin and one minute at 72°C. Gene expression was determined in duplicate in three separate experiments and normalized using the housekeeping gene ribosomal protein S29 then compared against HUVEC's gene expression that served as positive control; a non-template blank served as a negative control. Analyses and fold differences were determined using the comparative C_T method. Fold change was calculated from the $\Delta\Delta C_T$ values with the formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ and data are relative to control values.

1.5.2. Western Blot

Total protein from cultured HUVECs, WJ- and BM-MSCS was prepared as previously described (31). Proteins from each sample (25 µg) were boiled at 95°C for five minutes in

Laemmli sample buffer (BioRad®) and fractionated using 10% (for VEGF-R2) and 7% (for CD31 and VE-cadherin) acrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were incubated in blocking agent consisting of 5% BSA in Tris-buffered saline/Tween (TBST, pH: 7.4) for CD31 and VE-cadherin or 5% skim milk powder/TBST for VEGF-R2 for 1h at room temperature. Primary antibodies to GAPDH (1/1000 BSA/TBST, Santa Cruz), VEGF-R2 (1/1000 milk/TBST, Cell Signaling Technology), VE-cadherin (1/1000 BSA/TBST, Abcam) and CD31 (1/1000 BSA/TBST, Dako) were incubated overnight at 4°C. After extensive washing, the membranes were incubated for one hour at room temperature with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP) goat anti-mouse for CD31 and goat anti-rabbit for VEGF-R2 and VE-cadherin. HRP was detected by enhanced chemiluminescence (ECL, Santa Cruz).

1.6. Induced endothelial-like cells functionality

1.6.1. Nitric oxide (NO) release

Nitrite concentration was determined using Griess method as previously described (32). Briefly, WJ- and BM-MSCs culture supernatants were diluted with acetoacetic buffer (pH 2.5; 1.75 M) in order to obtain a final volume of 1 mL. Calibration curves were performed in the range 10^{-6} - 10^{-5} M, using sodium nitrite (NaNO_2) as a standard. A volume of 200 μL sulfanilamide solution (0.6 % (w/v) prepared in 0.4 M HCl) was added to the previously diluted supernatant. After three minutes of incubation in the dark at room temperature, 50 μL of *N*-1-(naphthyl)ethylene diamine solution (0.6 % (w/v) prepared in 0.4 M HCl) were added. Absorbance at 540 nm was determined after five minutes of incubation and the results were expressed as micromoles of nitrites produced per grams of total protein amount.

1.6.2. Acetylated Low density lipoprotein (Ac-LDL) Uptake assay

The specificity of the Ac-LDL uptake by endothelial like differentiated cells was qualitatively observed using 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate labeled Ac-LDL (Dil-Ac-LDL, 0.8 $\mu\text{g/mL}$ for four hours). Cells were then washed with RPMI 1640 and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Nuclei counter staining was performed using 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI for 1 min). The cells were visualized using fluorescence microscopy (Leica[®], $\times 40$) after using the appropriate excitation and emission filters for Rhodamin B (554nm_{Ex}/571nm_{Em}).

1.6.3. Immunofluorescence staining of intracellular von Willebrand (vWF) marker

Differentiated cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with PBS/Triton $\times$ -100 (0.1%) for 15 min and blocked with PBS/BSA (1%). Cells were then incubated for 45 min at 37°C with the primary monoclonal antibody anti vWF (1/100 PBS/BSA, Dako). After two washes with PBS, the appropriate secondary antibody labeled with Alexa-Fluor-488 (diluted at 1/100) was incubated for 30 min at 37°C. The cells were finally observed by fluorescence microscopy (Zeiss microscopy, $\times 63$ magnification) using the (485nm_{Ex}/538nm_{Em}) spectral line.

1.7. Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ SEM for each condition. Each experiment was repeated independently three times (n=3). Pairwise comparisons were performed using one-factor ANOVA with Fisher correction (Statview IVs, Abacus Concepts Inc., Berkley, CA). Differences were considered significant for p (rejection level of the null-hypothesis of equal means) values < 0.05 .

Results and discussion

In this study, we aimed to compare the potential of Wharton's jelly derived stem cells (WJ-MSCs) and bone marrow (BM-MSCs) to differentiate into endothelial lineage. Phenotypic analysis showed that WJ-MSCs, generated by our procedure, strongly expressed MSCs markers (CD73, CD44, CD90, CD105), but did not express HLA-DR nor hematopoietic markers (CD34, CD45) (Supplementary data). These characteristics were similar to those of BM-MSCs as described by previous studies (33) and consistent with the definition proposed by the International Society for Cell Therapy (ISCT) (34).

Morphological analysis of stimulated WJ-MSCs and BM-MSCs cultivated on PEM and collagen substrates

We have recently shown that WJ-MSCs behavior depends on the charge of the terminal layer (30). Indeed, we observed nodule-like structures on PAH ending layer, whereas WJ-MSCs cultured on four bilayered PAH/PSS and ending with PSS showed a cell layer growth similar to what is observed on a collagen covered substrate (30). So, in this study, we chose (PAH-PSS)₄ architecture as cell substrate and investigated the synergic effect of this substrate along with angiogenic growth medium. Identifying stem cells differentiation into endothelial cells (ECs) lineage was first highlighted through morphological changes. Indeed, MSCs exhibited a fibroblastic morphology whereas ECs had a cobblestone-like structure (29). Optical microscopic observations showed that specific growth factors (EGM-2[®]) stimulation enhanced cell confluence on (PAH-PSS)₄ and type I collagen substrates. However, EGM-2[®] stimulated WJ-MSCs seemed to have a greater cell growth rate compared to BM-MSCs (Fig. 1). We also noticed a slight evolution of stimulated WJ-MSCs morphology from fibroblastic to a polygonal-like appearance while in the absence of EGM-2[®] WJ and BM-MSCs preserved a fibroblastic appearance on both of (PAH-PSS)₄ and type I collagen substrates (**Fig. 1**). Concerning BM-MSCs, there was no difference in cell shape between unstimulated and

EGM-2[®] stimulated cells (**Fig. 1e-1h**). The increased WJ-MSCs growth rate compared to BM-MSCs, confirmed through Crystal Violet staining (supplementary data), matched with previous report (35). Furthermore, it was reported that angiogenic stimulation of BM-MSCs does not induce specific morphological changes (36, 37). Our next coming step was to check whether morphological switch is accompanied by the expression of ECs markers. Most relevant CD31, VEGF-R2 (known as the earliest (38)) and VE-cadherin (described as a late endothelial marker (39)) markers were investigated at mRNA level then at protein level. Indeed, all of these proteins play an important role in the endothelium maturation during angiogenesis process.

Phenotypic and proteomic analysis of stimulated BM-MSCs and WJ-MSCs cultivated on PEM and collagen substrates

RT-qPCR analyses showed a better endothelial differentiation for WJ-MSCs compared to BM-MSCs whatever the used substrate (**Fig. 2**). Combining angiogenic growth factors to (PAH-PSS)₄ substrate, compared to type I collagen, enhanced strongly and significantly WJ-MSCs expression of early (CD31 and VEGF-R2) and late (VE-cadherin) mRNA. In addition, the values obtained for WJ-MSCs were close to those obtained for HUVECs (**Fig. 2**). EGM-2[®] stimulation increased significantly VEGF-R2 mRNA in BM-MSCs cultivated on (PAH-PSS)₄ substrate compared to type I collagen (**Fig. 2A**). In contrast to type I collagen, (PAH-PSS)₄ substrate had a slight influence on CD31 mRNA in BM-MSCs (**Fig. 2B**). Finally, whatever the substrate, no expression of VE-cadherin was detected in EGM-2[®] stimulated BM-MSCs (**Fig. 2C**). Then, (PAH-PSS)₄ substrate compared to type I collagen seemed to improve and boost mRNA endothelial markers expression with a significant increase of these markers in WJ-MSCs.

The corresponding protein synthesis by BM- and WJ-MSCs was evaluated by Western blot. EGM-2[®] stimulated WJ-MSCs on (PAH-PSS)₄ highly expressed all the studied protein markers (**Fig. 3**). However, on type I collagen only lower CD31 and VE-cadherin protein bands were detected with an absence of VEGF-R2 protein band (**Fig. 3**). In addition, no band corresponding to CD31, VEGF-R2 and VE-cadherin protein was detected for EGM-2[®] stimulated BM-MSCs, after 15 days on both substrates (**Fig. 3**). In our differentiation system, after 15 days of culture, only WJ-MSCs cultivated on (PAH-PSS)₄ substrate acquired major characteristics of mature ECs and expressed CD31, VEGF-R2 and VE-cadherin at mRNA and protein levels. BM-MSCs did not express these protein markers whatever the used substrate. Elongation of differentiation time will probably lead to an up-regulation of these markers (40). Comparing our results to literature, these collagen substrate findings agreed with reported results (41, 42). Improving CD31, VEGF-R2 and VE-cadherin expression, similarly to our results, was obtained by adding to EGM-2[®] culture medium a high concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF, approximately 50 ng/mL) (41). Herein, (PAH-PSS)₄ seems to be the suitable substrate for WJ-MSCs differentiation toward endothelial lineage in EGM-2[®] without any other supplement. mRNA and protein expression of CD31, VEGF-R2 and VE-cadherin by WJ-MSCs demonstrated their ECs phenotype commitment, however a successful differentiation should be confirmed through endothelial functions.

Functional analysis of stimulated WJ-MSCs cultivated on PEM and collagen substrates

Among these functions, we evaluated first the nitric oxide (NO) release. Considered as a strong vasodilator, NO acts as an inhibitor of platelet aggregation, vascular smooth muscle cells proliferation and leukocytes adhesion which make it a strong antithrombotic and anti-atherogenic factor (43). As for HUVECs, the resulting EGM-2[®] stimulated WJ-MSCs were able to release NO in the culture supernatant whatever the substrate (**Fig. 4A**). We checked

similarly the capacity of EGM-2[®] stimulated WJ-MSCs to incorporate Dil-acetylated low-density lipoprotein (Dil-Ac-LDL), a hallmark of ECs and macrophages (44). EGM-2[®] stimulated WJ-MSCs cultivated on both surfaces were able to uptake Dil-Ac-LDL (**Fig. 4B**), similarly to HUVECs, with mostly a punctuated perinuclear distribution. These results agree with those of Berthelemy *et al.*, who induced the endothelial differentiation of rabbit circulating progenitor cells on PAH/PSS films and found that, after 14 days, these cells are able to uptake Dil-Ac-LDL, confirming that these cells on PEMs exhibit an ECs phenotype (25). The expression of von Willebrand Factor (vWF) by EGM-2[®] stimulated WJ-MSCs was finally evaluated. vWF is a high molecular weight glycoprotein, synthesized and secreted by mature and functional vascular ECs and plays a crucial role in preventing platelet adhesion and aggregation (45). Expressed in normal ECs, vWF expression is significantly reduced in damaged cells (46). EGM-2[®] stimulated WJ-MSCs seeded on (PAH-PSS)₄ showed a highly organized and marked expression of intracellular vWF protein whereas no expression was detected on type I collagen (**Fig. 4C**).

In summary, we can conclude, from this investigation, that build up of multilayer from PAH and PSS ending by PSS leads to distinct effect on differentiation of mesenchymal stem cells. While differentiation of BM-MSCs into ECs lineage is incomplete, an-up regulation of all the studied endothelial markers from WJ-MSCs was obtained. Overall, it can be stated that differentiation of WJ-MSCs can be modulated by the PAH/PSS multilayers in synergistic action with culture medium (EGM-2[®]). Our findings support the development of angiogenic lineage differentiation from allogenic Wharton's jelly mesenchymal stem cells. ECs-like could be beneficial in the treatment of cardio-vascular-related diseases and in the engineering of complex tissues, where vascularization of the tissue is an essential feature for the successful engraftment.

Acknowledgments

The authors are very grateful to the staff of Obstetric department of Nancy Maternity Hospital for providing umbilical cords and the staff of the cell and tissue therapy department (Nancy) for providing bone marrow samples. The authors thank Pr. Pierre Labrude, Dr. Huguette Louis and Alice Brion for their technical assistance.

References

1. Sieminski AL, Gooch KJ. (2000) Biomaterial-microvasculature interactions. *Biomaterials* 21:2232-2241.
2. Giannoni P, Scaglione S, Daga A, Ilengo C, Cilli M et al. (2010) Short-time survival and engraftment of bone marrow stromal cells in an ectopic model of bone regeneration. *Tissue Eng Part A* 16:489-499.
3. Nomi M, Miyake H, Sugita Y, Fujisawa M, Soker S. (2006) Role of growth factors and endothelial cells in therapeutic angiogenesis and tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther* 1:333-343.
4. Seifalian AM, Tiwari A, Hamilton G, Salacinski HJ. (2002) Improving the clinical patency of prosthetic vascular and coronary bypass grafts: the role of seeding and tissue engineering. *Artif Organs* 26:307-320.
5. Rodriguez-Morata A, Garzon I, Alaminos M, Garcia-Honduvilla N, Sanchez-Quevedo MC et al. (2008) Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg* 22:440-448.
6. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. (2003) Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 21:105-110.
7. Krawiec JT, Vorp DA. (2012) Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: a review. *Biomaterials* 33:3388-3400.
8. Rafii S, Lyden D. (2003) Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9:702-712.
9. Zhuo Y, Li S-H, Chen M-S, Wu J, Kinkaid HYM et al. (2010) Aging impairs the angiogenic response to ischemic injury and the activity of implanted cells: combined consequences for cell therapy in older recipients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 139:1286-1294.
10. Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, Albiero M, Baesso I et al. (2006) Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia* 49:3075-3084.
11. Cipriani P, Guiducci S, Miniati I, Cinelli M, Urbani S et al. (2007) Impairment of endothelial cell differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells: new insight into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 56:1994-2004.
12. Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK. (2008) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood* 111:4551-4558.

13. Galas RJ Jr, Liu JC. (2014) Vascular Endothelial Growth Factor Does not Accelerate Endothelial Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Physiol* 229:90-96.
14. Moby V, Labrude P, Bordenave L, Stoltz JF, Menu P. (2011) Polyelectrolyte multilayer film and human mesenchymal stem cells: an attractive alternative in vascular engineering applications. *J Biomed Mater Res A* 96:313-319.
15. König J, Huppertz B, Desoye G, Parolini O, Fröhlich JD et al. (2012) Amnion-derived mesenchymal stromal cells show angiogenic properties but resist differentiation into mature endothelial cells. *Stem Cells Dev* 21:1309-1320.
16. Fischer LJ, McIlhenny S, Tulenko T, Golesorkhi N, Zhang P et al. (2009) Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *J Surg Res* 152:157-166.
17. Choi M, Lee H-S, Naidansaren P, Kim H-K, O E et al. (2013) Proangiogenic features of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels. *Int J Biochem Cell Biol* 45:560-570.
18. Vittorio O, Jacchetti E, Pacini S, Cecchini M. (2013) Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells: when traditional biology meets mechanotransduction. *Integr Biol Quant Biosci Nano Macro* 5:291-299.
19. Wang H-S, Hung S-C, Peng S-T, Huang C-C, Wei H-M et al. (2004) Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 22:1330-1337.
20. Alaminos M, Pérez-Köhler B, Garzón I, García-Honduvilla N, Romero B et al. (2010) Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 223:640-647.
21. Campos Muñoz A. (2009) Artificial endothelial cell. From stem cells to transdifferentiated endothelial cells. *An R Acad Nac Med (Madr)* 126:285-294.
22. Tenney RM, Discher DE. (2009) Stem cells, microenvironment mechanics, and growth factor activation. *Curr Opin Cell Biol* 21:630-635.
23. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126:677-689.
24. Kerdjoudj H, Berthelemy N, Boulmedais F, Stoltz J-F, Menu P et al. (2010) Multilayered polyelectrolyte films: a tool for arteries and vessel repair. *Soft Matter* 6:3722-3734.
25. Berthelemy N, Kerdjoudj H, Gaucher C, Schaaf P, Stoltz J-F et al. (2008) Polyelectrolyte Films Boost Progenitor Cell Differentiation into Endothelium-like Monolayers. *Adv Mater* 20:2674-2678.

26. Salmon N, Paternotte E, Decot V, Stoltz J-F, Menu P et al. (2009) Polyelectrolyte multilayer films promote human cord blood stem cells differentiation into mature endothelial cells exhibiting a stable phenotype. *Biomed Mater Eng* 19:349-354.
27. Kerdjoudj H, Berthelemy N, Rinckenbach S, Kearney-Schwartz A, Montagne K et al. (2008) Small vessel replacement by human umbilical arteries with polyelectrolyte film-treated arteries: in vivo behavior. *J Am Coll Cardiol* 52:1589-1597.
28. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3:393-403.
29. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52:2745-2756.
30. Rammal H, Beroud J, Gentils M, Labrude P, Menu P et al. (2013) Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films. *Biomed Mater Eng* 23:299-309.
31. Kerdjoudj H, Boulmedais F, Berthelemy N, Mjahed H, Louis H et al. (2011) Cellularized alginate sheets for blood vessel reconstruction. *Soft Matter* 7: 3621-3626.
32. Bryan NS, Grisham MB. (2007) Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med* 43:645- 657.
33. Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M et al. (2011) Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol* 12:12.
34. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315- 317.
35. Baksh D, Yao R, Tuan RS. (2007) Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 25:1384- 1392.
36. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G et al. (2004) Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22:377- 384.
37. Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L et al. (2012) Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. *PloS One* 7:e46842.
38. Li Z, Wu JC, Sheikh AY, Kraft D, Cao F et al. (2007) Differentiation, survival, and function of embryonic stem cell derived endothelial cells for ischemic heart disease. *Circulation* 116:I46- I54.
39. Ali J, Liao F, Martens E, Muller WA. (1997) Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin): cloning and role in endothelial cell-cell adhesion. *Microcirc N Y N* 4:267- 277.

40. Liu JW, Dunoyer-Geindre S, Serre-Beinier V, Mai G, Lambert J-F et al. (2007) Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. *J Thromb Haemost JTH* 5:826- 834.
41. Pankajakshan D, Kansal V, Agrawal DK. (2012) In vitro differentiation of bone marrow derived porcine mesenchymal stem cells to endothelial cells. *J Tissue Eng Regen Med* doi:10.1002/term.1483
42. Lozito TP, Kuo CK, Taboas JM, Tuan RS. (2009) Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix. *J Cell Biochem* 107:714- 722.
43. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Gilligan DM, Panza JA et al. (1995) Contribution of nitric oxide to metabolic coronary vasodilation in the human heart. *Circulation* 92:320- 326.
44. Craig LE, Spelman JP, Strandberg JD, Zink MC. (1998) Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology. *Microvasc Res* 55:65- 76.
45. Ruggeri ZM, Ware J. (1993) von Willebrand factor. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 7:308- 316.
46. Meyer D, Piétu G, Fressinaud E, Girma JP. (1991) von Willebrand factor: structure and function. *Mayo Clin Proc Mayo Clin* 66:516- 523.

Figure Legends:

Figure. 1. *Cell morphology.* Unstimulated (a, c, e and g) and EGM-2[®] stimulated (b, d, f, h) Wharton's jelly (a-d) and bone marrow (e-h) mesenchymal stem cells morphology was investigated by inverted optical microscopy (Leica light microscope). Type I collagen (a, b, e, f) and (PAH-PSS)₄ (c, d, g, h) were used as culture substrate. White arrows were used to mark broadened flat (fibroblastic) cells whereas white arrowheads were used to mark non overlapping (polygonal) cells. ($\times 20$ magnification, scale bar = 50 μ m). Only EGM-2[®] stimulated WJ-MSCs showed a slight morphological evolution from fibroblastic to polygonal.

Figure. 2. *mRNA expression of endothelial cell markers.* VEGF-R2 (A), CD31 (B) and VE-cadherin (D) mRNA expression in WJ-MSCs and BM- cultivated on (PAH-PSS)₄ and type I collagen substrates were determined by RT-qPCR. Mature endothelial cells extracted from vein umbilical cord (HUVECs) were used as positive control. Results were normalized using the housekeeping gene ribosomal protein S29 and compared to HUVECs. (* WJ *versus* BM-MSCs on type I collagen, # WJ *versus* BM-MSCs on (PAH-PSS)₄, \$ Type I collagen *versus* (PAH-PSS)₄ for WJ-MSCs and £ Type I collagen *versus* (PAH-PSS)₄ for BM-MSCs. ($p < 0.001$)).

Figure. 3. *Protein expression of endothelial cell markers.* VEGF-R2 (A), CD31 (B) and VE-cadherin (C) expression by WJ-MSCs and BM- cultivated on (PAH-PSS)₄ and type I collagen substrates were determined by Western blot. Mature endothelial cells extracted from vein umbilical cord (HUVECs) were used as positive control. Protein expression was normalized to GAPDH protein reference then compared to HUVECs. (# WJ *versus* BM-MSCs on (PAH-PSS)₄ and \$ type I collagen *versus* (PAH-PSS)₄ for WJ-MSCs. $p < 0.001$ and $p < 0.01$). NDB corresponds to not detected band.

Figure. 4. *Endothelial-like cell functionality.* Assessment of nitric oxide content in supernatant of EGM-2[®] stimulated WJ-MSCs on (PAH-PSS)₄ and type I collagen substrate (A). Nitrite concentration was determined using Griess method. Mature endothelial cells extracted from vein umbilical cord (HUVECs) were used as positive control. Acetylated low-density lipoprotein (Dil-Ac-LDL) uptake by unstimulated (B1 and B3) and EGM-2[®] stimulated (B2 and B4) WJ-MSCs on (PAH-PSS)₄ (B1 and B2) and type I collagen (B3 and B4) substrates. HUVECs were used as positive control (B5). Nuclei counter-staining with DAPI appeared in blue whereas uptake Dil-Ac-LDL appeared in red. ($\times$ 40 oil objective, scale bar = 50 μ m). Von Willebrand factor (vWF) expression by unstimulated (C1 and C3) and EGM-2[®] stimulated (C2 and C4) WJ-MSCs on (PAH-PSS)₄ (C1 and C2) and type I collagen (C3 and C4) substrates. Nuclei counter-staining with DAPI appeared in blue whereas vWF expression appeared in green ($\times$ 63 oil objective, scale bar = 5 μ m).

Figure 1:

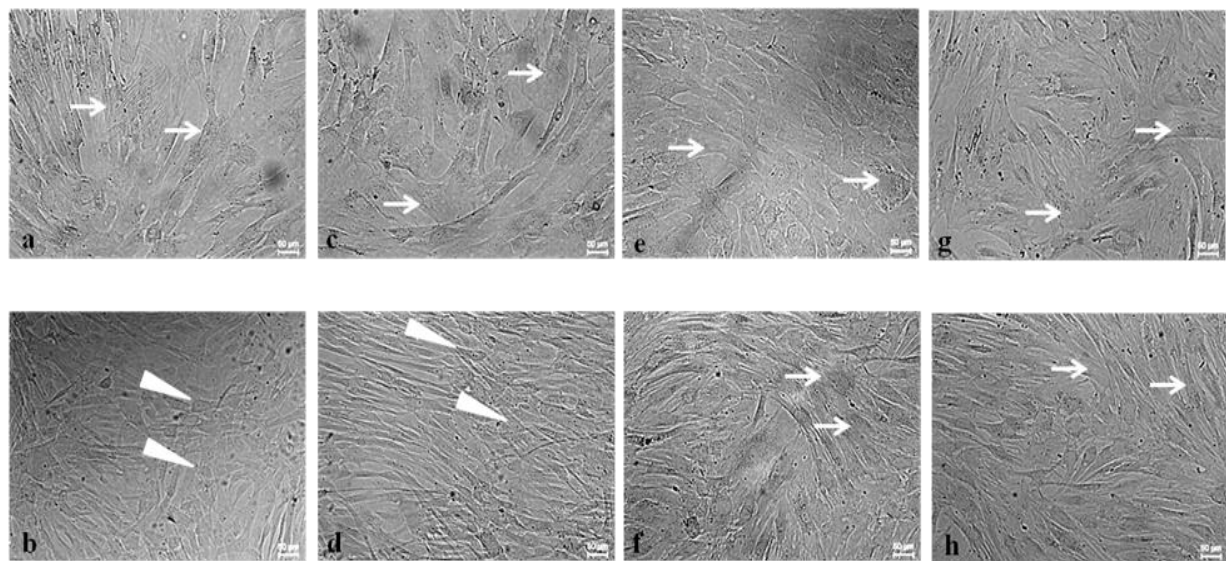


Figure 2:

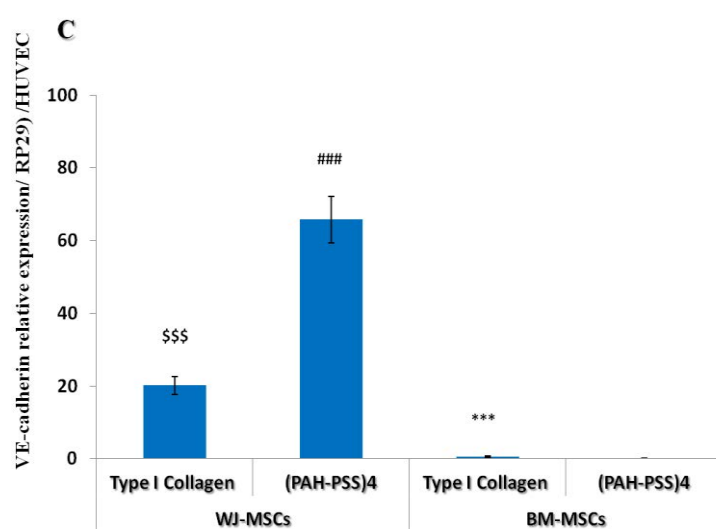
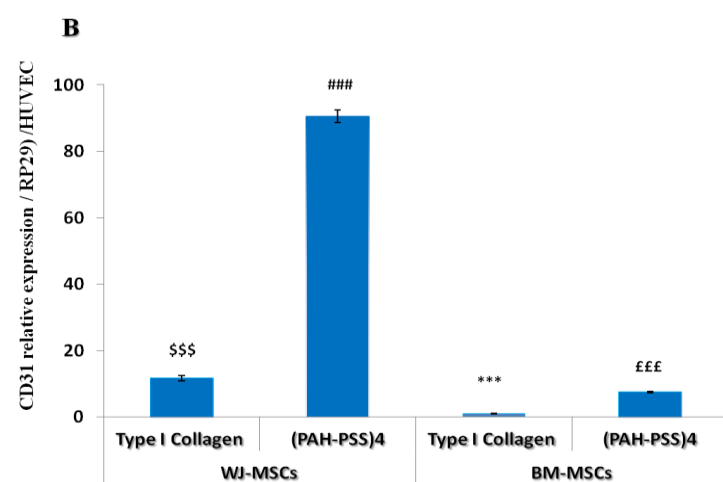
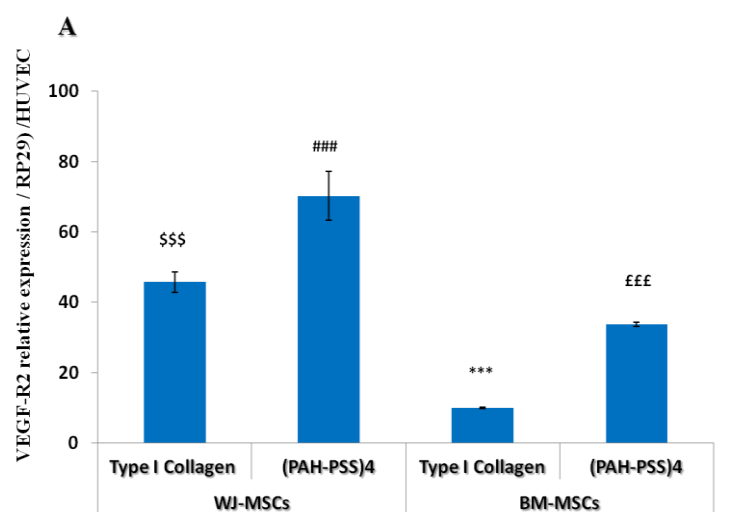


Figure 3:

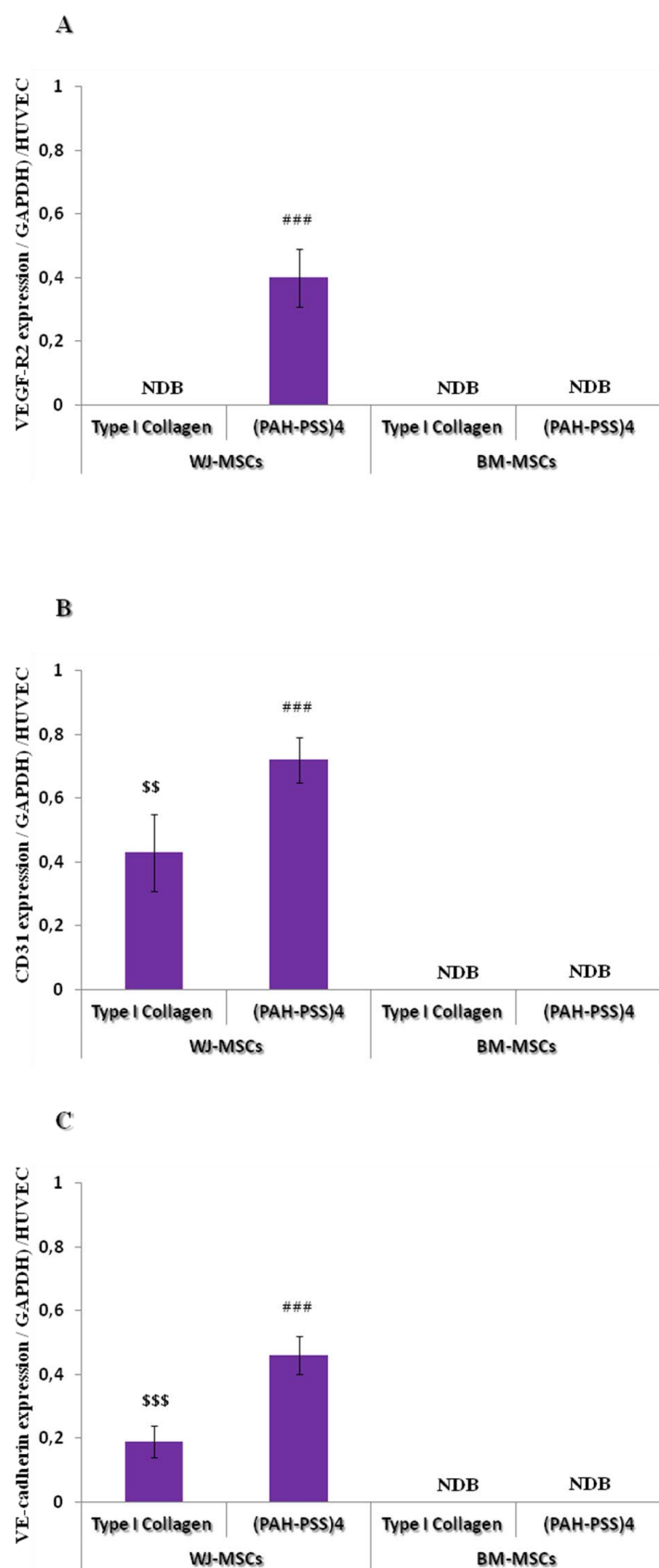
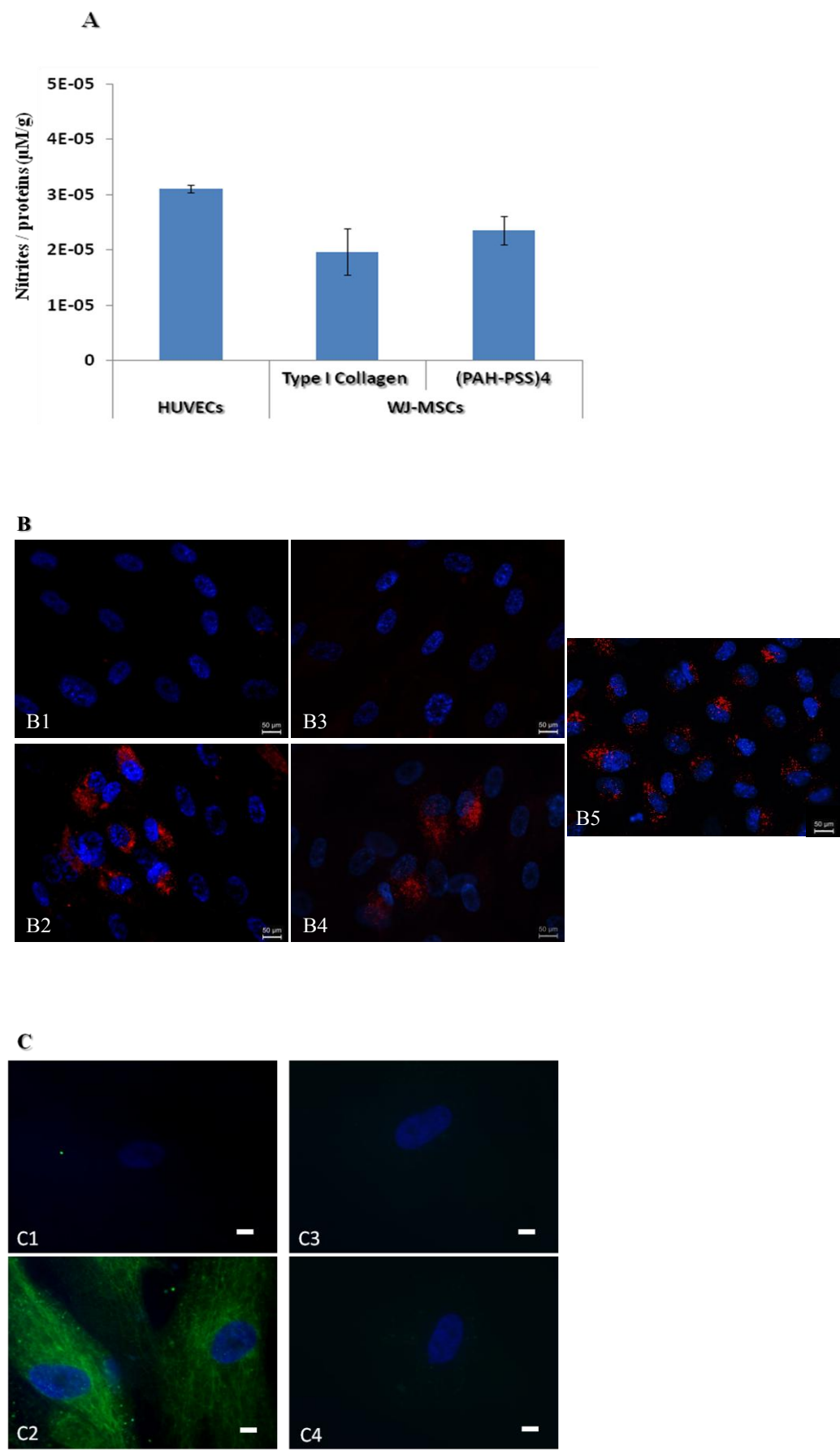


Figure 4:



3. Conclusion

Dans cette étude, nous avons évalué l'effet de la combinaison de facteurs de croissance angiogéniques avec des films multicouches de polyelectrolytes, sur la différenciation endothéliale de CSMs humaines. Pour ce faire, des CSM-GWs et CSM-MOs ont été cultivées sur des films (PAH-PSS)₄ dans un milieu de différenciation endothélial. Le phénotype endothélial a été évalué par microscopie optique (observation du changement de morphologie), par qRT-PCR (mesure de l'expression des gènes endothéliaux : CD31, VEGF-R2 et VE-cadhérine) et par Western blot (de l'expression de protéines endothéliales : CD31, VEGF-R2 et VE-cadhérine). En effet, l'ensemble de ces protéines joue un rôle important dans le développement de l'endothélium durant le processus d'angiogenèse.

Après 15 jours de culture, nous avons constaté une légère évolution de la morphologie des CSM-GWs stimulées en passant d'une morphologie fibroblastique à une morphologie polygonale. Les CSM-MOs, quant à elles, ont conservé une morphologie fibroblastique caractéristique des CSMs, et ce quelque soit la surface de culture utilisée. Les analyses en qRT-PCR et Western blot ont également confirmé une différenciation endothéliale plus affirmée des CSM-GWs comparées aux CSM-MOs, sans influence de la surface de culture. En ce qui concerne les CSM-GWs, comparé au contrôle (collagène de type I), le fait de combiner les facteurs de croissance angiogéniques au film (PAH-PSS)₄, permet d'augmenter fortement et significativement l'expression des ARNm et des protéines précoces (CD31 et VEGF-R2) et tardives (VE-cadhérine) par les CSM-GWs. Au contraire, les CSM-MOs ont montré une faible expression génique et une absence d'expression protéique endothéliale et ce, quel que soit le support de culture.

Les résultats obtenus après stimulation des CSM-GWs, en comparaison avec les CSM-MOs, ont démontré leur engagement vers un phénotype endothélial. Cependant, une différenciation réussie doit être confirmée par la fonctionnalité des cellules endothéliales. En considérant les résultats négatifs obtenus avec les CSM-MOs, seule la fonctionnalité des CSM-GWs a été étudiée. Parmi ces fonctions, nous avons évalué :

- la capacité des CSM-GWs stimulées à générer du NO. Considéré comme un puissant vasodilatateur en agissant sur les CMLs, NO a également un rôle inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, de la prolifération des cellules musculaires lisses et de

l'adhésion leucocytaire faisant de lui un acteur puissant antithrombotique et un facteur anti-athérogénique.

- la capacité de ces cellules à incorporer les Ac-LDLs, un marqueur spécifique des CEs et macrophages.

Nous avons montré dans ce travail que, quelque soit la surface de culture, les CSM-GWs ont été capables de générer du NO et d'incorporer les Ac-LDLs.

Finalement, l'expression du facteur de von Willebrand (vWF) par les CSM-GWs stimulées a été évaluée. Le vWF est synthétisé et sécrété par les CEs fonctionnelles et matures et joue un rôle crucial dans la prévention de l'adhésion plaquettaire. Après 15 jours de culture, seules les CSM-GWs stimulées et cultivées sur (PAH-PSS)₄ ont montré une expression hautement organisée du vWF intracellulaire alors qu'aucune expression n'a été détectée sur le collagène.

Les résultats obtenus semblent donc montrer que la combinaison des films multicouches de polyélectrolytes se terminant par une charge négative et des facteurs de croissance angiogéniques peut accélérer la différenciation endothéliale des CSMs humaines en cellules endothéliales. En respectant notre protocole de différenciation, seules les CSM-GWs stimulées semblent s'orienter vers des cellules endothéliales-*like* fonctionnelles. Ces cellules issues de la GW, dans nos conditions de culture, seraient donc le choix le plus judicieux, par rapport à celles issues de la MO, d'une source allogénique de cellules utilisables dans le domaine de l'ingénierie vasculaire.

PARTIE IV : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le recours à des cellules vasculaires matures limite l'application de l'ingénierie vasculaire. Les cellules progénitrices endothéliales (EPCs) ont la capacité de se différencier en CEs matures (196). Cependant, ces cellules se trouvent en très faible quantité et tendent à perdre leur potentiel après une longue période de culture (200). Avec leur capacité d'auto-renouvellement et leur pluripotence, les cellules souches embryonnaires humaines fournissent une source de CEs alternative pour l'ingénierie tissulaire vasculaire (193). Cependant, la possibilité d'un dérèglement concernant l'immunocompatibilité et la formation d'un tératome suivant la transplantation de ces cellules ont été rapportées (201). De plus, elles sont sujettes à beaucoup de controverses car leur extraction, se faisant à partir d'embryons et donc à partir d'êtres humains potentiels, soulève des dilemmes éthiques et religieux. La mise au point des cellules souches humaines pluripotentes induites (iPS) (202) a permis le développement d'une source potentielle et inépuisable de cellules vasculaires; elle sont faciles à produire, ne posent pas de problèmes immunologiques et ne soulèvent aucune question d'éthique (203). Cependant, l'utilisation de rétrovirus pour la génération de ces cellules, peut engendrer des risques de mutagenèse incontrôlée, représentant un réel problème si des applications en médecine régénératrice sont envisagées. Très récemment, une équipe a réussi à obtenir des iPS sans le recours à une transfection par un rétrovirus (204). Néanmoins, les avantages incontestables de cette méthode non-intégrative sont limités par une faible efficacité, un coût élevé et une difficulté de mise en place. La nécessité de trouver une source non traumatisante de CEs capables de proliférer rapidement nous a conduit à nous intéresser aux cellules souches mésenchymateuses (CSMs).

Il existe plusieurs sources susceptibles de fournir des CSMs, en particulier, celles issues du tissu adipeux, de la pulpe gingivale, du placenta, du sang du cordon ombilical, du liquide amniotique... En ce qui nous concerne, à l'instar de plusieurs équipes, nous avons tenté d'induire la différenciation endothéliale des CSMs issues de la GW et de la MO. Dans le but d'améliorer le rendement et d'accélérer cette différenciation, des recouvrements par des constituants de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine...) sont nécessaires. Cependant, ces protocoles sont longs à réaliser, ne sont pas aisés et aboutissent à des résultats peu satisfaisants (208, 209). De plus, les cellules résultantes n'expriment pas tous les marqueurs endothéliaux essentiels (vWF, VEGF-R2...) et ne sont pas ou peu fonctionnelles (210, 211). Dans ce travail, nous avons réalisé pour la première fois, la différenciation des CSM-GWs et CSM-MOs en combinant les films multicouches de polyélectrolytes et les facteurs de croissance angiogéniques. Nos résultats font ressortir une meilleure prolifération

cellulaire sur les films tout en favorisant la différenciation endothéliale des CSM-GWs en *CE-like* fonctionnelles en seulement 15 jours. En effet, le recouvrement de la surface de culture par le film (PAH-PSS)₄ semble être très « apprécié » par les CSM-GWs car leur encre, leur adhésion ainsi leur différenciation en *CE-like* en est facilitée. Cette hypothèse repose sur des études récentes évaluant l'effet des propriétés des surfaces de cultures (mécaniques, physiques, chimiques...) sur le comportement et la différenciation des CSMs (212, 213). Ce facteur, le support de culture, ne doit pas être le seul critère à être considéré lors de la différenciation cellulaire. Nous avons également montré que l'environnement cellulaire, la densité et le pourcentage de SVF jouent un rôle majeur au cours de ce processus.

Dans le contexte de l'ingénierie vasculaire, la possibilité de produire un greffon cellularisé devient une évidence. Et la première étape est d'endothélialiser la surface luminale avec des cellules d'accès facile. D'où l'intérêt d'avoir recours à des CSMs issues de la gelée de Wharton. Les résultats de la différenciation de ces cellules en cellules «endothéliale-like» sont très encourageants. En effet, la possibilité de disposer de telles cellules provenant de cellules souches, donc faiblement immunogènes, ouvre la voie à de nouvelles applications. De plus, ces cellules proviennent d'un déchet biologique, elles sont faciles à isoler, elles ont une meilleure capacité de prolifération et de différenciation qui les distinguent d'autres types de cellules fœtales telles que les CSMs du placenta (211).

Ce travail ouvre de très larges perspectives dans le domaine de l'ingénierie tissulaire vasculaire. A la lumière de nos résultats, il paraît judicieux d'évaluer les propriétés immunologiques des cellules après différenciation, qui est un facteur clé pour toutes applications cliniques. Par la suite, on pourrait appliquer directement ce protocole de différenciation autant sur des substituts synthétiques (ePTFE...) que naturels (artères ombilicales désendothélialisées...) traités par le film PAH/PSS dans le but de les implanter directement chez le petit animal (lapin), dans un premier temps et d'envisager ensuite des essais de substitution d'une coronnaire chez le porc. Ces étapes devraient mettre en lumière la résistance et la perméabilité d'une telle construction vis-à-vis du flux sanguin. Une première application clinique pourrait s'organiser autour d'un shunt vasculaire pour l'hémodialyse, au travers d'une demande de PHRC. Il serait également judicieux de fonctionnaliser les films multicouches par des réservoirs contenant des facteurs de croissance. La libération de ces facteurs directement à ces cellules favoriserait la différenciation des CSMs implantées et éventuellement le recrutement d'autres cellules vasculaires *in vivo*.

Références

1. Meinhart JG, Schense JC, Schima H, Gorlitzer M, Hubbell JA, Deutsch M, et al. (2005) Enhanced endothelial cell retention on shear-stressed synthetic vascular grafts precoated with RGD-cross-linked fibrin. **Tissue Eng** 11:887-895.
2. Zilla P, Fasol R, Deutsch M, Fischlein T, Minar E, Hammerle A, et al. (1987) Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report. **J Vasc Surg** 6:535-541.
3. Herring M, Smith J, Dalsing M, Glover J, Compton R, Etchberger K, et al. (1994) Endothelial seeding of polytetrafluoroethylene femoral popliteal bypasses: the failure of low-density seeding to improve patency. **J Vasc Surg** 20:650-655.
4. Decher G. (1997) Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. **Science** 277:1232-1237.
5. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. (2007) Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. **Stem Cells** 25:319-331.
6. Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolta JA. (2008) Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells** 26:2173-2182.
7. Giuliani N, Mangoni M, Rizzoli V. (2009) Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in multiple myeloma: identification of potential therapeutic targets. **Exp Hematol** 37:879-886.
8. Diederichs S, Röker S, Marten D, Peterbauer A, Scheper T, van Griensven M, et al. (2009) Dynamic cultivation of human mesenchymal stem cells in a rotating bed bioreactor system based on the Z RP platform. **Biotechnol Prog** 25:1762-1771.
9. Alwan A and World Health Organization. (2011) Global status report on noncommunicable diseases 2010.
10. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M (2013). Cardiovascular Disease in Europe : epidemiological update. **Eur Heart J** 34:3028-3034.
11. Aouba A, Eb M, Rey G, Pavillon G, Jouglé É. (2011) Données sur la mortalité en France: principales causes de décès en 2008 et évolutions depuis 2000. **BEH** 22:249-260.
12. Lobstein JGCFM. Traites d'Anatomie Pathologique. **Paris, France: Chez F. G. Levrault** (1833):533-534.
13. Marchand F. (1904) Über arteriosklerose. **Verhandlung des Congresses fur innere Medizin** 21:23-59.

14. Libby P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. **Nature** 420:868-874.
15. Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, et al. (2013) Cardiovascular Disease Risk Factors Other than Dyslipidemia. **J Atheroscler Thromb** 20:733-742.
16. Luc G. (2000) Mechanisms of action of hypolipidemic agents **Thérapie** 55:661-668.
17. Scaldaferri F, Pizzoferrato M, Ponziani FR, Gasbarrini G, Gasbarrini A. (2013) Use and indications of cholestyramine and bile acid sequestrants. **Intern Emerg Med** 8:205-210.
18. Abourbih S, Filion KB, Joseph L, Schiffrin EL, Rinfret S, Poirier P, et al. (2009) Effect of fibrates on lipid profiles and cardiovascular outcomes: a systematic review. **Am J Med** 122:962.e1-8.
19. Alsheikh-Ali AA, Kuvin JT, Karas RH. (2004) Risk of adverse events with fibrates. **Am J Cardiol** 94:935-938.
20. Singh M, Bedi US. (2013) Is atherosclerosis regression a realistic goal of statin therapy and what does that mean? **Curr Atheroscler Rep** 15:294.
21. Rosenbaum D, Dallongeville J, Sabouret P, Bruckert E. (2012) Discontinuation of statin therapy due to muscular side effects: A survey in real life. **Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD** 23:871-875.
22. Rizzo M, Battista Rini G. (2011) Ezetimibe, cardiovascular risk and atherogenic dyslipidaemia. **Arch Med Sci AMS** 7:5-7.
23. Boukhari N, Taleb-Senouci D, Chabane FZ, Besbes M, Lamri-Senhadjji MY. (2013) [Fish by-products oil corrects dyslipidemia, improves reverse cholesterol transport and stimulates paraoxonase-1 activity in obese rat]. **Ann Cardiol Angéiologie** 62:149-154.
24. Foroughi M, Akhavanzanjani M, Maghsoudi Z, Ghiasvand R, Khorvash F, Askari G. (2013) Stroke and nutrition: a review of studies. **Int J Prev Med** 4:S165-179.
25. Brussels Heart Center. Angioplastie: La dilatation coronaire et l'implantation du stent. <http://www.brusselsheartcenter.be/fr/cardiology/examens-et-gestes-therapeutiques/pdf/angioplastie.pdf>
26. LES INTERVENTIONS - Chirurgie vasculaire et endovasculaire. <http://www.chirurgie-vasculaire-caen.fr/les-interventions-1/>
27. Sourgounis A, Lipiecki J, Lo TS, Hamon M. (2009) Coronary stents and chronic anticoagulation. **Circulation** 119:1682-1688.
28. Morice M-C, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, et al. (2002) A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. **N Engl J Med** 346:1773-1780.
29. Farb A, Heller PF, Shroff S, Cheng L, Kolodgie FD, Carter AJ, et al. (2001) Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent. **Circulation** 104:473-479.

30. Palmerini T, Biondi-Zoccai G, Della Riva D, Stettler C, Sangiorgi D, D'Ascenzo F, et al. (2012) Stent thrombosis with drug-eluting and bare-metal stents: evidence from a comprehensive network meta-analysis. **Lancet** 379:1393-1402.
31. Venkatraman S, Boey F, Lao LL. (2008) Implanted cardiovascular polymers: Natural, synthetic and bio-inspired. **Prog Polym Sci** 33:853-874.
32. Harrison LH Jr. (1976) Historical aspects in the development of venous autografts. **Ann Surg** 183:101-106.
33. Arnulf G. (1987) [Long-term results of Jean Kunlin's first venous autograft. Apropos of the report of M. J. Descotes et al]. **Chir Mém Académie Chir** 113:751-752.
34. Natali J. (1992) Jacques Oudot and his contribution to surgery of the aortic bifurcation. **Ann Vasc Surg** 6:185-192.
35. VOORHEES AB Jr, JARETZKI A 3rd, BLAKEMORE AH. (1952) The use of tubes constructed from vinyon « N » cloth in bridging arterial defects. **Ann Surg** 135:332-336.
36. Lytle BW, Loop FD, Cosgrove DM, Ratliff NB, Easley K, Taylor PC.(1985) Long-term (5 to 12 years) serial studies of internal mammary artery and saphenous vein coronary bypass grafts. **J Thorac Cardiovasc Surg** 89:248-258.
37. Davies MG, Hagen PO. (1994) Pathobiology of intimal hyperplasia. **Br J Surg** 81:1254-1269.
38. Ramos JR, Berger K, Mansfield PB, Sauvage LR. (1976) Histologic fate and endothelial changes of distended and nondistended vein grafts. **Ann Surg** 183:205-228.
39. Loop FD, Lytle BW, Cosgrove DM, Stewart RW, Goormastic M, Williams GW, et al. (1986) Influence of the internal-mammary-artery graft on 10-year survival and other cardiac events. **N Engl J Med** 314:1-6.
40. Cameron A, Kemp HG Jr, Green GE. (1986) Bypass surgery with the internal mammary artery graft: 15 year follow-up. **Circulation** 74:III30-36.
41. Couet F, Rajan N, Mantovani D. (2007) Macromolecular biomaterials for scaffold-based vascular tissue engineering. **Macromol Biosci** 7:701-718.
42. Dardik H, Wengerter K, Qin F, Pangilinan A, Silvestri F, Wolodiger F, et al. (2002) Comparative decades of experience with glutaraldehyde-tanned human umbilical cord vein graft for lower limb revascularization: an analysis of 1275 cases. **J Vasc Surg** 35:64-71.
43. Huber AJT, Brockbank KGM, Riemann I, Schleicher M, Schenke-Layland K, Fritze O, et al. (2012) Preclinical evaluation of ice-free cryopreserved arteries: structural integrity and hemocompatibility. **Cells Tissues Organs** 196:262-270.

44. Mabrut J-Y, Abdullah SS, Rode A, Bourgeot J-P, Eljaafari A, Baulieux J, et al. (2012) Cryopreserved iliac artery allograft for primary arterial revascularization in adult liver transplantation. **Clin Transplant** 26:E12-16.
45. Streichenberger R, Barjoud H, Adeleine P, Larese A et al. (2000) Allogreffes veineuses conservées à 4° dans les pontages sous-inguinaux: Résultats à long terme dans 170 cas. **Ann Chir Vasc** 14:553-560.
46. Rendal E, Santos MVM, Rodriguez M, Sánchez J, Segura R, Matheu G, et al. (2004) Effects of cryopreservation and thawing on the structure of vascular segment. **Transplant Proc** 36:3283-3287.
47. Gabriel M, Wachal K, Dzieciuchowicz L, Pawlaczyk K, Krasinski Z, Oszkinis G. (2006) The influence of cryopreservation on changes in diameter and compliance of allografts in an animal experimental model. **Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg** 32:169-175.
48. Rosenberg DM, Glass BA, Rosenberg N, Lewis MR, Dale WA. (1970) Experiences with modified bovine carotid arteries in arterial surgery. **Surgery** 68:1064-1073.
49. Xiong Y, Chan WY, Chua AWC, Feng J, Gopal P, Ong YS, et al. (2013) Decellularized porcine saphenous artery for small-diameter tissue-engineered conduit graft. **Artif Organs** 37:E74-87.
50. Conklin BS, Richter ER, Kreutziger KL, Zhong D-S, Chen C. (2002) Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. **Med Eng Phys** 24:173-183.
51. Wang X-N, Chen C-Z, Yang M, Gu YJ. (2007) Implantation of decellularized small-caliber vascular xenografts with and without surface heparin treatment. **Artif Organs** 31:99-104.
52. Teebken OE, Haverich A. (2002) Tissue engineering of small diameter vascular grafts. **Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg** 23:475-485.
53. Ricco JB, Marchand C, Neau JP, Marchand E, Cau J, Fébrer G. (2009) Prosthetic carotid bypass grafts for atherosclerotic lesions: a prospective study of 198 consecutive cases. **Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg** 37:272-278.
54. Jensen LP, Lepäntalo M, Fossdal JE, Røder OC, Jensen BS, Madsen MS, et al. (2007) Dacron or PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. a multicenter randomised study. **Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg** 34:44-49.
55. Sarkar S, Sales KM, Hamilton G, Seifalian AM. (2007) Addressing thrombogenicity in vascular graft construction. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater** 82:100-108.
56. Chlupáč J, Filová E, Bacáková L. (2009) Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. **Physiol Res Acad Sci Bohemoslov** 58:S119- 139.
57. Xue L, Greisler HP. (2003) Biomaterials in the development and future of vascular grafts. **J Vasc Surg** 37:472-480.

58. Kumar VA, Brewster LP, Caves JM, Chaikof EL. (2011) Tissue Engineering of Blood Vessels: Functional Requirements, Progress, and Future Challenges. **Cardiovasc Eng Technol** 2:137-148.
59. Langer R, Vacanti JP. (1993) Tissue engineering. **Science** 260:920-926.
60. Horch RE, Kneser U, Polykandriotis E, Schmidt VJ, Sun J, Arkudas A. (2012) Tissue engineering and regenerative medicine -where do we stand? **J Cell Mol Med** 16:1157-1165.
61. Nerem RM, Seliktar D. (2001) Vascular tissue engineering. **Annu Rev Biomed Eng** 3:225-243.
62. Weinberg CB, Bell E. (1986) A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. **Science** 231:397-400.
63. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, et al. (1999) Functional arteries grown in vitro. **Science** 284:489-493.
64. Watanabe M, Shin'oka T, Tohyama S, Hibino N, Konuma T, Matsumura G, et al. (2001) Tissue-engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model. **Tissue Eng** 7:429-439.
65. Wake MC, Gupta PK, Mikos AG. (1996) Fabrication of pliable biodegradable polymer foams to engineer soft tissues. **Cell Transplant** 5:465-473.
66. L'Heureux N, Pâquet S, Labbé R, Germain L, Auger FA. (1998) A completely biological tissue-engineered human blood vessel. **FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol** 12:47-56.
67. Schmidt CE, Baier JM. (2000) Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. **Biomaterials** 21:2215-2231.
68. De Boer J, Blitterswijk CA van, Thomsen P, Hubbell J, Cancedda R, De Bruijn J.D, Lindahl A, Sohier J and Williams D. (2008) Tissue engineering, 1st edition. **Academic Press**.
69. Miano JM. (2010) Vascular smooth muscle cell differentiation-2010. **J Biomed Res** 24:169-180.
70. Pařízek M, Novotná K, Bačáková L. (2011) The role of smooth muscle cells in vessel wall pathophysiology and reconstruction using bioactive synthetic polymers. **Physiol Res Acad Sci Bohemoslov** 60:419-437.
71. Chan-Park MB, Shen JY, Cao Y, Xiong Y, Liu Y, Rayatpisheh S, et al. (2009) Biomimetic control of vascular smooth muscle cell morphology and phenotype for functional tissue-engineered small-diameter blood vessels. **J Biomed Mater Res A** 88:1104-1121.
72. Dahl SLM, Kypson AP, Lawson JH, Blum JL, Strader JT, Li Y, et al. (2011) Readily available tissue-engineered vascular grafts. **Sci Transl Med** 3:68ra9.

73. Nemen-Guanzon JG, Lee S, Berg JR, Jo YH, Yeo JE, Nam BM, et al. (2012) Trends in tissue engineering for blood vessels. **J Biomed Biotechnol** 2012:956345.
74. Tedgui A, Bernard C. (1994) Cytokines, immuno-inflammatory response and atherosclerosis. **Eur Cytokine Netw** 5:263-270.
75. Gaucher C, Devaux C, Boura C, Lacolley P, Stoltz J-F, Menu P. (2007) In vitro impact of physiological shear stress on endothelial cells gene expression profile. **Clin Hemorheol Microcirc** 37:99-107.
76. Egbrink MGO, Van Gestel MA, Broeders MAW, Tangelder GJ, Heemskerk JMW, Reneman RS, et al. (2005) Regulation of microvascular thromboembolism in vivo. **Microcirc** 12:287-300.
77. McGuigan AP, Sefton MV. (2007) The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity. **Biomaterials** 28:2547-2571.
78. Galley HF, Webster NR. (2004) Physiology of the endothelium. **Br J Anaesth** 93:105-113.
79. Stratman AN, Davis GE. (2012) Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: influence on vascular tube remodeling, maturation, and stabilization. **Microsc Microanal Off J Microsc Soc Am Microbeam Anal Soc Microsc Soc Can** 18:68-80.
80. Speiser W, Anders E, Preissner KT, Wagner O, Müller-Berghaus G. (1987) Differences in coagulant and fibrinolytic activities of cultured human endothelial cells derived from omental tissue microvessels and umbilical veins. **Blood** 69:964- 967.
81. Imbert E, Poot AA, Figdor CG, Feijen J. (1998) Different growth behaviour of human umbilical vein endothelial cells and an endothelial cell line seeded on various polymer surfaces. **Biomaterials** 19:2285-2290.
82. Aird WC. (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. **Circ Res** 100:158-173.
83. Weibel ER, Palade GE. (1964) New Cytoplasmic Components in arterial endothelia. **J Cell Biol** 23:101-112.
84. Chappey O, Wautier MP, Wautier JL. (1997) Structure and functions of the endothelium. **Rev Prat** 47:2223- 2226.
85. Craig LE, Spelman JP, Strandberg JD, Zink MC. (1998) Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology. **Microvasc Res** 55:65-76.
86. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, et al. (1997) Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. **Am J Pathol** 151:671-677.
87. Zhou Z, Christofidou-Solomidou M, Garlanda C, DeLisser HM. (1999) Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. **Angiogenesis** 3:181-188.

88. Casscells W. (1992) Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. **Circulation** 86:723-729.
89. Stratmann A, Acker T, Burger AM, Amann K, Risau W, Plate KH. (2001) Differential inhibition of tumor angiogenesis by tie2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 dominant-negative receptor mutants. **Int J Cancer J Int Cancer** 91:273-282.
90. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med** 9:669-676.
91. Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhäger R, McCarthy JE, Weich HA, Christ B, et al. (1997) VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. **Dev Biol** 188:96-109.
92. Waldner MJ, Wirtz S, Jefremow A, Warntjen M, Neufert C, Atreya R, et al. (2010) VEGF receptor signaling links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. **J Exp Med** 207:2855-2868.
93. Vestweber D. (2008) VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 28:223-232.
94. Schnürch H, Risau W. (1993) Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. **Dev Camb Engl** 119:957-968.
95. Thomas M, Augustin HG. (2009) The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. **Angiogenesis** 12:125-137.
96. Eklund L, Saharinen P. (2013) Angiopoietin signaling in the vasculature. **Exp Cell Res** 319:1271-1280.
97. Denis CV. (2002) Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. **Int J Hematol** 75:3-8.
98. Schick PK, Walker J, Profeta B, Denisova L, Bennett V. (1997) Synthesis and secretion of von Willebrand factor and fibronectin in megakaryocytes at different phases of maturation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 17:797-801.
99. Brinkhous KM, Sandberg H, Garriss JB, Mattsson C, Palm M, Griggs T, et al. (1985) Purified human factor VIII procoagulant protein: comparative hemostatic response after infusions into hemophilic and von Willebrand disease dogs. **Proc Natl Acad Sci U S A** 82:8752-8756.
100. Ruggeri ZM. (2003) Von Willebrand factor. **Curr Opin Hematol** 10:142-149.
101. Förstermann U, Kleinert H. (1995) Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 352:351-364.
102. Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C. (2006) Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. **J Intern Med** 259:351-363.

103. L'Heureux N, Germain L, Labbé R, Auger FA. (1993) In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. **J Vasc Surg** 17:499-509.
104. Graham LM, Vinter DW, Ford JW, Kahn RH, Burkel WE, Stanley JC. (1980) Endothelial cell seeding of prosthetic vascular grafts: early experimental studies with cultured autologous canine endothelium. **Arch Surg Chic Ill** 1960 115:929-933.
105. Radomski JS, Jarrell BE, Williams SK, Koolpe EA, Greener DA, Carabasi RA. (1987) Initial adherence of human capillary endothelial cells to Dacron. **J Surg Res** 42:133-140.
106. Rodriguez-Morata A, Garzon I, Alaminos M, Garcia-Honduvilla N, Sanchez-Quevedo MC, Bujan J, et al. (2008) Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. **Ann Vasc Surg** 22:440-448.
107. Yang J, Chang E, Cherry AM, Bangs CD, Oei Y, Bodnar A, et al. (1999) Human endothelial cell life extension by telomerase expression. **J Biol Chem** 274:26141-26148.
108. Poh M, Boyer M, Solan A, Dahl SLM, Pedrotty D, Banik SSR, et al. (2005) Blood vessels engineered from human cells. **Lancet** 365:2122-2124.
109. Williams SK, Jarrell BE, Rose DG, Pontell J, Kapelan BA, Park PK, et al. (1989) Human microvessel endothelial cell isolation and vascular graft sodding in the operating room. **Ann Vasc Surg** 3:146-152.
110. Winiarski BK, Acheson N, Gutowski NJ, McHarg S, Whatmore JL. (2011) An improved and reliable method for isolation of microvascular endothelial cells from human omentum. **Microcirc** 18:635-645.
111. Yoshida T, Komaki M, Hattori H, Negishi J, Kishida A, Morita I, et al. (2010) Therapeutic angiogenesis by implantation of a capillary structure constituted of human adipose tissue microvascular endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 30:1300-1306.
112. Bindu A H, Srilatha B. (2011) Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. **J Stem Cell Res Ther** 1:3.
113. Meddahi-Pellé A, Bataille I, Subra P, Letourneur D. (2004) Biomatériaux vasculaires: du génie biologique et médical au génie tissulaire. **M/S Médecine Sciences** 20:679-684.
114. Caplan AI, Dennis JE. (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **J Cell Biochem** 98:1076-1084.
115. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. (2007) Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Res Ther** 9:204.
116. L'Heureux N, Dusserre N, Marini A, Garrido S, de la Fuente L, McAllister T. (2007) Technology insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts--from research to clinical practice. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med** 4:389-395.

117. Rabkin E, Schoen FJ. (2002) Cardiovascular tissue engineering. **Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol** 11:305-317.
118. Lincoff AM, Furst JG, Ellis SG, Tuch RJ, Topol EJ. (1997) Sustained local delivery of dexamethasone by a novel intravascular eluting stent to prevent restenosis in the porcine coronary injury model. **J Am Coll Cardiol** 29:808-816.
119. Reilly GC, Engler AJ. (2010) Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. **J Biomech** 43:55-62.
120. De Mel A, Bolvin C, Edirisinghe M, Hamilton G, Seifalian AM. (2008) Development of cardiovascular bypass grafts: endothelialization and applications of nanotechnology. **Expert Rev Cardiovasc Ther** 6:1259-1277.
121. Scheller EL, Krebsbach PH, Kohn DH. (2009) Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. **J Oral Rehabil** 36:368-389.
122. Peck M, Gebhart D, Dusserre N, McAllister TN, L'Heureux N. (2012) The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. **Cells Tissues Organs** 195:144-158.
123. Niklason LE, Abbott W, Gao J, Klagges B, Hirschi KK, Ulubayram K, et al. (2001) Morphologic and mechanical characteristics of engineered bovine arteries. **J Vasc Surg** 33:628-638.
124. Gong Z, Niklason LE. (2008) Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). **FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol** 22:1635-1648.
125. Aper T, Haverich A, Teebken O. (2009) New developments in tissue engineering of vascular prosthetic grafts. **VASA Z Für Gefässkrankh** 38:99-122.
126. Dahl SLM, Rhim C, Song YC, Niklason LE. (2007) Mechanical properties and compositions of tissue engineered and native arteries. **Ann Biomed Eng** 35:348-355.
127. Higgins SP, Solan AK, Niklason LE. (2003) Effects of polyglycolic acid on porcine smooth muscle cell growth and differentiation. **J Biomed Mater Res A** 67:295-302.
128. Sung H-J, Meredith C, Johnson C, Galis ZS. (2004) The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. **Biomaterials** 25:5735-5742.
129. Wang X, Sui S. (2011) Pulsatile culture of a poly(DL-lactic-co-glycolic acid) sandwiched cell/hydrogel construct fabricated using a step-by-step mold/extraction method. **Artif Organs** 35:645-655.
130. Shum-Tim D, Stock U, Hrkach J, Shinoka T, Lien J, Moses MA, et al. (1999) Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. **Ann Thorac Surg** 68:2298-2304; discussion 2305.
131. Hoerstrup SP, Zünd G, Sodian R, Schnell AM, Grünenfelder J, Turina MI. (2001) Tissue engineering of small caliber vascular grafts. **Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg** 20:164-169.

132. Kim S-H, Kwon JH, Chung MS, Chung E, Jung Y, Kim SH, et al. (2006) Fabrication of a new tubular fibrous PLCL scaffold for vascular tissue engineering. **J Biomater Sci Polym Ed** 17:1359-1374.
133. Roh JD, Brennan MP, Lopez-Soler RI, Fong PM, Goyal A, Dardik A, et al. (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** 42:198-202.
134. Kerdjoudj H, Berthelemy N, Rinckenbach S, Kearney-Schwartz A, Montagne K, Schaaf P, et al. (2008) Small vessel replacement by human umbilical arteries with polyelectrolyte film-treated arteries: in vivo behavior. **J Am Coll Cardiol** 52:1589-1597.
135. Aper T, Schmidt A, Duchrow M, Bruch H-P. (2007) Autologous blood vessels engineered from peripheral blood sample. **Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg** 33:33-39.
136. Tamura N, Nakamura T, Terai H, Iwakura A, Nomura S, Shimizu Y, et al. (2003) A new acellular vascular prosthesis as a scaffold for host tissue regeneration. **Int J Artif Organs** 26:783-792.
137. Badylak SF, Lantz GC, Coffey A, Geddes LA. (1989) Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. **J Surg Res** 47:74-80.
138. Lantz GC, Badylak SF, Hiles MC, Coffey AC, Geddes LA, Kokini K, et al. (1993) Small intestinal submucosa as a vascular graft: a review. **J Invest Surg Off J Acad Surg Res** 6:297-310.
139. Lantz GC, Badylak SF, Coffey AC, Geddes LA, Sandusky GE. (1992) Small intestinal submucosa as a superior vena cava graft in the dog. **J Surg Res** 53:175-181.
140. Inoue Y, Anthony JP, Lleon P, Young DM. (1996) Acellular human dermal matrix as a small vessel substitute. **J Reconstr Microsurg** 12:307-311.
141. Clarke DR, Lust RM, Sun YS, Black KS, Ollerenshaw JD. (2001) Transformation of nonvascular acellular tissue matrices into durable vascular conduits. **Ann Thorac Surg** 71:S433-436.
142. Bowers SLK, Banerjee I, Baudino TA. (2010) The extracellular matrix: at the center of it all. **J Mol Cell Cardiol** 48:474-482.
143. Davis GE, Senger DR. (2005) Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. **Circ Res** 97:1093-1107.
144. Divya P, Sreerekha PR, Krishnan LK. (2007) Growth factors upregulate deposition and remodeling of ECM by endothelial cells cultured for tissue-engineering applications. **Biomol Eng** 24:593-602.
145. Lv Q, Hu K, Feng Q, Cui F. (2008) Fibroin/collagen hybrid hydrogels with crosslinking method: preparation, properties, and cytocompatibility. **J Biomed Mater Res A** 84:198-207.

146. De Mel A, Jell G, Stevens MM, Seifalian AM. (2008) Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review. **Biomacromolecules** 9:2969-2979.
147. Könönen M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I. (1992) Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. **J Biomed Mater Res** 26:1325-1341.
148. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. (2007) Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing. **Biomaterials** 28:5009-5027.
149. Zhang Z, Wang Z, Liu S, Kodama M. (2004) Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small-diameter microporous polyurethane vascular prostheses. **Biomaterials** 25:177-187.
150. Chung T-W, Liu D-Z, Wang S-Y, Wang S-S. (2003) Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. **Biomaterials** 24:4655-4661.
151. Kim MS, Shin YN, Cho MH, Kim SH, Kim SK, Cho YH, et al. (2007) Adhesion behavior of human bone marrow stromal cells on differentially wettable polymer surfaces. **Tissue Eng** 13:2095-2103.
152. Engler AJ, Rehfeldt F, Sen S, Discher DE. (2007) Microtissue elasticity: measurements by atomic force microscopy and its influence on cell differentiation. **Methods Cell Biol** 83:521-545.
153. Shin H, Jo S, Mikos AG. (2003) Biomimetic materials for tissue engineering. **Biomaterials** 24:4353-4364.
154. Advincula R, Aust E, Meyer W, Knoll W. (1996) *In Situ* Investigations of Polymer Self-Assembly Solution Adsorption by Surface Plasmon Spectroscopy. **Langmuir** 12:3536-3540.
155. Lvov Y, Ariga K, Onda M, Ichinose I, Kunitake T. (1999) A careful examination of the adsorption step in the alternate layer-by-layer assembly of linear polyanion and polycation. **Colloids Surf Physicochem Eng Asp** 146:337-346.
156. Ladam G, Schaad P, Voegel JC, Schaaf P, Decher G, Cuisinier F. (2000) In Situ Determination of the Structural Properties of Initially Deposited Polyelectrolyte Multilayers. **Langmuir** 16:1249-1255.
157. Hiller J, Mendelsohn JD, Rubner MF. (2001) Reversibly erasable nanoporous anti-reflection coatings from polyelectrolyte multilayers. **Nat Mater** 1:59-63.
158. Eckle M, Decher G. (2001) Tuning the Performance of Layer-by-Layer Assembled Organic Light Emitting Diodes by Controlling the Position of Isolating Clay Barrier Sheets. **Nano Lett** 1:45-49.
159. Tang Z, Kotov NA, Magonov S, Ozturk B. (2002) Nanostructured artificial nacre. **Nat Mater** 2:413-418.

160. Miller MD, Bruening ML. (2004) Controlling the nanofiltration properties of multilayer polyelectrolyte membranes through variation of film composition. **Langmuir ACS J Surf Colloids** 20:11545-11551.
161. Picart C. (2008) Polyelectrolyte multilayer films: from physico-chemical properties to the control of cellular processes. **Curr Med Chem** 15:685-697.
162. Etienne O, Schneider A, Taddei C, Richert L, Schaaf P, Voegel J-C, et al. (2005) Degradability of polysaccharides multilayer films in the oral environment: an in vitro and in vivo study. **Biomacromolecules** 6:726-733.
163. Wood KC, Boedicker JQ, Lynn DM, Hammond PT. (2005) Tunable drug release from hydrolytically degradable layer-by-layer thin films. **Langmuir ACS J Surf Colloids** 21:1603-1609.
164. Garza JM, Jessel N, Ladam G, Dupray V, Muller S, Stoltz J-F, et al. (2005) Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartiment films. **Langmuir ACS J Surf Colloids** 21:12372-12377.
165. Boura C, Menu P, Payan E, Picart C, Voegel JC, Muller S, et al. (2003) Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. **Biomaterials** 24:3521-3530.
166. Boura C, Muller S, Vautier D, Dumas D, Schaaf P, Claude Voegel J, et al. (2005) Endothelial cell--interactions with polyelectrolyte multilayer films. **Biomaterials** 26:4568-4575.
167. Moby V, Boura C, Kerdjoudj H, Voegel J-C, Marchal L, Dumas D, et al. (2007) Poly(styrenesulfonate)/poly(allylamine) multilayers: a route to favor endothelial cell growth on expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular grafts. **Biomacromolecules** 8:2156-2160.
168. Kerdjoudj H, Boura C, Moby V, Montagne K, Schaaf P, Voegel J-C, et al. (2007) Re-endothelialization of Human Umbilical Arteries Treated with Polyelectrolyte Multilayers: A Tool for Damaged Vessel Replacement. **Adv Funct Mater** 17:2667-2673.
169. Moby V, Kadi A, de Isla N, Stoltz JF, Menu P. (2008) Polyelectrolyte multilayer films: effect of the initial anchoring layer on the cell growth. **Biomed Mater Eng** 18:199-204.
170. Berthelemy N, Kerdjoudj H, Gaucher C, Schaaf P, Stoltz J-F, Lacolley P, et al. (2008) Polyelectrolyte Films Boost Progenitor Cell Differentiation into Endothelium-like Monolayers. **Adv Mater** 20:2674-2678.
171. Berthelemy N, Kerdjoudj H, Schaaf P, Prin-Mathieu C, Lacolley P, Stoltz J-F, et al. (2009) O2 level controls hematopoietic circulating progenitor cells differentiation into endothelial or smooth muscle cells. **PLoS One** 4:e5514.

172. Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. (2006) Microscale technologies for tissue engineering and biology. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103:2480-2487.
173. Mayer JE Jr, Shin'oka T, Shum-Tim D. (1997) Tissue engineering of cardiovascular structures. **Curr Opin Cardiol** 12:528-532.
174. Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, et al. (1995) Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. **Ann Thorac Surg** 60:S513-516.
175. Shinoka T, Shum-Tim D, Ma PX, Tanel RE, Isogai N, Langer R, et al. (1998) Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. **J Thorac Cardiovasc Surg** 115:536-545; discussion 545-546.
176. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. (2001) Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. **N Engl J Med** 344:532-533.
177. Hibino N, Imai Y, Shin-oka T, Aoki M, Watanabe M, Kosaka Y, et al. (2002) [First successful clinical application of tissue engineered blood vessel]. **Kyobu Geka** 55:368-373.
178. Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N, Naito Y, Watanabe M, Konuma T, et al. (2005) Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. **J Thorac Cardiovasc Surg** 129:1330-1338.
179. Hibino N, McGillicuddy E, Matsumura G, Ichihara Y, Naito Y, Breuer C, et al. (2010) Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. **J Thorac Cardiovasc Surg** 139:431-436, 436.e1-2.
180. Breuer CK. (2011) The development and translation of the tissue-engineered vascular graft. **J Pediatr Surg** 46:8-17.
181. L'Heureux N, Dusserre N, Konig G, Victor B, Keire P, Wight TN, et al. (2006) Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. **Nat Med** 12:361-365.
182. L'Heureux N, McAllister TN, de la Fuente LM. (2007) Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. **N Engl J Med** 357:1451-1453.
183. McAllister TN, Maruszewski M, Garrido SA, Wystrychowski W, Dusserre N, Marini A, et al. (2009) Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. **Lancet** 373:1440-1446.
184. Peck M, Gebhart D, Dusserre N, McAllister TN, L'Heureux N. (2012) The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. **Cells Tissues Organs** 195:144-158.
185. Abstracts From the Emerging Science Series, April 24, 2013. **Circulation** 127:2071-2072.

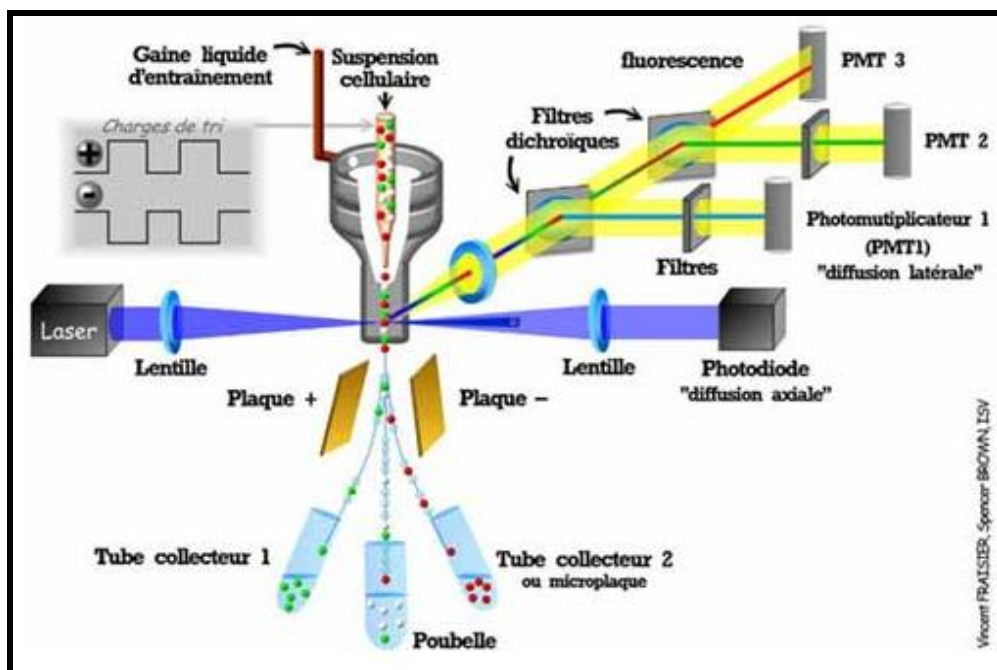
186. Wystrychowski W, Cierpka L, Zagalski K, Garrido S, Dusserre N, Radochonski S, et al. (2011) Case study: first implantation of a frozen, devitalized tissue-engineered vascular graft for urgent hemodialysis access. **J Vasc Access** 12:67-70.
187. Hibino N, Yi T, Duncan DR, Rathore A, Dean E, Naito Y, et al. (2011) A critical role for macrophages in neovessel formation and the development of stenosis in tissue-engineered vascular grafts. **FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol** 25:4253-4263.
188. Mima Y, Fukumoto S, Koyama H, Okada M, Tanaka S, Shoji T, et al. (2012) Enhancement of cell-based therapeutic angiogenesis using a novel type of injectable scaffolds of hydroxyapatite-polymer nanocomposite microspheres. **PloS One** 7:e35199.
189. Kerdjoudj H, Berthelemy N, Boulmedais F, Stoltz J-F, Menu P, Voegel JC. (2010) Multilayered polyelectrolyte films: a tool for arteries and vessel repair. **Soft Matter** 6:3722.
190. Moby V, Labrude P, Kadi A, Bordenave L, Stoltz JF, Menu P. (2011) Polyelectrolyte multilayer film and human mesenchymal stem cells: an attractive alternative in vascular engineering applications. **J Biomed Mater Res A** 96:313-319.
191. Tryoen-Tóth P, Vautier D, Haikel Y, Voegel J-C, Schaaf P, Chluba J, et al. (2002) Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. **J Biomed Mater Res** 60:657-667.
192. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. (2004) Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro. **Stem Cells** 22:377-384.
193. Descamps B, Emanuelli C. (2012) Vascular differentiation from embryonic stem cells: novel technologies and therapeutic promises. **Vascul Pharmacol** 56:267-279.
194. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. (2007) Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. **Cell Tissue Res** 327:449-462.
195. Anderson SB, Lin C-C, Kuntzler DV, Anseth KS. (2011) The performance of human mesenchymal stem cells encapsulated in cell-degradable polymer-peptide hydrogels. **Biomaterials** 32:3564-3574.
196. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, et al. (2001) Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. **Nat Med** 7:1035-1040.
197. Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, et al. (2003) Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. **J Appl Physiol Bethesda Md** 95:2081-2088.
198. Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, Miyazono K, Yamashita JK, Obi S, et al. (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** 288:H1915-1924.

199. Wang W, Itaka K, Ohba S, Nishiyama N, Chung U, Yamasaki Y, et al. (2009) 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. **Biomaterials** 30:2705-2715.
200. Gang EJ, Jeong JA, Han S, Yan Q, Jeon C-J, Kim H. (2006) In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. **Cytotherapy** 8:215-227.
201. Zhu S-F, Zhong Z-N, Fu X-F, Peng D-X, Lu G-H, Li W-H, et al. (2013) Comparison of cell proliferation, apoptosis, cellular morphology and ultrastructure between human umbilical cord and placenta-derived mesenchymal stem cells. **Neurosci Lett** 541:77-82.
202. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell** 131:861-872.
203. Samuel R, Daheron L, Liao S, Vardam T, Kamoun WS, Batista A, et al. (2013) Generation of functionally competent and durable engineered blood vessels from human induced pluripotent stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 110:12774-12779.
204. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh Y-H, Li H, Lau F, et al. (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. **Cell Stem Cell** 7:618-630.
205. Pankajakshan D, Kansal V, Agrawal DK. (2012) In vitro differentiation of bone marrow derived porcine mesenchymal stem cells to endothelial cells. **J Tissue Eng Regen Med**
206. Lozito TP, Kuo CK, Taboas JM, Tuan RS. (2009) Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix. **J Cell Biochem** 107:714-722.
207. Vittorio O, Jacchetti E, Pacini S, Cecchini M. (2013) Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells: when traditional biology meets mechanotransduction. **Integr Biol Quant Biosci Nano Macro** 5:291-299.
208. Alaminos M, Pérez-Köhler B, Garzón I, García-Honduvilla N, Romero B, Campos A, et al. (2010) Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. **J Cell Physiol** 223:640-647.
209. Tenney RM, Discher DE. (2009) Stem cells, microenvironment mechanics, and growth factor activation. **Curr Opin Cell Biol** 21:630-635.
210. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, et al. (2007) The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. **Nat Mater** 6:997-1003.
211. Rus Ciucă D, Sorițău O, Sușman S, Pop VI, Mișu CM. (2011) Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stem cells from the placenta. **Romanian J Morphol Embryol Rev Roum Morphol Embryol** 52:803-808.

Annexes

La cytométrie en flux permet de caractériser le phénotype d'un ensemble de cellules marquées par Immunocytochimie. Elle permet d'évaluer statistiquement la proportion de cellules qui, dans une même population, expriment une protéine. Les cellules en suspension passent une à une devant un ou plusieurs faisceau(x) laser et des détecteurs captent des signaux émis par chaque cellule tels que :

- * La lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des particules ;
- * La lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter-SSC) qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules.



Principe de la cytométrie en flux : Les cellules passent une par une devant un laser. Les signaux récoltés dans un angle de 90° par rapport à la source du laser (SSC), sont ensuite filtrés, puis récoltés par les photomultiplicateurs (PMT), et numérisés par un ordinateur. Ainsi des valeurs semi quantitatives de fluorescence, de granulométrie seront analysées par traitement informatique. Quant aux signaux récoltés par le détecteur de diffraction (FSC), ils

permettent de donner des informations sur la taille des cellules. (Source : Plateforme Imagerie et Biologie Cellulaire CNRS-IMAGIF, Gif-sur-Yvette, France)

Le laser peut exciter le fluorochrome qui va émettre de l'énergie à une longueur d'onde supérieure à celle du laser et la fluorescence va être captée par l'appareil. Ainsi, les données de ces paramètres vont être collectées par des photomultiplicateurs (PMT), puis amplifiées, numérisées, traitées et finalement stockées par un ordinateur. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres et permet de savoir pour une population donnée le pourcentage de cellules positives à un immunomarquage. Les signaux de fluorescence sont :

- * la fluorescence émise par la cellule elle-même (autofluorescence) ;
- * la fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome et qui se lie spécifiquement à la cellule.

Les données ainsi recueillies se présentent sous forme de graphiques ou d'histogrammes auxquels s'ajoutent des statistiques concernant les populations cellulaires et les paramètres étudiés (% , coefficient de variation (CV), intensité de fluorescence, etc.). Le principal avantage de la cytométrie en flux est la vitesse d'acquisition des données pour un très grand nombre de cellules, permettant l'analyse de sous-populations cellulaires complexes et/ou rares et de les trier pour ensuite les mettre en culture ou encore les analyser avec des outils de biologie moléculaire. Cette technique a permis d'identifier les protéines membranaires appelées clusters de différenciation (CD), dont la présence ou l'absence permet de déterminer le phénotype des cellules en prolifération ou en différenciation.

Résumé

L'incidence des maladies cardiovasculaires d'origine athéromateuse constitue un problème majeur en santé publique et malgré le développement de techniques curatives endovasculaires, la chirurgie demeure nécessaire chez de nombreux patients. La faible disponibilité des vaisseaux naturels, autologues ou non, et les limites mécaniques et biologiques des substituts artificiels pour le remplacement des vaisseaux de petit calibre, imposent le recours à une nouvelle science : l'ingénierie vasculaire. Ce concept a émergé et évolué depuis quelques années. Il pourrait permettre de proposer de nouveaux types de substituts vasculaires synthétiques et/ou biologiques, en particulier grâce à l'utilisation de cellules souches, 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 cellules souches mésenchymateuses (CSMs) issus de la gelée de Wharton (GW) du cordon ombilical et de la moelle osseuse (MO). Cependant, la différenciation de ces cellules nécessite une fonctionnalisation de la surface de culture, et notre groupe a démontré l'avantage des films multicouches de polyelectrolytes, constitués de PAH (hydrochlorure de poly(allylamine)) et de PSS (poly(styrène sulfonate)), sur l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. Les cellules ont été cultivées sur films (PAH-PSS)₄ ou sur collagène de type I (témoin), en présence de facteurs de croissance angiogéniques. La différenciation en cellules endothéliales (CEs) a été suivie par l'expression des marqueurs endothéliaux (PCR et western blot), et la fonctionnalité par leur capacité à incorporer les lipoprotéines acétylées (Ac-LDLs) ainsi que la capacité à produire du monoxyde d'azote et à exprimer le facteur von Willebrand (vWF). Après 14 jours de stimulation, seules les CSM-GWs étaient différenciées en CEs fonctionnelles démontrant l'intérêt de combiner l'utilisation des CSM-GWs et des films (PAH-PSS)₄ dans le domaine de l'ingénierie vasculaire.

Mots clés : Cellules mésenchymateuses humaines, différenciation cellulaire, films multicouches de polyelectrolytes, cellules endothéliales, ingénierie vasculaire.

Abstract

The incidence of cardiovascular disease remains a major public health problem. Despite the development of endovascular therapies, surgical treatment is necessary for many patients. The low availability of natural vessels, autologous or not, and the mechanical and biological limits of artificial substitutes, led to the use of a new domain: vascular engineering. In recent years, the concept has emerged and evolved. He could afford to offer new types of synthetic vascular substitutes and / or biological, in particular through the use of stem cells, offering interesting perspectives in the field of vascular engineering. The purpose of this study was to obtain a reliable and reproducible protocol to generate functional endothelial cells (ECs) from mesenchymal stem cells (MSCs) derived from the umbilical cord Wharton's jelly (WJ) and bone marrow (BM). Nevertheless, their differentiation into vascular cells needs a culture surface functionalization; our group demonstrated the potential use of polyelectrolyte multilayer made of poly(allylamine hydrochloride): PAH, and poly(styrene sulfonate): PSS, in promoting cells adhesion, proliferation and differentiation. Cells were cultured on (PAH-PSS)₄ films or collagen type I (used as control), in the presence of angiogenic growth factors. Cells differentiation into EC was followed through the expression of endothelial markers (PCR and western blot); cell functionality was checked through their ability to incorporate acetylated LDL (Low Density Lipoprotein), to produce NO (Nitric oxide) and to express the von Willebrand factor (vWF). After 14 days of stimulation, only WJ-MSCs were able to generate functional ECs demonstrating the potential of combining WJ-MSCs and (PAH-PSS)₄ films in vascular tissue engineering field.

Key words: Mesenchymal stem cells, cell differentiation, polyelectrolytes multilayer films, endothelial cells, vascular engineering.