



## AVERTISSEMENT

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

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

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

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

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

## **Ecole doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

### **Thèse**

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention "Sciences de la vie et de la santé"

Par **Chaza HARMOUCH**

## **Évaluation de l'adhésion et de la différenciation endothéliale de cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical humain sur des supports fonctionnalisés du type chitosane/hyaluronane**

Soutenue le 29 janvier 2014

### **Membres du jury :**

#### **Rapporteurs :**

M. Philippe LAVALLE	Directeur de Recherche Inserm, UMR 1121, Strasbourg
Mme Dominique-Laurent MAQUIN	Professeur des Universités-Praticien hospitalier, EA BioS 4691, SFR CapSanté, Université Reims Champagne-Ardennes, Reims

#### **Directeurs de la thèse :**

M. Pierre LABRUDE	Professeur des Universités, CNRS, UMR 7365, Université de Lorraine, Nancy
Mme Halima KERDJOUDJ	Maître de Conférences des Universités, EA BioS 4691, SFR, CapSanté, Université de Reims Champagne-Ardennes, Reims

#### **Membres du jury :**

M. Patrick MENU	Professeur des Universités, CNRS, UMR 7365, Université de Lorraine, Nancy
Mme Nathalie MERCIER	Maître de Conférences des Universités, Inserm, UMR 961, Université de Lorraine, Nancy



# REMERCIEMENTS

*A ma mère et à mon père, Vous êtes mes racines et ma destination de prédilection, où l'on sait que l'air est doux, Vous m'avez transmis la persévérance, la volonté et le goût de la vie*

*A mon frère Ezzeddine et à mes Soeurs Abir et Fatima, Vous m'avez supportée et m'avez apporté votre soutien*

*A mon neveu Mido et à mes nièces Sara et Tala, Mes petits anges gardiens*

*A mon oncle Mohammad et sa femme Nada, Vous étiez ma famille ici en France, je n'oublierai jamais les vacances d'été 2012 que j'ai passées parmi vous*

*A Omar, mon sel, formidable exhausteur des arômes de la vie!  
Mon amour, cette thèse t'est dédiée*

Je suis convaincue, à l'issue de la rédaction de cette recherche, que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sous le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de l'*apprenti-chercheur*.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur **Pierre Labrude**, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je lui ai adressés. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

J'exprime ma reconnaissance et ma gratitude à Madame le Docteur **Halima Kerdjoudj**, ma co-directrice de thèse, qui a su guider les débuts de ce travail avec une profonde connaissance du sujet. Je la remercie plus spécialement pour les nombreuses discussions et suggestions précieuses au cours du déroulement de cette thèse et pour ses encouragements pour rédiger mes articles.

Je souhaite aussi remercier Monsieur le Professeur *Patrick Menu*, le chef de notre équipe "Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Vectorisation", pour m'avoir acceptée dans l'unité de recherche et confié cette thèse.

Je souhaiterais aussi remercier Monsieur le Professeur *Jean-Yves Jouzeau*, directeur de l'UMR 7365, pour m'avoir acceptée dans l'unité de recherche, pour sa gentillesse, et pour son soutien.

Je tiens à remercier également Monsieur le Docteur *Norman Makdissy* pour sa gentillesse à mon égard et son soutien constant. Je lui exprime ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier Madame le Professeur *Dominique Laurent Maquin*, pour m'avoir accueillie pendant 6 mois dans son équipe de recherche EA BioS 4691 à Reims et pour sa gentillesse.

J'exprime ma gratitude et mon profond respect à Madame le Professeur *Dominique Laurent Maquin*, ainsi qu'à Monsieur le Professeur *Philippe Laval* pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Je remercie Mademoiselle le Docteur *Fouzia Boulmedais*, pour son soutien et pour sa disponibilité à me répondre quand j'avais des soucis avec la chimie de mes polymères.

Je remercie Monsieur le Professeur *Raphael Duval*, pour la confiance qu'il m'a donnée pour que je puisse tester l'activité anti-bactérienne de mes produits. J'ai beaucoup apprécié son caractère sérieux et gentil.

Un grand merci à Madame le Docteur *Nathalie Mercier*, membre du comité de suivi de ma thèse et avec qui j'ai réalisé mes manipulations de biologie moléculaires. Elle a été toujours patiente et gentille.

Mesdames Ghislaine Cauchois, Monique Gentils et Brigitte Guerber, pour leur gentillesse à mon égard et leur soutien constant. Je leur exprime ma profonde reconnaissance.

Chaleureux remerciements à vous mes collègues :

- \* En particulier Reine, elle a été ma partenaire des bas fonds, exercice de remontée assistée parfait. En tout cas pour moi tu es une vraie soeur
- \* Hassan, "Ghandi", partenaire de galère, nous étions constamment des co-auteurs et je n'oublierai jamais les moments durs qu'on a passés et dépassés ensemble
- \* A Jaqueline, elle est "un amour"!
- \* A Pan, Il a un sourire qui soulage toute l'équipe
- \* A Mostafa, merci pour les pauses café qu'on a passé ensemble en discutant de nos problèmes
- \* A Mathieu, Sarsour kbir, il a appris le libanais et il le pratique comme s'il avait des racines libanaises ! Merci pour les majnoun moments qu'on a passés ensemble

Merci à tous les membres du Biopôle, toutes les personnes croisées dans les couloirs, au café, dans les laboratoires ou à l'administration sans qui ces trois années n'auraient pas été assez riches.

Merci à tous mes amis à Nancy, particulièrement au "clan libanais : Rose, Rasha, Hassan Melhem, Ali, Maryam, Fatima et Talar" et la seule égyptienne : Maryam, sans qui je ne pourrais pas supporter tout le stress que j'ai vécu durant le déroulement de cette thèse.



# Liste des publications

**C. HARMOUCH**, R. EL-OMAR, P. LABRUDE, V. DECOT, P. MENU and H. KERDJOUJ.

Influence of serum percentage on the behavior of wharton's jelly mesenchymal stem cells in culture. *BMME : Biomedical Materials and Engineering*, (2013), 23 :273–280).

**C. HARMOUCH**, H. RAMMAL, F. DRAUX, D.L. MAQUIN, F. BOULMEDAIS, B. FRISH, P. MENU, P. LABRUDE et H. KERDJOUJ.

An ingenious biomaterial for vascular engineering : Functionalized Chitosane/Hyaluronane polyelectrolyte multilayers. (Article en fin de rédaction).

H. RAMMAL, **C. HARMOUCH**, M. GENTILS, F. BOULMEDAIS, P. LABRUDE, H. KERDJOUJ and P. MENU.

The potential of Mesenchymal stem cells in advancing the field of vascular tissue engineering. (Article en preparation).

**C. HARMOUCH**, H. RAMMAL, P. LABRUDE, H. KERDJOUJ and P. MENU.

Stem Cells in vascular tissue engineering. (Revue soumise dans *Stem Cells*).





# Liste des présentations orales

**C. HARMOUCH**, H. RAMMAL, F. DRAUX, D.L. MAQUIN, F. BOULMEDAIS, B. FRISH, P. MENU, P. LABRUDE et H. KERDJOUJ.

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. HARMOUCH**, M. GENTILS, F. BOULMEDAIS, H. KERDJOUJ 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.



# Liste des présentations affichées

**C. HARMOUCH**, H. RAMMAL, F. DRAUX, D.L. MAQUIN, F. BOULMEDAIS, B. FRISH, P. MENU, P. LABRUDE et H. KERDJOUJ.

Endothelial differentiation of hMSCs on Chitosan/Hyaluronan polyelectrolyte multi-layer films for vascular engineering. First symposium on Vascular tissue engineering, Leiden, Pays Bas, 27-29 Mai 2013, (fascicule, page 50).

H. RAMMAL, **C. HARMOUCH**, F. DRAUX, D.L. MAQUIN, F. BOULMEDAIS, B. FRISH, P. MENU, P. LABRUDE et H. KERDJOUJ.

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, (fascicule, page 78).

H. RAMMAL, **C. HARMOUCH**, 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, (fascicule des résumés, non paginé).

**C. HARMOUCH**, H. RAMMAL, F. DRAUX, D.L. MAQUIN, F. BOULMEDAIS, B. FRISH, P. MENU, P. LABRUDE et H. KERDJOUJ.

Différenciation endothéliale des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical humain sur des films multicouche de Chitosane/Hyaluronane pour l'ingénierie vasculaire. 8ème Journée Recherche Biomédicale, Nancy, 24 Mai 2013.

H. RAMMAL, **C. HARMOUCH**, J. BEROUD, M. GENTILS, F. BOULMEDAIS, E. VELOT, H. KERDJOUJ et 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, (fascicule des résumés, non paginé).

**C. HARMOUCH**, R. EL-OMAR, P. LABRUDE, V. DECOT, P. MENU and H. KERDJOUJ.

Influence of serum percentage on the behavior of Wharton's jelly mesenchymal stem cells in culture. 7e journées scientifiques du Pôle lorrain d'ingénierie du cartilage, Nancy, 18-19 Octobre 2012.

**C. HARMOUCH**, H. RAMMAL, F. DRAUX, B. FRISH, D.L. MAQUIN, F. BOULME-DAIS, P. MENU, P. LABRUDE et H. KERDJOUJ.

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, (fascicule des résumés, non paginé).

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des publications</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des présentations orales</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des présentations affichées</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>xxv</b>
<b>1 Types cellulaires utilisés en ingénierie tissulaire</b>	<b>1</b>
1.1 Lignées cellulaires immortalisées . . . . .	1
1.2 Cellules primaires . . . . .	2
1.3 Cellules souches . . . . .	2
1.3.1 Cellules souches totipotentes . . . . .	3
1.3.2 Cellules souches pluripotentes . . . . .	3
1.3.3 Cellules souches multipotentes . . . . .	4
1.3.3.1 Cellules souches mésenchymateuses . . . . .	5
Tissu de soutien ou niche des CSMs . . . . .	5
Propriétés immunologiques des CSMs . . . . .	7
Migration des CSMs . . . . .	8
1.3.4 Cellules souches unipotentes . . . . .	8
1.4 Revue : Les cellules souches : Une source prometteuse en médecine régénérative vasculaire . . . . .	9
<b>2 Biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire</b>	<b>51</b>
2.1 Définition du terme biomatériau . . . . .	51
2.2 Domaines d'application des biomatériaux . . . . .	51
2.3 Types de biomatériaux . . . . .	52
2.4 Propriétés de biomatériaux . . . . .	52
2.4.1 Principe de bioactivité . . . . .	53
2.4.1.1 Films multicouches de polyelectrolytes . . . . .	53
2.4.2 Principe de dépôt couche par couche . . . . .	54
2.4.2.1 Nature du substrat . . . . .	55
2.4.3 Chitosane . . . . .	55
2.4.3.1 Propriétés du chitosane . . . . .	58
Propriétés biologiques . . . . .	58

Effet du degré d'acétylation sur les propriétés biologiques . . . . .	58
Effet de la masse molaire sur les propriétés biologiques . . . . .	59
Activité antimicrobienne du chitosane . . . . .	59
Activité antifongique du chitosane . . . . .	60
Fonctionnalités et applications du chitosane . . . . .	61
Traitement des eaux usées . . . . .	61
Industrie agro-alimentaire . . . . .	61
Médecine . . . . .	61
Pharmacie . . . . .	61
Avantages du chitosane dans la préparation des biomatériaux . . . . .	62
2.4.4 Hyaluronane . . . . .	62
2.4.4.1 Propriétés biologiques de l'hyaluronane . . . . .	65
Rôle anti-inflammatoire de l'hyaluronane . . . . .	65
Rôle de l'hyaluronane dans les pathologies cardiovasculaires . . . . .	65
2.4.5 Scaffolds à base de chitosane et hyaluronane . . . . .	66
<b>3 Choix du microenvironnement cellulaire : systèmes de signalisation . . . . .</b>	<b>69</b>
3.1 Facteurs biochimiques et physico-chimiques . . . . .	69
3.1.1 Pression partielle en dioxygène . . . . .	70
3.1.2 Facteurs de croissance . . . . .	71
3.2 Facteurs mécaniques . . . . .	73
3.2.1 Contraintes mécaniques . . . . .	74
3.2.2 Bioréacteur . . . . .	75
<b>4 Applications de l'ingénierie tissulaire aux maladies vasculaires . . . . .</b>	<b>77</b>
4.1 Approches pour la création d'un substitut vasculaire . . . . .	78
4.1.1 Substituts synthétiques portant des cellules endothéliales . . . . .	79
4.1.1.1 Fonctions de l'endothélium vasculaire . . . . .	79
4.1.1.2 Caractérisation des cellules endothéliales . . . . .	80
Marqueurs membranaires des CEs . . . . .	80
Marqueurs intracellulaires des CEs . . . . .	81
Création d'un substitut vasculaire à base de cellules endothéliales . . . . .	82
4.1.2 Substituts vasculaires à base de collagène et de fibrine . . . . .	83
4.1.3 Substituts vasculaires basés sur des auto-assemblages cellulaires . . . . .	85
4.1.4 Substituts vasculaires basés sur des polymères synthétiques biodégradables . . . . .	85
4.1.5 Tissus décellularisés . . . . .	86

<b>5</b>	<b>Fonctionnalisation de chitosane et d'acide hyaluronique pour la construction de films réticulés</b>	<b>87</b>
5.1	Matériel et méthodes	87
5.1.1	Synthèse des polymères	87
5.1.1.1	Synthèse de HA-maléimide	88
	Mode de préparation	88
5.1.1.2	Synthèse de l'HA-N <sub>3</sub>	88
	Mode de préparation	89
5.1.1.3	Synthèse de l'HA-Thiopyridone	89
	Mode de préparation	89
5.1.1.4	Synthèse du CHI-Alcyne	90
	Mode de préparation	90
5.1.1.5	Synthèse du CHI-SH	90
	Mode de préparation	90
5.1.2	Croissance des films suivie par Microbalance à Cristal de Quartz (QCM)	91
5.1.3	Topographies des différents types de films CHI/HA par Microscopie à Force Atomique (AFM) à sec	91
5.2	Résultats	93
5.2.1	Résultats des analyses de la croissance des films	94
5.2.2	Résultats des analyses topographiques des films	96
<b>6</b>	<b>Techniques et matériels utilisés lors de cette thèse</b>	<b>99</b>
6.1	Cellules	99
6.1.1	Culture des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC)	99
6.1.1.1	Réactifs et matériels	99
	Milieu de culture	99
	Tampon HBSS (Hank's balanced salts solution)	99
6.1.1.2	Solutions de digestion	100
	Détachement des HUVECs de la veine ombilicale	100
	Solution de détachement des HUVECs des supports de culture	100
6.1.1.3	Culture des HUVECs	100
	Recueil des cordons	100
	Lavage de la veine ombilicale	100
	Détachement des cellules	100
	Evolution de la culture	100
	Aspect des cultures	101
	Passage en subcultures	101



6.1.2	Culture des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical humain (WJ-MSCs) . . . . .	101
6.1.2.1	Réactifs et matériel . . . . .	101
	Milieu de culture . . . . .	101
6.1.2.2	Culture des WJ-MSCs . . . . .	101
6.1.2.3	Amplification en monocouche des WJ-MSCs . . . . .	102
6.1.3	Caractérisation des CSMs par cytométrie en flux . . . . .	102
6.1.3.1	Principe . . . . .	102
6.1.3.2	Immunofluorescence indirecte . . . . .	104
6.1.3.3	Immunofluorescence directe . . . . .	104
	Analyse des échantillons cellulaires . . . . .	106
6.2	Biomatériaux . . . . .	107
6.2.1	Construction des films multicouche de polyélectrolytes . . . . .	107
6.2.1.1	Lavage des lames de verre . . . . .	107
6.2.1.2	Préparation des solutions de polyélectrolytes . . . . .	107
6.2.1.3	Préparations des films multicouche de polyélectrolytes . . . . .	107
6.3	Biocompatibilité des biomatériaux . . . . .	108
6.3.1	Observation des cellules au microscope électronique à balayage . . . . .	108
6.3.2	Vérification de l'étalement des cellules par immunomarquage des fibres d'actine avec la phalloïdine . . . . .	109
6.3.2.1	Protocole de l'immunomarquage des filaments d'actine . . . . .	109
6.3.3	Répartition des noyaux cellulaire/cm <sup>2</sup> . . . . .	110
6.3.4	Prolifération cellulaire par cristal violet . . . . .	110
6.4	Evaluation de la différenciation des CSMs en cellules endothéliales- <i>like</i> . . . . .	111
6.4.1	Etude de l'expression génique par RT-PCR . . . . .	111
6.4.1.1	Extraction des ARN . . . . .	111
6.4.1.2	La rétrotranscription RT . . . . .	111
6.4.1.3	PCR en temps réel . . . . .	112
6.4.2	Etude de l'expression protéique par Western Blot . . . . .	113
6.5	Evaluation de la fonctionnalité des cellules endothéliales- <i>like</i> . . . . .	114
6.5.1	Incorporation du Dil-Ac-LDL . . . . .	114
6.5.2	Immunomarquage du facteur prothrombinique de Von Willebrand . . . . .	115
<b>7</b>	<b>Résultats et discussions</b> . . . . .	<b>117</b>
7.1	Influence du pourcentage de sérum sur le comportement des CSMs issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical humain . . . . .	117
7.1.1	Introduction et objectifs de l'article . . . . .	117
7.1.2	Texte de l'article . . . . .	119
7.1.3	Résultats et discussion de l'article . . . . .	128

7.2	Mise au point du protocole de différenciation endothéliale des CSMs sur CHI/HA . . . . .	129
7.2.1	Matériel et méthodes . . . . .	129
7.2.2	Résultats et discussion . . . . .	129
7.3	Différenciation endothéliale des CSMs de la gelée de Wharton sur des films multicouche de polyélectrolytes de type chitosane/hyaluronane . . . . .	132
7.3.1	Introduction et objectifs de l'article . . . . .	132
7.3.2	Texte de l'article . . . . .	134
7.3.3	Résultats et discussion de l'article . . . . .	162
<b>8</b>	<b>Evaluation de l'effet des films CHI/HA sur la prolifération de quelques souches bactériennes</b> . . . . .	<b>165</b>
8.1	Matériel et méthodes . . . . .	165
8.1.1	Matériel et réactifs . . . . .	165
8.1.2	Souches bactériennes étudiées . . . . .	165
8.1.2.1	Mode opératoire . . . . .	166
8.2	Résultats . . . . .	166
<b>9</b>	<b>Conclusion générale</b> . . . . .	<b>171</b>
<b>A</b>	<b>Synthèse du HA-Maléimide</b> . . . . .	<b>175</b>
<b>B</b>	<b>Potentiel ostéogénique des CSMs sur CHI/HA</b> . . . . .	<b>181</b>
B.1	Matériel et méthodes . . . . .	181
B.2	Résultats . . . . .	182
	<b>Bibliographie</b> . . . . .	<b>185</b>



# Table des figures

2.1	Quelques dates d'apparition des biomatériaux [Durrieu, 2005] . . . . .	52
2.2	Principe du transfert d'une monocouche par la méthode de Langmuir [Blodgett and Langmuir, 1937] . . . . .	54
2.3	Schéma simplifié de la construction d'une multicouche de polyélectrolytes par adsorptions successives de polycations et de polyanions . . . . .	55
2.4	Chitosane : unité polymérique . . . . .	56
2.5	Production de la chitine et du chitosane à partir des exosquelettes des crustacés . . . . .	57
2.6	Unité de répétition disaccharidique de l'hyaluronane . . . . .	63
3.1	Comportement de cellules isolées à l'état individuel et état dynamique de tissus régulés par des interactions moléculaires réciproques entre les cellules et leur environnement [Lutolf and Hubbell, 2005] . . . . .	70
3.2	Les différents signaux biophysiques et les complexes d'interactions moléculaires de la MEC. Les signaux biophysiques comprennent la rigidité et la topographie de la matrice, la contrainte de cisaillement, les forces de contrainte, et d'autres forces mécaniques exercées par les cellules de soutien adjacentes (en bleu). Les cellules souches peuvent détecter ces stimuli biophysiques grâce à des mécanorécepteurs comme les canaux ioniques, les adhérences focales, les récepteurs de surface cellulaire, le cytosquelette d'actine et les adhésions cellule-cellule (en rouge). Un agrandissement de la structure d'adhésion focale est également représenté, comprenant des intégrines hétérodimériques transmembranaires, la paxilline (Pax), la taline, la kinase d'adhésion focale (FAK), la vinculine (Vin), la zyxine, et un vasodilatateur stimulé par une phosphoprotéine (VASP) [Sun et al., 2012] . . . . .	73
3.3	Courbes théoriques des forces (axiale, transversale et cisaillement) agissant sur le substrat en fonction de l'orientation [Fawzi-Grancher, 2006] . . . . .	75
3.4	Les éléments clés d'un bioréacteur [Badylak et al., 2012] . . . . .	76

4.1	Comparaison histologique d'un substitut vasculaire obtenu par ingénierie tissulaire (SVIT) à une veine cave inférieure native (VCI) après 6 mois de mise en place <i>in vivo</i> . Microphotographies représentatives de la caractérisation immunohistochimique de la VCI native par rapport aux SVITs 6 mois après l'implantation (CD31 (marqueur de cellules endothéliales) et calponine (marqueur de cellules musculaires lisses). Les biomatériaux sont entièrement dégradés à 6 mois et les SVITs possèdent une architecture de tissu semblable à une veine native avec une structure stratifiée constituée d'une couche intimale endothélialisée et d'une couche médiane de muscle lisse [Weinberg and Bell, 1986] . . . . .	84
5.1	Structure chimique du chitosane . . . . .	87
5.2	Structure chimique de l'acide hyaluronique . . . . .	87
5.3	Structure chimique du HA-maléimide . . . . .	88
5.4	Structure chimique du HA-N <sub>3</sub> . . . . .	89
5.5	Structure chimique du HA-Thiopyridone . . . . .	89
5.6	Structure chimique du CHI-Alcyne . . . . .	90
5.7	Structure chimique du CHI-SH . . . . .	90
5.8	Représentation schématique d'un microscope à force atomique . . . . .	93
5.9	Schéma montrant les interactions covalentes qui se forment entre les polymères modifiés : A : entre CHI-SH et HA-Mal, B : entre CHI-SH et HA-Thio, et C : entre CHI-Alcyn et HA-N <sub>3</sub> . . . . .	94
5.10	Evolution de l'opposé de la fréquence normalisée de la troisième harmonique, mesurée par QCM, en fonction de la dernière couche déposée lors de la construction des films. A : CHI/HA et CHI-SH/HA-Mal et B : CHI-Alcyn/HA-N <sub>3</sub> et CHI-SH/HA-Thio à pH 5,5 dans 0,15 M NaCl. Le résultat exprimé est la moyenne de deux expériences . . . . .	95
5.11	Morphologie obtenue par AFM des films construits par QCM à pH 5,5 dans 0,15 M NaCl. A : CHI/HA, B : CHI-SH/HA-Mal, C : CHI-Alcyn/HA-N <sub>3</sub> et D : CHI-SH/HA-Thio. L'échelle (x,y) représente 2 $\mu$ m, celle en z (A) représente 30 nm et (B, C et D) 50 nm . . . . .	96
6.1	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 (extrait du site <a href="http://pedagogie.ac-amiens.fr">pedagogie.ac-amiens.fr</a> ) . . . . .	103

6.2	Principe de l'immunofluorescence indirecte . . . . .	104
6.3	Principe de l'immunofluorescence directe . . . . .	104
6.4	Anticorps impliqués dans un immunomarquage direct . . . . .	105
6.5	Anticorps impliqués dans un immunomarquage indirect . . . . .	105
6.6	Protocole de construction des films multicouche de polyélectrolytes . . . . .	108
6.7	Séquences des amorces utilisées pour la PCR en temps réel . . . . .	112
6.8	Principe de la réaction de PCR en temps réel basée sur la technologie SybrGreen . . . . .	113
7.1	Double immunomarquage des noyaux (bleu), et du marqueur endothélial CD31 pour les CSMs stimulées et non stimulées après 15 jours de culture sur collagène, CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio (Zeiss Microscope, objectif*20). N=3. . . . .	129
7.2	Double immunomarquage des noyaux (bleu), et du marqueur endothélial CD31 pour les CSMs stimulées et non stimulées après 15 jours de culture sur collagène, CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio (Zeiss Microscope, objectif*63 oil), n=3. . . . .	130
8.1	Histogrammes montrant l'évaluation de la croissance bactérienne de la souche <i>E. coli</i> sur des films de type CHI/HA et du verre comme témoin positif. Moyenne $\pm$ écart-type, n=3 . . . . .	167
8.2	Histogrammes montrant l'évaluation de la croissance bactérienne de la souche <i>S. aureus 1</i> sur des films de type CHI/HA et du verre comme témoin positif. Moyenne $\pm$ écart-type, n=3 . . . . .	167
8.3	Histogrammes montrant l'évaluation de la croissance bactérienne de la souche <i>S. aureus 2</i> sur des films de type CHI/HA et du verre comme témoin positif. Moyenne $\pm$ écart-type, n=3 . . . . .	167
8.4	Histogrammes montrant l'évaluation de la croissance bactérienne de la souche <i>P. aeruginosa</i> sur des films de type CHI/HA et du verre comme témoin positif. Moyenne $\pm$ écart-type, n=3 . . . . .	168
8.5	Histogrammes montrant l'évaluation de la croissance bactérienne de la souche <i>E. faecalis</i> sur des films de type CHI/HA et du verre comme témoin positif. Moyenne $\pm$ écart-type, n=3 . . . . .	168
8.6	Photos en MEB des colonies bactériennesensemencées pendant 4h à 37°C sur : a : CHI/HA et b : verre. JEOL Phillips Microscope*1500, n=3 . . . . .	169
B.1	Photos du double marquage par immunofluorescence des noyaux (bleu) et d'ostéocalcine (FITC) des CSMs stimulées (a) et non stimulées (b) après 15 jours de culture sur CHI/HA (Zeiss Microscope, objectif*63 oil), n=3 . . . . .	182

---

B.2	Photos du double marquage par immunofluorescence des noyaux (bleu) et d'ostéopontine (FITC) des CSMs stimulées (a) et non stimulées (b) après 15 jours de culture sur CHI/HA (Zeiss Microscope, objectif*63 oil), n=3 . . . . .	183
B.3	Evaluation des dépôts de minéralisation calcique après 15 jours de différenciation ostéogénique (culture en monocouche), après coloration par le rouge d'alizarine (Zeiss Microscope, objectif*63 oil), n=3 . . . . .	183

# Liste des tableaux

2.1	Domaine d'application de l'ingenierie tissulaire . . . . .	67
8.1	Pourcentages d'inhibition de la croissance bacterienne . . . . .	169





# Liste des abréviations

b-FGF : basic fibroblast growth factor : facteur de croissance fibroblastique basique.

BSA : sérum albumine bovine.

CD : cluster de différenciation.

CE : cellule endothéliale.

CEP : cellule progénitrice endothéliale.

CHI : chitosane.

CML : cellule musculaire lisse.

CSEs : cellules souches embryonnaires.

CSH : cellules souches hématopoïétiques.

CSM : cellule souche mésenchymateuse.

CSN : cellules souches neurales.

CV : coefficient de variation.

DA : degré d'acétylation.

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole.

Dil-Ac-LDL : 1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthyl-indocarbocyanine, perchlorate-labeled acetylated low density lipoprotein.

EBM2 : milieu endothélial basal.

e-NOS : synthase d'oxyde nitrique endothéliale.

ePTFE : polytétrafluoroéthylène.

GAG : glycoasminoglycane.

HA : hyaluronane.

HB-EGF : heparin binding epidermal growth factor-like factor.

HIF-1 : hypoxia inducible factor 1 : facteur induisant l'hypoxie.

HUVEC : cellules endothéliales de veine ombilicale humaine  
IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase.

INF : interféron-gamma.

KDR : récepteur du domaine kinase.

LBL : layer-by-layer : couche-par-couche.

MEB : microscopie électronique à balayage.

MEC : matrice extracellulaire.

PAA : poly-allylamine.

PAF : paraformaldéhyde.

PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1.

PCL : poly-caprolactone.

PCR : réaction de polymérisation en chaîne.

PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes.

PGA : acide polyglycolique.

PGE2 : prostaglandine 2.

PMT : tension du photomultiplicateur.

PSI : petite sous muqueuse intestinale.

PSS : polystyrène sulfonate.

RT : rétrotranscription.

Si : silice.

SVF : sérum de veau foetal.

TNF : facteur de nécrose tumorale.

VEGF : facteur de croissance endothéliale vasculaire.

vWF : facteur de von Willebrand.

WB : western blot.

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le développement spectaculaire des biotechnologies et leur élargissement à de nombreuses branches d'activité ont entraîné l'émergence de nouveaux domaines de recherche et l'introduction de nouveaux concepts susceptibles de pallier le manque d'organes. C'est ainsi qu'au cours de ces deux dernières décennies, est apparue une nouvelle discipline basée sur les concepts du génie biologique, l'ingénierie tissulaire.

Cette discipline permet de concevoir en laboratoire un substitut apte à être utilisé dans une application spécifique. Par essence transdisciplinaire, l'ingénierie tissulaire fait appel à plusieurs domaines comme la biologie (culture cellulaire), la chimie (synthèse et développement de matrices implantables), la physique et les sciences de l'ingénieur (conception de bioréacteurs).

Pour concevoir des tissus fonctionnels, les cellules (hôtes et/ou issues d'un donneur) doivent être "munies" de repères spatiaux et temporels appropriés pour permettre la croissance, la différenciation et la synthèse d'une matrice extracellulaire (MEC) d'un volume suffisant et d'intégrité fonctionnelle.

La définition de l'ingénierie tissulaire comme étant l'ensemble des méthodes et techniques s'inspirant de l'ingénierie et des sciences de la vie pour développer des substituts biologiques pouvant maintenir, améliorer et restaurer les fonctions des tissus vivants [Skalak and Fox, 1988], nécessite de comprendre les relations structure fonction dans les tissus normaux et malades et d'utiliser ces données comme critères de conception pour l'ingénierie de nouveaux tissus. De nombreuses approches d'ingénierie tissulaire sont basées sur le triade du génie tissulaire, qui dérive des trois principaux composants des tissus : les cellules, leur MEC et les systèmes de signalisation [Lanza et al., 2011] (Fig 1). Un tissu fonctionnel peut être développé par l'utilisation d'un ou de plusieurs de ces composants.

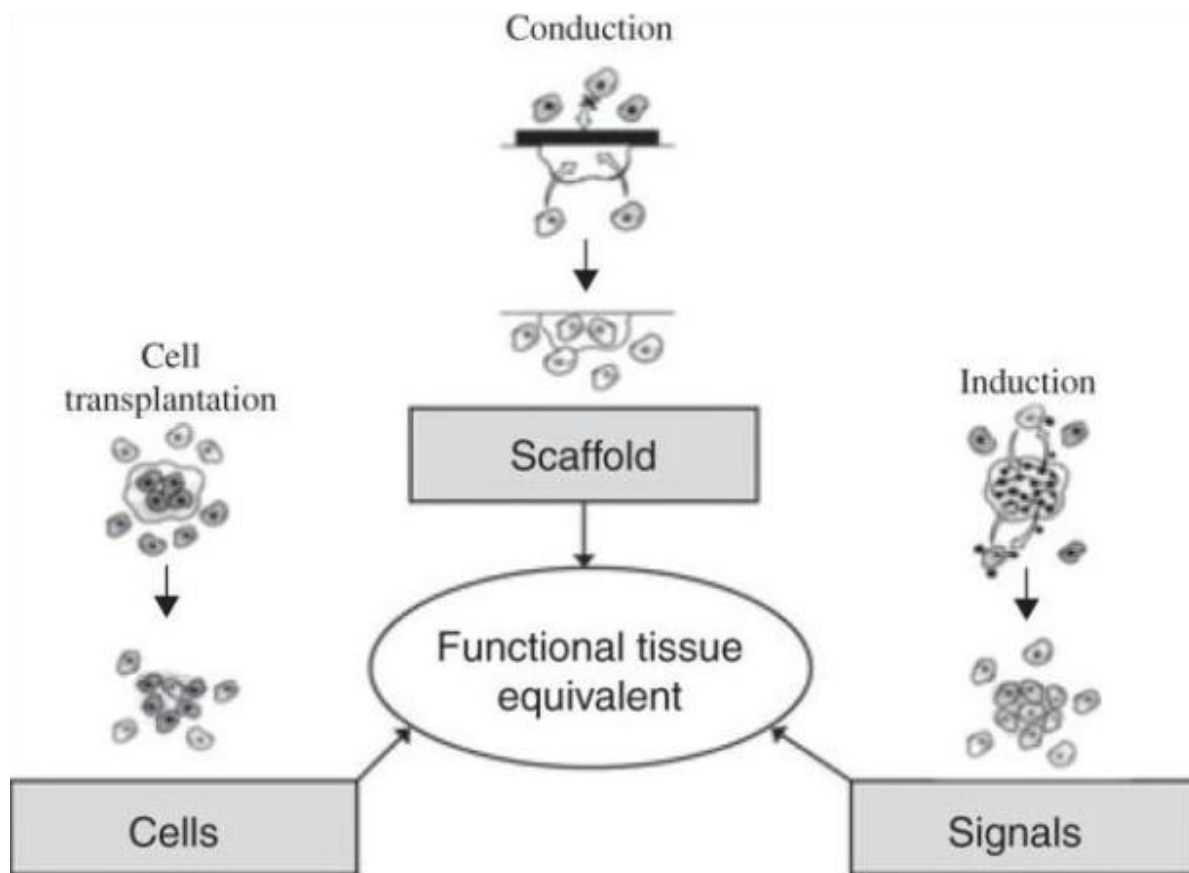


FIGURE 1 – Triade de l'ingénierie tissulaire [Lanza et al., 2011]

Les biomatériaux sont clairement le centre de l'avancement de l'ingénierie tissulaire et une variété de «scaffolds» ont été développés comme les analogues de la MEC assurant l'adhésion des cellules (conduction) et, dans certains cas, fournir les éléments nécessaires pour le développement spatial et temporel contrôlés (induction).

Les matériaux et les signaux peuvent être utilisés pour fournir des instructions aux cellules de l'hôte et/ou du donneur visant à contrôler la croissance et la différenciation cellulaires.

Chaque composante de la triade de l'ingénierie tissulaire peut être mise en œuvre dans une variété de façons. Certains des défis en ingénierie tissulaire consistent à identifier la forme la plus appropriée de chaque constituant de la triade de l'ingénierie tissulaire pour une application spécifique. Par exemple, la matière, ainsi que sa forme (gel, mousse ou de fibres) peuvent affecter de façon significative la réponse biologique [James et al., 1999, Yeung et al., 2005]. De même, l'identification des sources de cellules appropriées pour une application souhaitée (cellules autogènes contre allogènes, cellules primaires, lignées cellulaires, cellules

génétiqumment modifiées par rapport aux cellules souches, cellules adultes contre embryonnaires, . . .) est un défi majeur dans l'ingénierie tissulaire [Mao et al., 2006, Bianco and Robey, 2001]. Le prélèvement invasif des cellules autologues matures, leur mauvais état prolifératif et leur dédifférenciation rendent difficile leur utilisation en ingénierie tissulaire.

Les recherches actuelles s'orientent donc vers l'utilisation de sources alternatives de cellules réparatrices : les cellules souches. Depuis la découverte dans différents tissus humains adultes de cellules souches mésenchymateuses (CSMs), de nouveaux espoirs thérapeutiques ont été suscités par le développement de l'ingénierie tissulaire à partir de ces cellules. Quiescentes *in vivo*, les CSMs possèdent la capacité de proliférer et de se différencier vers tous les lignages mésenchymateux *in vitro*.

La moelle osseuse, première source de CSMs décrite chez l'homme adulte, est la plus utilisée. Mais la biodisponibilité de la moelle humaine, son prélèvement invasif et l'immunogénicité des cellules après différenciation rendent son utilisation très controversée.

Depuis 2004, une nouvelle source de CSMs a été identifiée : la gelée de Wharton du cordon ombilical humain. Considéré comme déchet opératoire, le cordon ombilical est bio-disponible et sa récupération est de faible coût. De fait, l'isolement des cellules se fait de façon totalement non invasive et ne présente aucun danger, ni pour la mère ni pour l'enfant. Plusieurs travaux ont par ailleurs mis en évidence une meilleure prolifération des cellules issues du cordon ombilical en comparaison avec celles issues de la moelle [Baksh et al., 2007, Kern et al., 2006, Chang et al., 2006]. L'ingénierie tissulaire associe aux cellules souches un environnement extracellulaire propice au développement et à la différenciation cellulaire. En effet, des études ont montré que la différenciation des CSMs est fortement tributaire du milieu de culture (facteurs de croissance, contenu du sérum) [Giuliani et al., 2009], de la densité d'ensemencement [McBeath et al., 2004, Kilian et al., 2010], de l'environnement mécanique des matrices [Engler et al., 2006, Breuls et al., 2008] et des contraintes mécaniques (bioréacteur) [Diederichs et al., 2009]. Afin d'améliorer l'adhésion et la différenciation cellulaires, plusieurs protocoles proposent de recouvrir les supports conventionnels de culture par des molécules de la matrice extracellulaire telles que : la fibronectine, le collagène de type I, la gélatine, . . . Depuis une dizaine d'années, les travaux du laboratoire se focalisent sur l'évaluation de l'effet des multicouches de polyélectrolytes type : chlorhydrate de polyallylamine (PAA) et de polystyrène sulfonate (PSS), sur la différenciation des progéniteurs circulant en cellules vasculaires. L'équipe a mis en évidence une accélération

notable de la différenciation au contact du film, en comparaison de celle observée sur une surface contrôlée de fibronectine ou de collagène de type I [Berthelemy et al., 2009]. Si le système PSS/PAH répond parfaitement à tous les aspects de différenciation cellulaire, son utilisation chez l'homme pourrait se heurter à des aspects réglementaires (absence d'autorisation de mise sur le marché des polymères). Aussi mon projet de thèse est-il de développer des multicouches à base de polymères naturels biocompatibles et dont l'utilisation en clinique ne posera pas de problèmes.

Les polymères choisis sont l'acide hyaluronique (HA) comme polyanion qui remplacera le PSS, et le chitosan (CHI) comme polycation qui remplacera le PAH. Les propriétés mécaniques insuffisantes des multicouches CHI/HA, fortement hydratées et donc de faible module d'élasticité, sont à l'origine de l'absence d'adhésion des cellules sur cette multicouche. Afin d'augmenter le module d'élasticité de cette multicouche et par conséquent d'améliorer l'adhésion et la prolifération cellulaires, des auteurs proposent de procéder à une réticulation chimique via EDC/NHS [Richert et al., 2006]. La toxicité de ce type de procédé rend difficile son utilisation en clinique.

Mon travail est d'utiliser des polymères modifiés par différents groupements et dont la post-réticulation ne fait appel à aucun agent chimique ; ensuite d'ensemencer les CSMs et d'évaluer la biocompatibilité de ces polymères ainsi que la différenciation endothéliale en présence des facteurs pro-angiogéniques. Les voies qui seront explorées concernent notamment le greffage de groupements thiols portés par le CHI (CHI-SH) qui peuvent réagir avec des fonctions maléimides (HA-Mal) ou thiopyridyles (HA-Thio) portées par HA, et le greffage du groupement Alcyne porté par le CHI (CHI-Alcyne) qui peut réagir avec le HA couplé à un polyéthylèneglycol activé (HA-PEG-N3). Les polymères ont été modifiés par les chimistes strasbourgeois (Dr. Fouzia Boulmedais (CR. CNRS, ICS) et Dr. Benoît Frish (DR. CNRS, IGBMC) avec qui nous avons fait une collaboration pour réussir mon projet de thèse. D'autres collaborations ont été initiées avec l'équipe d'accueil BioS 4691 de la Faculté d'odontologie de l'université de Reims Champagne-Ardenne (où j'ai passé 6 mois de ma thèse pour tester la biocompatibilité de nos polymères), et l'Unité Inserm UI 961 chez qui j'ai fait les manipulations de biologie moléculaire sous la direction de Dr. Nathalie Mercier.

Le premier chapitre de la thèse annonce les différents types de cellules utilisés en ingénierie tissulaire et dans lequel sera abordée une revue consacrée à la description des importantes

sources cellulaires employées en ingénierie vasculaire. le deuxième chapitre discute les différents biomatériaux répandus dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et le troisième explique les importants signaux permettant la création d'un micro-environnement cellulaire idéal pour la prolifération et la différenciation cellulaires. Le quatrième chapitre parle des principales applications de l'ingénierie tissulaire dans les maladies vasculaires.

Ensuite seront détaillés le matériel et les méthodes utilisés durant nos travaux de recherche.

Les résultats sont présentés sous forme d'articles, l'un publié et l'autre en préparation avec des résumés et des discussions comparant nos travaux à d'autres obtenus par des équipes connus dans notre domaine.





# Types cellulaires utilisés en ingénierie tissulaire

---

Une des limites de l'application des techniques basées sur les cellules pour le remplacement d'organes a été la difficulté inhérente de croissance en grandes quantités de types cellulaires spécifiques. Même lorsque certains organes, comme le foie, ont une grande capacité de régénération *in vivo*, la croissance cellulaire et l'expansion *in vitro* peuvent être difficiles. Au cours des deux dernières décennies, les scientifiques se sont tournés vers pratiquement tous les types cellulaires pour essayer de définir la meilleure source de cellules pour chaque tissu à substituer. L'élément le plus important pour le succès de l'ingénierie tissulaire est la capacité à générer un nombre suffisant de cellules qui puissent maintenir le phénotype approprié et effectuer les fonctions biologiques spécifiques. La composante cellulaire idéale doit répondre à plusieurs critères : être disponible en abondance, être isolée avec une morbidité minimale, être amplifiée sans dérive, être capable de se différencier de manière fiable vers différents lignages, et pouvoir être transplantée en toute sécurité et efficacement.

## 1.1 Lignées cellulaires immortalisées

Les lignées cellulaires immortalisées sont habituellement employées pour la mise au point des matériaux et le développement de modèles de culture. Ces cellules cancéreuses sont prélevées chez un patient (ex : les cellules HeLa), transformées artificiellement par un oncogène (un gène immortalisant tel que le gène T du virus SV40) ou encore mutées pour des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (ex : la protéine p53). Leur culture est considérée comme aisée, car elles échappent aux phénomènes de sénescence et d'apoptose. Elles s'adaptent donc facilement aux conditions artificielles de culture. L'intérêt de ce type cellulaire est sa grande homogénéité qui permet de s'affranchir d'une variabilité liée aux cellules primaires.

De plus, ces lignées sont facilement obtenues en quantité importante. C'est pour tous ces critères que les lignées immortalisées sont d'un usage quotidien dans les laboratoires de recherches de biologie. Néanmoins, l'inconvénient majeur de ce modèle cellulaire est qu'il ne peut pas être utilisé pour des applications chez l'homme dans

une optique de régénération de tissus car le génome et le métabolisme de ces cellules sont très modifiés par rapport aux cellules normales. C'est pourquoi, tout résultat obtenu à partir de lignées immortalisées doit être confirmé par ceux réalisés à partir de cellules humaines primaires [Hahn et al., 1999].

## 1.2 Cellules primaires

En ingénierie tissulaire, les cellules primaires sont systématiquement des cellules différenciées prélevées sur des patients. Ce sont des cellules matures spécifiques d'un type de tissu qui sont obtenues à partir d'explants éliminés lors d'intervention chirurgicale. Un exemple est constitué par les ostéoblastes humains primaires qui sont isolés à partir des têtes fémorales prélevées lors d'opérations de remplacement total de hanche. Les cellules primaires sont les plus intéressantes en ce qui concerne la compatibilité immunologique, en plus du fait qu'elles soient différenciées et post-mitotiques. Malgré ces avantages, il faut souligner la tendance de certains types cellulaires à se dédifférencier au cours de la culture *ex vivo* et à exprimer un phénotype inapproprié. Les autres désavantages de ces cellules résident dans les faibles rendements de récupération et les faibles taux de prolifération.

De plus, pour certains phénotypes comme les neurones de la moelle épinière, l'isolement de cellules primaires à partir de patients ou de donneurs n'est pas facile. Toutes ces limitations ont poussé les chercheurs à trouver et développer de nouvelles sources cellulaires compatibles avec les stratégies d'ingénierie tissulaire. Les cellules souches offrent déjà des solutions à certains des problèmes rencontrés avec l'utilisation de cellules primaires issues de tissus explantés [Unwin et al., 2006, Kuilman et al., 2010].

## 1.3 Cellules souches

Une avancée majeure dans le domaine de l'ingénierie tissulaire a été la reconnaissance des avantages énormes offerts par les cellules souches. Le terme de "stem cell", traduit de l'anglais par celui de "cellule souche" (CS), est apparu dès 1883 [Stappenbeck and Miyoshi, 2009]. Les cellules souches sont déjà reconnues comme étant le traitement du XXI<sup>e</sup> siècle. Récemment, elles ont été associées à l'idée de médecine régénératrice capable de traiter des pathologies graves et de régénérer des tissus. Cependant plusieurs questions se posent :

- \* Éthiques sur les limites et les possibilités des techniques médicales ;
- \* Philosophiques et juridiques sur le début de la vie ;
- \* Sociologiques sur les conséquences des techniques médicales modernes dans une société vieillissante.

Les cellules souches peuvent être classées selon leur maturité en trois types cellulaires : cellules souches embryonnaires, cellules souches foetales 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 : les cellules totipotentes qui peuvent en théorie donner naissance à tous les tissus et donc assurer le développement d'un organisme entier ; les cellules pluripotentes qui peuvent se différencier en tout type de cellules de l'organisme sauf les cellules extra-embryonnaires comme le placenta ; les cellules multipotentes spécifiquement dévolues à une fonction dépendante du feuillet embryonnaire d'origine. Enfin les cellules souches unipotentes qui ne peuvent donner qu'un seul type de cellule et dont les capacités d'auto-renouvellement sont plus limitées.

Les cellules souches (CS) possèdent des potentiels de prolifération et de différenciation importants, mais variables selon le type. Elles se définissent par leur aptitude à se différencier vers des types cellulaires davantage spécialisés et leur capacité d'auto-renouvellement à l'identique. Leur degré de plasticité est aussi important, et elles possèdent une capacité unique à protéger les télomères de leurs chromosomes.

### 1.3.1 Cellules souches totipotentes

Les cellules souches totipotentes sont définies par leur capacité à donner un organisme viable au complet. Elles ont donc, la propriété de se différencier en tous les types cellulaires d'un organisme issus des feuillets endodermique, mésodermique et ectodermique, ainsi que de former des annexes embryonnaires (vésicule vitelline, amnios, membrane séreuse, chorion,...). Ces cellules ne sont observées dans un organisme que depuis le stade zygote jusqu'au stade morula (8-16 cellules), soit pendant les 4 premiers jours après la fécondation chez l'homme. Cependant, l'utilisation expérimentale et le transfert en clinique de ces cellules posent plusieurs problèmes [Pucéat, 2008], premièrement d'ordre éthique [McLaren, 2001] et deuxièmement en raison de leur fort pouvoir mitogène et tumorigène [Yamamoto et al., 2006] ; elles sont alors difficilement exploitables en ingénierie tissulaire [Das et al., 2008, Kiatpongsan, 2007].

### 1.3.2 Cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes ont la capacité de se différencier en tous les types cellulaires d'un organisme issus des 3 feuillets embryonnaires, à l'exception des annexes embryonnaires [Ulloa-Montoya et al., 2005]. Elles sont présentes au niveau de la masse interne du blastocyste à partir du 5ème jour et jusqu'au 7ème après la fécondation. Il existe également des cellules pluripotentes à des stades beaucoup plus

tardifs (5-9 semaines de développement), il s'agit des cellules souches foetales. Elles peuvent être isolées à partir de foetus surnuméraires ou résultant d'une interruption volontaire de grossesse. Récemment des cellules souches pluripotentes ont été obtenues de manière artificielle par reprogrammation de cellules somatiques : elles s'appellent cellules pluripotentes induites. Cette reprogrammation consiste en l'expression forcée de facteurs de transcription tels que Oct3/4, Sox2, Myc-C, Klf-4, Nanog et Lin28 [Takahashi et al., 2007, Takahashi and Yamanaka, 2006, Wang et al., 2010].

### 1.3.3 Cellules souches multipotentes

Les cellules souches multipotentes sont d'ailleurs également appelées cellules souches adultes. Bien qu'elles soient engagées dans une certaine spécialisation, elles possèdent une capacité de prolifération et d'auto-renouvellement qui reste toutefois plus restreinte que celle des cellules souches embryonnaires. Elles sont définies par la capacité à se différencier vers tous les types cellulaires du feuillet embryonnaire dont elles sont issues. Les cellules souches adultes sont présentes à l'état indifférencié au sein de la plupart des tissus et assurent l'homéostasie des organes et tissus tout au long de la vie de l'individu [Wagers and Weissman, 2004]. Plusieurs types de cellules répondant à cette définition ont été identifiés chez l'homme :

- \* Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentes au sein de la moelle osseuse sont à l'origine de la production de toutes les cellules sanguines : granulocytes, monocytes, macrophages, lymphocytes, érythrocytes, mégacaryocytes ainsi que de certaines structures vasculaires [Kondo et al., 2003] ;
- \* Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) initialement isolées à partir de la moelle osseuse dans les années 60-70 [Friedenstein et al., 1976], sont capables de s'engager vers différentes voies de différenciation ;
- \* Les cellules souches neurales (CSN) ont été isolées dans l'encéphale à partir de la zone sous-ventriculaire du 4ème ventricule et du gyrus denté de l'hippocampe. Elles sont capables de se différencier en neurones, ainsi qu'en des cellules du système nerveux : les astrocytes et les oligodendrocytes [Kim et al., 2009] ;
- \* Les cellules souches musculaires sont présentes au niveau de l'espace situé entre la membrane basale et le sarcolemme de la fibre musculaire, d'où leur nom de cellules satellites [Boldrin et al., 2010] ;
- \* Les cellules souches de la peau se trouvent à la base du muscle pilo-érecteur et peuvent se différencier en kératinocytes ;
- \* Les cellules souches de l'épithélium intestinal sont présentes au niveau des cryptes intestinales et sont capables de redonner des villosités complètes [Takeda et al., 2011] ;
- \* Les cellules souches hépatobiliaires ou cellules ovales isolées à partir des canaux de Hering sont capables de se différencier en hépatocytes [Sell, 2001] ;

### 1.3.3.1 Cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) possèdent une multi-potentialité et des propriétés de régulation immunologique et inflammatoire. La thérapie cellulaire basée sur leur greffe semble une approche particulièrement prometteuse à l'heure actuelle, car ces cellules peuvent conduire à des adipocytes, des ostéoblastes, des chondrocytes, des cellules musculaires lisses ainsi qu'à des cellules endothéliales [Delorme et al., 2009].

L'utilisation des cellules souches mésenchymateuses en thérapie cellulaire semble due à différents mécanismes : la transdifférenciation, la fusion cellulaire, la stimulation de l'angiogenèse, la sécrétion de cytokines ou de facteurs de croissance bénéfiques, la stimulation de la prolifération des cellules souches endogènes, l'inhibition de l'apoptose, et l'effet immunomodulateur [Herrero and Pérez-Simón, 2010].

La différenciation, c'est la capacité de ces cellules de se différencier en plusieurs types cellulaires. Plusieurs études ont montré que les CSMs acquièrent une morphologie et changent de phénotype et expriment de nombreux marqueurs spécifiques selon les conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent. Il a été observé des différenciations en cardiomyocytes [Xu et al., 2004], neurones [Khoo et al., 2008], cellules pancréatiques [Chen et al., 2004], hépatocytes [Ishii et al., 2008], cellules tubulaires rénales [Kale et al., 2003] et cellules musculaire squelettiques ou lisses [Westerweel and Verhaar, 2008]. Afin d'être protégées des stimuli de différenciation, d'apoptose ou d'autres stimuli qui mettraient à l'épreuve leur réserve et qui limitent aussi leur expansion excessive, les cellules souches mésenchymateuses ont besoin d'un micro-environnement spécifique (niche) dont la principale composante est la pression de dioxygène.

**Tissu de soutien ou niche des CSMs** Elle est composée des constituants cellulaires du micro-environnement qui entoure les cellules souches ainsi que des signaux solubles émanant de ces cellules. Chaque niche est très spécifique du lignage cellulaire. Malgré la grande diversité de ces niches, il est possible de dégager les caractéristiques communes d'une niche [Li and Xie, 2005] :

- \* La niche a un rôle de support physique et nutritif ;
- \* Elle est constituée par un groupe de cellules qui possèdent une composition variable d'un tissu à l'autre, dont le rôle est le maintien des cellules souches ;
- \* Chez les invertébrés comme chez les vertébrés, la niche possède une structure asymétrique ;
- \* Elle sécrète des facteurs extrinsèques dont certains se trouvent chez tous les mammifères comme BMP (bone morphogenic protein) et WNT qui contrôlent

le devenir des cellules souches et leur nombre. Les cellules souches sont ainsi régulées à la fois par un programme intrinsèque et par des facteurs extrinsèques provenant de la niche. Les programmes intrinsèques contrôlant l'auto-renouvellement, la quiescence et la différenciation des cellules souches sont très variés [Morrison and Spradling, 2008].

À la suite d'une division, une des deux cellules est maintenue dans la niche et devient une cellule souche (auto-renouvellement) tandis que l'autre cellule quitte la niche, prolifère et s'engage dans une voie de différenciation. La niche semble avoir un rôle dans le maintien de la vitalité des cellules souches ainsi dans le vieillissement de l'organisme. Il est aussi à noter que certaines cellules souches peuvent migrer d'une niche à l'autre ou se localiser provisoirement dans des niches dites facultatives [Morrison and Spradling, 2008].

La notion de niche est largement confirmée et peut être appliquée à la plupart des cellules souches. Les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse constituent la population la mieux caractérisée. La transplantation des cellules souches hématopoïétiques et des cellules progénitrices est utilisée dans le traitement de diverses tumeurs malignes [Bornhäuser et al., 2004]. Pour améliorer le résultat clinique de la transplantation, de nombreux groupes travaillent sur l'expansion *ex vivo* de ces cellules, en particulier dans les cas où la taille de greffe est limitée [Sorrentino, 2004]. Plusieurs stratégies ont été développées pour faire proliférer ces cellules *in vitro* en utilisant des cytokines et des CSMs [Gottschling et al., 2007]. Dans la moelle osseuse (*in vivo*), elles interagissent avec un micro-environnement spécifique, appelé « niche de cellules souches » qui régleme la prolifération, la différenciation et l'auto-renouvellement des cellules. Ces niches sont considérées comme des régions hypoxiques, condition qui modifie de nombreuses propriétés biologiques et peut-être leur potentiel immunologique, dans lesquelles seules les cellules nécessitant le moins d'oxygène sont capables de survivre. En outre, la concentration en oxygène dans la moelle osseuse des sujets sains est inférieure à celle dans le sang périphérique [Harrison et al., 2002]. D'autre part, les CSMs sont les précurseurs des différentes populations stromales spécialisées qui interagissent avec les cellules immunitaires matures dans la moelle osseuse [Tokoyoda et al., 2010]. Récemment, les cellules souches hématopoïétiques et les cellules progénitrices ont été signalées comme se trouvant principalement dans une niche sinusoïdale hypoxique [Kubota et al., 2008]. Plusieurs études *in vitro* ont révélé que l'hypoxie facilite le maintien de ces cellules [Eliasson and Jönsson, 2010].

La niche ou le microenvironnement physiologique joue un rôle crucial dans le maintien des propriétés des cellules souches, où la concentration d'oxygène est un

élément important dans la composition de cette niche. L'hypoxie est répandue dans le microenvironnement des cellules souches embryonnaire et dans de nombreuses cellules souches adultes à des stades précoces du développement [Nekanti et al., 2010]. Les embryons de mammifères se développent dans un environnement à faible concentration d'O<sub>2</sub>. Cependant, les cellules souches embryonnaires CSEs sont généralement cultivées dans une atmosphère de 21% d'O<sub>2</sub> (normoxie), où elles tendent à se différencier spontanément. Cette condition peut ne pas être la plus appropriée pour la prolifération de ces cellules. La croissance de cellules hES sous hypoxie fournit une meilleure formation de corps embryoïdes. La culture en conditions hypoxiques semble être nécessaire pour maintenir la pluripotence complète de ces cellules [Ezashi et al., 2005]. De même l'équipe de Nékanti *et al.*, a montré qu'en hypoxie les cellules souche mésenchymateuses de la gelée de Wharton possèdent une meilleure prolifération tout en gardant leur potentiel de différenciation en lignées multiples et l'expression des marqueurs de surface [Nekanti et al., 2010].

**Propriétés immunologiques des CSMs** A ce jour, l'efficacité de l'injection de CSMs dans différents modèles de lésions tissulaires (lésions myocardiques, musculaires, articulaires ou neuronales) chez l'animal, serait essentiellement due à un effet paracrine au cours duquel les CSM produiraient après quelques jours des molécules anti-inflammatoires et immunosuppressives favorisant la régénération du tissu de l'hôte [Lee et al., 2009]. En effet, c'est dans la maladie aiguë du greffon contre l'hôte (GvHD) que les CSMs ont fait la preuve principale de leur efficacité clinique en matière d'immunosuppression. La GvHD se caractérise par une destruction des tissus du receveur, reconnus comme étrangers par les cellules immunitaires présentes dans le greffon. Une étude publiée chez 55 patients atteints de GvHD sévère corticorésistante et traités par une ou plusieurs injections de CSMs fait état d'un taux exceptionnel de réponses favorables atteignant 43% chez l'adulte et 68% chez l'enfant. Le taux de survie à 2 ans de la greffe atteignait même 52% contre 10% attendus avec les autres thérapeutiques disponibles [Le Blanc et al., 2008]. Sachant que l'efficacité immunosuppressive des CSM en thérapeutique ne fait aucun doute, ceci conduit, outre le traitement de la GvHD, à la réalisation de premiers essais cliniques prometteurs dans le lupus érythémateux disséminé sévère et corticorésistant [Sun et al., 2010].

De plus, *in vitro* ces cellules ont été déjà appliquées dans les études préclinique et cliniques, afin de traiter avec succès des maladies telles que le diabète de type I [Vojtassak et al., 2006], la sclérose en plaque [Guiducci et al., 2010], la cirrhose du foie (Kharaziha 2009), et la maladie de Crohn [Duijvestein et al., 2010]. Ces études démontrent le potentiel clinique important des cellules souches mésenchymateuses.



Les caractéristiques les plus importantes cliniquement applicables des CSMs sont la conséquence de leur facilité à proliférer en culture et de leur capacité immunosuppressive. Les CSMs peuvent être très immunosuppressives et sont capables de supprimer la prolifération des cellules T et la production des cytokines [Sato et al., 2007]. D'autres études ont démontré que des médiateurs comme IL-10 [Batten et al., 2006], TGF- $\beta$  (facteur de croissance transformant bêta) [Groh et al., 2005], NO (monoxyde d'azote) [Sato et al., 2007],IDO (indoléamine 2,3-dioxygénase) [Meisel et al., 2004], le facteur de nécrose tumorale (TNF) [Lee et al., 2009] et de la prostanglandine (PGE2) [Aggarwal and Pittenger, 2005] sont responsables de la capacité immunosuppressive des CSM. Cet effet dépend aussi de l'interféron-gamma (IFN) en présence d'une autre co-cytokine : le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  [Ren et al., 2009].

**Migration des CSMs** Les CSMs de la moelle osseuse et du placenta ont une plus grande capacité de migration que celles du cordon ombilical. Cette capacité semble être réglée par une expression accrue de la cathepsine B, la cathepsine D, la prohibine et par une diminution de celle du PAI-1 (plasminoggen activator inhibitor-1) et de la superoxyde dismutase manganèse dépendante [Li et al., 2009].

### 1.3.4 Cellules souches unipotentes

Les cellules souches unipotentes sont capables d'auto-renouvellement, tout comme les cellules souches multipotentes, mais elles ne peuvent générer qu'un seul type cellulaire.

## **1.4 Revue : Les cellules souches : Une source prometteuse en médecine régénérative vasculaire**

Les cellules souches ont deux propriétés principales : l'autorenouvellement (elles se multiplient en donnant de nouvelles cellules souches) et la différenciation (selon certaines conditions de milieu, elles produisent des cellules spécialisées, par exemple de foie, de pancréas, de peau, de muscle, etc.). On les trouve dans l'embryon, le fœtus, le sang de cordon et divers tissus de l'individu après sa naissance. Mais les cellules souches dites adultes (c'est-à-dire de l'individu après sa naissance) ont un moindre potentiel de renouvellement et de différenciation que les cellules souches embryonnaires, dites "totipotentes" (elles sont capables de produire les 200 familles cellulaires spécialisées de notre organisme). Ces dernières ont été pour la première fois isolées et cultivées chez l'homme en 1998. Neuf ans plus tard, en 2007, la recherche a franchi un nouveau pas en produisant une cellule souche pluripotente à partir d'une cellule adulte (cellules iPS), par manipulation génétique.

Dans notre revue on a essayé de résumer les principales sources de cellules souches utilisées en ingénierie vasculaire ainsi que leurs capacités de différenciation en des lignées vasculaires. Cette revue sera soumise dans le journal Stem Cells Research and Therapy.

## Life Sciences

### Stem Cells: A promising source for vascular regenerative medicine

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Stem Cells: A promising source for vascular regenerative medicine
<b>Short Title:</b>	Stem Cells: A promising source for vascular regenerative medicine
<b>Article Type:</b>	Review
<b>Section/Category:</b>	Journal of Stem Cell Research & Therapy
<b>Keywords:</b>	stem cells differentiation, endothelial cells, smooth muscle cells, vascular tissue engineering
<b>Corresponding Author:</b>	Patrick Menu, PhD UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA) Vandoeuvre-les Nancy, FRANCE
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA)
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Hassan RAMMAL, PhD
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Hassan RAMMAL, PhD Chaza HARMOUCH, PhD Jean-Jacques Lataillade, MD, PhD Dominique Laurent-Maquin Pierre LABRUDE, PhD, PD Patrick Menu, PhD Halima KERDJOUJ, PhD
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Manuscript Region of Origin:</b>	FRANCE
<b>Abstract:</b>	<p>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.</p>
<b>Suggested Reviewers:</b>	
<b>Opposed Reviewers:</b>	

Patrick MENU  
UMR 7365 CNRS-Université de lorraine,  
Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Vectorisation  
Faculté de Médecine, 9 Av. de la forêt de Haye  
54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France  
Tél. 33(0)3.83.68.54.57  
E-mail : [patrick.menu@univ-lorraine.fr](mailto:patrick.menu@univ-lorraine.fr)

Vandoeuvre, December 19<sup>th</sup> 2013

Dear Editor(s),

Please find herein a manuscript entitled “**Stem Cells: A promising source for vascular regenerative medicine**” by “Hassan Rammal, Chaza Harmouch, Jean Jacques Lataillade, Pierre Labrude, Patrick Menu and Halima Kerdjoudj“ that we would like to submit for publication in “Stem Cell Research & Therapy”.

This paper corresponds to a “Review” which summarizes for the **first time** the potential use of stem cells in vascular tissue engineering and regenerative medicine. Engineering of tissues *in vitro* has traditionally been challenging for scientists. The use of tissular and cellular therapy approaches made this challenge more like a reality. Yet many fundamental problems, such as standardization of cell source/culture/differentiation protocols, remain to be solved before this new technology becomes a routine. In light of all these shortcomings, current research is directed towards the use of alternative cells sources. This review highlights for the first time the crucial role of stem cells origin in vascular regenerative medicine. Indeed Various stem cell sources and differentiation protocols have been described in the literature. So, we discussed the different strategies used for stem cells differentiation into both mature and functional smooth muscle cells and endothelial cells and focused on their application in vascular regenerative medicine

We hope that the present contribution will satisfy all the criteria of a “review” in “Stem Cell Research & Therapy “.

Sincerely yours,

Pr. P. MENU

## **STEM CELLS: A PROMISING SOURCE FOR VASCULAR REGENERATIVE MEDECINE**

**H. Rammal<sup>1\*</sup>, C. Harmouch<sup>1\*</sup>, J.J. Lataillade<sup>2</sup>, D. Laurent-Maquin<sup>3</sup>, P. Labrude<sup>1</sup>, P. Menu<sup>1□</sup>  
and H. Kerdjoudj<sup>3</sup>**

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

<sup>2</sup> Centre de transfusion sanguine des Armées Jean Julliard, Clamart, France.

<sup>3</sup> 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 21<sup>st</sup> 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 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 embryonic 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 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 Tetracarcinoma derived growth factor 1 (TDGF1), *homeobox domain transcription factor (SOX-2)*, *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 ( $O_2$ ) 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- $\beta$ ) 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- $\beta$ ) (21) supplemented media promotes SMCs differentiation. Resulting spindle-shaped cells, displayed smooth muscle (SM)-myosin heavy chain (SM-MHC) and SM- $\alpha$ -actin ( $\alpha$ -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*,  $\alpha$ -SMA, *calponin*, *smoothelin*, *SM-MHC*, *SM22 $\alpha$*  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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 *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- $\beta$ 1 to differentiate ESCs into SMCs. *In vitro*, the resulted population expressed  $\alpha$ -SMA, SM22 $\alpha$ , 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- $\beta$  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 20<sup>th</sup> 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  $\alpha$ -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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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](http://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 :  $\gamma$ -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- $\beta$  : Transforming growth factor- $\beta$  ; 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	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fetal muscle</li> <li>• Fetal skin</li> <li>• Adult fallopian tube</li> </ul>	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	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 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 :               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Enzymatically digested using DNase/collagenase (135), pronase/collagenase (136) or Dispase/Collagenase (137), or</li> <li>– Plated on culture flask allowing cells migration from explants to the flask (77).</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plastic adherent with a fibroblastic morphology;</li> <li>• Highly positive for CD44, CD73, CD166, CD90, CD13, HLA-A, B, C and positive for CD9</li> <li>Negative for CD105, CD34, CD45, CD117, CD31 and HLA-DR, DP, DQ cell surface markers (137);</li> <li>• Express <i>Oct-3/4</i>, <i>Sox-2</i>, <i>Nanog3</i> pluripotency markers (138) with a decrease in mRNA with passages.</li> </ul>
Chorion termed fetal membrane	<ul style="list-style-type: none"> <li>• After removing enzymatically the trophoblastic layer, the chorion, as far away from the maternal side as possible, is cut into small pieces then :               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Enzymatically treated with collagenase with (139) or without DNase (140), or</li> <li>– Plated on culture flask allowing cells migration from explants to the flask (141).</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plastic adherent with a fibroblastic morphology, simple cytoplasmic organization with dispersed mitochondria and glycogen lakes (142);</li> <li>• Highly positive for CD105, CD90, CD73, CD44, CD166, CD10, CD13, CD49, CD54 and a low expression of CD271, HLA-A, B and C (143);</li> <li>• Negative for CD34, CD45, CD133, CD117, CD14 and HLA-DR cell surface markers (144);</li> <li>• 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).</li> </ul>

umbilical cord blood	<ul style="list-style-type: none"> <li>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).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plastic adherent, fibroblastic morphology;</li> <li>Highly positive for CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 and HLA-ABC;</li> <li>Negative for CD14, CD31, CD45, CD271, CD34 and HLA-DR (147,148);</li> <li>Expressing pluripotency markers <i>Oct4</i>, <i>Sox2</i> and <i>Nanog</i> (146).</li> </ul>
Umbilical cord Wharton's jelly	<ul style="list-style-type: none"> <li>After discarding umbilical cord's epithelium and blood vessels, the Wharton's jelly is segmented into small pieces (1-5 mm<sup>3</sup>) then : <ul style="list-style-type: none"> <li>1) Enzymatically digested with collagenase followed by Trypsine (149), or</li> <li>2) Plated on culture flask allowing cells migration from the explants to the flask (150,151).</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plastic adherent with a fibroblastic morphology;</li> <li>Highly positive for CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD51, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD166 and HLA-1/HLA-ABC;</li> <li>Negative for CD14, CD31, CD34, CD38, CD45 and HLA-DR (61);</li> <li>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).</li> </ul>
Amniotic fluid	<ul style="list-style-type: none"> <li>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).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plastic adherent with a fibroblastic morphology;</li> <li>Positive for CD29, CD44, CD49e, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166 and HLA-1/HLA-ABC;</li> <li>Negative for CD10, CD11, CD14, CD25, CD31, CD34, CD40, CD45, CD50, CD62, CD80, CD86, CD106, CD127 and HLA-DR (89);</li> <li>Expressing pluripotent markers as <i>SSEA-4</i>, <i>Oct4</i>, <i>Nanog3</i> and <i>Sox2</i> (88).</li> </ul>

**Table 3**

Adult stem cell sources	Cell isolation technique	Morphological and Phenotypical characterization
<p>Bone marrow (BM-MSCs)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aspirated from tibia and femur, BM-MSCs are cultured from mononuclear cells using the standard Ficoll-Plaque 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).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plastic adherent with a spindle shape morphology;</li> <li>Highly positive for CD13, CD44, CD49e, CD62, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD126, HLA-ABC and several integrins like <math>\alpha 4\beta 1</math>;</li> <li>Negative for CD3, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD31, CD33, CD34, CD45, CD71, CD133, CD144, CD184 and HLA-DR (154);</li> <li>Expression of <i>SSEA4</i> (157,158), <i>Nanog</i> (159,160) and <i>Oct-4</i> (159);</li> <li>Able to differentiate into adipogenic, osteogenic, chondrogenic and myogenic lineages (158).</li> </ul>
<p>Adipose tissue (ADSCs)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>The lipoaspirated or dissected fat lobules are mostly digested with collagenase. Stromal cell fraction is obtained after centrifugation, incubated with NH<sub>4</sub>CL 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).</li> <li>Approximately 5000 ADSCs are obtained from 1g of adipose tissue (163).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plastic adherent with a fibroblastic morphology;</li> <li>Presenting an extensive proliferative capacity;</li> <li>Highly positive for CD13, CD44, CD49e, CD62, CD73, CD90, CD105, CD117 and HLA-ABC;</li> <li>Negative for CD3, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD31, CD33, CD34, CD45, CD71, CD133, CD144, CD184 and HLA-DR (154);</li> <li>Expression of pluripotent cells associated genes <i>Oct-4</i>, <i>Nanog</i>, <i>Sox2</i> and <i>SSEA4</i> (164,165);</li> <li>Able to differentiate into adipogenic, osteogenic, chondrogenic and myogenic lineages.</li> </ul>

<p>Dental pulp (DPSCs)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Teeth (third molars) are mechanically fractured in order to reveal the pulp chamber, the pulp tissue is then minced into small fragments (1-2mm<sup>3</sup>) then : <ul style="list-style-type: none"> <li>– Enzymatically digested with Dispase or Collagenase (166), or</li> <li>– Plated on culture flask allowing cells migration from explants to the culture surface (166).</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plastic adherent with a fibroblastic morphology;</li> <li>• Highly positive for CD13, CD29, CD44, CD49b, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD146, CD166, CD271 and HLA-ABC;</li> <li>• Negative for CD3, CD7, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD31, CD34, CD45, CD71, CD133, CD195 and HLA-DR (167,168);</li> <li>• Expression of pluripotent cells associated genes <i>SSEA-4</i>, <i>Oct3/4</i>, <i>Nanog</i> and <i>Sox2</i> (167,168);</li> <li>• Able to differentiate into adipogenic, osteogenic, chondrogenic and myogenic lineages.</li> </ul>
<p>Gingival tissue (GSCs)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 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).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plastic adherent with fibroblastic morphology;</li> <li>• Highly positive for CD146, CD105, CD90, CD29, CD73, CD44, CD166, CD13 and STRO-1 (169–172);</li> <li>• Negative for CD34, CD38, CD45, CD54 and CD31 (169,171);</li> <li>• Able to differentiate into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages (171).</li> </ul>

## V. REFERENCES

1. Deedwania P (2013) Diabetes, cardiovascular disease, and ethnicity. *J Am Coll Cardiol* 61:1787-1789.
2. Li S, Henry JJD (2011) Nonthrombogenic approaches to cardiovascular bioengineering. *Annu Rev Biomed Eng* 13:451-475.
3. Klopsch C, Steinhoff G (2012) Tissue-engineered devices in cardiovascular surgery. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur* 49:44-52.
4. Menu P, Stoltz JF, Kerdjoudj H (2013) Progress in vascular graft substitute. *Clin Hemorheol Microcirc* 53:117-129.
5. Caplan AI, Dennis JE (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98:1076-1084.
6. 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.
7. Martin GR (1981) 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* 78:7634-7638.
8. Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa S, Williams D et al. (1991) Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 353:750-752.
9. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ et al. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
10. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18:399-404.
11. Talbot NC, Sparks WO, Powell AM, Kahl S, Caperna TJ (2012) 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* 48:1-11.
12. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J et al. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336:688-690.
13. Bhattacharya B, Miura T, Brandenberger R, Mejido J, Luo Y et al. (2004) Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood* 103:2956-2964.
14. Iida M, Heike T, Yoshimoto M, Baba S, Doi H et al. (2005) 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* 19:371-378.
15. Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R (2002) Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4391-4396.

16. Wang ZZ, Au P, Chen T, Shao Y, Daheron LM et al. (2007) Endothelial cells derived from human embryonic stem cells form durable blood vessels in vivo. *Nat Biotechnol* 25:317-318.
17. Cho S-W, Moon S-H, Lee S-H, Kang S-W, Kim J et al. (2007) Improvement of postnatal neovascularization by human embryonic stem cell derived endothelial-like cell transplantation in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* 116:2409-2419.
18. Yamahara K, Sone M, Itoh H, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T et al. (2008) Augmentation of neovascularization [corrected] in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PLoS One* 3:e1666.
19. Levenberg S, Ferreira LS, Chen-Konak L, Kraehenbuehl TP, Langer R (2010) Isolation, differentiation and characterization of vascular cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Protoc* 5:1115-1126.
20. Nourse MB, Halpin DE, Scatena M, Mortisen DJ, Tulloch NL et al. (2010) VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:80-89.
21. Han Y, Li N, Tian X, Kang J, Yan C et al. (2010) 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* 60:35-41.
22. Li Z, Suzuki Y, Huang M, Cao F, Xie X et al. (2008) 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* 26:864-873.
23. Shin JM, Kim J, Kim HE, Lee MJ, Lee KI et al. (2011) Enhancement of differentiation efficiency of hESCs into vascular lineage cells in hypoxia via a paracrine mechanism. *Stem Cell Res* 7:173-185.
24. Han Y, Kuang S-Z, Gomer A, Ramirez-Bergeron DL (2010) 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* 28:799-809.
25. Goldman O, Feraud O, Boyer-Di Ponio J, Driancourt C, Clay D et al. (2009) A boost of BMP4 accelerates the commitment of human embryonic stem cells to the endothelial lineage. *Stem Cells* 27:1750-1759.
26. James D, Nam H, Seandel M, Nolan D, Janovitz T et al. (2010) Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFbeta inhibition is Id1 dependent. *Nat Biotechnol* 28:161-166.
27. Pieciewicz SM, Pandey A, Roy B, Xiang SH, Zetter BR et al. (2012) Insulin-like growth factors promote vasculogenesis in embryonic stem cells. *PLoS One* 7:e32191.
28. Majesky MW (2007) Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1248-1258.



29. Xie C-Q, Zhang J, Villacorta L, Cui T, Huang H et al. (2007) A highly efficient method to differentiate smooth muscle cells from human embryonic stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:e311-312.
30. Lu S-J, Ivanova Y, Feng Q, Luo C, Lanza R (2009) Hemangioblasts from human embryonic stem cells generate multilayered blood vessels with functional smooth muscle cells. *Regen Med* 4:37-47.
31. El-Mounayri O, Mihic A, Shikatani EA, Gagliardi M, Steinbach SK et al. (2013) Serum-free differentiation of functional human coronary-like vascular smooth muscle cells from embryonic stem cells. *Cardiovasc Res* 98:125-135.
32. Rafii S, Kloss CC, Butler JM, Ginsberg M, Gars E et al. (2013) Human ESC-derived hemogenic endothelial cells undergo distinct waves of endothelial to hematopoietic transition. *Blood* 121:770-780.
33. Sone M, Itoh H, Yamahara K, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T et al. (2007) Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2127-2134.
34. Hill KL, Obertlikova P, Alvarez DF, King JA, Keirstead SA et al. (2010) Human embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells capable of endothelial and smooth muscle cell function. *Exp Hematol* 38:246-257.e1.
35. Li Z, Barron MR, Lough J, Zhao M (2008) Rapid single-step separation of pluripotent mouse embryonic stem cells from mouse feeder fibroblasts. *Stem Cells Dev* 17:383-387.
36. Blancas AA, Shih AJ, Lauer NE, McCloskey KE (2011) Endothelial cells from embryonic stem cells in a chemically defined medium. *Stem Cells Dev* 20:2153-2161.
37. Park S-W, Jun Koh Y, Jeon J, Cho Y-H, Jang M-J et al. (2010) Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into functional CD34+ progenitor cells by combined modulation of the MEK/ERK and BMP4 signaling pathways. *Blood* 116:5762-5772.
38. Kane NM, Howard L, Descamps B, Meloni M, McClure J et al. (2012) Role of microRNAs 99b, 181a, and 181b in the differentiation of human embryonic stem cells to vascular endothelial cells. *Stem Cells* 30:643-654.
39. Prado-Lopez S, Conesa A, Armiñán A, Martínez-Losa M, Escobedo-Lucea C et al. (2010) Hypoxia promotes efficient differentiation of human embryonic stem cells to functional endothelium. *Stem Cells* 28:407-418.
40. Vo E, Hanjaya-Putra D, Zha Y, Kusuma S, Gerecht S (2010) Smooth-muscle-like cells derived from human embryonic stem cells support and augment cord-like structures in vitro. *Stem Cell Rev* 6:237-247.
41. Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, Ikeda M, Stastny V et al. (2005) Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet* 37:1099-1103.
42. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.

43. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872.
44. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL et al. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917-1920.
45. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J et al. (2008) Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2883-2888.
46. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S et al. (2007) Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1:55-70.
47. Meissner A, Wernig M, Jaenisch R (2007) Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 25:1177-1181.
48. Rufaihah AJ, Huang NF, Kim J, Herold J, Volz KS et al. (2013) Human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells exhibit functional heterogeneity. *Am J Transl Res* 5:21-35.
49. Taura D, Sone M, Homma K, Oyamada N, Takahashi K et al. (2009) Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1100-1103.
50. Azhdari M, Baghaban-Eslaminejad M, Baharvand H, Aghdami N (2013) Therapeutic potential of human-induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells in a bleomycin-induced scleroderma mouse model. *Stem Cell Res* 10:288-300.
51. Rufaihah AJ, Huang NF, Jamé S, Lee JC, Nguyen HN et al. (2011) Endothelial cells derived from human iPSCS increase capillary density and improve perfusion in a mouse model of peripheral arterial disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:e72-79.
52. Karamariti E, Margariti A, Winkler B, Wang X, Hong X et al. (2013) Smooth muscle cells differentiated from reprogrammed embryonic lung fibroblasts through DKK3 signaling are potent for tissue engineering of vascular grafts. *Circ Res* 112:1433-1443.
53. Wang A, Tang Z, Li X, Jiang Y, Tsou DA et al. (2012) Derivation of smooth muscle cells with neural crest origin from human induced pluripotent stem cells. *Cells Tissues Organs* 195:5-14.
54. Lee T-H, Song S-H, Kim KL, Yi J-Y, Shin G-H et al. (2010) Functional recapitulation of smooth muscle cells via induced pluripotent stem cells from human aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 106:120-128.
55. Margariti A, Winkler B, Karamariti E, Zampetaki A, Tsai T et al. (2012) Direct reprogramming of fibroblasts into endothelial cells capable of angiogenesis and reendothelialization in tissue-engineered vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:13793-13798.
56. Tiscornia G, Vivas EL, Izpisua Belmonte JC (2011) Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nat Med* 17:1570-1576.

57. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC (2005) Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 23:1549-1559.
58. Witkowska-Zimny M, Wrobel E (2011) Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion. *Cell Mol Biol Lett* 16:493-514.
59. Erices A, Conget P, Minguell JJ (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109:235-242.
60. Matikainen T, Laine J (2005) Placenta--an alternative source of stem cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 207:544-549.
61. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG et al. (2007) Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells* 25:319-331.
62. Troyer DL, Weiss ML (2008) Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 26:591-599.
63. Spurway J, Logan P, Pak S (2012) The development, structure and blood flow within the umbilical cord with particular reference to the venous system. *AJUM* 15:97-102.
64. Roura S, Pujal J-M, Bayes-Genis A (2012) Umbilical cord blood for cardiovascular cell therapy: from promise to fact. *Ann N Y Acad Sci* 1254:66-70.
65. Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ (2002) Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 23:3-19.
66. Zhu S-F, Zhong Z-N, Fu X-F, Peng D-X, Lu G-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.
67. Gucciardo L, Lories R, Ochsenbein-Kölble N, Done' E, Zwijsen A et al. (2009) Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 116:166-172.
68. 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.
69. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24:1294-1301.
70. Yoon DS, Kim YH, Jung HS, Paik S, Lee JW (2011) Importance of Sox2 in maintenance of cell proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells in low-density culture. *Cell Prolif* 44:428-440.
71. Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C et al. (2006) Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res* 16:329-336.

72. Kim HG, Choi OH (2011) Neovascularization in a mouse model via stem cells derived from human fetal amniotic membranes. *Heart Vessels* 26:196-205.
73. Kim S-W, Zhang H-Z, Kim CE, An HS, Kim J-M et al. (2012) Amniotic mesenchymal stem cells have robust angiogenic properties and are effective in treating hindlimb ischaemia. *Cardiovasc Res* 93:525-534.
74. Kim S-W, Zhang H-Z, Kim C-E, Kim J-M, Kim MH (2013) Amniotic mesenchymal stem cells with robust chemotactic properties are effective in the treatment of a myocardial infarction model. *Int J Cardiol* 168:1062-1069.
75. Breyman C, Schmidt D, Hoerstrup SP (2006) Umbilical cord cells as a source of cardiovascular tissue engineering. *Stem Cell Rev* 2:87-92.
76. Meraviglia V, Vecellio M, Grasselli A, Baccarin M, Farsetti A et al. (2012) Human chorionic villus mesenchymal stromal cells reveal strong endothelial conversion properties. *Differ Res Biol Divers* 83:260-270.
77. Warriar S, Haridas N, Bhonde R (2012) Inherent propensity of amnion-derived mesenchymal stem cells towards endothelial lineage: vascularization from an avascular tissue. *Placenta* 33:850-858.
78. Roura S, Bagó JR, Soler-Botija C, Pujal JM, Gálvez-Montón C et al. (2012) Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells promote vascular growth in vivo. *PLoS One* 7:e49447.
79. Chen M-Y, Lie P-C, Li Z-L, Wei X (2009) Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 37:629-640.
80. Benavides OM, Petsche JJ, Moise KJ Jr, Johnson A, Jacot JG (2012) Evaluation of endothelial cells differentiated from amniotic fluid-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 18:1123-1131.
81. Nur Fariha M-M, Chua K-H, Tan G-C, Lim Y-H, Hayati A-R (2012) Endogenous and induced angiogenic characteristics of human chorion-derived stem cells. *Cell Biol Int* 36:1145-1153.
82. Li P, Zhou C, Yin L, Meng X, Zhang L (2013) Role of hypoxia in viability and endothelial differentiation potential of UC-MSCs and VEGF interference. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 38:329-340.
83. Wang S-H, Lin S-J, Chen Y-H, Lin F-Y, Shih J-C et al. (2009) 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* 29:816-822.
84. Farias VA, Linares-Fernández JL, Peñalver JL, Payá Colmenero JA, Ferrón GO et al. (2011) Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties. *Placenta* 32:86-95.
85. Hayward CJ, Fradette J, Galbraith T, Rémy M, Guignard R et al. (2013) Harvesting the potential of the human umbilical cord: isolation and characterisation of four cell types for tissue engineering applications. *Cells Tissues Organs* 197:37-54.

86. 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.
87. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring H-J et al. (2008) Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* 26:300-311.
88. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC et al. (2007) Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 25:100-106.
89. Tsai M-S, Lee J-L, Chang Y-J, Hwang S-M (2004) Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod Oxf Engl* 19:1450-1456.
90. 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.
91. Mikkola HKA, Orkin SH (2006) The journey of developing hematopoietic stem cells. *Dev Camb Engl* 133:3733-3744.
92. Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 9:641-650.
93. Can A, Karahuseyinoglu S (2007) Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* 25:2886-2895.
94. 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.
95. 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*
96. Zhang P, Moudgill N, Hager E, Tarola N, Dimatteo C et al. (2011) Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells from elderly patients with cardiovascular disease. *Stem Cells Dev* 20:977-988.
97. Lim TY, Poh CK, Wang W (2009) Poly (lactic-co-glycolic acid) as a controlled release delivery device. *J Mater Sci Mater Med* 20:1669-1675.
98. Poh CK, Shi Z, Lim TY, Neoh KG, Wang W (2010) The effect of VEGF functionalization of titanium on endothelial cells in vitro. *Biomaterials* 31:1578-1585.
99. Shevchenko EK, Makarevich PI, Tsokolaeva ZI, Boldyreva MA, Sysoeva VY et al. (2013) Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle. *J Transl Med* 11:138.
100. Wosnitza M, Hemmrich K, Groger A, Gräber S, Pallua N et al. (2007) Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation. *Differ Res Biol Divers* 75:12-23.

101. Colazzo F, Chester AH, Taylor PM, Yacoub MH (2010) Induction of mesenchymal to endothelial transformation of adipose-derived stem cells. *J Heart Valve Dis* 19:736-744.
102. Bai K, Huang Y, Jia X, Fan Y, Wang W (2010) Endothelium oriented differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under chemical and mechanical stimulations. *J Biomech* 43:1176-1181.
103. Wang N, Zhang R, Wang S-J, Zhang C-L, Mao L-B et al. (2013) 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* 45:1447-1456.
104. 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.
105. Zhao L, Hantash BM (2011) TGF- $\beta$ 1 regulates differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Vitam Horm* 87:127-141.
106. 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.
107. Narita Y, Yamawaki A, Kagami H, Ueda M, Ueda Y (2008) 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* 333:449-459.
108. Adamo L, García-Cardena G (2011) Directed stem cell differentiation by fluid mechanical forces. *Antioxid Redox Signal* 15:1463-1473.
109. Wang JH-C, Thampatty BP (2008) Mechanobiology of adult and stem cells. *Int Rev Cell Mol Biol* 271:301-346.
110. Gong Z, Niklason LE (2011) Use of human mesenchymal stem cells as alternative source of smooth muscle cells in vessel engineering. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 698:279-294.
111. Maul TM, Chew DW, Nieponice A, Vorp DA (2011) Mechanical stimuli differentially control stem cell behavior: morphology, proliferation, and differentiation. *Biomech Model Mechanobiol* 10:939-953.
112. Kim DH, Heo S-J, Kim S-H, Shin JW, Park SH et al (2011) Shear stress magnitude is critical in regulating the differentiation of mesenchymal stem cells even with endothelial growth medium. *Biotechnol Lett* 33:2351-2359.
113. O'Ceirbhail ED, Punchard MA, Murphy M, Barry FP, McHugh PE et al. (2008) Response of mesenchymal stem cells to the biomechanical environment of the endothelium on a flexible tubular silicone substrate. *Biomaterials* 29:1610-1619.
114. Bassaneze V, Barauna VG, Lavini-Ramos C, Kalil J, Schettert IT et al. (2010) Shear stress induces nitric oxide-mediated vascular endothelial growth factor production in human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 19:371-378.

115. Wang S, Qu X, Zhao R (2012) Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol* 5:19.
116. Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D (2011) Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med* 9:52.
117. Bajpai VK, Andreadis ST (2012) Stem cell sources for vascular tissue engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 18:405-425.
118. Hibino N, McGillicuddy E, Matsumura G, Ichihara Y, Naito Y et al. (2010) Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg* 139:431-436, 436.e1-2.
119. Chen JS, Wong VW, Gurtner GC (2012) Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cutaneous wound healing. *Front Immunol* 3:192.
120. Souidi N, Stolk M, Seifert M (2013) Ischemia-reperfusion injury: beneficial effects of mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Organ Transplant* 18:34-43.
121. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD et al. (2002) 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* 99:8932-8937.
122. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense J-R, Begot L et al. (2005) Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* 205:228-236.
123. Stehlík D, Pytlík R, Rychtrmocová H, Kideryová L, Veselá R et al. (2012) Xenogeneic protein-free cultivation of mesenchymal stromal cells - towards clinical applications. *Folia Biol (Praha)* 58:106-114.
124. Unger C, Skottman H, Blomberg P, Dilber MS, Hovatta O (2008) Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. *Hum Mol Genet* 17:R48-53.
125. Lanzendorf SE, Boyd CA, Wright DL, Muasher S, Oehninger S et al. (2001) Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cell lines. *Fertil Steril* 76:132-137.
126. Richards M, Fong C-Y, Chan W-K, Wong P-C, Bongso A (2002) Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 20:933-936.
127. Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Strömberg A-M, Inzunza J et al. (2003) A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod Oxf Engl* 18:1404-1409.
128. Mitalipova M, Calhoun J, Shin S, Wininger D, Schulz T et al. (2003) Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. *Stem Cells* 21:521-526.
129. Heins N, Englund MCO, Sjöblom C, Dahl U, Tønning A et al. (2004) Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22:367-376.

130. Lee JB, Lee JE, Park JH, Kim SJ, Kim MK et al. (2005) Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. *Biol Reprod* 72:42-49.
131. Inzunza J, Gertow K, Strömberg MA, Matilainen E, Blennow E et al. (2005) Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* 23:544-549.
132. Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T, Brunette E, Powell S et al. (2005) Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil Steril* 83:1517-1529.
133. Wang Q, Fang ZF, Jin F, Lu Y, Gai H et al. (2005) Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders derived from themselves. *Stem Cells* 23:1221-1227.
134. Hong-mei P, Gui-an C (2006) Serum-free medium cultivation to improve efficacy in establishment of human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod Oxf Engl* 21:217-222.
135. Fatimah SS, Tan GC, Chua K, Fariha MMN, Tan AE et al. (2013) Stemness and angiogenic gene expression changes of serial-passage human amnion mesenchymal cells. *Microvasc Res* 86:21-29.
136. Rossi D, Pianta S, Magatti M, Sedlmayr P, Parolini O (2012) Characterization of the conditioned medium from amniotic membrane cells: prostaglandins as key effectors of its immunomodulatory activity. *PLoS One* 7:e46956.
137. Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M, Hennerbichler S, van Griensven M et al. (2007) Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng* 13:1173-1183.
138. Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I et al. (2005) Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 79:528-535.
139. Vellasamy S, Sandrasaigaran P, Vidyadaran S, George E, Ramasamy R (2012) Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue. *World J Stem Cells* 4:53-61.
140. Rus Ciucă D, Sorițău O, Sușman S, Pop VI, Miha CM (2011) Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stem cells from the placenta. *Romanian J Morphol Embryol Rev Roum Morphol Embryol* 52:803-808.
141. Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S et al. (2006) Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 340:944-952.
142. Pasquinelli G, Tazzari P, Ricci F, Vaselli C, Buzzi M et al. (2007) Ultrastructural characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta. *Ultrastruct Pathol* 31:23-31.



143. Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M et al. (2007) Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med* 1:296-305.
144. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A et al. (2006) Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol* 194:664-673.
145. Battula VL, Bareiss PM, Trembl S, Conrad S, Albert I et al. (2007) 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* 75:279-291.
146. Divya MS, Roshin GE, Divya TS, Rasheed VA, Santhoshkumar TR et al. (2012) 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* 3:57.
147. Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, Schlenke P (2010) Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology? *Transfus Med Hemotherapy Off Organ Dtsch Ges Transfusionsmedizin Immunhamatologie* 37:75-83.
148. Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L et al. (2011) 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* 112:1206-1218.
149. Schneider RK, Püllen A, Kramann R, Bornemann J, Knüchel R et al. (2010) Long-term survival and characterisation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on dermal equivalents. *Differ Res Biol Divers* 79:182-193.
150. De Bruyn C, Najar M, Raicevic G, Meuleman N, Pieters K et al. (2011) A rapid, simple, and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment. *Stem Cells Dev* 20:547-557.
151. La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T et al. (2009) 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* 131:267-282.
152. Lu L-L, Liu Y-J, Yang S-G, Zhao Q-J, Wang X et al. (2006) Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 91:1017-1026.
153. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
154. Zhu X, Shi W, Tai W, Liu F (2012) The comparison of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived Mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 350:277-287.
155. Peter S, Scutt AM, Wright PC, Biggs CA (2013) Comparative study of in vitro expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett* 35:463-469.

156. Peptanariu D, Zlei M, Negură A, Carasevici E (2012) Optimization of culture conditions for bone marrow stromal cells in RPMI-1640 medium. *Rev Medico-Chir Soc Medici Şi Nat Din Iaşi* 116:222-227.
157. Noort WA, Oerlemans MIFJ, Rozemuller H, Feyen D, Jaksani S et al. (2012) Human versus porcine mesenchymal stromal cells: phenotype, differentiation potential, immunomodulation and cardiac improvement after transplantation. *J Cell Mol Med* 16:1827-1839.
158. Boxall SA, Jones E. (2012) Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int* 2012:975871.
159. Lee MW, Kim DS, Yoo KH, Kim HR, Jang IK et al. (2013) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell gene expression patterns vary with culture conditions. *Blood Res* 48:107-114.
160. Pierantozzi E, Gava B, Manini I, Roviello F, Marotta G et al. (2011) Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells Dev* 20:915-923.
161. Martínez-Lorenzo MJ, Royo-Cañas M, Alegre-Aguarón E, Desportes P, Castiella T et al. (2009) Phenotype and chondrogenic differentiation of mesenchymal cells from adipose tissue of different species. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 27:1499-1507.
162. González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M (2009) Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 136:978-989.
163. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH (2006) Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 24:150-154.
164. Sachs PC, Francis MP, Zhao M, Brumelle J, Rao RR et al. (2012) Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites. *Cell Tissue Res* 349:505-515.
165. Wan Safwani WKZ, Makpol S, Sathapan S, Chua KH (2011) The changes of stemness biomarkers expression in human adipose-derived stem cells during long-term manipulation. *Biotechnol Appl Biochem* 58:261-270.
166. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W et al. (2013) Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res* 353:65-78.
167. Ferro F, Spelat R, Beltrami AP, Cesselli D, Curcio F (2012) 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* 7:e48945.
168. Kerkis I, Caplan AI (2012) Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Eng Part B Rev* 18:129-138.
169. Fournier BPJ, Ferre FC, Couty L, Lataillade J-J, Gourven M et al. (2010) Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Eng Part A* 16:2891-2899.



# Biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire

---

## 2.1 Définition du terme biomatériau

Il s'agit d'un matériau inerte non vivant destiné à être en contact temporaire ou permanent avec des systèmes biologiques (tissus, organes ou fluides d'un être vivant) pour évaluer, traiter, augmenter ou remplacer un tissu, un organe, une fonction quelconque du corps humain [Williams, 1987]. Actuellement, se développe l'utilisation de biomatériaux recouverts de molécules biologiques ou pré-cultivés avec les cellules du patient pour accélérer l'intégration tissulaire, ce nouveau concept est celui de l'ingénierie tissulaire. Le domaine des biomatériaux intéresse donc les médecins, les ingénieurs (chimie, métallurgie), les biologistes. Le marché mondial du biomatériau est estimé à 88,4 milliards de dollars d'ici à 2017, passant de 44,0 milliards de dollars en 2012.

## 2.2 Domaines d'application des biomatériaux

Les biomatériaux prennent une part de plus en plus grande dans la médecine actuelle. Leurs applications sont innombrables et intéressent les diverses spécialités : valves cardiaques, cathéters, cœur artificiel, prothèses articulaires, implants dentaires, dialyse, prothèses vasculaires et trachéales, lentilles cornéennes, cristallins artificiels ... (2.1).

## 2.3 Types de biomatériaux

La nature (greffe d'origine biologique, métaux, céramiques, ...), les applications biomédicales (prothèses, revêtements prosthétiques, comblements de défauts osseux, ...) et les propriétés des biomatériaux (stabilité à long terme de l'implant, dégradation contrôlée,...) sont très diverses. Il existe donc une grande diversité de biomatériaux que l'on peut classer en quatre grandes catégories suivant leur nature [Menasché, 2012] :

- \* Les biomatériaux métalliques (métaux purs, alliages métalliques, ...)
- \* Les biomatériaux céramiques (céramiques bioinertes, bioactives, ...)
- \* Les biomatériaux à base de polymères de synthèse (plastiques, résorbables ou non, ...)
- \* Les biomatériaux d'origine naturelle : animale (collagène, chitosan, hyaluronan, ...) ou végétale (cellulose, ...).

Contrairement à ce que l'on pourrait penser intuitivement, les biomatériaux naturels ne représentent actuellement qu'environ 10% du marché mondial des biomatériaux.

La figure (Fig 2.1) montre l'apparition de quelques biomatériaux au cours du temps, et notamment celle des verres bioactifs en 1971.

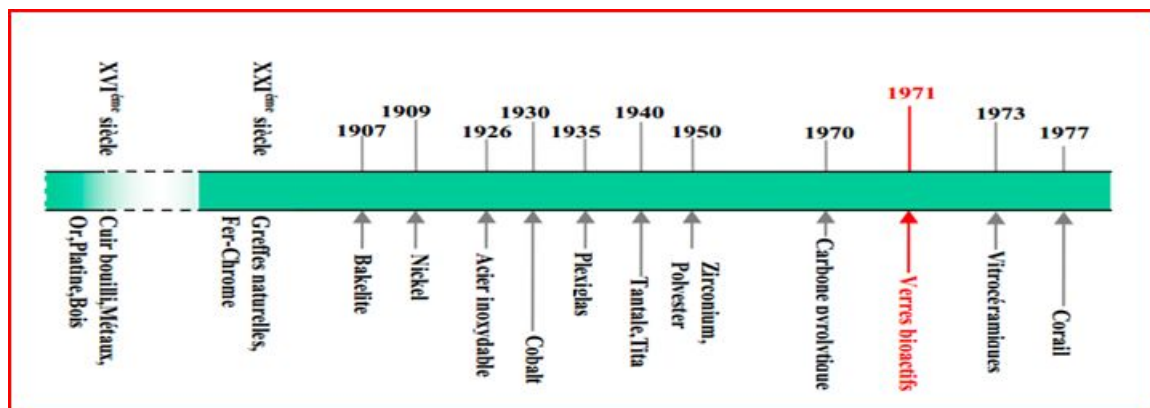


FIGURE 2.1 – Quelques dates d'apparition des biomatériaux [Durrieu, 2005]

## 2.4 Propriétés de biomatériaux

Le biomatériau (ou scaffold) a plusieurs rôles bien définis dans l'ingénierie tissulaire conventionnelle [Langer, 2013, Mironov et al., 2009, Hutmacher et al., 2007] :

- \* Il doit permettre l'adhésion et la prolifération cellulaire sur un substrat solide, ce qui semble être un environnement favorable à la fonction cellulaire ;
- \* Il doit reproduire la forme spécifique de l'organe et maintenir cette forme dans le temps ;

- \* Il peut être un vecteur de facteurs de migration, prolifération et différenciation pour les cellules souches environnantes ;
- \* La structure poreuse des scaffolds solides doit permettre l'ensemencement cellulaire et la mise en place d'une vascularisation [Karageorgiou and Kaplan, 2005] ;
- \* Ses propriétés mécaniques doivent être suffisantes pour supporter la fonction du tissu ;
- \* De plus, la résorption du scaffold doit se faire en parallèle avec la reconstruction tissulaire.

### 2.4.1 Principe de bioactivité

La bioactivité est définie comme la propriété de créer des liens "chimiques" étroits au niveau de l'interface implant/ tissu receveur. Elle dépend directement des propriétés physico-chimiques du matériau. Durant les trente dernières années, les efforts de recherche se sont portés sur l'enjeu de rendre un matériau "bioactif" par modification de sa surface :

- \* la modulation des propriétés physiques telles que la mouillabilité, la charge de surface, la topographie ou la rugosité ;
- \* le greffage de molécules en surface du matériau ou le dépôt par adsorption de molécules, en vue de former des films "biomimétiques" ;
- \* le dépôt de films auto-assemblés de polyélectrolytes, appelés films multicouches de polyélectrolytes.

#### 2.4.1.1 Films multicouches de polyélectrolytes

Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, Irving Langmuir et Katherine Blodgett décrivent la possibilité d'obtenir des films minces nano-structurés, appelés films de « Langmuir-Blodgett » ou films LB, dont l'épaisseur peut varier de quelques Angströms à plusieurs nanomètres. Ils consistent à réaliser un film monocouche par le dépôt de molécules tensioactives à une interface air/eau. Cette monocouche est ensuite transférée sur un support solide par trempage de celui-ci dans la sous-phase [Blodgett, 1934, Blodgett and Langmuir, 1937](Fig 2.2). L'adsorption est basée sur des interactions de type hydrophile/hydrophobe. Cette technique est principalement exploitée dans le but d'étudier les bicouches lipidiques, dont l'un des intérêts concerne la possibilité de mimer la paroi des cellules. Cependant, cette technique présente de nombreux inconvénients, notamment l'instabilité des films, les restrictions de la topographie liées au substrat, ainsi que des réactions parasites non contrôlées entre les solvants et les molécules contenues dans le film. De plus, d'un point de vue énergétique, après le dépôt de seulement quelques couches de tensio-actifs, la désorption devient plus im-

portante que l'adsorption.

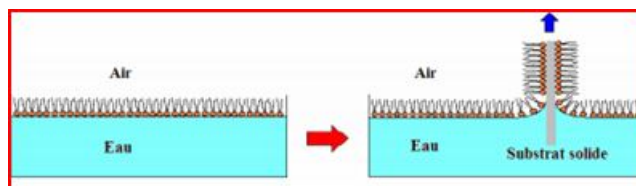


FIGURE 2.2 – Principe du transfert d'une monocouche par la méthode de Langmuir [Blodgett and Langmuir, 1937]

Dans les années 1980, d'autres méthodes d'auto-assemblage ont été développées pour former des films organiques structurés. Ainsi, la chimie de coordination des systèmes métal/phosphonate [Cao et al., 1992] et la chimie covalente [Netzer and Sagiv, 1983] ont constitué les premières alternatives à la technique LBL. Ces méthodes sont cependant restreintes à certaines molécules et ne permettent pas de réaliser des films de grande qualité. De plus, il est difficile d'obtenir des rendements de 100% avec les réactions chimiques, ce qui limite les possibilités de conserver les densités de groupes fonctionnels d'une couche à l'autre. Un problème de reproductibilité dans les caractéristiques des films se pose également.

Les films multicouches de polyélectrolytes sont des films minces de quelques nanomètres à quelques micromètres, ils ont été découverts par Iler en 1966 à partir de complexes colloïdaux formés après mélange de deux solutions de polyélectrolytes de charges opposées [Iler, 1966]. Cependant, ce procédé de fabrication de films n'a connu un véritable essor tant scientifique qu'industriel qu'après que Decher et ses collaborateurs eurent développé le processus de construction couche par couche (Layer by Layer ou LBL) des films multicouches de polyélectrolytes [Decher et al., 1992]. Leur application dans le cadre des biomatériaux est la constitution d'interfaces fonctionnalisables pour des matériaux bioinertes.

## 2.4.2 Principe de dépôt couche par couche

Le principe de la méthode de dépôt couche par couche, "Layer-by-Layer" (LbL) est décrit très schématiquement dans (Fig 2.3). Un substrat chargé négativement est d'abord exposé à une solution de polyion de charge opposée (polycation) pendant un temps assez court (de 5 à 20 min) [Ramsden et al., 1995, Advincula et al., 1996, Hoogeveen et al., 1996] (Fig 2.3). Les polycations s'adsorbent à la surface et le surplus est éliminé par simple rinçage [Caruso et al., 1998, Lvov et al., 1999]. Après cette opération, la surface n'est plus neutre mais chargée positivement : il y a surcompensation de charge lors de l'adsorption [Caruso et al., 1998, Ladam et al., 2000]. Par conséquent,

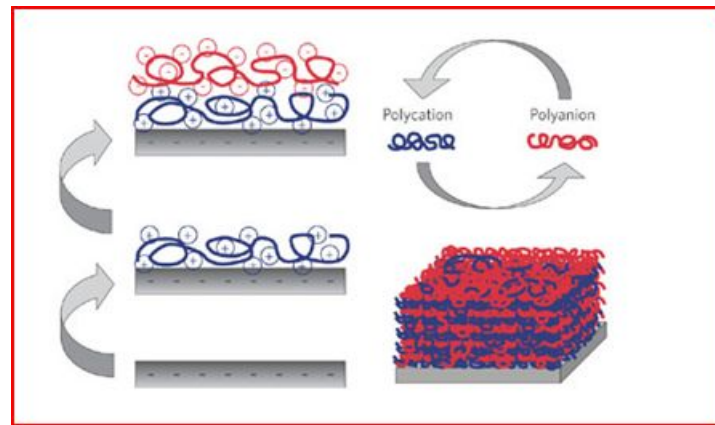


FIGURE 2.3 – Schéma simplifié de la construction d'une multicouche de polyélectrolytes par adsorptions successives de polycations et de polyanions

lorsque ce substrat est exposé à une seconde solution, contenant des polyanions, ceux-ci peuvent également interagir et s'adsorber à la surface. Cette adsorption est à nouveau suivie d'une étape de rinçage et le signe de la charge de surface, à l'issue de celui-ci, est de nouveau inversé. Des cycles consécutifs, alternant l'adsorption de polycations et de polyanions, permettent ainsi la croissance par étapes des architectures de polyélectrolytes. Grâce aux interactions électrostatiques entre les polyélectrolytes et le substrat, les films présentent généralement une bonne uniformité et une bonne adhésion sur leur substrat.

Néanmoins, même si au cours de la construction ce sont les interactions électrostatiques qui prédominent, d'autres types d'interactions peuvent entrer en jeu comme des interactions de type hydrophobes ou des liaisons hydrogènes, en fonction de la nature des polyélectrolytes employés [Haynie et al., 2005].

#### 2.4.2.1 Nature du substrat

La construction de multicouches par la méthode LbL peut être effectuée sur bon nombre de substrats. Ainsi le dépôt couche par couche peut être appliqué à de nombreux polyélectrolytes, qu'ils soient naturels comme le collagène [Zhang et al., 2005], la fibrine, l'acide hyaluronique [Thierry et al., 2003b] ou le chitosane [Elsabee et al., 2008], ou qu'ils soient synthétiques comme le poly(styrène sulfonate) (PSS) ou la poly(allylamine) (PAH). La nature des polyélectrolytes va déterminer les caractéristiques physico-chimiques des assemblages, tout d'abord dans leur mode de croissance.

#### 2.4.3 Chitosane

Polysaccharide biodégradable et non toxique possédant une faible immunogénicité, il est obtenu par désacétylation alcaline de la chitine, polysaccharide extrait de



l'exosquelette des crustacés et des insectes. Il est composé de deux sous-unités : la D-glucosamine et la Nacetyl-D-glucosamine liées par une liaison glucosidique (Fig 5.1). Le chitosane possède un degré élevé de réactivité chimique dû à son groupement

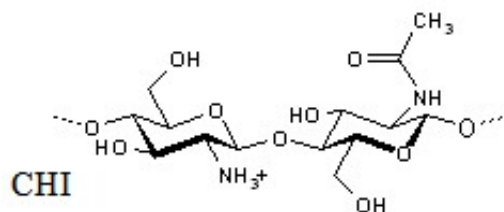


FIGURE 2.4 – Chitosane : unité polymérique

amine primaire libre qui lui confère une forte densité de charges positives (transformation de  $\text{NH}_2$  en  $\text{NH}_3^+$  en milieu acide). Une autre spécificité du chitosane est sa structure chimique particulière, qui permet d'entrevoir des capacités à interagir, complexer ou adsorber avec d'autres substances chimiques. Ce comportement est essentiellement attribué :

- \* aux propriétés hydrophiles des chaînes macromoléculaires dues à la présence des nombreux groupes hydroxyles des unités glucose ;
- \* à la présence de groupes fonctionnels (hydroxyle, acétamide et amine) et à leur grande réactivité ;
- \* et à la structure flexible des chaînes de polymères (fonction du pH et de la température).

Le chitosane présente des propriétés de rétention d'eau, de chélation d'ions, de complexation et d'adsorption de molécules ou de polymères. Son caractère cationique en milieu acide permet son adhésion à des surfaces chargées négativement.

La chitine et le chitosane diffèrent par leur degré d'acétylation, noté DA [Ravi Kumar, 2000, Minagawa et al., 2007], qui représente le pourcentage d'unités N-acétyl-D-glucosamine. Il n'existe cependant pas de valeur précise du DA proposant une limite entre les termes chitine et chitosane. Néanmoins, nous appellerons chitosane tout copolymère dont le DA est inférieur à 60 % comme c'est l'usage dans la littérature relative à ce biopolymère [Vachoud et al., 2001, Rinaudo, 2006].

La source majeure du chitosane vendu commercialement provient de la désacétylation de la chitine obtenue à partir de crustacés. La production de la chitine (et de chitosane) provient, en effet, des crevettes et des crabes qui représentent les deux sources naturelles les plus abondantes. Ce sont donc des produits d'origine animale. Néanmoins, de nouvelles voies alternatives sont apparues comme par exemple la production de biopolymères à partir de cultures de moisissures (*Aspergillus niger*), en raison notamment des inquiétudes sanitaires liées à l'encéphalite spongiforme

bovine. Certaines autorités de la Santé suggèrent, en effet, de ne pas utiliser des matériaux d'origine animale pour des applications biomédicales. La chitine obtenue à partir d'une source fongique bien caractérisée et produite selon un procédé standardisé pourrait être utilisée à ce propos [Rinaudo, 2006].

La chitine présente d'intéressantes caractéristiques qui influencent notamment le choix des méthodes d'extraction/isolation et de purification :

- \* étant un polymère polyacétylé, la chitine est très sensible à l'hydrolyse acide [Brine and Austin, 1981] ;
- \* le polymère est caractérisé par sa stabilité en milieu alcalin ;
- \* la chitine est sensible à des températures de 40-50, ce qui peut conduire à sa dénaturation en fonction du temps ;
- \* le biopolymère est doté d'une capacité de séquestrer les métaux, ce qui nécessite plusieurs lavages à l'eau désionisée [Muzzarelli and Rocchetti, 1985] ;
- \* la chaîne macromoléculaire est caractérisée par un nombre réduit des groupes amines, en raison d'une unité contre 6 de glucose, ce qui lui confère des propriétés de chiralité

. Les procédés les plus courants de fabrication du chitosane à partir de la chitine font appel à une série de traitements chimiques incluant des étapes (acides et basiques) d'extraction des protéines, de déminéralisation et de désacétylation [Lertsutthiwong et al., 2002] (Fig 2.5). Le chitosane est soluble dans les solutions

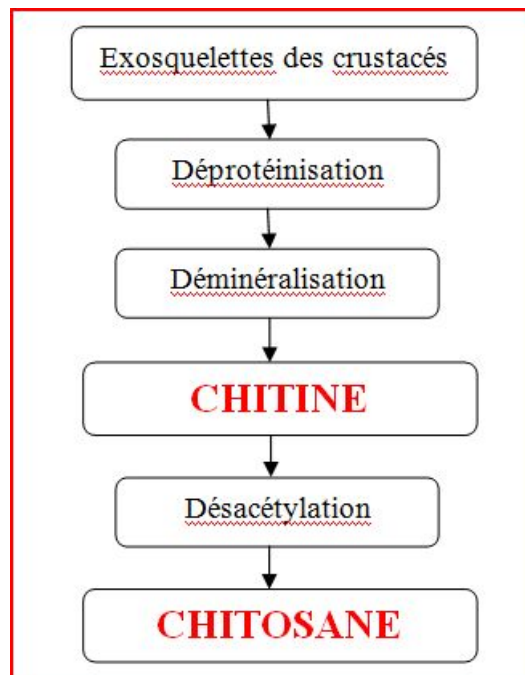


FIGURE 2.5 – Production de la chitine et du chitosane à partir des exosquelettes des crustacés

d'acides dilués [Limam et al., 2011] dans lesquelles il forme un polyélectrolyte cationique.

#### 2.4.3.1 Propriétés du chitosane

Le chitosane possède de nombreuses propriétés biologiques qui le rendent intéressant pour des applications dans le domaine de la santé. Il est ainsi bioactif (favorise la prolifération cellulaire), biodégradable (se résorbe de manière naturelle), et biocompatible (toléré par l'organisme). Par ailleurs, sa structure chimique lui confère des propriétés d'adsorption vis-à-vis de différents composés en solution (colorants, métaux, ...).

**Propriétés biologiques** La principale propriété biologique ayant conduit au choix du chitosane pour cette étude est sa biocompatibilité, c'est-à-dire son aptitude à être utilisé avec une réponse appropriée de l'organisme sans entraîner d'effets adverses, d'où il est utilisé pour ses capacités à induire la régénération des tissus [Gao et al., 2012, Kiyozumi et al., 2007, Tai et al., 2012] et spécifiquement les tissus vasculaires [Han et al., 2013].

La propriété de biodégradabilité du chitosane chez les mammifères est quant à elle due à l'action d'une enzyme non spécifique, le lysozyme, sur la liaison glucosidique des unités N-acétyl-D-glucosamine [Maurstad et al., 2013].

Une autre propriété importante du chitosane est sa capacité d'accélération du processus de cicatrisation des plaies, propriété découlant de sa bioactivité, mise en évidence par de nombreux auteurs [Friedman et al., 2012, Ishihara et al., 2012] et due à la structure de type glycosaminoglycane du chitosane.

**Effet du degré d'acétylation sur les propriétés biologiques** Plusieurs études montrent une meilleure adhésion et prolifération des kératinocytes, des fibroblastes, des ostéoblastes et des cardiomyocytes sur le chitosane de faible degré d'acétylation [Hussain et al., 2013, Amaral et al., 2007, Chatelet et al., 2001]. Ces auteurs expliquent ce résultat par la densité de charge du chitosane qui augmente lorsque le DA diminue, ce qui favorise les interactions électrostatiques avec les parois des cellules chargées négativement. Ainsi, si Hamilton et al. [Hamilton et al., 2007] ont obtenu un haut degré de prolifération de cellules osseuses sur des films de chitosane de faible DA, compris entre 4 et 24 %, Montembault et al. [Montembault et al., 2006] ont obtenu des régénérations maximales de tissus cartilagineux pour des valeurs de DA plus élevées, allant de 30 à 40 %.

En ce qui concerne la biodégradabilité du chitosane, Hsu et al. [Hsu et al., 2004] ont montré qu'un DA élevé conduisait à une biodégradation plus rapide du chitosane.

Ces auteurs expliquent ce résultat par l'état structural du matériau. Ainsi, plus le DA est élevé, plus le nombre de fonctions acétylées (-NHCOCH<sub>3</sub>) est important, induisant une prédominance des zones amorphes par rapport aux zones cristallines, favorisant ainsi la dégradation du polymère.

**Effet de la masse molaire sur les propriétés biologiques** En ce qui concerne la bioactivité du chitosane, il n'y a pas à notre connaissance d'études portant sur l'effet de la masse molaire sur l'adhésion et la prolifération cellulaire, propriétés biologiques nous intéressant dans le cadre de cette étude. Néanmoins, d'autres propriétés biologiques du chitosane, telles que ses activités antifongique, antithrombotique (anticoagulante), antimicrobienne, antitumorale, antioxydante et immunostimulante ont fait l'objet de recherches récentes [Le Dévédec et al., 2008, Seyfarth et al., 2008, Wang et al., 2008].

Ces études montrent que le chitosane de faible masse molaire présente des propriétés biologiques accrues. Cependant, Le Devedec [Le Dévédec et al., 2008] insiste sur le fait que les mécanismes d'action moléculaire restent à élucider. En outre, notons que la biodégradabilité du chitosane dépend également de la masse molaire du chitosane vu que plus les chaînes de polymère sont longues, plus la cinétique de dégradation du chitosane par les enzymes spécifiques est lente [Zhang et al., 2002].

**Activité antimicrobienne du chitosane** Le chitosane, sous différentes formes : solutions, films et composites, a été considéré comme matériau antimicrobien contre une grande variété de cibles : algues, bactéries, levures et champignons dans différentes expériences réalisées *in vitro* et *in vivo*. Les premières recherches décrivant le potentiel antimicrobien du chitosan et ses dérivés datent des années 1980-1990 [Hadwiger et al., 1994, Papineau et al., 1991, Sudarshan et al., 1992].

L'activité antimicrobienne est fortement dépendante des caractéristiques du chitosane (origine, degré de polymérisation et pourcentage de résidus N-acétylés) et des facteurs environnementaux tel que le pH [Tikhonov et al., 2006].

En général, dans la plupart des études portant sur l'activité antibactérienne du chitosane, ce matériau est considéré comme bactéricide (tue les bactéries vivantes ou une fraction de celles-ci) ou bactériostatique (empêche la croissance des bactéries, mais sans préciser si les bactéries ont été tuées ou pas), souvent sans distinction entre les activités. Des données récentes de la littérature ont tendance à caractériser le chitosane en tant que bactériostatique plutôt que bactéricide [Coma, 2008] bien que le mécanisme exact n'est pas entièrement compris et plusieurs autres facteurs peuvent contribuer à cette action antibactérienne.

L'activité antibactérienne du chitosane est attribuée aux interactions électrostatiques

entre le groupement amine ( $\text{NH}_3^+$ ) porté par ce matériau et la membrane cellulaire des bactéries chargées négativement [Tsai and Su, 1999]. D'une part, ces interactions provoquent des changements dans la perméabilité de la membrane bactérienne ainsi que des déséquilibres osmotiques inhibant la croissance des micro-organismes. D'autre part, elles induisent l'hydrolyse des peptidoglycanes constituant la paroi de ces micro-organismes conduisant à la fuite d'électrolytes intracellulaires tels que les ions potassium et autres constituants protéiques de faible poids moléculaire (par exemple : protéines, acides nucléiques, glucose et lactate déshydrogénase) [Fang et al., 1994, Devlieghere et al., 2004, Raafat and Sahl, 2009].

L'efficacité bactérienne sur les bactéries gram-positives ou Gram négatif est, cependant quelque peu controversée. Certains auteurs ont affirmé que le chitosane a généralement montré des effets plus importants pour les bactéries gram-positives (par exemple, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. bulgaris*, etc) que pour les bactéries gram-négatives (par exemple, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus typhymurium*, etc) [Coma, 2008, No et al., 2002]. Inversement, il a été démontré que l'hydrophilicité de bactéries gram-négatives est beaucoup plus élevée que dans les bactéries Gram-positives, ce qui les rendent plus sensibles au chitosane [Chung et al., 2004]. La densité de charge sur la surface cellulaire est un facteur déterminant pour établir la quantité de chitosane adsorbé. Plus la quantité de chitosane adsorbé est élevée, plus on aura de modifications de la structure et de la perméabilité de la membrane cellulaire. Cela suggère que le mode d'action antibactérienne dépend du micro-organisme hôte [Raafat and Sahl, 2009].

Un autre mécanisme proposé basé sur la chélation de métaux, la suppression d'éléments de spores et la liaison aux éléments nutritifs essentiels à la croissance bactérienne [Roller and Covill, 1999]. Il est bien connu que le chitosane possède d'excellentes capacités liant les métaux dues aux groupes amines responsables de l'absorption de cations métalliques par chélation.

**Activité antifongique du chitosane** Laflamme *et al.* ont montré que l'utilisation du chitosane à partir d'une concentration de 1g/L réduit considérablement la croissance des souches fongiques suivante : *Cylindrocladium floridanum*, *Cylindrocarpon destructans* et *Fusarium oxysporum* [Laflamme et al., 2000]. Roller et Covill (1999) [Roller and Covill, 1999] ont étudié l'action du glutamate de chitosane sur la croissance d'*Aspergillus flavus*, de *Cladosporium cladosporioides*, de *Mucor racemosus*, de *Pennicillium aurantiogriseum* et de *Sachharomyces cerevisiae*, dans le jus de pomme. L'obtention d'une action inhibitrice contre toutes ces souches a nécessité une concentration de chitosane de 5 g/L.

**Fonctionnalités et applications du chitosane** La nature  $\beta$  (1-4) des liaisons glycosidiques confère au chitosane des propriétés filmogènes. En outre, ces films présentent une perméabilité importante et leur utilisation dans les secteurs économiquement porteurs comme les industries alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques ou agricoles, a fait l'objet de nombreux brevets. Différentes revues ont été consacrées aux nombreuses applications du chitosane [Kumar et al., 2004]. Parmi les nombreuses applications, nous pouvons citer :

**Traitement des eaux usées** Le chitosane est utilisé dans le traitement des eaux usées pour ses propriétés coagulantes et son pouvoir chélatant qui lui permettent de fixer les métaux lourds, même en de très faibles quantités.

**Industrie agro-alimentaire** Le chitosane possède des propriétés coagulantes permettant d'agglomérer puis de séparer les particules colloïdales dispersées. Le chitosane est employé en outre pour immobiliser les enzymes industriels (papaïne, invertase, ...). En agronomie, l'enrobage des semences avec du chitosane leur permet de résister aux attaques fongiques; cette activité antifongique se manifeste également pendant la vie de la plante de façon directe ou par stimulation de certains processus de défense.

**Médecine** Le chitosane s'avère très efficace pour ses effets hypocholestérolémiques, ses actions anti-ulcère et anti-acide [Hejazi and Amiji, 2003], dans les soins des blessés et des brûlés, pour les verres de contacts durs et souples, les membranes d'organes artificiels et dans l'immobilisation d'enzymes ou de cellules vivantes [Remunan-Lopez and Bodmeier, 1996].

**Pharmacie** La principale utilisation du chitosane dans l'industrie pharmaceutique est en tant que matériau enrobant de micro-capsules ou de micro-sphères contenant les substances à délivrer à l'intérieur de l'organisme. Le fait d'utiliser un matériau tel que le chitosane permet de contrôler la libération des substances par ces systèmes, de mieux atteindre les organes cibles et l'amélioration du taux de solubilité et de la disponibilité des drogues non solubles dans des phases aqueuses.

**Avantages du chitosane dans la préparation des biomatériaux** Dans leur revue sur les applications des biomatériaux à base de chitosane, Suh et Matthieu [Francis Suh and Matthew, 2000] ont souligné un certain nombre de caractéristiques positives du chitosane, parmi lesquelles la dépolymérisation physiologique en présence de lysozymes (une caractéristique extrêmement pratique car le "scaffold" doit être temporaire), l'absence de réaction inflammatoire chronique, l'absence d'encapsulation fibreuse, les effets chimio-attractifs favorables, accompagnés d'excellentes caractéristiques technologiques qui permettent de le traiter dans des structures poreuses ou nanofibrillaires comme l'a récemment décrit par Muzzarelli [Muzzarelli, 2011].

Son aptitude à former des films permet d'obtenir des structures poreuses par congélation et lyophilisation de solutions de chitosane, pour une utilisation dans la transplantation de cellules et la régénération tissulaire : l'adhésion cellulaire et la prolifération chondrocytaire sur ces structures ont été rapportées par Nettles *et al.* et Oliveira *et al.* [Nettles *et al.*, 2002, Oliveira *et al.*, 2008]. Les chitosanes biologiquement actifs obtenus par piégeage ou immobilisation chimique d'oligopeptides et de protéines, et les stratégies associées de leur développement pour l'ingénierie tissulaire, ont été examinés par Jiang, Kumbar, Nair, et Laurencin [Laurencin *et al.*, 2008].

La formation des scaffolds de chitosane a lieu également lors de l'addition de *n*-butanol à des solutions aqueuses de chitosane : l'adhésion initiale et la vitesse de prolifération de fibroblastes dermiques humains dans ce type de scaffolds étaient presque le double de celle du contrôle, après 3 jours de culture, en raison principalement de leur surface spécifique qui était assez grande pour la fixation des cellules et la croissance des tissus [Chun *et al.*, 2008].

Un exemple de la polyvalence du chitosane en termes de "filmogénicité" et de formation de pores est fourni par Zhong *et al.* [Zhong *et al.*, 2011] qui a adopté la technique d'émulsion suivie d'une lyophilisation pour fabriquer des gels de chitosane et poly ( $\epsilon$ -caprolactone). Le choix de la température de congélation et la composition de l'émulsion permettent de préparer des scaffolds constitués de films minces et poreux.

#### 2.4.4 Hyaluronane

L'acide hyaluronique (HA) fut isolé pour la première fois par Meyer et Palmer en 1934 à partir de l'humeur vitreuse des yeux bovins [Meyer and Palmer, 1934]. Meyer est le pionnier de la recherche sur le HA ; malheureusement ses études se sont interrompues au cours de la Deuxième Guerre mondiale et l'histoire de la recherche sur l'acide hyaluronique ne reprend qu'en 1948 avec les travaux de Hadidian et Pirie sur sa préparation [Hadidian and Pirie, 1948]. Quelques années plus tard, Jeanloz a travaillé sur la détermination de la structure de ce polysaccharide

[Jeanloz and Flowers, 1962, Stoffyn and Jeanloz, 1954]. Trois années plus tôt, Blix a publié la première détermination de la viscosité intrinsèque de l'acide hyaluronique obtenu à partir du liquide synovial bovin [Blix, 1951]. Un point important de similitude entre l'acide hyaluronique et la chitine partiellement désacétylée est l'unité de répétition GlcNAc. L'acide hyaluronique est composé d'unités d'acide glucuronique (GlcUA) et de N-acétylglucosamine liées en alternance par des liaisons  $\beta$ -1,3 et  $\beta$ -1,4 (Fig 2.6). L'acide hyaluronique est un composé clé dans la MEC du cartilage, grâce à sa nature de type hydrogel, sa masse moléculaire extrêmement élevée et son anionicité modérée. La présence d'un acide uronique dans l'unité de répétition du HA lui

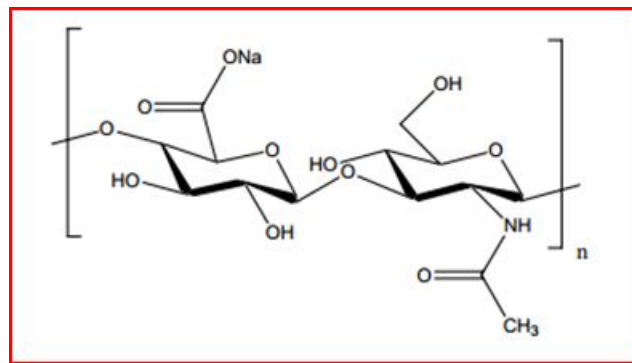


FIGURE 2.6 – Unité de répétition disaccharidique de l'hyaluronane

confère des propriétés de polyélectrolyte et le rend parfaitement soluble en milieu aqueux neutre. C'est un polyanion dont une caractéristique importante en tant que polyacide est la valeur de son pK intrinsèque (pK<sub>0</sub>) qui peut être obtenue par titration potentiométrique d'une solution de HA sous forme acide. Fouissac et al. ont obtenu une valeur de pK<sub>0</sub> = 2,9 ± 0,1. Un pH de 7.5 est nécessaire pour une neutralisation totale des groupements carboxyliques [Fouissac et al., 1992]. Balazs a montré que lorsque le pH de la solution de HA diminue, en ajoutant progressivement du HCl, un gel se forme à pH 2.5, ce qui s'expliquerait par la diminution de la dissociation des carboxylates, favorisant les liaisons hydrogène et conduisant à la formation du gel [Balazs, 1966, Gatej et al., 2005]. La synthèse d'AH est sous la dépendance de 3 glycosyltransférases transmembranaires (AH Synthétases 1, 2 et 3). L'EMMPRIN [Toole and Slomiany, 2008] est une métalloprotéinase présente au sein de la matrice extracellulaire. Cette glycoprotéine stimule la production d'AH. L'acide hyaluronique contribue à l'élasticité et à la viscosité du liquide synovial, et agit comme un amortisseur de fluide tout en maintenant les caractéristiques structurales et fonctionnelles de la matrice du cartilage. Ce polymère hautement viscoélastique remplit l'espace intercellulaire entre le réseau de collagène fibrillaire, entourant l'ensemble des cellules, les vaisseaux sanguins et lymphatiques et les éléments neuronaux dans le tissu fibreux de l'articulation. Il inhibe également la formation et la libération de prostaglandines, induit l'agrégation et la synthèse de protéoglycanes, et module la



réponse inflammatoire.

L'acide hyaluronique est produit industriellement à l'aide de *Streptococcus sp.*, néanmoins cette approche est confrontée à une préoccupation croissante en raison du risque d'endotoxines d'accompagnement. C'est pourquoi la production d'acide hyaluronique recombinant a suscité un intérêt croissant, et les novozymes l'ont produit avec les bactéries *Bacillus subtilis* recombinantes [Widner et al., 2005]. Dans leur étude, Liu *et al.* [Liu et al., 2011] ont rapporté l'historique, les marchés actuels, et la production de l'acide hyaluronique par *Streptococcus zooepidemicus*, ainsi que les défis auxquels fait face la production de cellules microbiennes. Les bactéries utilisées comme hôtes comprennent *Bacillus sp.*, *Lactococcus lactis*, *Agrobacterium sp.*, et *Escherichia coli*, qui produisent des hyaluronanes ayant des longueurs de chaîne différentes dans un mélange, donc un produit monodispersé qui représente encore un défi. Cependant, les hyaluronanes avec une masse moléculaire relativement faible (> 10 kDa) ont une bonne visco-élasticité, rétention d'humidité et mucoadhésion, c'est à dire des qualités souhaitables en ophtalmologie et orthopédie ainsi que dans la cicatrisation des plaies et dans les cosmétiques. Néanmoins, dans le but de la régénération de tissus, des valeurs de PM beaucoup plus élevés, dans la gamme 700-6000 kDa, sont nécessaires.

Un grand nombre de préparations différentes d'acide hyaluronique sont disponibles dans le commerce en Europe et aux USA : chacune est produite à partir de crêtes de coq ou par biotechnologie recombinante et se distingue par la masse moléculaire et par conséquent le temps de séjour dans l'articulation, et les propriétés rhéologiques.

Les hyaluronanes ont une efficacité comparable à celle des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens, mais sans effets indésirables gastro-intestinaux, et leurs avantages peuvent durer plus longtemps avec les corticoïdes intra-articulaires. Dans la plupart des préparations commerciales les hyaluronanes ont la même structure que l'acide hyaluronique endogène. L'AH agit par l'intermédiaire de sa liaison avec divers récepteurs cellulaires de type transmembranaire. CD44 est le récepteur principal, le plus étudié aujourd'hui. Son état de glycosylation est un des éléments conditionnant sa capacité à se lier avec l'HA. L'HA est catabolisé par des hyaluronidases et par des radicaux libres oxygénés (anion superoxyde,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ) qui génèrent des polymères de poids moléculaire variables, aux propriétés biologiques significativement différentes, opposées sur certains points. Cette notion revêt une importance significative dans le rôle de l'HA dans le déterminisme des maladies inflammatoires, cancéreuses et cardio-vasculaires [Toole and Slomiany, 2008].

### 2.4.4.1 Propriétés biologiques de l'hyaluronane

L'acide hyaluronique est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques. L'AH intervient dans des processus pathologiques variés, notamment inflammatoires, néoplasiques et cardio-vasculaires.

**Rôle anti-inflammatoire de l'hyaluronane** L'extravasation des leucocytes est un phénomène fondamental dans le développement de la réaction inflammatoire. Elle succède à l'attraction des leucocytes, à leur adhésion aux cellules endothéliales et à leur freinage circulatoire. La transmigration est la dernière étape.

Les cellules endothéliales (CEs) jouent un rôle important dans le recrutement des leucocytes sur le lieu de l'inflammation. Les mécanismes qui concourent à ce rôle font intervenir la sécrétion de chemokines mais aussi l'HA présent au sein des CEs [Butler et al., 2009]. La production d'AH par les CEs, au cours des premières étapes de la réaction inflammatoire, est induite par des cytokines pro-inflammatoires ( $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$ ) [Taylor and Gallo, 2006].

Le rôle de l'AH dans ce phénomène de recrutement des leucocytes est évoqué par plusieurs données expérimentales [Butler et al., 2009]. Ainsi, le traitement des souris par l'hyaluronidase réduit significativement le recrutement de leucocytes au lieu de l'inflammation. Une réduction comparable est observée chez des souris transgéniques n'exprimant pas le récepteur CD44. Des anticorps anti-CD44 réduisent significativement les capacités des neutrophiles à être recrutés sur la zone inflammatoire. Au total, l'AH par sa liaison avec CD44 par principalement présent à la surface des cellules impliquées dans la réaction inflammatoire, intervient de manière déterminante dans l'attraction et l'adhésion des leucocytes aux CEs, puis dans la migration transpariétale de ces cellules.

**Rôle de l'hyaluronane dans les pathologies cardiovasculaires** L'HA est principalement impliqué dans la pathogénie de l'athérosclérose. Des modifications inflammatoires constituent le *primum movens* au sein de l'endothélium. Ces réactions inflammatoires sont déclenchées par l'accumulation de lipoprotéines oxydées et de stimulus mécaniques. Il en résulte une surexpression de molécules d'adhésion et la production de nombreuses cytokines et chemokines pro-inflammatoires, aboutissant in fine à l'attraction et à l'accumulation de cellules inflammatoires [Zhao et al., 2008]. CD44 joue un rôle pivot dans l'équilibre entre inflammation et fibrose au sein des lésions d'athérosclérose [Zhao et al., 2008]. Ce récepteur de l'AH est surexprimé au sein de lésions d'athérosclérose et est présent sur toutes les cellules participant au processus (plaquettes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses).

Il a par ailleurs été montré une accumulation d'AH au sein des plaques d'athérosclérose, tout comme celle d'autres GAG (versican, biglycan, décorine). Des souris transgéniques CD44 nul présentent des lésions athéroscléreuses peu importantes. Comme dans la réaction inflammatoire, l'HA peut servir de pont entre cellules endothéliales et cellules leucocytaires et attirer et fixer des cellules inflammatoires sur les plaques. Certains auteurs font de l'association AH-versican une véritable matrice pro-trombotique (fixation de plaquettes et de cellules inflammatoires) [Kolodgie et al., 2004]. Il a été montré que l'AH forme des complexes pathogènes avec les low density lipoproteins [Bot et al., 2008]. Les oligomères de dégradation de l'AH de faible PM, par leur effet angiogène, contribuent à l'aggravation des phénomènes microcirculatoires. Ces oligomères sont la conséquence de l'action des hyaluronidases sur l'HA. De fait, il a été récemment mis en évidence une expression très significativement accrue de la hyaluronidase au sein de plaques d'athérosclérose compliquée [Krupinski et al., 2007, Berbis, 2010].

#### 2.4.5 Scaffolds à base de chitosane et hyaluronane

Grâce à sa nature cationique, le chitosane forme des polyélectrolytes complexes avec une grande variété de polysaccharides anioniques, parmi lesquels l'acide hyaluronique [Muzzarelli et al., 2004]. Les scaffolds de chitosane et d'acide hyaluronique dans les différents ratios ont été préparés, fondés sur l'hypothèse que l'acide hyaluronique pourrait améliorer les propriétés structurelles et biologiques de ces biomatériaux : ils ont été jugés non-cytotoxiques et favorisant l'adhésion cellulaire. L'incorporation de l'acide hyaluronique améliore la production de la matrice extracellulaire [Correia et al., 2011]. De même, l'étude des membranes de chitosane-hyaluronane ensemencées avec des kératinocytes indiquent que le chitosane et l'hyaluronane sont compatibles, ont une structure homogène, des propriétés chimiques appropriées et une biocompatibilité vis-à-vis des cellules [Yao and Wu, 2011].

Domaines	Applications
Cardiovasculaire	Valves cardiaques, matériel pour circulation extra-corporelle, coeur artificiel, assistance ventriculaire, stimulateurs cardiaques, prothèses et endoprothèses (stents) vasculaires, matériels pour angioplastie luminale, cathéters
Chirurgie plastique et reconstructive	Matériaux et implants pour chirurgie esthétique, drains de chirurgie, colles tissulaires, peau artificielle, sutures résorbables
Chirurgie orthopédique	Prothèses articulaires (hanche, coude, genou, poignet), orthèses, ligaments et tendons artificiels, cartilage, matériel de remplacement ou comblement osseux, chirurgie du rachis, réparation de fractures (vis, plaques, clous, broches)
Endocrinologie	Pancréas artificiel, pompes portables et implantables
Odontologie et stomatologie	Matériaux de restauration, comblement dentaire et osseux, traitements prophylactiques, orthodontie, traitements du parodonte et de la pulpe, implants, reconstruction maxillo-faciale
Ophtalmologie	Implants, lentilles, coussinets de récupération, produits visqueux de chambre postérieure
Radiologie et imagerie	Produits de contraste, produits pour embolisation, produits pour radiologie interventionnelle
Urologie et néphrologie	Dialyseurs, poches, cathéters et tubulures pour dialyse, rein artificiel portable, prothèses, matériaux pour traitement de l'incontinence

TABLE 2.1 – Domaine d'application de l'ingenierie tissulaire



# Choix du microenvironnement cellulaire : systèmes de signalisation

---

Afin de maximiser le succès de l'ingénierie tissulaire, la reproduction autant que possible du microenvironnement naturel dans lequel cellule/tissu se développent et fonctionnent normalement à l'intérieur de l'organisme est souhaitable. L'ingénierie tissulaire apporte la MEC et les protéines solubles nécessaires aux cellules pour la construction tissulaire. Cette approche est complétée par l'étude des signaux cellulaires spécifiques susceptibles d'améliorer la construction tissulaire par les cellules [Hibi et al., 2006]. Dans ce chapitre on parle des différents facteurs biochimiques, physico-chimiques (pression partielle en dioxygène, facteurs de croissance) et mécaniques (contraintes mécaniques, bioréacteur), et leurs effets dans la signalisation cellulaire.

### 3.1 Facteurs biochimiques et physico-chimiques

Ce microenvironnement extracellulaire est un réseau de gel hydraté à base de protéines et de protéoglycanes comprenant des signaux solubles et physiques ainsi que des signaux résultant des interactions cellule-cellule [Bottaro et al., 2002] (Fig 3.1). Les liaisons signaux/récepteurs de surface entraînent l'activation de cascades de signalisation intracellulaire responsables de la régulation de l'expression des gènes, l'établissement d'un phénotype cellulaire ou l'homéostasie et la régénération de tissus.

Le microenvironnement comprend une gamme importante de facteurs physiques et chimiques, largement divisés en macromolécules hydratées insolubles (protéines fibrillaires telles que les collagènes, glycoprotéines non collagéniques telles que l'élastine, la laminine ou la fibronectine et des protéoglycanes hydrophiles avec de longues chaînes latérales de glycoaminoglycanes (GAG) appelées signaux physiques, macromolécules solubles (les facteurs de croissance, les chémokine et les cytokines) et protéines d'interaction cellulaire (les molécules d'adhésion cellulaire : CAM)[Bottaro et al., 2002, Lutolf and Hubbell, 2005, Kleinman et al., 2003].

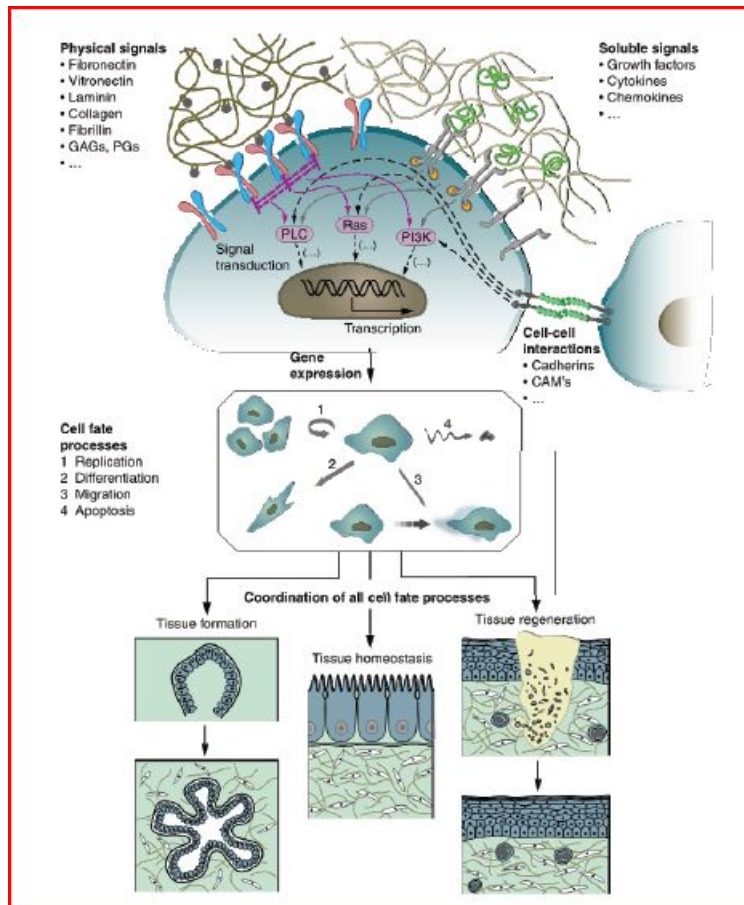


FIGURE 3.1 – Comportement de cellules isolées à l'état individuel et état dynamique de tissus régulés par des interactions moléculaires réciproques entre les cellules et leur environnement [Lutolf and Hubbell, 2005]

Le devenir d'une cellule, à savoir se différencier, proliférer, migrer, entrer en apoptose ou effectuer d'autres fonctions spécifiques, est une réponse coordonnée entre l'ensemble de ces signaux. Le flux d'information entre les cellules et la MEC est bidirectionnel comme observé par exemple dans les processus impliquant la dégradation et le remodelage de cette matrice.

Les facteurs biochimiques sont essentiels pour induire et/ou maintenir le phénotype des cellules différenciées ainsi que les lignages spécifiques à partir de cellules souches [Moreau et al., 2005]. Ces facteurs régulateurs peuvent être de différents types : biochimiques ou physico-chimiques.

### 3.1.1 Pression partielle en dioxygène

De tous les nutriments nécessaires pour les cellulesensemencées sur des biomatériaux pour la régénération des tissus, le dioxygène est l'élément limitant en raison de sa faible solubilité dans les milieux de culture tandis que les cellules consomment cinq à six moles de dioxygène pour chaque mole de monosaccharide. La diminution de la concentration en dioxygène tissulaire active l'expression de gènes endogènes

tels que celui de l'érythropoïétine ou ceux contrôlant l'angiogenèse et la glycolyse.

Afin de contrôler l'expression des gènes par la pression partielle en dioxygène, il est nécessaire de comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans la transduction du signal hypoxique et l'activation des gènes endogènes sensibles à l'hypoxie. Des données récentes indiquent que l'hypoxie contrôle la différenciation de plusieurs types cellulaires au cours du développement [Heinis et al., 2010]. Les effets dus aux variations de la pression partielle en dioxygène ( $PO_2$ ) sont régis par le complexe Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1), un médiateur de la réponse cellulaire à l'hypoxie. La protéine HIF-1 est disponible en quelques secondes dans les cellules maintenues en hypoxie. Lorsque l'apport en  $O_2$  se normalise, HIF-1 disparaît en quelques minutes (ils a une demi-vie d'environ 5 minutes). Il a été démontré par immunohistochimie que HIF-1 est exprimé dans des conditions normoxiques dans le cerveau, le rein, le foie, le coeur et le muscle squelettique de souris [Stroka et al., 2001]. Le dioxygène peut affecter *in vitro* la synthèse de MEC et le développement des tissus [Radisic et al., 2006]. Les effets du dioxygène sur la différenciation de cellules souches sont encore peu connus. Fermor *et al.* ont prouvé que les pressions élevées en dioxygène (21 %) favorisent la prolifération cellulaire. En revanche, des  $PO_2$  inférieures (10 %) favorisent la synthèse des molécules de la MEC [Fermor et al., 1998, Balguid et al., 2009].

### 3.1.2 Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance présentent une importance qui n'est plus à démontrer en ingénierie tissulaire. Leur injection directe sous forme soluble peut accélérer la régénération de cellules mais n'est pas assez efficace. En effet, ils diffusent rapidement loin du lieu de l'injection. Pour leur permettre d'exercer efficacement leurs effets, un "Drug Delivery System" devrait être employé. Par exemple, la diffusion contrôlée de facteurs de croissance au niveau de la lésion pendant une période prolongée est rendue possible en incorporant le facteur dans un support approprié, pour prolonger son activité *in vivo*. Le système de délivrance devra être dégradé par l'organisme après relargage de facteurs de croissance [Tabata, 2003, Freed and Vunjak-Novakovic, 2002, Hori et al., 2001].

La régénération de tissu est souvent induite par l'utilisation des facteurs de croissance sous forme soluble, mais la quantité administrée est beaucoup plus élevée que dans les conditions physiologiques, ce qui peut avoir des effets défavorables [Levy et al., 1998]. Il est également possible d'utiliser la thérapie génique et des cellules transfectées sécrétant le facteur de croissance désiré. Cependant, il est impossible de contrôler le niveau et la durée d'expression du gène [Kasahara et al., 2003, Taniyama et al., 2001].



Les facteurs de croissance peuvent agir soit sur la prolifération cellulaire [Marui et al., 1997], soit sur leur différenciation, soit sur la synthèse de la MEC [Marui et al., 1997, Lo et al., 2003]. Ce sont des polypeptides qui régulent la croissance et les fonctions cellulaires, grâce à leur fixation sur des récepteurs spécifiques de grande affinité. L'activation de la cellule se traduit par une stimulation de signaux transmembranaires, puis par une cascade de phénomènes cytoplasmiques et aboutit à la transcription des gènes spécifiques d'une ou de plusieurs protéines. A la différence des hormones sécrétées à distance du tissu effecteur (sécrétion endocrine), les facteurs de croissance agissent généralement sur les cellules voisines (sécrétion paracrine), et leur concentration plasmatique est très faible. Certaines cellules ont des récepteurs pour leur propre production de facteurs de croissance (sécrétion autocrine).

Le terme "facteurs de croissance" n'est pas idéal pour décrire la fonction de ces polypeptides parce qu'ils ne favorisent pas uniquement la croissance cellulaire, mais aussi induisent les phénomènes de synthèse. Ils agissent essentiellement en tant que régulateurs des activités cellulaires. En outre, ils peuvent avoir un même effet biologique. Ils ne présentent pas de spécificités de synthèse ou d'activité : deux facteurs de croissance peuvent agir de manière semblable. En fait, leur action dépend des conditions physiologiques (état de la cellule, type cellulaire, présence de molécules d'intérêt biologique, ...) et des conditions physico-chimiques, mécaniques ainsi que de leur concentration. Ils sont capables d'autorégulation et peuvent sous- ou sur-réguler l'expression de leurs récepteurs.

Le sérum de veau foetal (SVF) est l'une des premières sources de facteurs de croissance *in vitro*, ce qui le rend encore indispensable en culture cellulaire. Dans le sérum sont trouvées de nombreuses molécules essentielles telles que les acides aminés, les vitamines, les protéines, les hormones, les lipides, les minéraux et les inhibiteurs de différenciation. Néanmoins, le sérum utilisé en routine n'est pas idéal pour des applications médicales puisqu'il dérive de l'animal.

Les molécules utilisées pour stimuler la production de tissu vasculaire (platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), heparin binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF), basic fibroblast growth factor (bFGF)) ont prouvé leur efficacité chez l'homme dans des indications précises.

### 3.2 Facteurs mécaniques

Les facteurs physiques du microenvironnement cellulaire local dont la forme et la géométrie de la cellule, les mécaniques matricielles, les forces mécaniques extérieures, et les caractéristiques nano-topographiques de la MEC peuvent tous avoir une forte influence sur le devenir des cellules souches [Estes et al., 2004]. Celles-ci détectent ces signaux biophysiques insolubles et leur répondent à (Fig 3.2).

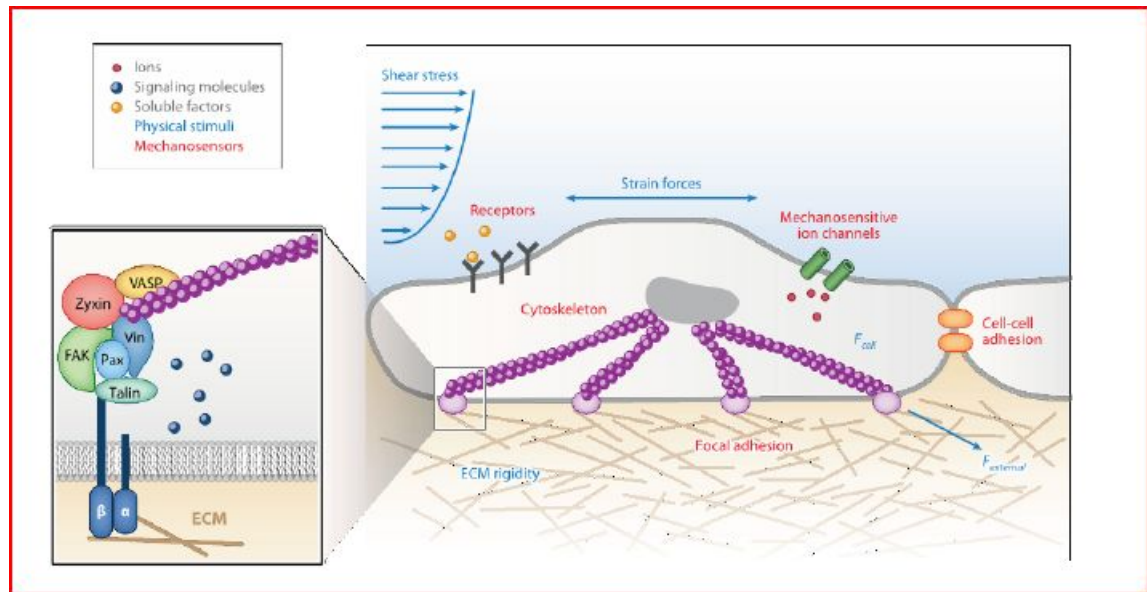


FIGURE 3.2 – Les différents signaux biophysiques et les complexes d'interactions moléculaires de la MEC. Les signaux biophysiques comprennent la rigidité et la topographie de la matrice, la contrainte de cisaillement, les forces de contrainte, et d'autres forces mécaniques exercées par les cellules de soutien adjacentes (en bleu). Les cellules souches peuvent détecter ces stimuli biophysiques grâce à des mécanorécepteurs comme les canaux ioniques, les adhérences focales, les récepteurs de surface cellulaire, le cytosquelette d'actine et les adhésions cellule-cellule (en rouge). Un agrandissement de la structure d'adhésion focale est également représenté, comprenant des intégrines hétérodimériques transmembranaires, la paxilline (Pax), la taline, la kinase d'adhésion focale (FAK), la vinculine (Vin), la zyxine, et un vasodilatateur stimulé par une phosphoprotéine (VASP) [Sun et al., 2012]

Ces processus de mécanotransduction peuvent s'associer à des facteurs de croissance, influençant les voies de signalisation pour réguler le devenir des cellules souches. Différents outils de bioingénierie et des dispositifs microscopiques/nanométriques ont été développés avec succès pour percevoir les aspects physiques du microenvironnement cellulaire nécessaires aux cellules souches.

Ces outils et dispositifs se sont révélés extrêmement utiles pour identifier les facteurs physiques extrinsèques et leurs voies de signalisation intracellulaires qui contrôlent les fonctions des cellules souches.

Les signaux mécaniques qui affectent la croissance et le développement de tissu natif *in vivo* jouent le même rôle pendant la culture de tissu *in vitro*. L'application de contrainte peut modifier le développement de tissu, en augmentant le transport de masse des nutriments ou en stimulant directement les cellules.

Les effets des forces mécaniques sur la physiologie d'organes sont très répandus, mais particulièrement importants pour le système cardiovasculaire. Dans les maladies de ce système, les plaques d'athérosclérose se produisent principalement dans les points de branchement et les régions fortement incurvées des artères où l'écoulement de fluide est perturbé [Feaver et al., 2010]. La pression sanguine étend les parois de l'artère, ce qui favorise la différenciation des cellules du muscle lisse vasculaire, et son élévation contribue à l'athérosclérose [Orr et al., 2009].

### 3.2.1 Contraintes mécaniques

Les contraintes mécaniques peuvent moduler la physiologie des cellules, et améliorer ou accélérer la régénération de tissu et la réparation *in vitro*. Les contraintes d'étirement, avec des elongations et des fréquences différentes, ont un effet sur l'alignement, la morphologie, les modifications cellulaires du cytosquelette, la prolifération, et la synthèse protéique de différents types cellulaires [Wang et al., 2000, Kim et al., 2002].

L'organisation des cellules dans le tissu reconstruit et la qualité de la MEC sont des paramètres importants pour le maintien des propriétés mécaniques du tissu. Comme les cellules et les tissus sont soumis à diverses formes de stimulations mécaniques *in vivo* [Mammoto et al., 2012, Wang et al., 2004], des systèmes *in vitro* ont été développés pour étudier ce phénomène dans un environnement contrôlé [Wang et al., 1995]. Trois forces agissent sur le substitut : une force axiale, une force transversale et une force de cisaillement (Fig 3.3). Ces trois forces changent avec l'orientation des cellules, mais elles peuvent être calculées pour toutes les orientations [Fawzi-Grancher, 2006].

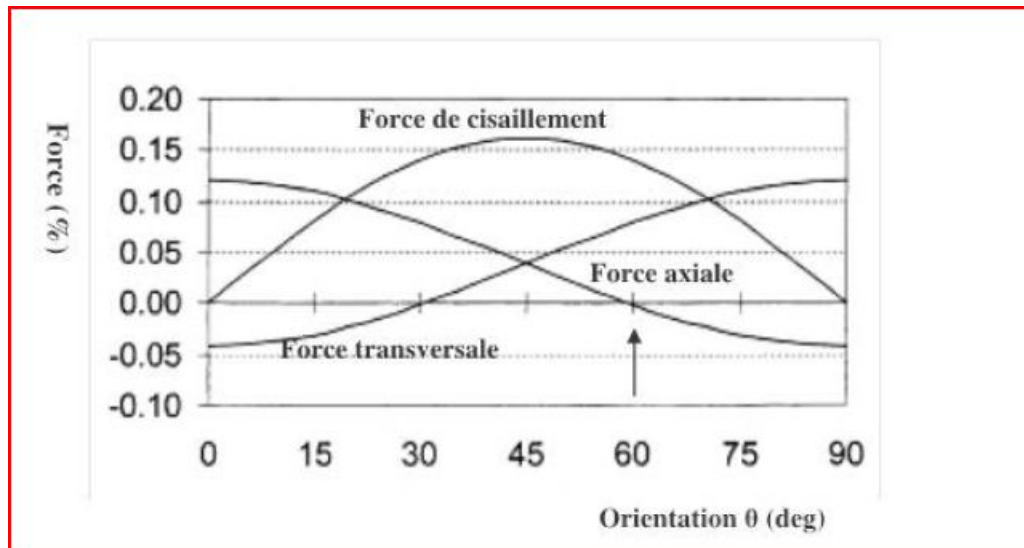


FIGURE 3.3 – Courbes théoriques des forces (axiale, transversale et cisaillement) agissant sur le substrat en fonction de l'orientation [Fawzi-Grancher, 2006]

### 3.2.2 Bioréacteur

Les bioréacteurs sont définis comme des dispositifs *ex vivo* dans lesquels les processus biologiques et/ou biochimiques ont lieu dans des conditions de fonctionnement environnementales surveillées et programmées (ex : pH, température, pression, apport nutritif et élimination des déchets) [Korossis et al., 2005, Shakesheff and Rose, 2012]. Construire un tissu en condition *ex vivo* dans un bioréacteur offre plusieurs perspectives comme une meilleure compréhension du développement du tissu et des mécanismes pathologiques [Badylak et al., 2012].

Différents systèmes commerciaux de bioréacteurs sont disponibles. Altman *et al.* ont développé un bioréacteur capable d'appliquer une combinaison de trois contraintes : la compression, la torsion et la tension pour imiter les conditions de charge physiologiques des cellules. Les éléments clés d'un bioréacteur sont présentés dans la figure ci-dessous (Fig 3.4). Ils ont montré également que l'application des contraintes mécaniques multidimensionnelles aux cellules stromales de moelle osseuse placées dans un gel de collagène augmente l'expression des marqueurs fibroblastiques (collagène de type : I et III ; et la ténascine-C). Le rôle des bioréacteurs, en appliquant les forces mécaniques aux constructions 3D, a pu être élargi au-delà de l'approche conventionnelle en induisant la différenciation de cellules et/ou le dépôt de MEC dans les tissus reconstruits [Altman et al., 2002]. Par exemple, ces bioréacteurs ont pu également servir de modèle *in vitro* pour étudier les effets physiopathologiques des forces mécaniques sur les tissus en développement, et pour prévoir les réponses d'un tissu aux forces physiologiques lors de l'implantation chirurgicale.

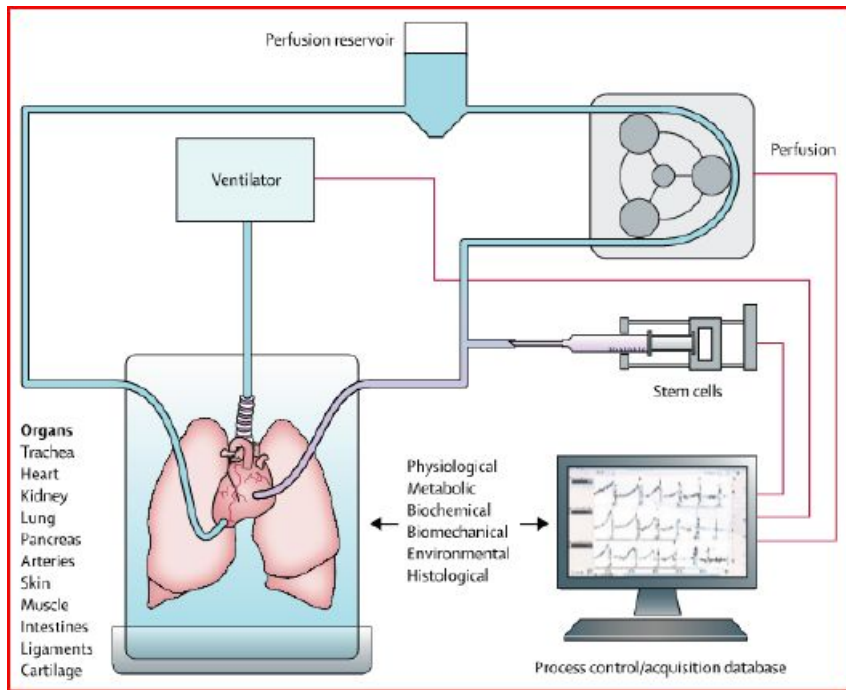


FIGURE 3.4 – Les éléments clés d'un bioréacteur [Badylak et al., 2012]

Une des dernières avancées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, est l'utilisation de biomatériaux synthétiques pour créer des microenvironnements qui miment la MEC naturelle, et ceci dans le but de diriger la différenciation des cellules souches et la morphogénèse des tissus cibles [Zhang, 2003, Wehrle-Haller, 2012]. Concernant les cellules souches, la coculture avec des cellules matures ou des tissus est de plus en plus utilisée comme un moyen pour guider leur différenciation vers le lignage requis [Jing et al., 2010, Kang et al., 2012].

# Applications de l'ingénierie tissulaire aux maladies vasculaires

---

Il est connu, à l'échelle mondiale, que dans les pays développés, les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de mortalité et de morbidité. En se basant sur la revue effectuée par *Zaragoza et al.*, les facteurs génétiques et environnementaux sont impliqués dans les complications cardiaques et vasculaires. Par conséquent, ces pathologies complexes et multifactorielles sont très difficiles à prévenir [*Zaragoza et al., 2011*]. Bien que des travaux antérieurs ont souligné que de nouveaux médicaments et dispositifs innovants ont permis d'améliorer la qualité de vie des patients atteints de maladies cardiovasculaires, ils n'ont pas nécessairement réduit le taux de mortalité et de morbidité [*Nugent and Edelman, 2003*].

Ensuite, la transplantation d'organes a fourni une nouvelle voie thérapeutique. Elle propose un «remède» immédiat en remplaçant les tissus ou organes endommagés par des substituts normalement fonctionnels [*Platt, 2004*]. Cependant, deux obstacles majeurs limitent la transplantation d'organes : le manque critique de donneurs et le risque élevé de rejet de greffe [*Yang et al., 2005*]. En effet, le succès du traitement des maladies vasculaires a été limité en raison du manque de tissus autologues pour servir de conduits vasculaires remplaçant les vaisseaux occlus. Par conséquent, l'ingénierie tissulaire a été proposée comme un traitement alternatif à ces problèmes en remplaçant le tissu endommagé ou la fonction des organes avec des constructions "biofabriquées" basées sur les fonctionnalités du tissu ou de l'organe requis [*Nugent and Edelman, 2003*]. En particulier, l'ingénierie vasculaire est plus utile et pertinente que d'autres domaines de l'ingénierie tissulaire, principalement parce qu'elle augmente l'espérance de vie et s'adresse à un grand nombre de patients [*L'Heureux et al., 2007a*].

Les vaisseaux sanguins s'étendent à travers le corps et permettent les échanges de gaz, d'éléments nutritifs et de déchets, ainsi que la défense immunitaire. Ils sont constitués de cellules endothéliales qui sont en contact avec le sang, de cellules musculaires lisses, de fibroblastes et d'une matrice formant la couche extérieure [*Vara et al., 2005, Berger et al., 1972, Furchgott and Zawadzki, 1980, Autio et al., 1989, Majesky et al., 2011, Chen et al., 2012*]. Tous ces types de cellules sont impliqués, non seulement dans la pathologie vasculaire, mais aussi en thérapie vasculaire.

Les maladies des vaisseaux sanguins tels que l'athérosclérose, l'artériopathie oblitérante [Wilcox and Scott, 1996, Ross, 1993], l'insuffisance veineuse chronique et la thrombose [Moriyama et al., 2011, Klinkert et al., 2004] demeurent globalement les problèmes vasculaires majeurs. L'augmentation du taux de mortalité par les maladies vasculaires a donc nécessité le développement de substituts vasculaires, en particulier pour les vaisseaux de faible diamètre (inférieur à 6 mm) comme les coronaires et d'autres petits vaisseaux présents sous le genou [Klinkert et al., 2004, Foster and Kranc, 1989]. Bien que les vaisseaux autologues restent les "standards" pour les petites greffes, de nombreux patients présentent des vaisseaux qui ne peuvent pas servir en raison de leur état physiopathologique, d'une amputation ou d'un prélèvement antérieur [Isenberg et al., 2006]. Malgré le grand besoin clinique de greffons artériels fonctionnels, les possibilités ont été limitées jusqu'à présent au remplacement d'artères de gros calibre comme l'aorte thoracique et abdominale, les vaisseaux iliaques et les artères fémorales communes. À l'inverse, pour la substitution artérielle de petit calibre, qui représente la majorité des besoins, ceci n'a pas été possible à cause de la thrombogénéicité aiguë des greffons, de l'hyperplasie de la paroi artérielle, de la formation d'un anévrisme, de l'infection et de la progression de la maladie athéroscléreuse [Conte, 1998]. C'est pourquoi, l'ingénierie tissulaire constitue une approche prometteuse pour combler les lacunes d'un tel traitement.

La création d'un substitut vasculaire nécessite l'incorporation de cellules musculaires lisses et de cellules endothéliales dans un scaffold tubulaire de manière à établir une architecture identique à celle d'un vaisseau sanguin natif. Les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales ont été les premières sources largement utilisées pour construire des substituts vasculaires [Hu et al., 2012]. Néanmoins, en raison de leur capacité de prolifération limitée et de la perte du phénotype contractile des cellules musculaires lisses matures (CMLs), diverses sources alternatives de cellules ont été explorées pour la production de ces substituts. La revue ci-après résume les caractéristiques des principales sources de cellules souches utilisées en ingénierie vasculaire.

## 4.1 Approches pour la création d'un substitut vasculaire

À ce jour, malgré les nombreux scaffolds ayant été fabriqués par diverses techniques d'ingénierie tissulaire, la construction d'un vaisseau sanguin entièrement biomimétique est toujours en cours. Pour parvenir à une application clinique réussie des vaisseaux sanguins en ingénierie tissulaire, la biofabrication de substituts vascu-

laire nécessite un procédé biotechnologique vigoureux et efficace [Kelm et al., 2010].

Plusieurs stratégies d'ingénierie tissulaire ont émergé pour répondre aux défauts biologiques des scaffolds synthétiques au niveau de l'interface sang-matériau, ouvrant la voie à l'ensemencement de cellules vasculaires et à la conception de polymères bioactifs pour la régénération *in situ*. En outre, les progrès établis dans le "design" du biomatériau ont été orientés vers la production de matériaux appropriés qui n'ont pas seulement comme but d'imiter les propriétés mécaniques du tissu vasculaire, mais aussi de promouvoir la croissance cellulaire, d'inhiber la thrombogénicité, et de faciliter la production de la matrice extracellulaire. De plus, une caractéristique importante des scaffolds artificiels n'est pas seulement la tolérance des cellules, mais aussi la capacité de mimer la MEC naturelle afin de réguler l'étendue et la force de l'adhésion cellulaire, l'activité de la croissance, la différenciation cellulaire et la maturation vers le phénotype désiré. Ces exigences soulèvent la question inévitable de savoir où obtenir ces cellules et comment les organiser dans un vaisseau tubulaire structuré.

Au cours des dernières décennies, ce problème a été abordé à partir d'une grande variété de directions, mais il y a cinq approches principales de fabrication d'un substitut vasculaire : (i) des substituts synthétiques portant des cellules endothéliales, (ii) des substituts vasculaires à base de collagène et de fibrine, (iii) des substituts vasculaires basés sur des auto-assemblages cellulaires, (iv) des substituts vasculaires basés sur des polymères synthétiques biodégradables, et (v) des tissus décellularisés.

#### 4.1.1 Substituts synthétiques portant des cellules endothéliales

##### 4.1.1.1 Fonctions de l'endothélium vasculaire

Situé à l'interface sang/tissus, l'endothélium vasculaire se comporte comme une barrière semi-perméable sélective qui autorise et régule les échanges de molécules de tailles variables (eau, sels, protéines) entre le sang et les tissus [Galley and Webster, 2004]. Les modes et les mécanismes de transport au travers de la barrière endothéliale varient selon leur localisation artérielle, veineuse ou microcirculatoire.

L'endothélium assure principalement le transport du glucose et des acides aminés par l'intermédiaire d'invaginations de la membrane cellulaire (les cavéoles) et de jonctions serrées. Il doit également protéger la paroi vasculaire des médiateurs moléculaires ou cellulaires responsables des réponses inflammatoires. L'activité antithrombotique de l'endothélium est l'une de ses fonctions essentielles, et c'est cette



propriété qui fait de la cellule endothéliale (CE) 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 présent à la surface des cellules. De plus, les CE sont capables de synthétiser de puissantes molécules telles que l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), la prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), l'antithrombine III, l' $\alpha$ 2-macroglobuline ou le monoxyde d'azote, connues pour assurer la fluidité du sang en empêchant l'aggrégation plaquettaire et l'adhésion leucocytaire, principaux composants du thrombus [McGuigan and Sefton, 2007]. Elles assurent également des fonctions métaboliques, comme la conversion de l'angiotensine-1 en angiotensine-2, et des fonctions immunitaires, comme la synthèse d'interleukine-1 (IL-1). Le dysfonctionnement endothélial est impliqué dans de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose, l'hypertension artérielle, les syndromes septiques et inflammatoires [Galley and Webster, 2004].

#### 4.1.1.2 Caractérisation des cellules endothéliales

La caractérisation des CE peut s'effectuer préalablement par une étude qualitative en microscopie. Leur morphologie typique et leur façon de s'agencer (juxtaposition pavimenteuse, voir paragraphe précédent) permettent de détecter leur présence et/ou le début de différenciation de cellules souches ou progénitrices en CE, avant de procéder à une étude plus poussée par immunocytochimie. Dès lors, la caractérisation du phénotype se fait par visualisation de l'expression des marqueurs endothéliaux. Certains sont spécifiques aux CE, mais d'autres sont exprimés à la fois par les CE et par des types cellulaires différents. Enfin, d'autres marqueurs sont exprimés par des CE n'appartenant qu'à certains vaisseaux, et non à tous.

**Marqueurs membranaires des CEs CD31, ou PECAM-1 :** (molécule d'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales), une protéine transmembranaire d'une masse moléculaire d'environ 135 kDa, affiliée à la superfamille des immunoglobulines. Les ligands hétérophiles comprennent les glycosaminoglycanes de sulfate d'héparane, l'héparine et l'intégrine  $\alpha v\beta 3$ . Le CD31 joue un rôle dans les interactions adhésives entre les cellules endothéliales adjacentes et également entre lymphocytes et monocytes et cellules endothéliales (diapédèse/migration). Il est exprimé dans tous les endothéliums continus au niveau des jonctions cellulaires, mais pas dans l'endothélium discontinu comme celui de la pulpe rouge splénique [Kishimoto, 1998].

**VE-Cadhérine (cadhérine endothéliale vasculaire), ou CD144 :** une protéine de 120 kDa appartenant à la famille des cadhérines, qui comporte 5 domaines extracellulaires et qui est reliée dans le cytoplasme à l'actine du cytosquelette. La VE-cadhérine

joue un rôle dans les liaisons homophiliques entre les cellules endothéliales et se trouve principalement localisée au niveau des jonctions cellulaires. Elle est exprimée de façon constitutive et participe à de nombreuses fonctions endothéliales telles que la migration, la survie cellulaire ou l'inhibition de contact.

**VEGF-R2 (récepteur 2 du VEGF), ou KDR (kinase domain receptor)** : d'une masse moléculaire comprise entre 210 et 230 kDa, c'est un récepteur de type tyrosine kinase impliqué dans le développement de l'endothélium vasculaire, exprimé au niveau des CE chez l'adulte, mais également au cours du développement embryonnaire. La fixation du VEGF entraîne la dimérisation de son récepteur, puis son autophosphorylation, ce qui stimule les voies de transmission du signal. L'interaction du VEGF avec son récepteur nécessite la présence de protéoglycanes et notamment d'héparine. Le VEGF-R2 est un inducteur de la réponse proliférative des CEs [Colavitti et al., 2002].

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

#### **Marqueurs intracellulaires des CEs :**

**vWF (von Willebrand Factor)** : une glycoprotéine importante dont la structure est multimérique, et dont la masse moléculaire peut aller de 500 kDa à plus de 10.000 kDa. L'expression du gène du vWF est spécifique de certains tissus et se limite aux cellules endothéliales et aux mégacaryocytes [Denis, 2002]. Le vWF est présent dans le plasma, dans les corps denses de Weibel-Palade des cellules endothéliales, dans les granules alpha des mégacaryocytes et des plaquettes qui en dérivent, ainsi que dans la matrice subendothéliale de la paroi des vaisseaux. Il joue un rôle de médiateur dans l'adhésion plaquettaire et la formation du caillot sur les sites des lésions vasculaires, et sert de transporteur pour le facteur VIII dans le plasma.

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

**Dil-Ac-LDL (1,1' - dioctadécyl - 3,3,3'3' - tétraméthyl - indocarbocyanine perchlorate - labeled acetylated low density lipoprotein)** : peut être internalisé spécifiquement par les CE, ce qui en fait un marqueur qui, couplé à une sonde fluorescente, permet de les distinguer par exemple des CML ou des fibroblastes [Gaffney et al., 1985].

**Création d'un substitut vasculaire à base de cellules endothéliales** Une monocouche luminale de CE confère une résistance à la formation de thrombus et réduit l'ampleur de l'hyperplasie intimale [Schneider et al., 1988]. Cependant, les CE ont une capacité limitée de régénération, leur renouvellement s'arrête après environ 70 cycles cellulaires, conduisant à l'hypothèse que l'endothélialisation de greffes vasculaires se fait par l'un des quatre mécanismes : (i) par ensemencement de CE, (ii) via la migration des CE du vaisseau adjacent natif, (iii) par le dépôt de cellules progénitrices endothéliales (CEPs) sur la surface luminale, ou (iv) par la formation de capillaires à travers les greffes poreuses.

Herring a proposé en 1978 une méthode d'ensemencement des CE sur la surface luminale des conduits synthétiques [Herring, 1978]. Depuis, de nombreuses études ont tenté d'améliorer les taux de perméabilité clinique par l'optimisation de l'attachement des CE. Bien que les essais cliniques primaires aient été prometteurs, les suivis ont suggéré que l'étape d'endothélialisation n'a pas amélioré la qualité du substitut de genou comme mentionné préalablement [Herring et al., 1994]. Cela peut être dû à la perte de cellules après exposition à un flux pulsatile : un phénomène que d'autres auteurs ont tenté de contrecarrer à l'aide de diverses molécules d'adhésion et des traitements du substitut en vue d'améliorer la rétention des CE et la couverture luminale [Rosenman et al., 1985, Mazzucotelli et al., 1994, Nishibe et al., 2001, Krijgsman et al., 2002]. Les données à long terme de Zilla *et al.* ont suggéré que l'endothélialisation *in vitro* des substituts à base de polytétrafluoroéthylène (ePTFE) revêtus de fibrine, améliore la qualité des substituts vasculaires de petit diamètre [Deutsch et al., 1999, Zilla et al., 1994, Deutsch et al., 2009]. Malgré ces avancées, un matériau synthétique tel que le PTFE ou le Dacron ne peut pas se remodeler, éliminant ainsi tout potentiel de croissance ou de vasoréactivité.

D'autres revêtements de surface comme le sérum [Lamm et al., 2001] constituent des supports pour la formation d'un néo-endothélium dans des prothèses vasculaires. Cette étude a été basée sur l'endothélialisation de substituts vasculaires naturels, à l'issue de la cryocongélation réalisée sur des matrices totalement désendothélialisées (par éversion et abrasion de la surface interne) au préalable. Cependant, si la rétention des cellules est satisfaisante en condition statique, la quantité de cellules restant adh-

rentes après application d'une contrainte de cisaillement, reproduisant les contraintes imposées par le sang à l'endothélium, est très faible [Tiwari et al., 2001]. Par ailleurs, les tests réalisés sur les animaux sont peu satisfaisants et mettent en évidence qu'aucun revêtement de surface ne remplit correctement son rôle dès lors que la prothèse est soumise à des contraintes de cisaillement [James et al., 1992].

#### 4.1.2 Substituts vasculaires à base de collagène et de fibrine

Le modèle à base de collagène est fondé sur l'idée d'intégrer les cellules vasculaires dans une MEC pour leur fournir la structure de soutien. Weinberg et Bell ont démontré la faisabilité de ce concept en utilisant des cellules endothéliales aortiques bovines, des CMLs, et des fibroblastes de l'adventice pour recréer respectivement une intima, une média et un adventice [Weinberg and Bell, 1986]. Ces couches sont illustrées dans (Fig 4.1) qui détaille les résultats de ces expériences.

La présence de collagène et d'élastine assure la force et l'élasticité nécessaires pour maintenir la fonctionnalité du substitut à long terme. Malheureusement, bien que le substrat de gel de collagène a promu l'attachement et la signalisation cellulaires, les pressions de rupture enregistrées étaient inférieures à 10 mmHg, loin du seuil nécessaire pour résister aux forces hémodynamiques physiologiques (2031-4225 mmHg). Pour répondre à la question de l'intégrité structurale, L'Heureux et ses collègues ont conçu une structure permettant au gel de collagène contenant des CMLs de se former autour d'un mandrin central et d'assurer des pressions de rupture allant jusqu'à 120 mmHg [L'Heureux et al., 1993]. Les essais réalisés sur le chien ont révélé des ruptures au bout de quelques jours après l'implantation [Hirai et al., 1994]. Ces résultats, peu concluants, limitent l'utilisation de ces substituts en chirurgie vasculaire clinique. Plusieurs groupes ont modifié la densité, le contenu et l'orientation des fibres de collagène, et introduit des techniques avancées de réticulation afin d'améliorer la qualité de la construction.

Une autre modification réussie de réalisation à base de collagène est l'utilisation d'une stimulation mécanique dynamique afin d'augmenter le remodelage à médiation cellulaire du scaffold à base de collagène [Seliktar et al., 2000]. Il a été démontré que ce résultat était probablement dû à l'orientation circonférentielle accrue des fibres de collagène et des CMLs [Kanda et al., 1993, Kanda et al., 1993]. Malgré ces progrès, le défi consiste à créer une construction mécanique robuste qui ne devient pas trop rigide. Compte tenu de certaines limitations des constructions à base de collagène, des travaux récents ont exploré l'utilisation de gels de fibrine, d'élastine de polymères de protéines recombinantes donnant plus de souplesse aux substituts vasculaires [Cummings et al., 2004, Swartz et al., 2005, Buijtenhuijs et al., 2004,

Nagapudi et al., 2005].

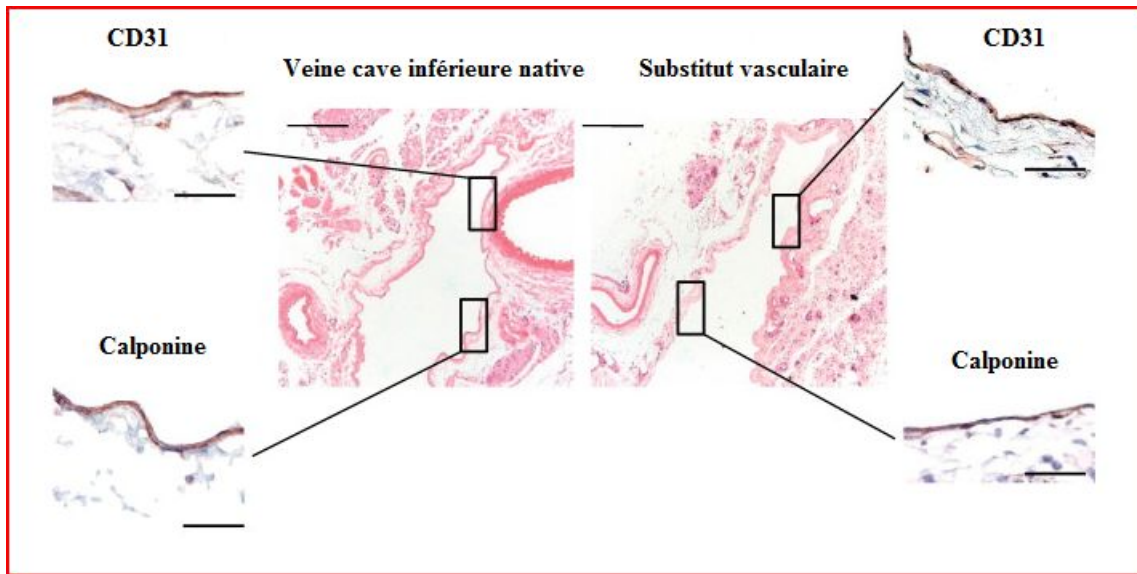


FIGURE 4.1 – Comparaison histologique d'un substitut vasculaire obtenu par ingénierie tissulaire (SVIT) à une veine cave inférieure native (VCI) après 6 mois de mise en place *in vivo*. Microphotographies représentatives de la caractérisation immunohistochimique de la VCI native par rapport aux SVITs 6 mois après l'implantation (CD31 (marqueur de cellules endothéliales) et calponine (marqueur de cellules musculaires lisses)). Les biomatériaux sont entièrement dégradés à 6 mois et les SVITs possèdent une architecture de tissu semblable à une veine native avec une structure stratifiée constituée d'une couche intimale endothélialisée et d'une couche médiane de muscle lisse [Weinberg and Bell, 1986]

Les études utilisant les gels de fibrine ont démontré la formation de matrices biocompatibles, autologues et tridimensionnelles capables d'atteindre des taux élevés d'ensemencement des cellules [Ye et al., 2000]. Malgré des succès préliminaires, les gels de fibrine ne sont pas physiquement suffisants pour résister à la manipulation chirurgicale [Jockenhoevel et al., 2001]. Swartz, Russell et Andreadis ont surmonté ce problème par la culture de CMLs ovines pendant 2 semaines dans une matrice de gel de fibrine moulée autour d'un mandrin central. Les scaffolds tubulaires obtenus ont été ensuite cultivés avec des CE ovines pour les préparer à l'implantation comme substituts ovins de la veine jugulaire externe.

Les substituts réalisés ont montré une amélioration des propriétés biomécaniques, de la bioréactivité de l'oxyde nitreux par rapport au vaisseau atteint, et deviennent résistants au rejet 15 semaines après l'implantation [Swartz et al., 2005]. Plus récemment, Syedain et ses collègues ont utilisé avec succès un bioréacteur pour créer des substituts artériels à base de fibrine possédant des caractéristiques biomécaniques similaires à celles des artères natives [Syedain et al., 2011]. Cependant, les longues périodes d'incubation *in vitro* limitent l'utilité potentielle de ces gels.

### 4.1.3 Substituts vasculaires basés sur des auto-assemblages cellulaires

Une autre méthode a suscité un intérêt significatif : l'auto-assemblage cellulaire. Cette technique est particulièrement intéressante car elle utilise des cellules autologues cultivées *in vitro*. Elle permet d'atténuer la réponse immunologique qui peut survenir à la suite de l'incorporation de protéines animales telles que le collagène ou la fibrine.

Dans un protocole proposé par L'Heureux, des feuillets de CMLs et de fibroblastes ont été cultivés jusqu'à sur-confluence et ensuite assemblés autour d'un mandrin pour former une structure tubulaire qui est ensuite cultivée pendant 6 à 8 semaines [L'heureux et al., 1998]. Pendant cette période d'incubation, les cellules autologues s'arrangent et produisent leur MEC, établissant ainsi une intégrité structurale capable de résister à des pressions supérieures à 2000 mmHg. La lumière intérieure de la construction est ensuiteensemencée avec des CEs pour promouvoir la non-thrombogénicité.

Récemment, cette technologie a été traduite en clinique chez les patients hémodialysés et a donné des résultats constructifs [L'Heureux et al., 2007b, McAllister et al., 2009]. Bien que la robustesse et la nature non immunogène des substituts d'auto-assemblage soient très prometteuses, la principale limite de cette technique est le temps nécessaire à la culture des cellules qui augmente les coûts et entrave la capacité d'une telle technologie ainsi qu'un risque important de calcification.

### 4.1.4 Substituts vasculaires basés sur des polymères synthétiques biodégradables

Une vaste gamme de scaffolds synthétiques biodégradables a été utilisée pour créer un environnement propice aux cellules autologues, permettant leur adhésion et la sécrétion de leur MEC. L'acide polyglycolique (PGA) est largement utilisé comme matériel de suture chirurgicale et se dégrade par hydrolyse de ses liaisons ester, ce qui entraîne son élimination sous forme d'eau et de dioxyde de carbone pendant une période de 2 à 4 semaines avec une disparition complète au bout de 6 mois [Mooney et al., 1996, Hutmacher et al., 2001]. La cinétique de dégradation du PGA peut être modulée via sa copolymérisation avec d'autres polymères tels que l'acide poly-L-lactique (PLLA) [Mooney et al., 1996, Ravi and Chaikof, 2010].

Niklason et ses collègues ont utilisé un bioréacteur pulsatile dans lequel ils ont in-

cubé le scaffold PGAensemencé avec des CMLs aortiques porcines. Ils ont découvert que le substitut obtenu possède des similitudes histologiques avec le système vasculaire naturel [Niklason et al., 1999]. Le scaffold à base de PGA a été largement dégradé après une période d'incubation de 8-10 semaines, laissant de grandes quantités de MEC qui ont été enrichies par l'addition de facteurs de croissance et de compléments tels que l'acide ascorbique, la proline, l'alanine et la glycine.

Le poly-caprolactone (PCL) est un autre biomatériau classique ayant une dégradation lente. L'implant est éliminé par les macrophages et par encapsulation dans des cellules géantes. La première étude clinique chez l'homme, menée au Japon, a donné des résultats prometteurs à long terme grâce à l'utilisation d'un copolymère P(CL/LA) renforcé avec du PGA et servant de canal artériel pulmonaire [Shum-Tim et al., 1999].

#### **4.1.5 Tissus décellularisés**

Dans une tentative d'utiliser une MEC structurellement organisée sans courir le risque d'une réponse immunitaire, les chercheurs ont développé des méthodes de décellularisation de tissus pour éliminer les composants antigéniques. Le procédé utilise une combinaison d'agitation physique, de traitement par surfactant chimique, et de digestion enzymatique pour éliminer les protéines, les lipides et les restes de nucléotides [Dahl et al., 2003, Tamura et al., 2003]. En utilisant un raisonnement similaire, la petite sous-muqueuse intestinale (PSI) a également été utilisée comme substitut vasculaire. Elle est constituée de collagène, fibronectine, protéoglycanes, glycosaminoglycanes et glycoprotéines. Les premières études utilisant des implants PSI dans un système artériel canin ont montré des résultats prometteurs [Uchimura et al., 2003, Roeder et al., 1999]. Certaines des limitations restantes de ce système sont la biodégradation lente et le risque potentiel de transmission de virus à partir de tissus d'origine animale [Ravi and Chaikof, 2010].

# Fonctionnalisation de chitosane et d'acide hyaluronique pour la construction de films réticulés

---

## 5.1 Matériel et méthodes

### 5.1.1 Synthèse des polymères

La synthèse des différents polymères utilisés dans notre étude a été réalisée par Corinne Baehr (post-doctorante dans l'équipe de Dr Benoît Frisch, UMR 7199, Strasbourg) et comme ce n'est pas notre domaine, nous ne présentons que quelques résultats pouvant servir pour comprendre les structures de nos polymères. Les réactifs ont été obtenus auprès de sources commerciales et utilisés sans autre purification :

- ★ Le chitosane de faible poids moléculaire, inconnu et non indiqué par les instructions du fournisseur (CHI, 448869, Sigma, France) et dont la structure chimique est présentée dans la figure [Fig 5.1](#),

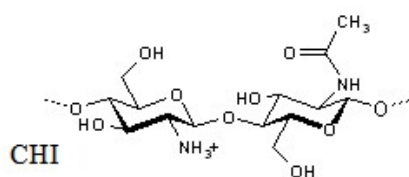


FIGURE 5.1 – Structure chimique du chitosane

- ★ Le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC, Sigma, France),
- ★ L'acide hyaluronique (HA, PM = 200 kDa, Lifecore biomédical, USA), et dont la structure chimique est présentée dans la figure [Fig 5.2](#),

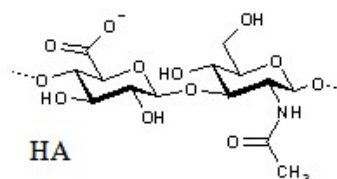


FIGURE 5.2 – Structure chimique de l'acide hyaluronique



- ★ Le  $\alpha$ -amino- $\omega$ -azido dodéca(eéthylène-glycol) ( $\text{NH}_2$ -PEG(12)- $\text{N}_3$ , Iris Biotech, Allemagne),
- ★ Le N-hydroxysulfosuccinimide (sulfoNHS, Fluka, France),
- ★ Le 2-(2-pyridyldithio) éthylamine (thiopyridone), EDC (Santa Cruz Biotechnology, USA),
- ★ La membrane de dialyse " $M_w$  cutoff" (12-14 kDa, Fisher Scientific, France).

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  ont été enregistrés à 300 MHz sur un spectromètre 300 DPX Bruker. Ils permettent de caractériser la molécule, d'apporter une information sur sa pureté et dans le cas présent de déterminer le taux de greffage. Les "shifts" chimiques sont rapportés en parties par million (ppm), et les constantes de couplage (J) sont signalées en hertz (Hz). Pour la synthèse de l'alcyne : voir [Agard et al., 2006], et pour la synthèse de maléimide-  $\text{NH}_3$  : voir [Boeckler et al., 1998].

#### 5.1.1.1 Synthèse de HA-maléimide

La structure chimique du HA-Maléimide est présentée dans Fig 5.3.

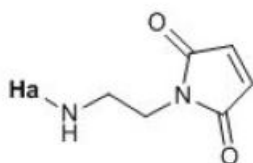
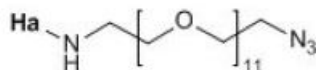


FIGURE 5.3 – Structure chimique du HA-maléimide

**Mode de préparation** A une solution d'acide hyaluronique (150 mg, 0,359 mmol) dans de l'eau déminéralisée (10 ml), ont été ajoutés l'EDC (68 mg, 0,359 mmol), le sulfoNHS (78 mg, 0,359 mmol) et le maléimide- $\text{NH}_2$  (3,5 mg, 0,025 mmol). Après 24 heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel a été dialysé, d'abord contre l'eau déminéralisée (contenant 1% NaCl) pendant 12 h, puis deux fois contre l'eau Milli Q pendant 12 heures à chaque fois. Le solvant a été éliminé par lyophilisation pour donner 160 mg du polymère HA-Maleimide greffé à 5%. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) : 6,88 (m, 2H), 4,52 à 3,36 (m, 224H), 2,88 (m, 2H), 2,00 (s, 53H). Le nombre de maléimide greffé sur HA a été calculé à partir du rapport relatif de l'intégration du pic de RMN  $^1\text{H}$  du proton dans le groupe acétyle à 2,00 ppm (3H), et le pic à 6,88 ppm (2H) à partir du maléimide.

#### 5.1.1.2 Synthèse de l'HA- $\text{N}_3$

La structure chimique du HA- $\text{N}_3$  est présentée dans Fig 5.4.

FIGURE 5.4 – Structure chimique du HA-N<sub>3</sub>

**Mode de préparation** A une solution d'acide hyaluronique (100 mg, 0,24 mmol) dans de l'eau déminéralisée (10 ml), ont été ajoutés l'EDC (46 mg, 0,24 mmol), le sulfoNHS (52 mg, 0,24 mmol) et le NH<sub>2</sub>-PEG(12)-N<sub>3</sub> (9,6 mg, 0,016 mmol). Après 24 heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel a été dialysé, d'abord contre l'eau déminéralisée (NaCl 1%) pendant 12 h, puis deux fois contre l'eau Milli Q pendant 12 heures à chaque fois. Le solvant a été éliminé par lyophilisation pour donner 100 mg Ha-polymère PEG 5% greffé. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : de 4,54 à 3,32 (m, 290H), de 2,88 à 2,86 (m, 2 H), 1,99 (s, 60 H). Le nombre de PEG12 greffé sur HA a été calculé à partir du rapport d'intégration relative du pic de RMN <sup>1</sup>H du proton dans le groupe acétyle à 1,99 ppm (3H), et le pic à 2,88 à 2,86 ppm (2H) à partir du PEG12.

### 5.1.1.3 Synthèse de l'HA-Thiopyridone

La structure chimique du HA-Thio est présentée dans [Fig 5.5](#).

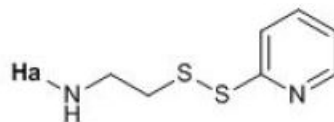


FIGURE 5.5 – Structure chimique du HA-Thiopyridone

**Mode de préparation** A une solution d'acide hyaluronique (150 mg, 0,359 mmol) dans de l'eau déminéralisée (10 ml), ont été ajoutés l'EDC (68 mg, 0,359 mmol), le sulfoNHS (78 mg, 0,359 mmol) l'*i*-Pr<sub>2</sub>EtN (4 pi, 0,002 mmol) et le 2-(2-pyridyldithio)éthylamine (5,56 mg, 0,025 mmole). Après 24 heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel a été dialysé, d'abord contre l'eau déminéralisée (NaCl 1%) pendant 12 h, puis deux fois contre l'eau Milli Q pendant 12 heures à chaque fois. Le solvant a été éliminé par lyophilisation pour donner 150 mg du polymère HA-thio greffé à 5%. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) : 8,36 (m, 1H), 7,79 (m, 2H), 7,25 (m, 1H), 4,47 à 3,24 (m, 250 H), 2,84 à 2,78 (m, 2H), 1,92 (s, 53 H). Le nombre de thiopyridone greffé sur HA a été calculé à partir du rapport relatif de l'intégration du pic de RMN <sup>1</sup>H du proton dans le groupe acétyle à 1,92 ppm (3H), et le pic à 2,84 à 2,78 ppm (2H) de la thiopyridone.

#### 5.1.1.4 Synthèse du CHI-Alcyne

La structure chimique du CHI-Alcyne est présentée dans Fig 5.6.

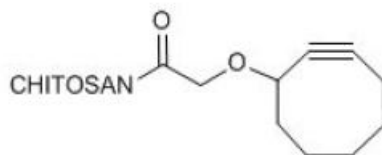


FIGURE 5.6 – Structure chimique du CHI-Alcyne

**Mode de préparation** A une solution de chitosane (100 mg, 0,62 mmol) dans 1 ml d'HCl 1M ont été ajoutés de l'eau déminéralisée (10 ml), l'EDC (119 mg, 0,62 mmol), l'alcyne (8 mg, 0,043 mmol) et le sulfoNHS (134 mg, 0,62 mmol). Après 3 jours d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est dialysé, d'abord contre l'eau déminéralisée (contenant HCl 5 mM pendant 12 h, puis deux fois à l'eau déminéralisée (contenant HCl 5 mM et NaCl 1%) pendant 12 h à chaque fois et ensuite contre l'eau Milli Q (HCl 1 mM) pendant 12 h. Le solvant a été éliminé par lyophilisation pour donner 121 mg du polymère CHI-alcyne greffé à 5%. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) : de 4,13 à 3,51 (m, 513 H), 3,18 (m, 96 H), 2,06 (s, 39H), 1,35 à 0,81 (m, 11 H). Le nombre d'alcyne greffé sur le chitosane a été calculé à partir du rapport d'intégration relative du pic de RMN  $^1\text{H}$  du proton  $\text{H}_2$  sur le chitosane à 3,18 ppm (1H) et le pic à 1,35 à 0,81 ppm (11H) de l'alcyne cyclique.

#### 5.1.1.5 Synthèse du CHI-SH

La structure chimique du CHI-SH est présentée dans Fig 5.7.

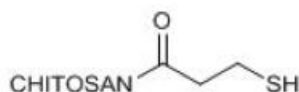


FIGURE 5.7 – Structure chimique du CHI-SH

**Mode de préparation** A une solution de chitosane (250 mg, 1,55 mmol) dans 2 ml d'HCl 1M ont été ajoutés de l'eau déminéralisée (25 ml), l'EDC (239 mg, 1,25 mmol), l'acide mercaptopropionique (12 mg, 0,108 mmol) et le sulfoNHS (78 mg, 0,36 mmol). Après 3 jours d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est dialysé,

d'abord contre l'eau déminéralisée (par HCl 5 mM) pendant 12 h, puis deux fois à l'eau déminéralisée (HCl 5 mM et NaCl à 1%) pendant 12 h à chaque fois et ensuite contre l'eau Milli Q (HCl 1 mM) pendant 12 h. Le solvant a été éliminé par lyophilisation pour donner 216 mg du polymère CHI-SH avec 5% thiol. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) : de 3,78 à 3,33 (m, 520 H), 3,04 à 2,92 (m, 100 H), 1,87 (s, 39 H).

### 5.1.2 Croissance des films suivie par Microbalance à Cristal de Quartz (QCM)

La Microbalance à Cristal de Quartz avec dissipation (notée QCM-D), a été utilisée afin de suivre *in situ* la construction des films de polyelectrolytes. Cette méthode permet de mesurer la masse déposée avec une précision de l'ordre du  $\text{ng}\cdot\text{cm}^2$ . Suivant les caractéristiques physiques du système étudié (viscosité du dépôt, nature du milieu), deux modèles mathématiques sont appliqués pour déterminer l'épaisseur du film déposé. Si le film est rigide, le modèle de Sauerbrey est appliqué. Dans le cas d'un film hydraté, le modèle viscoélastique de Voigt et Voinova est appliqué [Voinova et al., 2002].

Comme les macromolécules (protéines, polymères, ...) déposées sur une surface ne constituent pas une fine couche rigide, leur comportement visco-élastique induit une perte d'énergie de vibration par dissipation. L'acquisition des données à différentes harmoniques permet de déterminer les caractéristiques visco-élastiques des couches déposées, d'écarter les variations de fréquence dues à la dissipation de l'énergie de vibration, et de calculer, à partir d'un modèle, la masse déposée à la surface du quartz.

Le principe de la microbalance à cristaux de quartz (en anglais QCM) repose sur la mesure de la fréquence d'un cristal de quartz sur la surface duquel une fine couche rigide de matière est déposée. La variation de la fréquence est directement proportionnelle à celle de masse due aux molécules adsorbées sur la surface. Elle est également proportionnelle à la densité et à la viscosité du liquide en contact avec le quartz.

### 5.1.3 Topographies des différents types de films CHI/HA par Microscopie à Force Atomique (AFM) à sec

Parmi les nombreuses techniques d'analyse des matériaux, seul un nombre restreint permet une étude *in situ* d'une surface. Restent alors en jeu deux types de microscopies : la microscopie optique, de faible résolution, actuellement supplantée par la puissance de résolution des microscopes dits à sonde locale, notamment la microscopie à effet tunnel (STM : Scanning Tunneling Microscope) et la microscopie

à force atomique (AFM : Atomic Force Microscopy). Ces microscopies à sonde locale ont pour principe d'utiliser une pointe très fine pour balayer la surface à très faible distance (quelques nanomètres) ou au contact. Elles fournissent une représentation tridimensionnelle de la surface d'un échantillon avec une résolution pouvant atteindre la résolution atomique.

La microscopie à force atomique, mise au point par G. Binnig et ses collaborateurs en 1986 est "la petite soeur" de la microscopie à effet tunnel développée en 1980 à Zurich et qui a valu à ses inventeurs le prix Nobel de Physique en 1986. STM et AFM mesurent différents types d'interactions entre la pointe et la surface. En STM, la tension appliquée entre la pointe et la surface crée, lorsque celles-ci sont suffisamment proches (un nm), un courant d'électrons tunnel de la pointe vers la surface (ou inversement), qui est mesuré. Cette technique s'applique donc uniquement aux matériaux conducteurs. Dans le cadre de notre étude, le milieu étant conducteur et la surface étant recouverte d'un film passif mauvais conducteur, la STM n'apparaît pas comme l'outil adéquat pour effectuer des analyses *in situ*. L'AFM, par contre, autorise l'investigation de matériaux non conducteurs, quel que soit le milieu (liquide, gaz, vide). Les principes de fonctionnement de l'AFM vont maintenant être détaillés.

L'AFM fonctionne selon un principe conceptuellement simple, illustré par la Fig 5.8. Une sonde (pointe) de taille microscopique est approchée de la surface à imager au moyen d'un positionneur de haute précision. Au voisinage de la surface, la sonde est soumise à une force qui dépend de la nature des éléments composant la pointe et la surface. En mesurant cette force à l'aide d'un détecteur adapté, la distance sonde-surface peut être contrôlée à chaque instant. Il suffit que la sonde balaye la surface à l'aide d'un positionneur tout en gardant constante la force d'interaction : la trace x,y,z des déplacements représente une "image" de la surface étudiée. Les résolutions latérale et verticale des images dépendront de la finesse des déplacements du translateur, de la taille de la sonde (rayon de courbure à l'extrémité) et de la sensibilité de la détection de force. Décrivons maintenant plus en détail les éléments de base d'un AFM travaillant à l'air, dans une configuration que nous avons utilisée au cours de ce travail.

La croissance des films a été suivie par QCM. Toutes les solutions de polymères utilisées sont préparées à une concentration de 0,2 mg/ml dans de l'eau Milli-Q contenant 0,15 M NaCl pour les solutions de HA, et  $2 \times 10^{-3}$  M HCl contenant 0,15 M NaCl pour les solutions de CHI. Dans le cas de CHI-SH, la solution est fraîchement préparée dans une solution préalablement dégazée pour éviter la formation de ponts disulfure grâce au dioxygène dissout. Tous les pH sont ajustés à 5,5.

Le temps de contact pour chaque solution ainsi que pour le rinçage avec 0,15 M NaCl

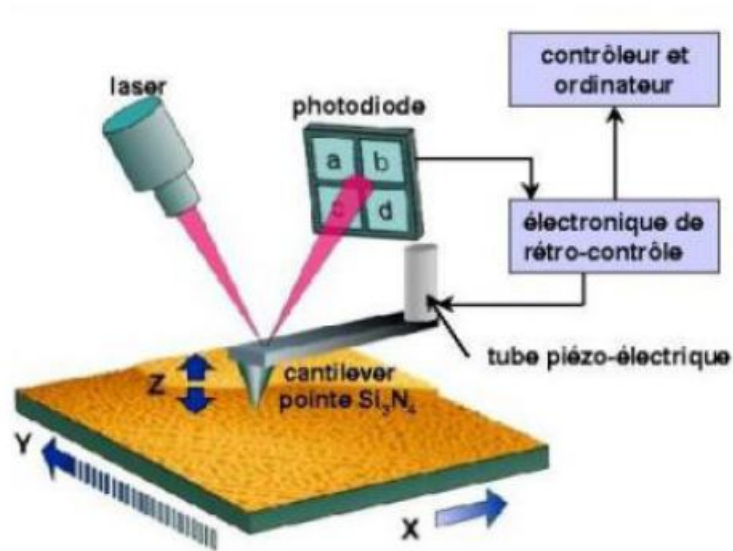


FIGURE 5.8 – Représentation schématique d'un microscope à force atomique

est de 5 min. L'opposé de la fréquence normalisée de la troisième harmonique augmente après chaque dépôt de CHI et de HA.

## 5.2 Résultats

Tous les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus par Gwenaëlle Cado (doctorante dans l'équipe de Dr Fouzia Boulmedais, Institut Charles Sadron, Strasbourg).

La représentation des interactions covalentes qui se forment entre les polymères modifiés est résumée dans la figure [Fig 5.9](#).

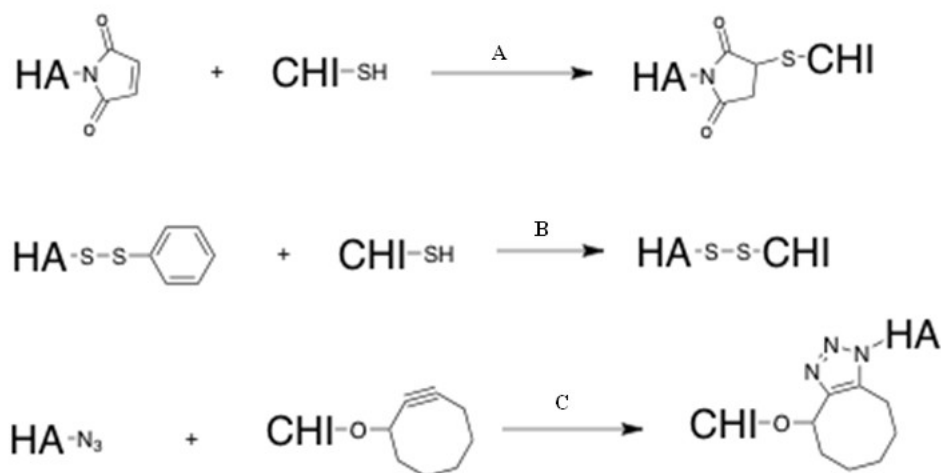


FIGURE 5.9 – Schéma montrant les interactions covalentes qui se forment entre les polymères modifiés : A : entre CHI-SH et HA-Mal, B : entre CHI-SH et HA-Thio, et C : entre CHI-Alcyn et HA-N<sub>3</sub>

### 5.2.1 Résultats des analyses de la croissance des films

La construction des films CHI/HA et CHI-SH/HA-Mal est exponentielle. Lors du contact avec une solution de 0,15 M NaCl à pH 5,5, CHI-HA diminue en épaisseur ; en parallèle les films à base de polysaccharides modifiés restent stables ou gonflent. Il est possible que le pH 5,5 limite la réaction entre le SH et le maléimide, ce qui donne une croissance linéaire comme avec CHI et HA non fonctionnalisés. Cependant la réaction semble effective puisque le film reste stable à pH 7,4.

Dans le cas des films CHI-SH/HA-Thiopyridone et CHI-Alcyn/HA-N<sub>3</sub>, la construction est linéaire (Fig 5.10).

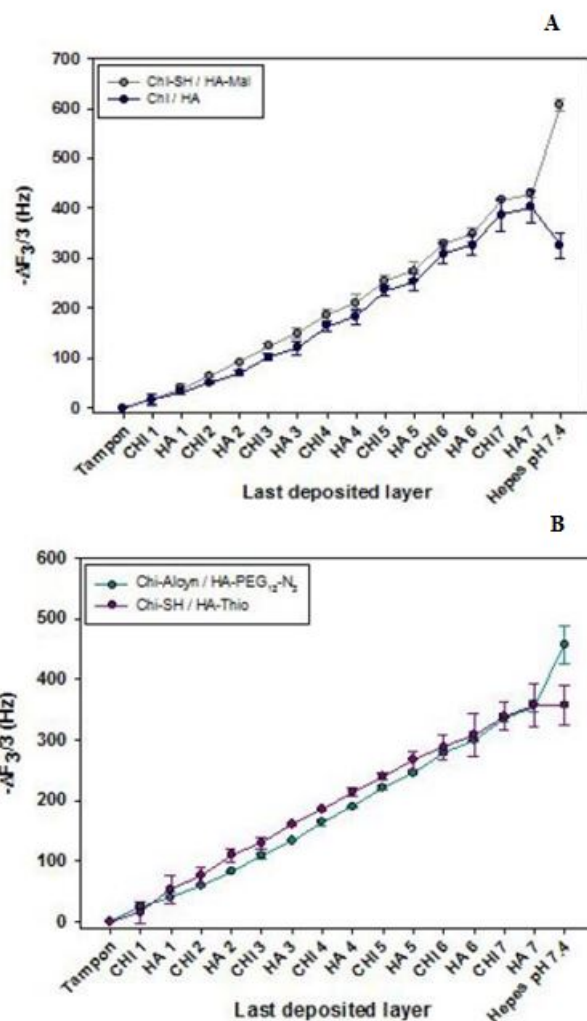


FIGURE 5.10 – Evolution de l’opposé de la fréquence normalisée de la troisième harmonique, mesurée par QCM, en fonction de la dernière couche déposée lors de la construction des films. A : CHI/HA et CHI-SH/HA-Mal et B : CHI-Alcyn/HA-N<sub>3</sub> et CHI-SH/HA-Thio à pH 5,5 dans 0,15 M NaCl. Le résultat exprimé est la moyenne de deux expériences

Les films non fonctionnalisés de CHI/HA ont déjà été caractérisés dans la littérature. Le chitosane de faible poids moléculaire a permis une croissance plus rapide des films [Richert et al., 2004, Kujawa et al., 2005], c’est pour cette raison que la construction de nos films non fonctionnalisés était faite de chitosane (low molecular weight) Sigma-Aldrich. Les constructions présentées ci-dessus ont été faites en présence d’une forte concentration en sel (0,15 M NaCl), en accord avec les résultats obtenus par Richert *et al.* [Richert et al., 2004] montrant l’effet de la concentration en sel sur la cinétique de la croissance des films. Il était difficile de construire des films CHI/HA avec une faible concentration en sel (10<sup>-4</sup>M), alors que leur construction était meilleure avec une forte concentration en sel (0,15 M).



### 5.2.2 Résultats des analyses topographiques des films

La morphologie de ces films a été également étudiée par AFM en mode contact à sec après contact avec une solution 0,15 M NaCl à pH 7.4. Les films CHI-SH/HA-Mal et CHI-Alcyn/HA-N<sub>3</sub> recouvrent totalement le substrat. Ils ont respectivement une épaisseur de 11 et 6 nm pour une rugosité de 4 et 5 nm. Les films CHI/HA et CHI-SH/HA-Thiopyridone ne recouvrent pas toute la surface du substrat. Ils ont une rugosité de 6 nm pour CHI/HA et 5 nm pour CHI-SH/HA-Thiopyridone (Fig 5.11).

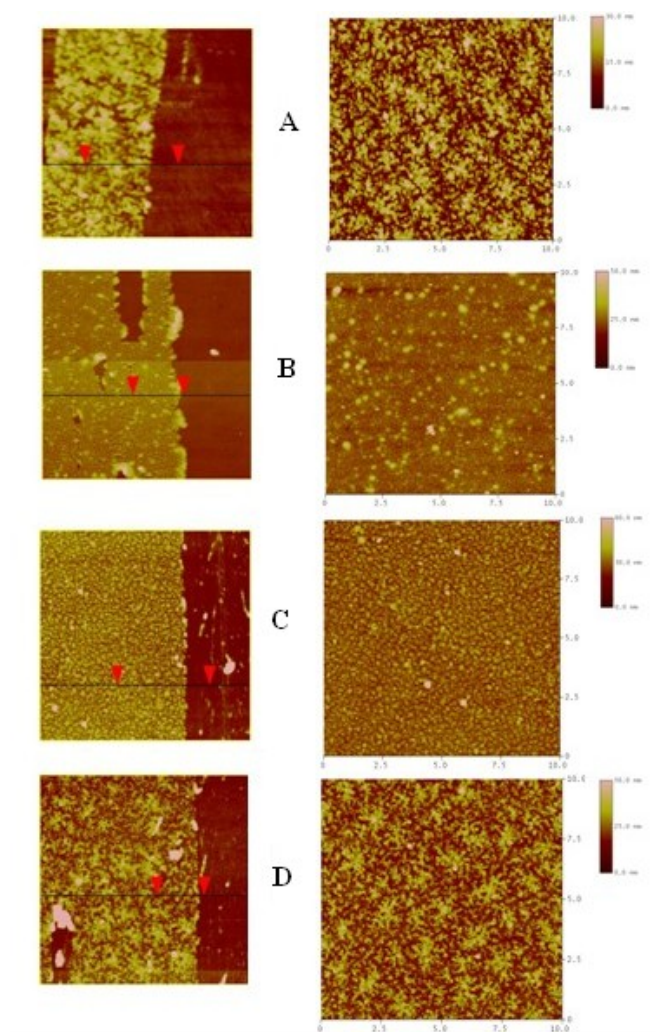


FIGURE 5.11 – Morphologie obtenue par AFM des films construits par QCM à pH 5,5 dans 0,15 M NaCl. A : CHI/HA, B : CHI-SH/HA-Mal, C : CHI-Alcyn/HA-N<sub>3</sub> et D : CHI-SH/HA-Thio. L'échelle (x,y) représente 2  $\mu$ m, celle en z (A) représente 30 nm et (B, C et D) 50 nm

L'adhésion des cellules a également été étudiée sur ces films naturels. Des études sur des films multicouche de type CHI/HA mettent en évidence la faible adhésion de plaquettes et leucocytes [Thierry et al., 2003a], de cellules issues de chondrosarcomes [Richert et al., 2004] et de cellules souches dérivées de la moelle osseuse [Liu et al., 2010]. Pour tous les auteurs de ces études, la faible adhésion et prolifération des cellules sur les films CHI/HA est principalement due aux propriétés mécaniques de ces derniers, qui sont fortement hydratés et donc insuffisamment rigides. Dans notre étude, on utilise les films réticulés de CHI/HA pour évaluer l'adhésion des CSMs de la gelée de Wharton ainsi que leur différenciation endothéliale, en comparaison avec les films non fonctionnalisés.



# Techniques et matériels utilisés lors de cette thèse

---

## 6.1 Cellules

### 6.1.1 Culture des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC)

La mise en culture d'HUVEC est effectuée selon la méthode de Jaffe modifiée [Marin et al., 2001].

#### 6.1.1.1 Réactifs et matériels

**Milieu de culture** Le milieu de culture est constitué du milieu endothélial basal EBM2 et de certains additifs. Sa composition est la suivante :

- \* Endothelial Basal Medium EBM2 (Lonza, Belgique),
- \* Sérum de veau foetal (SVE, Sigma, France) décomplémenté à +56° C pendant 30 min et utilisé à 10% (v/v dans  $\alpha$ -MEM),
- \* glutamine, 2 mM (GibcoBRL, France),
- \* pénicilline, 100 U/mL (GibcoBRL, France),
- \* streptomycine, 100  $\mu$ g/mL (GibcoBRL, France),
- \* fungizone, 2,5  $\mu$ g/mL (GibcoBRL, France),
- \* HEPES, 20 mM (Sigma, France).

**Tampon HBSS (Hank's balanced salts solution)** L'HBSS (Sigma, France) sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  sous forme de poudre, est reconstitué de la manière suivante :

- \* Ajouter 0,35g de  $\text{NaHCO}_3$  (Sigma, France)
- \* Compléter avec de l'eau distillée jusque 1000 mL (pH 7,2)
- \* Filtrer la solution sur 0,22  $\mu$ m
- \* Conserver à 4° C

Ce tampon contient : KCl 0,4g/L, NaCl 8,0g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,06g/L,  $\text{Na}_2\text{HP0}_4$  0,04778 g/L, D glucose 1,0g/L et Rouge de phénol 0,011 g/L.

### 6.1.1.2 Solutions de digestion

**Détachement des HUVECs de la veine ombilicale** Solution trypsine-EDTA à 0,05% (v/v) (Gibco, France).

**Solution de détachement des HUVECs des supports de culture** La solution de digestion précédente est diluée avec du tampon HBSS à la concentration de 0,025%.

### 6.1.1.3 Culture des HUVECs

Elle comporte plusieurs étapes : le recueil des cordons, le lavage de la veine ombilicale, le détachement des cellules et ainsi l'évolution de la culture.

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

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

**Détachement des cellules** A l'aide de la seringue, la veine est remplie avec 15-20 mL de la solution de digestion préchauffée à 37°C, jusqu'à ce qu'elle soit gonflée. Le cordon immergé dans du tampon est placé au bain-marie à 37°C pendant 10 min. Le cordon est alors retiré, posé sur une boîte de pétri, massé doucement quelques secondes. L'extrémité fermée par la pince est coupée et la solution de digestion est recueillie dans un tube plastique de 50 mL contenant 1 mL de sérum humain pour arrêter l'action de la trypsine. La veine est lavée trois fois avec 10 mL de tampon HBSS. La suspension cellulaire est centrifugée à 300 g pendant 10 min, à température ambiante. Après centrifugation, un petit culot de cellules est visible. Le surnageant est jeté et les cellules sont lavées dans 5 mL de milieu de culture. Les cellules sontensemencées dans un flacon de culture de 25 cm<sup>2</sup>, puis placées dans un incubateur à 37°C (5% CO<sub>2</sub> et 95% d'air).

**Evolution de la culture** Dès le lendemain, l'examen au microscope inversé à contraste de phase montre que la plupart des cellules ont adhéré au fond de la boîte,

sous la forme de nombreux îlots de cellules endothéliales. On fait subir à la boîte quelques mouvements oscillatoires et on élimine le milieu contenant des érythrocytes. Les cellules sont lavées deux fois dans la boîte avec HBSS. Elles sont remises dans l'incubateur avec 5 mL de milieu de culture. Normalement après 5-7 jours, les cellules sont confluentes.

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

**Passage en subcultures** A confluence, les cellules sont lavées 2 fois avec 5 mL de tampon HBSS préchauffé à 37°C. Les cellules sont détachées en laissant agir, pendant 2 minutes à 37°C, 4 mL de trypsine EDTA 0,125% filtrée. Ensuite, la digestion est arrêtée avec 8 mL de milieu de culture. La suspension cellulaire est recueillie dans des tubes coniques stériles, puis centrifugée à 300 g pendant 6 minutes. Après avoir été lavées, les cellules sont remises en suspension dans 5 ml de milieu de culture.

### 6.1.2 Culture des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical humain (WJ-MSCs)

La mise en culture des est effectuée selon la méthode de Sarugaser modifiée (Sarugaser et al; 2005).

#### 6.1.2.1 Réactifs et matériel

**Milieu de culture** Le milieu de culture est constitué du milieu de base  $\alpha$ -MEM et de certains additifs. La composition du milieu de culture est la suivante :

- \* Alpha Modified Eagle Medium ( $\alpha$ -MEM) (Lonza, Belgique),
- \* Sérum de veau foetal (SVE, Sigma, France) décomplémenté à +56°C pendant 30 min et utilisé à 10% (v/v dans  $\alpha$ -MEM),
- \* glutamine, 2 mM (GibcoBRL, France),
- \* penicilline, 100 U/mL (GibcoBRL, France),
- \* streptomycine, 100  $\mu$ g/mL (GibcoBRL, France),
- \* fungizone, 2,5  $\mu$ g/mL (GibcoBRL, France).

#### 6.1.2.2 Culture des WJ-MSCs

A l'aide d'une pince, le cordon est retiré de la boîte de culture, puis placé dans une boîte carrée remplie d'HBSS. Afin d'éliminer les résidus sanguins, l'extérieur du

cordon est lavé avec de l'éthanol à 70% puis divisé en plusieurs morceaux d'environ 5 cm de longueur. Chaque morceau est découpé sur la longueur afin de retirer la veine et les artères à l'aide de la pince. Les morceaux restants (membrane ombilicale et gelée de Wharton) sont récupérés avec la pince et déposés dans une autre boîte. La gelée est détachée de la membrane puis hachée en petits morceaux de 2 à 3 mm avant d'être répartis dans des plaques 6 puits. La gelée de Wharton est ensuite couverte de 2 mL de milieu de culture, et laissée à incuber à 37°C sous deux conditions différentes : normoxie (21% de dioxygène (O<sub>2</sub>) et 5% de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>)) et hypoxie (5% d'O<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub>).

### 6.1.2.3 Amplification en monocouche des WJ-MSCs

Pour la méthode des explants, les plaques 6 puits contenant les morceaux de gelée de Wharton sont légèrement agitées chaque jour afin de favoriser la migration des cellules du tissu foetal vers le support de culture. L'examen quotidien, au microscope inversé à contraste de phase, renseigne sur l'adhésion, le bon étalement et la morphologie des cellules souches mésenchymateuses au fond des plaques 6 puits et montre la formation des petites colonies de cellules sous forme fibroblastique (CFU-F). Après 6 jours de culture, les morceaux de gelée sont retirés des puits. Pour éviter toute contamination et afin d'éliminer toute trace de cellules sanguines non adhérentes, un double lavage à l'HBSS est nécessaire avant de renouveler le milieu de culture. Pour la suite de la culture, le milieu est changé deux fois par semaine. Les cellules sont laissées en culture jusqu'à l'obtention de 80% de confluence (subconfluence), c'est-à-dire jusqu'à ce qu'elles recouvrent 80% de la surface de culture.

## 6.1.3 Caractérisation des CSMs par cytométrie en flux

### 6.1.3.1 Principe

La cytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer sur une suspension de particules (cellules, bactéries, parasites, billes...), les caractéristiques individuelles de chaque particule telles que la taille, la forme et la complexité, et n'importe quel composant ou fonction qui peut être détecté par un composé fluorescent. 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

Enfin, après un immunomarquage fluorescent, 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 trois 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 [Fig 6.1](#). Cette technique

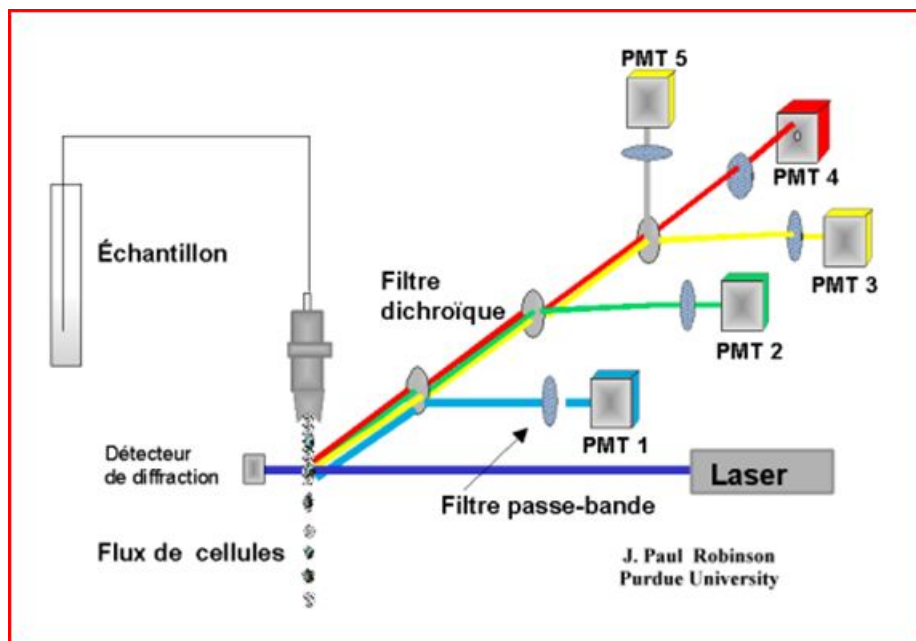


FIGURE 6.1 – Principe de la cytométrie en flux : Les cellules passent une par une devant un laser. Les signaux récoltés dans un angle de 90° par rapport à la source du laser (SSC), sont ensuite filtrés, puis récoltés par les photomultiplicateurs (PMT), et numérisés par un ordinateur. Ainsi des valeurs 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 (extrait du site [pedagogie.ac-amiens.fr](http://pedagogie.ac-amiens.fr))

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.

### 6.1.3.2 Immunofluorescence indirecte

Les récepteurs exprimés à la surface des cellules (marqueurs cellulaires) sont reconnus spécifiquement par un anticorps (anticorps primaire). Afin de mettre en évidence la formation du complexe récepteur-anticorps primaire, un deuxième anticorps est utilisé (anticorps secondaire). Ce dernier est couplé à un fluorochrome et est dirigé spécifiquement contre la partie Fc (fragment commun) de l'anticorps primaire [Fig 6.2](#).

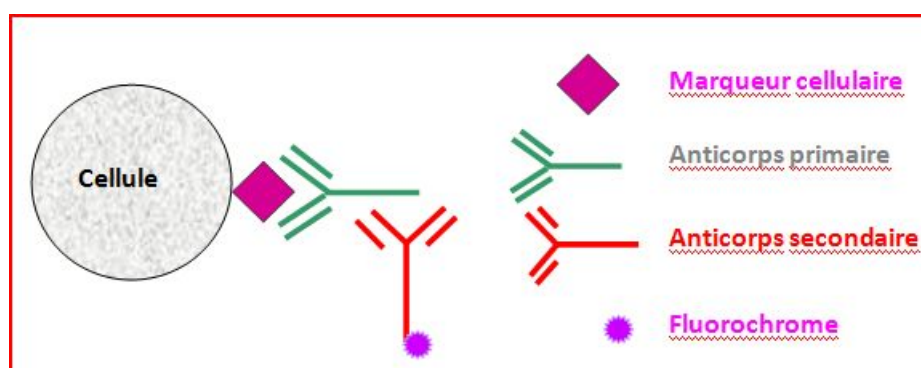


FIGURE 6.2 – Principe de l'immunofluorescence indirecte

### 6.1.3.3 Immunofluorescence directe

A la différence de l'immunofluorescence indirecte, l'anticorps spécifique du marqueur cellulaire est directement couplé à un fluorochrome [Fig 6.3](#).

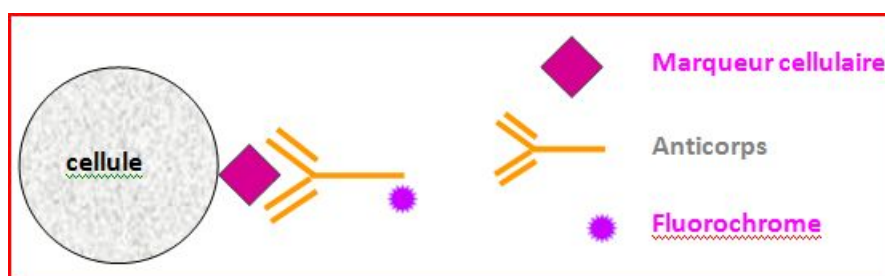


FIGURE 6.3 – Principe de l'immunofluorescence directe

Nous avons utilisé différents anticorps qui nous ont permis de réaliser des immunomarquages directs et indirects. Les caractéristiques des anticorps monoclonaux impliqués dans un immunomarquage direct : CD90, CD105, CD44, CD45 et HLA-DR, et

<u>Anticorps</u>	<u>Fluorochrome</u>	<u>Isotype</u>	<u>Fournisseur</u>
IgG1 FITC control	FITC	IgG1 (Souris)	BD <u>Pharmingen</u>
IgG1 PE control	PE	IgG1(Souris)	BD <u>Pharmingen</u>
IgG1 HLA-DR	PE	IgG2a (Souris)	BD <u>Pharmingen</u>
CD34	FITC	IgG1(Souris)	BD <u>Pharmingen</u>
CD45	FITC	IgG1(Souris)	BD <u>Pharmingen</u>
CD73	PE	IgG1(Souris)	BD <u>Pharmingen</u>
CD90	FITC	IgG1(Souris)	<u>Dako</u>
CD105	PE	IgG1(Souris)	<u>Dako</u>
CD86	PE	IgG1(Souris)	BD <u>Pharmingen</u>
HLA-DR	PE	IgG1(Souris)	BD <u>Pharmingen</u>

FIGURE 6.4 – Anticorps impliqués dans un immunomarquage direct

indirect : CD31, vWF, VE-cadhérine et VEGF-R2 ainsi que celles de l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor 488, sont présentées dans les tableaux Fig 6.4 et Fig 6.5.

<u>Anticorps</u>	<u>Spécificité de l'espèce</u>	<u>Isotype</u>	<u>Fournisseur</u>
CD31	<u>Humain</u>	<u>IgG (Souris)</u>	<u>Dako</u>
vWF	<u>Humain</u>	<u>IgG (Souris)</u>	<u>Dako</u>
VE-cadhérine	<u>Humain</u>	<u>IgG (Lapin)</u>	<u>Abcam</u>
VEGF-R2	<u>Humain</u>	<u>IgG (Lapin)</u>	Cell signaling
<u>IgG-Alexa Fluor® 488</u>	Lapin	<u>IgG (Chèvre)</u>	<u>Invitrogen</u>

FIGURE 6.5 – Anticorps impliqués dans un immunomarquage indirect

Autres réactifs :

- \* Tampon Phosphate Buffer Saline (PBS) (Gibco, France)
- \* Solution de blocage : Sérum Albumine Bovine (BSA, Euromedex, France) utilisée à 1% (p/v dans du PBS) ; la BSA empêche toute fixation aspécifique des anticorps
- \* Solution de perméabilisation : Triton X100 à 0,1% dans PBS à 37°C (Sigma, France)

- \* Solution de fixation : paraformaldéhyde (PAF, Sigma, France) à 4% (p/v dans PBS)

Le protocole d'immunomarquage des molécules d'adhérence : CD90, CD73, CD105, CD34 et CD45 comporte plusieurs étapes :

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

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

**Analyse des échantillons cellulaires** Les cellules sont analysées sur un cytomètre FACScan (Becton Dickinson, France). 10 000 événements sont collectés lors de chaque analyse. La population cellulaire est repérée sur le scattogramme en fonction de sa taille et de sa granulosité. Une fenêtre prenant en compte uniquement cette population est dessinée afin d'éliminer les débris cellulaires ou les doublets et triplets de cellules.

Sur l'histogramme de la fluorescence, la tension du photomultiplicateur (PMT) est réglée de manière à ce que les cellules non marquées, ainsi que le contrôle isotypique (cellules incubées en présence d'immunoglobulines non spécifiques) apparaissent négatives, entre 0 et 1 sur l'échelle logarithmique. La tension du PMT ne doit plus être touchée après ce réglage afin de ne pas faire d'erreur sur la lecture des intensités de fluorescence des échantillons analysés. L'intensité de fluorescence de la population cellulaire est mesurée automatiquement par le cytomètre et analysée à l'aide du logiciel WinMDI.

## 6.2 Biomatériaux

### 6.2.1 Construction des films multicouche de polyélectrolytes

Les films multicouche de polyélectrolytes ont été construits sur des lames de verre de tailles différentes suivant nos expériences. Nous avons essentiellement utilisé des lamelles de verre circulaires (surface 1,9 cm<sup>2</sup>) pouvant être insérées dans des puits de plaques 24 puits pour les tests de biocompatibilité et la culture bactérienne, et des lames de verre circulaires (surface 9,6 cm<sup>2</sup>) servant pour la culture cellulaire. La réalisation des films comporte plusieurs étapes : lavage des lames de verre, préparation des solutions de polyélectrolytes et la construction de ces films.

#### 6.2.1.1 Lavage des lames de verre

Afin de mettre en évidence la silice (Si) et de rendre la surface des lames électriquement négative, les lames sont immergées pendant 15 min dans une solution de SDS (0,01 M) à 100°C, lavées avec de l'eau distillée filtrée sur 0,22  $\mu$ M. Ensuite, les lames sont immergées pendant 15 min à 100°C dans une solution d'HCl (0,12 M) puis lavées avec de l'eau distillée filtrée. Les lames sont gardées dans l'eau distillée filtrée jusqu'à leur utilisation.

#### 6.2.1.2 Préparation des solutions de polyélectrolytes

Les polycations utilisés sont préparés dans une solution de NaCl, HCl ( $2 \times 10^{-3}$  M) et les polyanions dans une solution de NaCl (0,15 M).

##### Polycations utilisés

- \* Chitosane (CHI) de faible poids moléculaire (Sigma, France, MW : 50000-190000 Da), 0,2 mg/mL ;
- \* Chitosane couplé au groupement Thiol (CHI-SH), 0, 2 mg/mL ;
- \* Chitosane couplé au groupement Alcyne (CHI-Alcyne), 0, 2 mg/mL.

##### Polyanions utilisés

- \* Hyaluronane (HA) (Lifecore, USA, MW : 176000-350000 Da), 0, 2 mg/mL ;
- \* Hyaluronane couplé au groupement Thiopyridone (HA-Thio), 0, 2 mg/mL ;
- \* Hyaluronane couplé au groupement Maléimide (HA-Mal), 0, 2 mg/mL ;
- \* Hyaluronane couplé au groupement Azide (HA-N<sub>3</sub>), 0, 2 mg/mL.

#### 6.2.1.3 Préparations des films multicouche de polyélectrolytes

Les polyélectrolytes sont déposés à température ambiante, sur les lames de verre, dans l'ordre suivant [Fig 6.6](#). Le dépôt des différents polyélectrolytes permet l'obtention des architectures suivantes sur les lames de verre : (CHI-HA)<sub>10</sub>, (CHI-SH-HA-Thio)<sub>10</sub>,

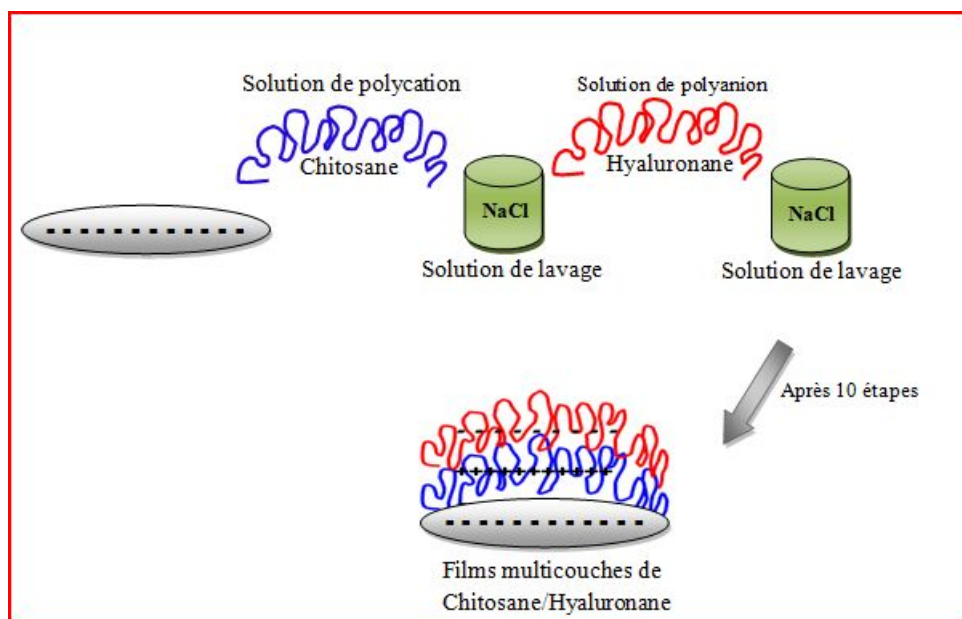


FIGURE 6.6 – Protocole de construction des films multicouche de polyelectrolytes

(CHI-SH-HA-Mal)<sub>10</sub> et (CHI-Alcyne-HA-N<sub>3</sub>)<sub>10</sub>. Les films multicouche sont ensuite rincés par une solution Hepes-NaCl (0,01 M) de pH 7,4 avant leur utilisation et sont conservés au maximum une nuit à 4° C. Avant chaque expérience, les films sont exposés sous une lampe UV germicide pendant 30 min.

### 6.3 Biocompatibilité des biomatériaux

Au 4<sup>ème</sup> passage, les CSMs ont étéensemencées à raison de 3000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les tests suivants ont été réalisés :

- \* Observation des cellules au microscope électronique à balayage ;
- \* Vérification de l'étalement des cellules par immuno-marquage des fibres d'actine avec la phalloïdine ;
- \* Répartition des noyaux cellulaire/cm<sup>2</sup> ;
- \* Coloration des composants cellulaires par le cristal violet.

#### 6.3.1 Observation des cellules au microscope électronique à balayage

Le microscope électronique à balayage fournit des images en trois dimensions des surfaces observées. Pour former une image, il utilise les électrons secondaires qui sont émis de la surface d'un échantillon lorsque celui-ci est balayé par un fin faisceau d'électrons primaires. Afin de rendre cet échantillon conducteur pour le flux d'électrons qui le balaye et optimiser l'émission d'un nombre suffisant d'électrons secondaires, un échantillon biologique, après fixation et déshydratation, doit être

recouvert d'une fine couche de métal lourd.

L'image obtenue est formée par un faisceau balayant avec une intensité contrôlée par la quantité d'électrons secondaires émis en chaque point de l'échantillon. Un microscope électronique à balayage offre une profondeur de champ très grande. Vu que le nombre des électrons secondaires dépend de l'angle d'incidence du faisceau d'électrons primaires, l'image produit une impression de relief avec des zones claires et des zones d'ombre. La résolution du microscope électronique à balayage est au mieux d'environ 10 nanomètres, ce qui fait que ce microscope est surtout utilisé pour étudier la surfaces des cellules et des tissus, plutôt que les organites subcellulaires.

Afin de pouvoir étudier la morphologie des CSMs cultivées sur les différents polymères commerciaux et modifiés ainsi que sur le collagène, les surnageants sont éliminés et les lamelles de verre, sur lesquelles la culture cellulaire a été réalisée, sont rincées 2 fois pendant 5 min avec du PBS préalablement chauffé à 37°C. Puis les cellules sont fixées au glutaraldéhyde à 2,5 % (v/v) dans du PBS pendant 1 h à température ambiante. Ensuite, les lamelles sont rincées pendant 5 min avec du PBS puis une seconde fois pendant 5 min avec de l'eau distillée. Les échantillons subissent ensuite une déshydratation par des bains successifs d'alcool à 50%, 70% et 95% (10 min chacun) et enfin 2 bains de 10 min dans de l'alcool absolu. Puis les lamelles sont plongées pendant 10 min dans un bain d'un mélange d'héxaméthylsilazane (HMDS)/alcool absolu (v/v) et enfin dans un bain d'HMDS pur pendant une nuit. Les lamelles sont ensuite métallisées à l'or-palladium à l'aide d'un évaporateur cathodique puis observées au microscope électronique à balayage (JEOL).

### **6.3.2 Vérification de l'étalement des cellules par immunomarquage des fibres d'actine avec la phalloïdine**

La phalloïdine, extraite de phallotoxines, est couramment utilisée pour marquer, identifier et stabiliser les filaments d'actine car elle a une forte affinité pour ces derniers, et empêche leur dépolymérisation. Les cellules sont incubées en présence de la phalloïdine couplée à un fluorochrome vert (FITC : Fluorescein isothiocyanate)(Invitrogen, France), et un contre-marquage des noyaux au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI, Sigma Aldrich) est effectué.

#### **6.3.2.1 Protocole de l'immunomarquage des filaments d'actine**

- \* Les cellules fixées sont rincées 5 minutes dans une solution de PBS. Pendant le rinçage, préparer une solution de PBS contenant 0,5% de Triton : solution de perméabilisation. Incuber les lamelles dans la solution de perméabilisation pen-

dant 15 minutes ;

- \* Faire 2 rinçages au PBS de 5 minutes chacun. Pendant les rinçages, diluer la phalloïdine dans une solution de PBS contenant 0,1% Triton + 0,5% BSA : solution de marquage. Garder à l'abri de la lumière car ce réactif est photosensible ;
- \* Incuber pendant 30 minutes ;
- \* Faire 3 rinçages au PBS ;
- \* Diluer la solution mère de DAPI au 1/250 dans l'eau puis diluer cette dernière à 1/100 dans du PBS contenant 0,1% Triton ;
- \* Incuber pendant 5 minutes ;
- \* Faire 3 rinçages au PBS ;
- \* Déposer une goutte de la solution de montage sur une lame et y disposer la lamelle, face contenant les cellules vers le bas ;
- \* Observer les préparations au microscope à fluorescence en utilisant les filtres appropriés aux fluorochromes utilisés.

### 6.3.3 Répartition des noyaux cellulaire/cm<sup>2</sup>

Les CSMsensemencées sur les différents polymères ont été incubées avec du DAPI, agent intercalant de l'ADN, pendant 5 min. Dix champs différents pour chaque type de polymère ont été observés en microscopie à fluorescence (Zeiss microscope, Japon), puis nous avons procédé à la numération des noyaux sur des photographies.

### 6.3.4 Prolifération cellulaire par cristal violet

Le cristal violet est un colorant qui interagit avec les composants intracellulaires. Nous avons donc réalisé une cinétique sur une semaine de culture. Après extraction du colorant au SDS, nous avons mesuré l'absorbance à 594 nm. Deux témoins ont été utilisés : le collagène de type 1 qui permet une bonne adhésion des cellules (témoin positif) et le Triton X100 qui perméabilise les cellules (témoin négatif).

Après 15 jours de différenciation, le milieu de prolifération a été remplacé par du milieu de différenciation EGM-2 supplémenté par 0,5 % SVF et des facteurs pro-angiogéniques : hydrocortisone, human epidermal growth factor (hEGF), VEGF, human fibroblast growth factor-b (hFGF-b), human R-3-insulin like growth factor-1 (R3-IGF-1), acide ascorbique, héparine et gentamicine/amphotéricine-B. Le milieu a été changé deux fois par semaine.

## 6.4 Evaluation de la différenciation des CSMs en cellules endothéliales-*like*

### 6.4.1 Etude de l'expression génique par RT-PCR

La RT-PCR en temps réel a été utilisée afin d'évaluer l'expression relative de gènes caractéristiques de l'engagement des CSMs vers la voie endothéliale.

#### 6.4.1.1 Extraction des ARN

L'extraction des ARN a été effectuée à l'aide du kit d'extraction d'ARN RNeasy Mini selon les instructions du fabricant (Qiagen, Venlo, Pays-Bas). Les cellules cultivées sur plastique ont été détachées mécaniquement à l'aide d'un grattoir stérile dans un volume de 350  $\mu$ L de tampon de lyse RLT puis transférés dans des tubes 1,5 mL. Les hybrides cellules/biomatériau ont été transférés directement dans des tubes de 1,5 mL contenant 350  $\mu$ L de tampon RLT. Les tubes ont été vigoureusement agités à l'aide d'un vortex puis le lysat a été transféré dans une colonne (QIAshredder), elle-même disposée dans un tube collecteur de 2 mL. Le tout a été centrifugé pendant 2 min à 300g. Le lysat récupéré dans le tube collecteur a été homogénéisé avec un même volume d'éthanol à 70% puis transféré dans une seconde colonne (RNeasy) disposée dans un tube collecteur de 2 mL. Une centrifugation de 15 secs à 300 *g/min* permettait d'éliminer le tampon RLT qui se retrouvait dans le tube collecteur. Un tampon de lavage (RW1) a été ajouté à raison de 700  $\mu$ L dans la colonne (RNeasy). Une centrifugation de 15 secs à 300 *g/min* permettait d'éliminer ce tampon de lavage. Deux lavages successifs ont ensuite été effectués avec l'ajout dans la colonne RNeasy de 500  $\mu$ L de tampon RPE. Ces deux solutions de tampon ont été éliminées par deux centrifugations successives de respectivement 15 secs et 2 min à 300 *g/min*. Les colonnes RNeasy ont ensuite été placées dans un tube collecteur de 1,5 mL, et l'ARN est élué par l'ajout de 30  $\mu$ L d'eau sans RNase directement déposés sur la membrane de la colonne puis récupérés par une centrifugation d'1 min à 300 *g/min*. Les ARN ainsi purifiés ont alors été quantifiés puis conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

#### 6.4.1.2 La rétrotranscription RT

L'objectif de la transcription inverse ou rétrotranscription (RT) est de convertir les ARN totaux purifiés en ADN complémentaire (ADNc). Cette réaction est possible grâce à l'action d'une enzyme iScript rétro-transcriptase capable de synthétiser un brin d'ADNc à partir d'un brin d'ARN. La RT a été réalisée à partir de 350 ng d'ARN totaux à l'aide d'un kit iScript cDNA synthesis (Bio-Rad, USA) selon les instructions du fabricant. Cet ARN a été mélangé à 4  $\mu$ L du 5x iScript reaction mix et 1  $\mu$ L de l'iScript retro-transcriptase et de l'eau stérile sans RNase pour obtenir un volume final de 20



$\mu\text{L}$ . Cette solution était alors agitée délicatement puis chauffée 5 min à 25°C, 30 min à 42°C et enfin chauffée 5 min à 85°C pour inactiver l'enzyme avant d'être mise sur glace et conservée à -20°C jusqu'à son utilisation pour les PCR en temps réel.

#### 6.4.1.3 PCR en temps réel

Le thermocycleur utilisé est le miniOpticon (Biorad) qui permet de détecter le signal de fluorescence émis par le sybr green s'intercalant à l'ADN au fur et à mesure de l'amplification. Le volume réactionnel de 20  $\mu\text{L}$  comprend 1  $\mu\text{L}$  d'ADNc et 19  $\mu\text{L}$  du mélange :

- \* 10  $\mu\text{L}$  d'IQ SYBR GREEN Supermix (Biorad) dont la solution mère à 2X est composée de KCl 100 mM, Tris-HCl pH 8,4 40 mM, dNTP 0,4 mM, iTaq polymérase 50 unités/mL, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, SYBR GREEN I, fluorescéine 20 nM et divers stabilisants ;
- \* 1  $\mu\text{L}$  de chaque amorce sens et anti-sens (Eurogentec, France) Fig 6.7 à 6000 nM pour une concentration finale de 300 nM dans le volume réactionnel de 20  $\mu\text{L}$  ;
- \* 7  $\mu\text{L}$  d'eau stérile garantie sans nucléases.

Cibles	Sens	Anti-sens
<b>CD31</b>	5'-ATGATGCCCAGTTTGAGGTC-3'	5'-ACGTCTTCAGTGGGGTTGTC-3'
<b>KDR</b>	5'-GTGACCAACATGGAGTCGTG-3'	5'-TGCTTCACAGAAGACCATGC-3'
<b>CDH5</b>	5'-CCTACCAGCCCAAAGTGTGT-3'	5'-GACTTGGCATCCCATTGTCT-3'

FIGURE 6.7 – Séquences des amorces utilisées pour la PCR en temps réel

Le gène de référence utilisé est celui de la protéine ribosomale SP29. La PCR permet, grâce à de nombreux cycles, d'amplifier des séquences d'ADNc d'intérêt présentes en quantités infinitésimales. Le profil d'amplification que nous avons utilisé est le suivant :

- \* Dénaturation de la matrice d'ADN double brin à 95°C pendant 30 sec ;
- \* Hybridation des amorces à 60°C pendant 1 min ;
- \* Elongation des brins complémentaires à 72°C pendant 30 sec.

Au fil des cycles, la quantité du double brin d'ADN délimité par les amorces augmente de façon exponentielle, en théorie 2n copies pour n cycles de PCR. Mais en pratique, cette quantité dépend de l'efficacité de la réaction de PCR. Pour un rendement classique de 85%, une PCR de 30 cycles produira environ 106 copies d'amplicons de taille attendue. Contrairement à la PCR classique qui ne permet d'obtenir une quantité d'ADNc qu'à la fin de la réaction, la PCR en temps réel permet, comme son nom l'indique, de suivre l'augmentation de la quantité d'ADNc en temps réel. Le principe de la PCR en temps réel repose sur l'utilisation de sondes fluorescentes qui peuvent se fixer à l'ADN double brin, comme c'est le cas pour la SYBRgreen que nous avons utilisée

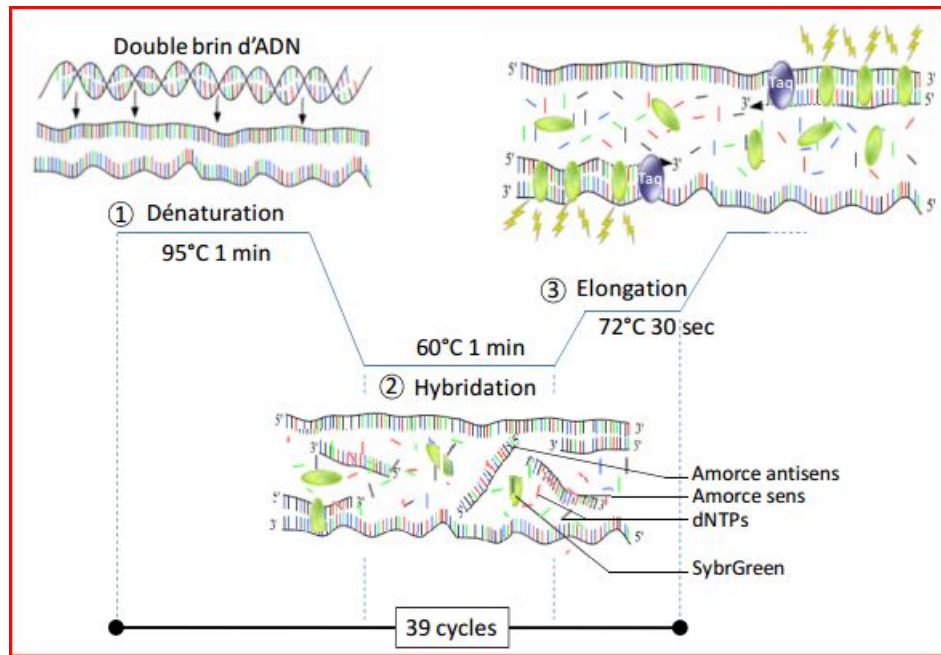


FIGURE 6.8 – Principe de la réaction de PCR en temps réel basée sur la technologie SybrGreen

Fig 6.8 ou se fixent à une séquence d'ADN spécifique (Taqman ou Beacon).

### 6.4.2 Etude de l'expression protéique par Western Blot

Dans le but de tester l'efficacité du milieu de différenciation et notamment de vérifier l'expression de certains marqueurs endothéliaux, des analyses protéiques ont été effectuées par Western Blot sur des CSMs cultivées sur les différents types de films multicouche de polyelectrolytes. Un tampon de lyse cellulaire a été ajouté dans chacun des puits (100  $\mu\text{L}$ /puits pour une plaque 6 puits) et les tapis cellulaires ont été détachés mécaniquement à l'aide d'un grattoir stérile. Les suspensions de cellules lysées contenues dans chacun des puits ont alors été transférées dans des tubes de 1,5 mL. Après une centrifugation de 10 min à 10000  $g$  et 4°C qui a permis la séparation des débris cellulaires insolubles et des protéines solubles contenues dans le surnageant, les surnageants ont été collectés et leur concentration en protéines totales a été évaluée par spectrophotométrie (Varioskan, Thermo scientific, USA). Puis tous les échantillons sont dénaturés directement dans du tampon Laemmli 2X ((Bio-Rad, USA) supplémenté de 5% de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Sigma Aldrich). Les lysats sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes afin de dénaturer les protéines et rendre accessible tous les sites (qui peuvent être inaccessibles en raison de la conformation en 3D des protéines).

Les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire lors d'une électrophorèse SDS-PAGE (gel à 7,5% ou 12% selon les protéines d'intérêt). 20  $\mu\text{L}$  de lysat,

correspondant à 200000 cellules, sont déposés par puits. Des marqueurs de masse moléculaire (15  $\mu\text{L}$  de Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standard All Blue, Biorad, France) sont utilisés pour déterminer la taille des bandes de protéines. La migration s'effectue à 180 volts pendant 4 heures 30 en moyenne.

Les protéines sont transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose (Biorad, France) dans un système de transfert semi-sec (Biorad) pendant 75 minutes à 25 volts. La coloration des bandes de protéines au rouge ponceau (Sigma Aldrich) permet de vérifier l'efficacité du transfert sur la membrane. La membrane est alors saturée 1 heure dans du PBS supplémenté de 5% (p/v) de lait ou de BSA (Sigma Aldrich) pour l'analyse des protéines phosphorylées, 0,1% (v/v) de Tween 20 (Sigma Aldrich). La saturation permet de réduire les bruits de fond en prévenant la fixation non spécifique des anticorps primaires et/ou secondaires. La membrane de nitrocellulose est ensuite incubée avec un anticorps primaire ciblant la protéine d'intérêt, puis avec un anticorps secondaire conjugué HRP (HorseRadish Peroxidase) selon les instructions du fournisseur. Le système de détection par chemiluminescence ECL ou ECL<sup>+</sup> (GE Healthcare Europe GmbH) est utilisé pour la révélation des bandes de protéines sur les films.

## 6.5 Evaluation de la fonctionnalité des cellules endothéliales-*like*

### 6.5.1 Incorporation du Dil-Ac-LDL

Afin de mettre en évidence la fonctionnalité des cellules endothéliales-*like* obtenues par la différenciation des CSMs sur les différents supports CHI/HA ainsi que le collagène, la méthode d'incorporation du Dil-Ac-LDL (acetylated low-density lipoprotein ; marqueur spécifique aux cellules endothéliales et aux macrophages) a été utilisée après 15 jours de culture. Une concentration de 0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Dil-Ac-LDL (Tebu-bio, France) a été ajoutée au milieu de culture RPMI 1640 sans rouge de phénol pendant 4 heures à 37°C. Ensuite, les cellules ont été lavées par du milieu frais, fixées par une solution aqueuse de paraformaldéhyde à 4% (p/v) et incubées avec du DAPI pour 5 min. Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence (Leica) avec un filtre à la rhodamine.

### 6.5.2 Immunomarquage du facteur prothrombinique de Von Willebrand

Après 15 jours de différenciation endothéliale, les CSMs ensemencées sur collagène, CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio ont été analysées par immunofluorescence pour l'expression du marqueur de cellules endothéliales : facteur Von Willbrand. Les cellules ont été fixées par une solution de paraformaldéhyde à 4% (p/v), bloquées avec 1% de BSA, marquées avec un anticorps anti-vWF (IgG polyclonal anti-souris, Dako, France, 1/100). Les contrôles négatifs ont également été utilisés dans chaque analyse afin de supprimer l'autofluorescence des anticorps primaire et/ou secondaire. En outre, les cellules ont été marquées au DAPI afin de visualiser leurs noyaux. Les résultats ont été observés et photographiés par microscopie à fluorescence (Zeiss microscope).

Dans ce chapitre on décrit la mise au point du protocole de différenciation endothéliale des CSMs. Depuis une dizaine d'années, les travaux du laboratoire se focalisent sur l'évaluation de l'effet des multicouches de polyélectrolytes type : chlorhydrate de polyallylamine (PAA) et de polystyrène sulfonate (PSS), sur la différenciation des progéniteurs circulant en cellules vasculaires. L'équipe a mis en évidence une accélération notable de la différenciation au contact du film, en comparaison de celle observée sur une surface contrôle de fibronectine ou de collagène de type I [Berthelemy et al., 2008]. D'où les premières mises au point ont été faites sur les CSMs cultivées sur le PAH/PSS en présence des facteurs pro-angiogéniques du milieu EGM2 et puis elles ont été évaluées pour les cellules cultivées sur les films de type CHI/HA. Dans cette étude, nous avons évalué l'influence du pourcentage de SVF sur le comportement des CSMs issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical humain ensemencées sur des films multicouches de polyélectrolytes de PSS/PAH organisés en quatre bicouches. Les CSMs ont été isolées de la gelée de Wharton par la méthode des explants, puis elles ont été amplifiées jusqu'au troisième passage. Leur caractérisation phénotypique a été réalisée par des analyses de cytométrie en flux. Ensuite les cellules ont été ensemencées sur les films en présence du milieu endothélial basal (EGM-2) complété par 5% ou 2% de SVF. Le comportement des cellules a été suivi pendant 20 jours par microscopie optique et immunofluorescence (DAPI). Après deux semaines sur des lames de verre, aucune différence n'a été observée quel que soit le pourcentage de SVF. Puis avec 5% de SVF, Les CSMs forment des sphéroïdes tridimensionnels sur PSS/PAH après 20 jours de culture avec un agrégat nucléaire. Alors qu'avec 2% de SVF, ces sphéroïdes n'apparaissent pas et les cellules cultivées en 2D ont gardé leur morphologie fibroblastique. La diminution du pourcentage de SVF de 5% à 2% évite la formation de sphéroïdes sur PAH/PSS. Ces résultats pourraient guider la bio-ingénierie à la construction de monocouches de cellules en 2D ou des structures 3D, en augmentant le potentiel de différenciation ostéogénique ou chondrogénique des

CSMs.

# Résultats et discussions

---

## 7.1 Influence du pourcentage de sérum sur le comportement des CSMs issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical humain

### 7.1.1 Introduction et objectifs de l'article

Dans ce chapitre nous vous décrivons la mise au point du protocole de différenciation endothéliale des CSMs. Depuis une dizaine d'années, les travaux du laboratoire se focalisent sur l'évaluation de l'effet des multicouches de polyélectrolytes de type : chlorhydrate de polyallylamine (PAH) et polystyrène sulfonate (PSS), sur la différenciation des progéniteurs circulant en cellules vasculaires [Berthelemy et al., 2008]. L'équipe a mis en évidence une accélération notable de la différenciation au contact du film, en comparaison de celle observée sur une surface contrôle de fibronectine ou de collagène de type I [Berthelemy et al., 2008]. Les premières mises au point ont été effectuées sur des CSMs cultivées sur PAH/PSS en présence des facteurs pro-angiogéniques du milieu EGM2, puis elles ont été évaluées sur des films de type CHI/HA. Dans l'étude présentée, nous avons évalué l'influence du pourcentage de SVF sur le comportement des CSMs issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical humain ensemencées sur des films multicouche de polyélectrolytes PAH/PSS organisés en quatre bicouches. Les CSMs ont été isolées de la gelée de Wharton par la méthode des explants, puis elles ont été amplifiées jusqu'au troisième passage. Leur caractérisation phénotypique a été réalisée par des analyses de cytométrie en flux. Ensuite les cellules ont été ensemencées sur les films en présence du milieu endothélial basal (EGM-2) complété par 5% ou 2% de SVF. Leur comportement a été suivi pendant 20 jours par microscopie optique et immunofluorescence (DAPI). Après deux semaines sur des lames de verre, aucune différence n'a été observée quel que soit le pourcentage de SVF. Ultérieurement avec 5% (recommandations du fournisseur) de SVF, les CSMs forment des sphéroïdes tridimensionnels avec un agrégat nucléaire sur PAH/PSS après 20 jours de culture. Au contraire avec 2% de SVF, ces sphéroïdes n'apparaissent pas et les cellules cultivées, quand elles sont observées, ont gardé leur morphologie fibroblastique. La diminution du pourcentage de SVF de 5% à 2% évite la formation de sphéroïdes. Ces résultats pourraient guider la bio-ingénierie à la

construction de monocouches de cellules en 2D ou de structures 3D, en augmentant le potentiel de différenciation ostéogénique ou chondrogénique des CSMs.

### **7.1.2 Texte de l'article**

Cet article a été publié dans le journal "Biomedical materials and engineering" suite à une communication affichée dans le programme des 7èmes journées scientifiques du PLIC : Pole Lorrain d'Ingénierie du Cartilage.



# Influence of serum percentage on the behavior of Wharton's jelly mesenchymal stem cells in culture

C. Harmouch<sup>a,b,\*</sup>, R. El-Omar<sup>a,b,\*</sup>, P. Labrude<sup>a</sup>, V. Decot<sup>a,c</sup>, P. Menu<sup>a,\*,\*\*</sup> and H. Kerdjoudj<sup>d</sup>

<sup>a</sup> UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, MoPA, Vandœuvre-les-Nancy, France

<sup>b</sup> Reviva Regenerative Medicine Center, Middle East Institute of Health, Bsalim, Lebanon

<sup>c</sup> CHU de Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, Vandœuvre-les-Nancy, France

<sup>d</sup> UFR Odontologie, SFR CapSanté, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

## Abstract.

**BACKGROUND:** Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells able to differentiate into several lineages with valuable applications in regenerative medicine. MSCs differentiation is highly dependent on physicochemical properties of the culture substrate, cell density and on culture medium composition.

**OBJECTIVE:** In this study, we assessed the influence of fetal bovine serum (FBS) level on Wharton's jelly (WJ)-MSCs behavior seeded on polyelectrolyte multilayer films (PEMF) made of four bilayers of poly-allylamine hydrochloride (PAH) as polycation and poly-styrene sulfonate (PSS) as polyanion.

**METHODS:** MSCs isolated from WJ by explants method were amplified until the third passage. Their phenotypic characterization was performed by flow cytometry analyses. MSCs were seeded on PEMF, in Endothelial growth medium-2 (EGM-2) supplemented by either 5% or 2% FBS. Cell's behavior was monitored for 20 days by optical microscopy and immunofluorescence.

**RESULTS:** Until 2 weeks on glass slides, no difference was observed whatever the FBS percentage. Then with 5% FBS, MSCs formed three-dimensional spheroids on PSS/PAH after 20 days of culture with a nuclear aggregate. Whereas, with 2% FBS, these spheroids did not appear and cells grown in 2D conserved the fibroblast-like morphology.

**CONCLUSIONS:** The decrease of FBS percentage from 5% to 2% avoids 3D cell spheroids formation on PAH/PSS. Such results could guide bioengineering towards building 2D structures like cell layers or 3D structures by increasing the osteogenic or chondrogenic differentiation potential of MSCs.

Keywords: MSCs, fetal bovine serum, spheroids, tissue engineering

## 1. Introduction

Cell sources considerations hamper progress in many areas of tissue engineering, including vascular regeneration [1]. Despite significant progress toward development of biomaterials and methods to cultivate 3D vascular constructs, cell sourcing remains a major challenge for tissue engineering. Mature

\*These authors contributed equally to this work.

\*\* Address for correspondence: Pr. Patrick Menu, UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Bâtiment Biopôle, Faculté de Médecine, B.P. 184, 54505 Vandœuvre-les-Nancy Cedex, France. Tel.: +33 3 83 68 54 57; Fax: +33 3 83 68 54 09; E-mail: patrick.menu@univ-lorraine.fr.

cells from tissue of origin may be difficult to obtain and suffer from limited proliferative capacity, which may further decline as a function of donor age and health. Isolation of smooth muscle and endothelial cells injures the donor site and may also be limited by the health and age of the patient. Moreover, mature cell amplification decrease their function and involve cell dedifferentiation [2]. On the other hand, multipotent and pluripotent stem cells have tremendous potential to provide large numbers of cells with a great differentiation capacity towards vascular lineages, and can be used, as an alternative source of mature cells, in engineering of functional and implantable vascular tissues. Specifically, mesenchymal stem cells (MSCs) are a promising tool and have valuable applications in regenerative medicine based on the tissue engineering concept [3].

MSCs are a population of cells which maintain a self-renewal capacity for extended periods [4,5], and have the ability to generate a large quantity of different cell types. Although bone marrow (BM) is actually the main source for both experimental and clinical studies, the use of BM-derived MSCs is not always acceptable due to the high degree of viral exposure, the possibility of donor morbidity, and the significant decreases in cell number and proliferation/differentiation capacity with age [6]. Thus investigators have worked to identify other abundant and easily attainable source of MSCs for therapeutic use. In this regard, Wharton's jelly (WJ) has been established as an alternative to BM source of MSCs [7]. MSCs isolated from the umbilical cord harvesting are of great importance because they are pluripotent which under appropriate conditions can differentiate into many cell types including neurons, cardiomyocytes, smooth muscle, insulin secreting cells, cartilage and osteocytes [8].

Several groups are studying the feasibility of using human WJ-MSCs as endothelial cell progenitors to engineer small-diameter human vessels with substantial histological and molecular similarity to native ones after optimization of the culture conditions. Indeed, studies have shown that the differentiation of MSCs is highly dependent on the mechanical environment of substrate [9,10] and on the culture medium (growth factors, serum content) [11]. One of the main components of the culture medium is fetal bovine serum (FBS). FBS may contain many components, including proteins, electrolytes, lipids, carbohydrates, attachment factors, hormones, enzymes and inhibitory factors [12]. Many of the substances in serum are related to factors that have been shown to have a large effect on the adhesion and differentiation of MSCs. Although the identities and concentrations of these substances in serum are not well characterized, we worked out the impact of the optimal concentration of FBS for the culture and differentiation of MSCs.

To improve cell adhesion and differentiation, several protocols proposed to cover conventional culture supports by molecules of the extracellular matrix like: fibronectin, collagen type I ... whereas these proteins can not allow a cell adhesion as effective as the multilayer films [13]. Our lab's studies focused on the evaluation of the effect of polyelectrolyte multilayer films (PEMF) made of polyallylamine hydrochloride (PAH) and polystyrene sulfonate (PSS), on the differentiation of progenitor cells into vascular cells. Berthelemy et al. demonstrated a significant increase of cell differentiation in contact with such a PEMF, compared to that observed on control surface [14]. The architecture corresponding to deposited PAH/PSS layers showed the best conditions for the culture of human WJ-MSC. FBS-based medium is conventional for isolation and expansion of MSCs and has been used in several clinical trials [15]. In order to optimize the culture conditions, on our selected antithrombogenic PEMF ((PAH-PSS)<sub>4</sub>) which allowed an effective cell adhesion, this work focused on the influence of FBS concentration on the behavior of WJ-MSCs after one week of culture.

## 2. Material and methods

### 2.1. Building of Polyelectrolyte Multilayer Films (PEMF)

Anionic PSS (MW = 70,000 Da) and cationic PAH (MW = 70,000 Da) were purchased from Sigma Aldrich. The PEMF were built on cover glasses from polyelectrolyte solutions (PSS and PAH) at 1 mg/ml, dissolved in Tris ( $10^{-2}$  M)/NaCl ( $15 \times 10^{-2}$  M) solution. Each experiment was preceded by a cleaning step of the cover glasses (diameter: 34.7 mm) for 15 min at 100°C with  $10^{-2}$  M sodium dodecyl sulfate (SDS: Sigma Aldrich). This procedure was followed by an extensive ultrapure water rinse. Glasses were then brought in contact for 15 min at 100°C with  $10^{-1}$  M hydrochloric acid and finally extensively rinsed with ultrapure water (Millipore). The cover glasses were then placed in 6-well plates and PAH solution was incubated for 5 min at room temperature. Then, the polyanion (PSS) was adsorbed for 5 min. Each polyelectrolyte adsorption was followed by an intensive Tris/NaCl solution rinse. Eight alternate depositions of polycationic PAH and polyanionic PSS layers were built up.

### 2.2. Isolation and culture of MSCs from Wharton's jelly umbilical cord

Fresh human umbilical cords were obtained after full-term births with informed consent using the guidelines approved by the CHU of Nancy. Briefly, after rinsing in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma) solution, cords were aseptically stored at 4°C in sterile saline until processing. Next, umbilical cord vessels were removed manually from cord segments, and the exposed Wharton's jelly was cut into very small pieces or explants of approx 1–2 mm. These explants were cultured in proliferation medium: alpha-MEM (Lonza) supplemented with 10% decompartmented FBS (Sigma) and 1% antibiotics (Penicillin and Fungizon®). Medium was changed every 2 days until the third passage. WJ-MSCs were used at the fourth passage and accordingly seeded at 3000 cells/cm<sup>2</sup> on (PSS/PAH)<sub>4</sub> film and glass slides (control) in  $\alpha$ -MEM medium and incubated at 37°C under normoxic environment (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) and cultured until 80% of cell confluence.

### 2.3. Immunophenotyping

To detect cell surface antigens, cultured adherent cells after detachment with Trypsin-EDTA, were washed with phosphate-buffer saline (PBS) (Gibco). Cells were immunolabelled with the following anti-human antibodies: CD90-FITC, CD105-PE (Dako), CD34-FITC, CD45-FITC, CD73-PE, CD86-PE and HLA-DR-PE (BD Pharmingen, France). As controls, mouse IgG1-PE, IgG1-FITC and IgG1-HLA-DR (BD Pharmingen, France) were used. At least 10,000 events were acquired on BD FACS Calibur® flow cytometer, and the results were analyzed using WinMDI v2.8 software.

### 2.4. Cell stimulation

Once WJ-MSCs reached 80% of confluence, they were stimulated with appropriate medium (EBM-2) (Lonza) supplemented with either 5% FBS, and growth supplements (Single Quotes) including hydrocortisone, human epidermal growth factor (hEGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), human fibroblast growth factor-b (hFGF-b), human R-3-insulin like growth factor-1 (R3-IGF-1), ascorbic acid, heparin and gentamicin/amphotericin-B. Medium was changed twice per week for 2 weeks.

### 2.5. Cell morphology

WJ-MSCs cultured on both surfaces (glass slides and (PSS/PAH)<sub>4</sub>) were observed by optical microscopy (Nikon Diaphot, VFX-DX, Japan) to evaluate their morphology after 20 days of culture.

### 2.6. Nuclei staining

WJ-MSCs seeded on (PAH/PSS)<sub>4</sub> were incubated with DAPI (Calbiochem; vwr international), DNA intercalating agent, for 5 min at room temperature. Different fields were observed by fluorescence microscopy (Zeiss microscopy, Japan) and then cell's behavior was compared in photographs.

## 3. Results

### 3.1. Characterization of WJ-MSCs

Results are representative of those obtained using 3 umbilical cords. MSCs displayed a homogeneous fibroblast-like morphology with a positive expression of CD73, CD90 and CD105 (MSCs surface antigen markers), and a negative expression of CD34, CD45 (hematopoietic lineage markers), HLA-DR (MHC-class II) and CD86 (co-stimulatory molecule). Because WJ-MSCs expressed mesenchymal stem cells markers and did not express hematopoietic markers, they may be all considered mesenchymal origin.

### 3.2. Influence of FBS percentage on the morphology of WJ-MSCs

Microscopic observation showed that, after 20 days, MSCs cultured with 5% FBS formed three-dimensional spheroids on (PSS/PAH)<sub>4</sub>. Spheroids did not appear when FBS percentage was reduced from 5% to 2% and cells grew, on (PSS/PAH)<sub>4</sub>, in a monolayer aspect conserving the fibroblast-like morphology. MSCs cultured on glass slides, with 5% FBS showed normal monolayer growth after 20 days and reduction of FBS percentage to 2% had no effect on the behavior of these cells (Fig. 1).

### 3.3. Influence of FBS percentage on the nuclei repartition of WJ-MSCs

We investigated characteristics of spheroids (three dimensional) compared to monolayer cells (two dimensional) in order to further characterize them. DAPI staining showed nuclear aggregates when MSCs were cultured with 5% FBS on (PSS/PAH). Once percentage of FBS was reduced to 2%, a regular repartition of nuclei appeared. MSCs cultured on glass slides showed a normal repartition of nuclei whatever FBS percentage (Fig. 2). These results are consistent with those of optical microscopy.

## 4. Discussion

Stem cells have the ability to renew themselves and can be differentiated into specialized types: neurons, cardiomyocytes, muscle, insulin secreting cells, cartilage and osteocytes, upon numerous inductions. They are considered as good cell sources for tissue engineering. However, pluripotent stem cells can lose their stemness properties due to the *in vitro* culture environment. Embryonic stem cells (ESCs)

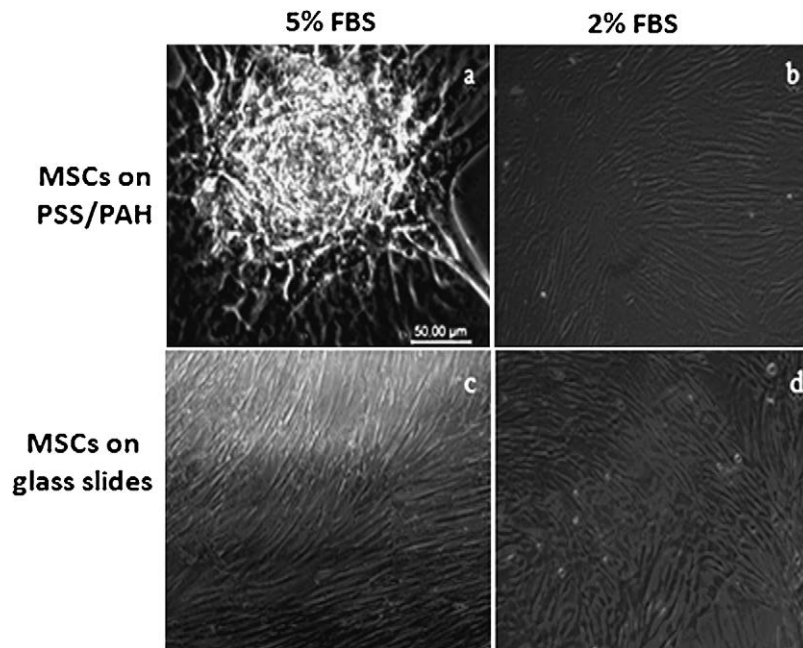


Fig. 1. Effect of FBS percentage on the WJ-MSCs cultured on PSS/PAH films and on glass slides in appropriate medium (EGM-2, Lonza<sup>®</sup>). Morphology of cells cultured on PSS/PAH and glass slides after 20 days in appropriate medium with 5% (a), (c) and 2% FBS (b), (d). The scale bar represents 50 μm (Nikon Diaphot, VFX-DX).

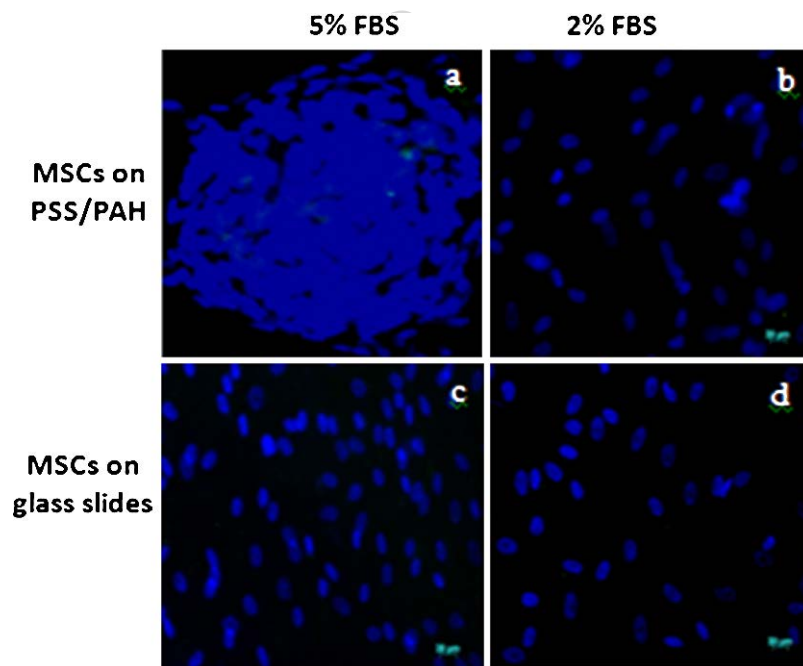


Fig. 2. Effect of FBS percentage on the WJ-MSCs cultured on PSS/PAH films and on glass slides in appropriate medium (EGM2, Lonza<sup>®</sup>). Photos of MSCs immunostained with DAPI after 20 days of culture in appropriate medium with 5% (a), (c) and 2% FBS (b), (d) (Zeiss microscopy, objective  $\times 20$ ). (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-130751>.)

would be perfect because of their capacity to differentiate into virtually every kind of specialized cell in human body. However, the use of fertilized eggs to harvest ESCs is ethically controversial and involve teratoma formation after their implantation [16], which has rendered their clinical application difficult. On the contrary, tissue-specific adult stem cells, particularly MSCs, exhibit few ethical issues regarding their procurement, and thus have drawn much attention to their potential application in tissue engineering [16].

Different studies showed that MSCs behavior is highly dependent on physicochemical properties of the culture substrate. Recent literature has shown that collagen coating allowed an effective MSCs adhesion but it's essential for platelet aggregation and activation [17]. Moreover, fibronectin coated surfaces had enhancing effect on cell adhesion, however it suffers from being hydrolyzed and so there is a need for another substrate for clinical use [13].

In this report, we have used (PAH-PSS)<sub>4</sub> films as substrate for mesenchymal stem cells differentiation. Cell types such as endothelial cells [18] fibroblasts [19] osteoblastic cells [20] and hepatocytes [21] have been cultured on these films. As a general rule, adhesion and proliferation on these films are very good, which may be attributed partly to the presence of sulfonate groups. Moreover anti-inflammatory and antithrombogenic properties of this PEMF were also a reason for their selection [22]. Before seeding WJ-MSCs on this chosen support, we have examined their immune phenotype. No single marker was identified so far predictably defining MSC. Traditionally culture expanded MSCs are described to be negative for hematopoietic markers including CD45, CD14, CD34, as well as for the endothelial markers CD31, CD144. On the contrary MSCs express CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 and CD146. In addition, MSCs are described by the expression of HLA class I but the absence of HLA class II and co-stimulatory molecules such as CD80 and CD86 [7,23]. Indeed our cells satisfied this panel.

We induced MSCs culture in commercial medium (EGM-2) supplemented with 5% FBS as recommended by Lonza. After a week of culture, MSCs were organized to form 3D spheroids on PAH-PSS architecture which was not the case on glass slides. Since studies have shown that the comportment of WJ-MSCs is highly dependent on mechanical environment of matrices [9] and on the culture conditions (growth factors, serum content, O<sub>2</sub> percentage . . .) [24], we worked out the percentage of FBS in EGM-2 medium and observed that within 2% FBS, cells developed in monolayers and remained fibroblast-like morphology.

Growing stem cells as spheres has been described in many research fields, such as tumourigenesis, pharmacogenetics, embryoid body formation from ESCs, and neurospheres from neuroprogenitors [25]. Bone marrow-derived MSCs have been induced to form 3D spheroids in recent years by culturing cells in microwells [26] or on micropatterned surfaces [26,27]. hBMSC spheroids on microfabricated surfaces had a more efficient osteogenic [25] or adipogenic differentiation [26,27]. However, no study has examined the automatic spheroid formation on a flat biomaterial, the stemness gene expression associated with MSC spheroids, or their chondrogenesis potential.

## 5. Conclusion

Therefore, the reduction of the percentage of FBS from 5% to 2% avoids 3D cell spheroids formation on PAH/PSS. Such structures may serve to maintain the self-renewal of MSCs and could guide bioengineering towards building 2D structures like cell layers or 3D structures by increasing the osteogenic or chondrogenic differentiation potential of MSCs. After solving the problem of spheroid like aspect, we will expand our study towards the expression of endothelial markers.

## Acknowledgements

The first two authors have a financial support of Reviva Regenerative Medicine Center, Middle East Institute of Health, Bsalim, Lebanon.

## References

- [1] Z. Gong, G. Calkins, E.C. Cheng, D. Krause and L.E. Niklason, Influence of culture medium on smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Tissue Eng. Part A* **15**(2) (2009), 319–330.
- [2] V.K. Bajpai and S.T. Andreadis, Stem cell sources for vascular tissue engineering and regeneration, *Tissue Eng. Part B Rev.* **18**(5) (2012), 405–425.
- [3] J.L. Santos, D. Pandita, J. Rodrigues, A.P. Pego, P.L. Granja and H. Tomas, Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration, *Curr. Gene Ther.* **11**(1) (2011), 46–57.
- [4] S.P. Bruder, N. Jaiswal and S.E. Haynesworth, Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation, *J. Cell Biochem.* **64**(2) (1997), 278–294.
- [5] P.A. Conget and J.J. Minguell, Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells, *J. Cell Physiol.* **181**(1) (1999), 67–73.
- [6] L. Moroni and P.M. Fornasari, Human mesenchymal stem cells: A bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues, *J. Cell Physiol.* **228**(4) (2012), 680–687.
- [7] T. Margossian, L. Reppel, N. Makkissy, J.F. Stoltz, D. Bensoussan and C. Huselstein, Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: comparative phenotype analysis between tissue and *in vitro* expansion, *Biomed. Mater. Eng.* **22**(4) (2012), 243–254.
- [8] N. Tsagias, I. Koliakos, V. Karagiannis, M. Eleftheriadou and G.G. Koliakos, Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes, *Transfus. Med.* **21**(4) (2011), 253–261.
- [9] S.B. Anderson, C.C. Lin, D.V. Kuntzler and K.S. Anseth, The performance of human mesenchymal stem cells encapsulated in cell-degradable polymer-peptide hydrogels, *Biomaterials* **32**(14) (2011), 3564–3574.
- [10] S. Diederichs, S. Roker, D. Marten, A. Peterbauer, T. Scheper, M. van Griensven et al., Dynamic cultivation of human mesenchymal stem cells in a rotating bed bioreactor system based on the Z RP platform, *Biotechnol. Prog.* **25**(6) (2009), 1762–1771.
- [11] A. Apel, A. Groth, S. Schlesinger, H. Bruns, P. Schemmer, M.W. Buchler et al., Suitability of human mesenchymal stem cells for gene therapy depends on the expansion medium, *Exp. Cell Res.* **315**(3) (2009), 498–507.
- [12] J. van der Valk, D. Brunner, K. De Smet, A. Fex Svenningsen, P. Honegger, L.E. Knudsen et al., Optimization of chemically defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods, *Toxicol. In Vitro* **24**(4) (2010), 1053–1063.
- [13] A. Tiwari, H.J. Salacinski, G. Punshon, G. Hamilton and A.M. Seifalian, Development of a hybrid cardiovascular graft using a tissue engineering approach, *FASEB J.* **16**(8) (2002), 791–796.
- [14] N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, C. Gaucher, P. Schaaf, J.F. Stoltz, P. Lacolley et al., Polyelectrolyte films boost progenitor cell differentiation into endothelium-like monolayers, *Adv. Mat.* **20**(14) (2008), 2674–2678.
- [15] E.M. Horwitz, D.J. Prockop, L.A. Fitzpatrick, W.W. Koo, P.L. Gordon, M. Neel et al., Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta, *Nat. Med.* **5**(3) (1999), 309–313.
- [16] I.G. Cohen and E.Y. Adashi, Human embryonic stem-cell research under siege – battle won but not the war, *N. Engl. J. Med.* **364**(22) (2011), e48.
- [17] C.B. Weinberg and E. Bell, A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells, *Science* **231**(4736) (1986), 397–400.
- [18] C. Boura, P. Menu, E. Payan, C. Picart, J.C. Voegel, S. Muller et al., Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification, *Biomaterials* **24**(20) (2003), 3521–3530.
- [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**(8) (2008), 1025–1035.
- [20] P. Tryoen-Toth, D. Vautier, Y. Haikel, J.C. Voegel, P. Schaaf, J. Chluba et al., Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films, *J. Biomed. Mater. Res.* **60**(4) (2002), 657–667.
- [21] C.R. Wittmer, J.A. Phelps, C.M. Lopus, W.M. Saltzman, M.J. Harding and P.R. Van Tassel, Multilayer nanofilms as substrates for hepatocellular applications, *Biomaterials* **29**(30) (2008), 4082–4090.

- [22] T. Boudou, T. Crouzier, K. Ren, G. Blin and C. Picart, Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: New biomedical applications, *Adv. Mat.* **21**(4) (2009), 1–27.
- [23] M.M. Carvalho, F.G. Teixeira, R.L. Reis, N. Sousa and A.J. Salgado, Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine, *Curr. Stem. Cell Res. Ther.* **6**(3) (2011), 221–228.
- [24] I. Rosova, M. Dao, B. Capoccia, D. Link and J.A. Nolte, Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells, *Stem. Cells* **26**(8) (2008), 2173–2182.
- [25] T.J. Bartosh, J.H. Ylostalo, A. Mohammadipoor, N. Bazhanov, K. Coble, K. Claypool et al., Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**(31) (2010), 13724–13729.
- [26] W. Wang, K. Itaka, S. Ohba, N. Nishiyama, U.I. Chung, Y. Yamasaki et al., 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells, *Biomaterials* **30**(14) (2009), 2705–2715.
- [27] Y. Miyagawa, H. Okita, M. Hiroshima, R. Sakamoto, M. Kobayashi, H. Nakajima et al., A microfabricated scaffold induces the spheroid formation of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells and promotes efficient adipogenic differentiation, *Tissue Eng. Part A* **17**(3,4) (2010), 513–521.

AUTHOR COPY



### 7.1.3 Résultats et discussion de l'article

Traditionnellement les CSMs sont décrits comme étant négatives pour les marqueurs hématopoïétiques CD45, CD14, CD34, ainsi que pour les marqueurs endothéliaux CD31 et CD144. Au contraire les CSMs expriment les marqueurs CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 et CD146. En outre, les cellules souches mésenchymateuses sont décrites par l'expression de l'antigène HLA de classe I et par l'absence de l'antigène HLA de classe II et des molécules de co-stimulation tels que CD80 et CD86 [Margossian et al., 2012, M Carvalho et al., 2011].

En effet, nos cellules satisfaisaient ce panneau. Nous avons cultivé les CSMs dans le milieu commercial (EGM-2) supplémenté avec 5% de SVF comme recommandé par Lonza. Après une semaine de culture, les CSMs s'étaient organisées pour former des sphéroïdes tridimensionnels sur PAH-PSS, ce qui n'était pas le cas sur les lames de verre. Puisque les études ont montré que le comportement des CSMs est très dépendant de l'environnement mécanique des matrices [Anderson et al., 2011] et des conditions de culture (facteurs de croissance, contenu du sérum, pourcentage d'O<sub>2</sub>, ...) [Rosova et al., 2008], nous avons étudié l'influence du pourcentage de SVF dans le milieu EGM-2, et nous avons constaté qu'avec 2% de SVF, les cellules se développent en monocouches et acquièrent une morphologie fibroblastique.

La croissance en sphères des cellules souches a été décrite dans de nombreux domaines de recherche, tels que la tumorigenèse, la pharmacogénétique, la formation de corps embryoïdes de CSEs et de neurosphères neuroprogéniteurs [Bartosh et al., 2010]. Les CSMs dérivées de la moelle osseuse forment des sphéroïdes 3D par culture dans des micropuits [Wang et al., 2009]. Ces structures ont un potentiel de différenciation ostéogénique et adipogénique. Cependant, aucune étude n'a examiné l'expression de gènes de primitivité associés à ces sphéroïdes ou leur potentiel chondrogénique.

Les résultats de ce chapitre nous conduisent à appliquer les mêmes conditions de culture afin d'évaluer l'effet du support (types de films multicouche) sur le comportement des CSMs dans un milieu de différenciation endothéliale.

## 7.2 Mise au point du protocole de différenciation endothéliale des CSMs sur CHI/HA

Après fixation du pourcentage de sérum permettant une croissance en monocouches des CSMs, le même protocole a été appliqué pour différencier les CSMs cultivées sur les films de type CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio.

### 7.2.1 Matériel et méthodes

Les CSMsensemencées sur collagène, CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio ont été fixées dans du PBS 1X (référence déjà citée dans le chapitre matériel et méthodes) contenant 4% de PAF pendant 10 min à 4°C puis rincées au PBS, ensuite marquées par l'anticorps anti-CD31 (Dako, France) et incubées pendant 45 min à 37°C. Plusieurs lavages avec du PBS sont ensuite effectués, suivis d'un marquage des noyaux cellulaires au DAPI. Les observations sont réalisées après montage au microscope à fluorescence.

### 7.2.2 Résultats et discussion

L'immunomarquage de la molécule d'adhésion CD31, caractéristique des cellules endothéliales, et des noyaux montre la persistance de nodules de cellules endothéliales-*like* sur la surface des multicouches de type CHI/HA exprimant le marqueur CD31 alors que les cellules cultivées sur CHI-SH/HA-Thio prolifèrent en monocouches et expriment le marqueur CD31. Par contre, sur le collagène il n'y a pas d'expression du marqueur CD31 et, quelque soit le pourcentage de SVE, les cellules prolifèrent en monocouches (Fig 7.1). Nous avons essayé de diminuer encore le pour-

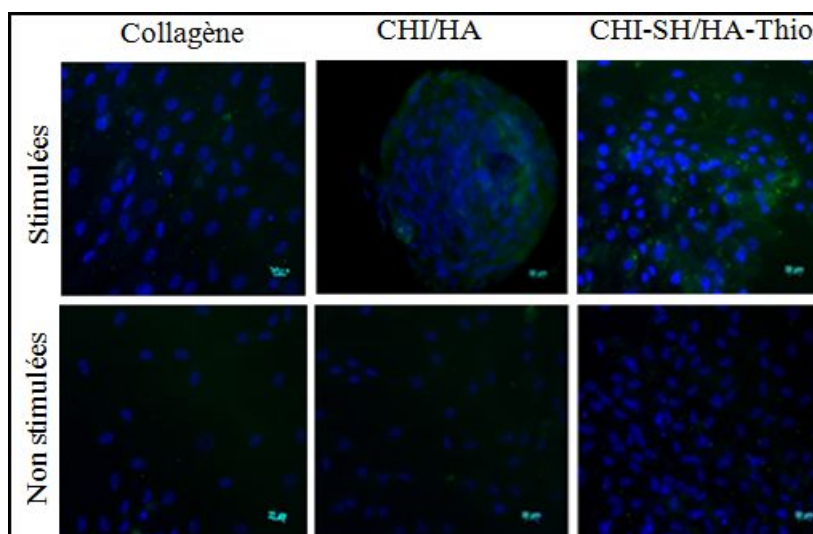


FIGURE 7.1 – Double immunomarquage des noyaux (bleu), et du marqueur endothélial CD31 pour les CSMs stimulées et non stimulées après 15 jours de culture sur collagène, CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio (Zeiss Microscope, objectif\*20). N=3.

centage de SVF dans le milieu EGM2 de 2% jusqu'à 0,5%. Dans ce cas les cellules endothéliales-*like* ne forment pas des sphéroïdes sur CHI/HA et, avec un grossissement plus important, nous avons pu détecter les clusters CD31 sur les films CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio (Fig 7.2). L'état multicellulaire tridimensionnel a été décrit dans

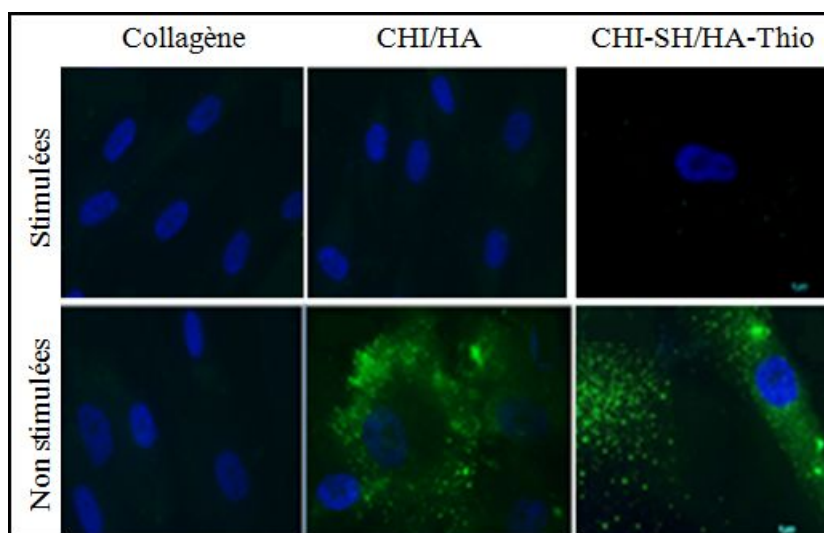


FIGURE 7.2 – Double immunomarquage des noyaux (bleu), et du marqueur endothélial CD31 pour les CSMs stimulées et non stimulées après 15 jours de culture sur collagène, CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio (Zeiss Microscope, objectif\*63 oil), n=3.

de nombreuses circonstances, comme les corps embryoides issus des CSEs et les neurosphères issues des neuroprogéniteurs. Cet état peut aider davantage au développement des cellules souches [Kim et al., 2008].

En comparant avec d'autres études montrant la formation de nodules sur des biomatériaux de type CHI/HA, nous suggérons que cet aspect est dû à l'interaction entre le marqueur mésenchymateux CD44 et l'HA jouant un rôle important dans l'adhésion, la diffusion et la migration des CSMs. Les hydrogels d'HA ont été signalés comme permettant de maintenir l'auto-renouvellement des CSEs chez l'homme [Gerecht et al., 2007]. L'HA peut activer l'expression du gène Nanog dans les cellules tumorales du sein et de l'ovaire [Bourguignon et al., 2008]. Il favorise également les voies de signalisation ROCK et phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) en se liant au récepteur transmembranaire CD44 [Torre et al., 2010]. La voie Rho/ROCK est l'un des principaux régulateurs du cytosquelette d'acto-myosine, de la migration des cellules et de l'adhésion cellule-cellule. La voie de signalisation Rho/ROCK joue un rôle essentiel dans la régulation des communications cellule-cellule dans les CSEs murines et humaines [Harb et al., 2008]. ROCK sert en tant que signal d'auto-renouvellement des cellules souches murines mammaires [Zeng and Nusse, 2010] et joue une variété de rôles dans l'activité des cellules souches. Dans l'étude de Huang *et al.*, il a été montré que le blocage de la voie Rho/ROCK par le composé Y a empêché significativement la

formation de sphéroïdes (ou les démolit) et entraîne une diminution de l'expression des gènes de primitivité ((Oct<sub>4</sub>, Sox<sub>2</sub> and Nanog), ce qui indique que le réarrangement du cytosquelette et la formation des sphéroïdes peuvent être cruciales pour garder l'expression de ces gènes. D'autre part, l'inhibition de la formation des sphéroïdes en bloquant CD44 (interaction cellule-cellule et interaction cellule-HA) a eu moins d'effet dramatique sur l'expression des gènes de primitivité que le blocage de la voie Rho/ROCK [Huang et al., 2011].

Ces observations suggèrent que le stade non différencié des CSMs peut être maintenu par l'agrégation de sphéroïdes en 3D sur les membranes de CHI-HA. Ces sphéroïdes peuvent avoir la capacité de différenciation chondrocytaire lors de l'induction. La formation de sphéroïdes de cellules en 3D sur les biomatériaux peut servir comme une stratégie visant à maintenir l'auto-renouvellement des CSMs et à augmenter le potentiel de différenciation de ces cellules en chondrocytes pour l'ingénierie du tissu cartilagineux. Le mécanisme de régulation de la formation ces sphéroïdes est ROCK-dépendant, cette voie mérite d'être étudiée.

## 7.3 Différenciation endothéliale des CSMs de la gelée de Wharton sur des films multicouche de polyélectrolytes de type chitosane/hyaluronane

### 7.3.1 Introduction et objectifs de l'article

Récemment, le dépôt couche par couche de polyélectrolytes naturels a été suggéré comme une nouvelle technique ingénieuse de modification de surface visant à reproduire l'environnement naturel de la matrice extracellulaire d'un tissu spécifique.

Notre structure est basée sur le dépôt alterné d'un polycation : le chitosan (CHI), et d'un polyanion : l'acide hyaluronique (HA). Cette construction de multicouches a montré de mauvaises propriétés d'adhésion cellulaire, probablement en raison de la forte teneur en eau de ces polymères [Petzold et al., 2012]. Le but de cette étude était de développer des films multicouche à base de CHI et de HA portant des groupements chimiques formant des liaisons covalentes conférant une rigidité aux films. La biocompatibilité et le comportement des cellules ont été évalués en utilisant des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) issues de la gelée de Wharton de cordons ombilicaux humains.

Les polysaccharides réticulables développés ont été : HA couplé à la thiopyridone (HA-Thio), à l'azide (HA-N<sub>3</sub>) et au maléimide (HA-Mal), tandis que CHI a été couplé au thiol (CHI-SH) et à l'alcyne (CHI-Alcyne). Nous avons donc construit des films comptant 10 bicouches de polyélectrolytes : (CHI-SH/HA-Thio), (CHI-SH/HA-Mal) et (CHI-Alcyne/HA-N<sub>3</sub>). Les films CHI/HA et le collagène ont été utilisés comme contrôle. Les CSMs de la gelée de Wharton ont étéensemencées sur ces substrats à raison de 3000 cellules/cm<sup>2</sup>, au 4<sup>ème</sup> passage. La biocompatibilité a été évaluée par microscopie électronique à balayage (MEB) et par marquage des filaments d'actine du cytosquelette à la phalloïdine. La différenciation en phénotype endothélial a été suivie par Western blot et q-RT-PCR (CD31, VEGF-R2 et VE-cadhérine), et la fonctionnalité des cellules endothéliales-*like* par incorporation de Dil-Ac-LDL et par immunomarquage de vWF.

Tout d'abord, les photographies de MEB ont montré une morphologie fibroblastique de cellules adhérentes sur CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio comme pour le contrôle. Cependant, sur CHI-SH/HA-Mal et CHI-Alcyne/HA-N<sub>3</sub>, les cellules semblaient peu adhérentes et formaient des débris. Ces résultats ont été confirmés par le marquage du cytosquelette d'actine. L'analyse de cellules différenciées par Western blot et q-PCR a montré une augmentation de l'expression de CD31, VEGF-R2 et VE-cadhérine

sur CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio, comparés aux HUVECs (contrôle positif). Les résultats des tests ont montré une meilleure fonctionnalité des cellules endothéliales-*like* sur le CHI-SH/HA-Thio. Les films de chitosane et d'hyaluronane portant respectivement les groupements thiol et thiopyridone apparaissent biocompatibles et semblent promettre la différenciation endothéliale et une bonne fonctionnalité des cellules différenciées.

### 7.3.2 Texte de l'article

Cet article est en cours de rédaction et il sera soumis prochainement.

## **Introduction:**

L-b-L deposition of polyelectrolytes is a versatile technique which is beginning to be explored as smart coating for tissue engineering applications [1]. In the vascular regenerative field, the approach is often employed to promote vascular cell adhesion [2], to differentiate stem cell into vascular cells [3], to inhibit thrombus formation and smooth muscle cell dedifferentiation [4], and to embed bioactive molecules in the film architecture to design drug delivery material [5]. The most studied film from synthetic polyelectrolytes, such as poly(styrene sulfonate) and poly(allylamine hydrochloride), are relatively stiff and thus favor cell behaviour [6]. Their drawbacks for clinical use are due to the absence of approval by the U.S. FDA and to potential inflammatory risks. Designing polyelectrolyte multilayer (PEM) films using natural polyelectrolytes (polysaccharides or proteins) is then of great interest for medical applications. PEMs made from Chitosan (CHI) and hyaluronane (HA) are highly hydrated and often behave as gel-like with a weak stiffness [7, 8]. They have been described as poorly adhesive for chondrosarcoma and osteoblastic cell line [9] but showed a good human fibroblasts and stem cells adhesion and proliferation [10, 11] through specific HA-receptor (i. e. CD44). Cross-linker agents as carbodiimide (EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl))/sulfo-NHS (N-hydroxysulfo-succinimide) [12] with a fine-tuning of their concentration in contact with the hydrated PEMs varies the film's stiffness over two orders of magnitude and then improves adhesive properties for a wide variety of cell type [13]. However, due to eventual residues that can remain in the film, the PEMs crosslinking approach has to be avoided for human applications.

Development of functional vascular networks, following endothelial cells (ECs) seeding with the cell type of interest, has been proposed to improve graft integration. Extracting mature ECs from blood vessels is an invasive procedure and harvested cells are characterized by a poor proliferative rate and dedifferentiation features, making them difficult to use in tissue



engineering. Mesenchymal stem cells (MSCs) with high multipotent capacities are currently the subject of several studies thanks to their potential applications in regenerative medicine. Commonly, MSCs have been isolated from a range of sources including circulating blood, bone marrow, and perinatal tissues. Autologous MSCs, harvested from the patient's tissues as bone marrow and adipose tissue, could be differentiated into ECs [14, 15]. Although they represent the main available source of MSCs, their obtaining requires a painful and an invasive procedure. Moreover, their use is not always acceptable due to the high risk of viral contamination, the significant decrease in cell number and proliferation capacity with age. An interesting alternative, based on perinatal tissues like umbilical Wharton jelly (WJ), presents major advantages. Considered as surgical waste, WJ is available tissue and its recovery has a low cost. Moreover, MSCs extraction from WJ (WJ-MSCs) is completely non-invasive and has no harm either the mother or the child. So, a new source of stem cells has been identified: Wharton's Jelly of the human umbilical cord. Considered surgical waste, the umbilical cord is bio-available and its recovery has a low cost. In fact, the isolation of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) is completely non-invasive and has no harm either the mother or the child [16]. Several studies have also demonstrated a greater proliferation of cells derived from umbilical cord compared with those derived from the bone marrow [17, 18]. Indeed, studies have shown that the differentiation of MSCs is highly dependent on culture medium (growth factors, serum content) [19, 20], seeding density [21], mechanical environmental matrices [22] and mechanical stress (bioreactor) [23]. To improve cell adhesion and differentiation, several protocols cover conventional culture surfaces by extracellular matrix molecules such as fibronectin, collagen I, gelatin ...).

In this work for the first time, we proposed to differentiate WJ-MSCs to differentiate into endothelial lineage using CHI/HA PEMs as substrate. CHI and HA polymers bear chemical moieties (HA through free amino groups were modified with thiopyridone (HA-Thio), azid

(HA-N<sub>3</sub>) and maleimide (HA-Mal), whereas CHI through its free carboxylated groups was modified with thiol (CHI-SH) and Alcyn (CHI-Alcyn) that form covalent bonds, without use of chemical crosslinking agent. Such bonds allow stiffness tuning for WJ-MSCs adhesion and differentiation. Our findings suggest the potential use of modified CHI/HA films in vascular tissue engineering approaches.

## **II- Material and methods**

### **II- 1- Polyelectrolyte multilayers**

The polyelectrolyte multilayers were built from polyelectrolyte solutions at 0.2 mg/mL, dissolved in NaCl (0.15 M) for Hyaluronane (HA, from Lifecore) and in NaCl (0.15 M)/HCl ( $2 \times 10^{-3}$  M) for Chitosan (CHI, from Sigma Aldrich) solutions. Each experiment was preceded by a cleaning step of the cover glasses for 15 min at 100°C with  $10^{-2}$  M sodium dodecyl sulfate (Sigma Aldrich). This procedure was followed by an extensive ultrapure water rinse. The cover glasses were then brought in contact for 15 min at 100°C with  $10^{-1}$  M HCl and finally extensively rinsed with ultrapure water. CHI was incubated for 5 min followed by HA was adsorbed (contact time of 5 min). Each polyelectrolyte adsorption was followed by an intensive NaCl solution rinse. (CHI-HA)<sub>10</sub>, (CHI-SH/HA-Thio)<sub>10</sub>, (CHI-SH/HA-Mal)<sub>10</sub> and (CHI-Alcyn/HA-N<sub>3</sub>)<sub>10</sub> films were built up from 20 alternate depositions of polycation and polyanion layers. The type I collagen (100 µg/mL from BD) was used as positive control for cellular adhesion.

### **II. 2. Cells isolation and culture**

Fresh human umbilical cords were obtained after full-term births with informed consent using the guidelines approved by the Nancy Hospital.

Umbilical cord vessels were removed manually from cord segments, and the exposed Wharton's jelly was cut into very small pieces or explants. These explants were cultured in  $\alpha$ -

MEM (Lonza, Belgium) supplemented with 10% decompemented fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 IU/mL Penicillin/streptomycin and 2.5 mg/mL Fungizon<sup>®</sup> (Fisher, France) at 37°C and in 5% CO<sub>2</sub>. At the fourth passage WJ-MSCs were characterized by flow cytometry (FACSCalibur; BD Bioscience) through the expression of CD73, CD90, CD44, CD105, CD34, CD45 and HLA-DR then used in our experimental procedure.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated according to the method of Jaffe *et al.* [24] HUVECs were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in 25 cm<sup>2</sup> tissue-culture-treated flask in complete medium. The medium consisted of an equal mixture of media M199/RPMI 1640 (from Sigma, France), supplemented with 20% human serum AB, 2 mM L-glutamin, 20 mM HEPES, 100 IU/mL Penicillin, 2.5 mg/mL Fungizon<sup>®</sup> (Fisher, France), was replaced each two days. The cells were used at the second passage culture and were seeded at  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>.

## **II-3 Evaluation of biocompatibility of PEMs architecture**

### **II-3-1- Cytoskeleton visualization:**

F-actin cytoskeleton was labelled using Phalloidin<sup>®</sup> coupled with Alexa<sup>®</sup> 488 (Invitrogen, France). After two weeks of culture, WJ-MSCs were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with PBS/Triton X-100 (0.1%) for 15 min and blocked with PBS/BSA (1%). Cells were then incubated for 45 min at 37°C with Phalloidin<sup>®</sup> (1/100). After two washes with PBS, nuclei were counterstained using the dye DAPI (Calbiochem; vwr international), DNA intercalating agent, for 5 min at room temperature. The labeled cells were mounted on slides to be observed by fluorescence microscopy (Zeiss microscopy,  $\times 20$  magnification) using the (485<sub>Ex</sub>/538<sub>Em</sub>) spectral line.

### **II-3-2- Scanning Electron Microscopy:**

WJ-MSCs were fixed in 2.5% glutaraldehyde (Sigma France) followed by two washing steps with 0.1 M PBS. Then, they are dehydrated by successive passages in alcohol solutions of increasing concentration: (50%, 70%, 95% and 100%; 10 minutes for each concentration). Cells are dried with HMDS (Hexamethyldisilazane for monolayer cells) and samples are plated with gold palladium in a cathodic evaporator JEOL JFC-1100 ION SPUTTER (8 mA and 1.2 kV) for observation. After drying, the specimens were directly put on a carbon pad of a SEM-holder. Scanning electron microscopy was performed with a JEOL Phillips microscope (JEOL 5400 LV).

### **II-3-3 Nuclei staining**

WJ-MSCs seeded on different CHI-HA films were incubated with DAPI (Calbiochem ; vwr international), DNA intercalating agent, for 5 min at room temperature. Different fields were observed by fluorescence microscopy (Zeiss microscopy, Japan) and then cell's behavior was compared in photographs.

### **II-3-4 Proliferation kinetic of WJ-MSCs stained with dye crystal violet**

Crystal violet is a dye which interacts with the intracellular components. We therefore performed a kinetic study for ten days of culture. After extraction of the dye in SDS, we measured the absorbance at 594 nm. Two controls were used: collagen type 1, which allowed good adhesion of cells (positive control) and Triton X100 which permeabilized cells which wouldn't adhere and die (negative control).

### **II-4 Endothelial cell differentiation**

WJ -MSCs were seeded at 3000 cells/cm<sup>2</sup> on PEMs or on type I collagen coated glass in  $\alpha$ -MEM medium for two days then in endothelial growth medium-2 (EGM-2, Lonza<sup>®</sup>)

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<sup>®</sup>) supplemented with 0.5% FBS but without angiogenic cocktail growth factors. Unstimulated and stimulated cells on both surfaces (collagen and PEMs architectures) were observed daily by optical microscopy (Leica microscopy) to evaluate their morphology.

## **II-5 Evaluation of endothelial markers expression**

### **II-5-1 Analysis of endothelial-specific markers expression by realtime q-RT-PCR**

Transcript levels of CD31, CDH5 and KDR genes were quantified by real-time RT-PCR. Total RNA was isolated with RNeasy mini kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) following manufacturer's instructions. Complementary DNA synthesis was performed with 350 ng total RNA using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA). Real-time RT-PCR was conducted as described previously [25]. As a positive control, RNA isolated from HUVECs was used. Measurements were performed in duplicates; a non-template blank served as a negative control. qPCR was carried out using iQ SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad<sup>®</sup>) and home designed primers for human CD-31, VE-cadherin, VEGF-R2 and the ribosomal protein S29 (Eurogentec) with the use of MyCycler<sup>™</sup> Personal Thermal Cycler (Bio-Rad<sup>®</sup>). Cycling parameters were 3 min at 95°C; 40 cycles of 3 min at 60°C for CD31, VEGF-R2 and RP29 and 62°C for VE-cadherin and 1 min at 72°C. Amplification curves and gene expression were normalized to the housekeeping gene for ribosomal protein S29. 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.

### **II-5-2 Evaluation of endothelial-specific markers expression by Western Blot**

Total protein from cultured cells was prepared as previously described [26]. 25  $\mu$ g proteins from each sample were heated to 95°C for 5 min in laemmli sample buffer (Bio-Rad, USA)

and the total protein were separated by 10% VEGFR2 and 7% (CD31 and VE-cadherin) acrylamide gel and blotted to nitrocellulose membranes. Western blots were performed by using primary antibodies for endothelial markers VEGFR2 (1/1000 milk/TBST, Cell signaling technology, England), VE-cadherin (1/1000 BSA/TBST, Abcam, USA), CD31 (1/1000 BSA/TBST, Dako, France). The membranes were blocked with the blocking buffer TBS for 1h at room temperature and incubated with primary antibodies by gentle agitation at 4°C overnight. After extensive washing, the membranes were incubated for 1h at room temperature with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP) added. HRP was detected by enhanced chemiluminescence (ECL, Santa Cruz Biotechnology, USA).

## **II-6 Evaluation of endothelial-like cells functionality**

### **II-6-1 LDL-uptaking assay**

Low-density lipoprotein (LDL)-uptaking assay was performed as described previously [27]. At day 15, WJ-MSCs seeded on collagen, PEMs architectures were incubated for 4 h at 37°C in RPMI 1640 without phenol red supplemented with 0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dil-Ac-LDL (Tebu-bio, France). The cells were washed with RPMI 1640 without phenol red to remove Dil-Ac-LDL. They were then fixed with 4% paraformaldehyde and nuclei were counterstained using DAPI. The cells were observed using fluorescence microscopy (Leica microscope,  $\times 40$ ) after using the appropriate excitation and emission filters for Rhodamin B ( $554\text{nm}_{\text{Ex}}/571\text{nm}_{\text{Em}}$ ).

### **II-6-2 Immunostaining of von Willebrand Factor: vWF**

After 15 days of endothelial differentiation, WJ-MSCs seeded on collagen, PEMs architectures were analyzed through Von Willbrand factor (vWF) expression. Cells were fixed by 4% paraformaldehyde, permeabilized with PBS/Triton X-100 (0.1%) for 15min, blocked in 1% Bovine Serum Albumine (BSA) and stained by anti-vWF (1/100 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, × 63 magnification) using the (485<sub>Ex</sub>/538<sub>Em</sub>) spectral line.

## **II-7 Statistical analysis**

Data are presented as mean ± 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.

## **III- Results and discussion**

### **III-1 Characterization of WJ-MSCs**

Results are representative of those obtained using 3 umbilical cords. MSCs (4th passage) displayed a homogeneous fibroblast-like morphology. The International Society for Cellular Therapy published a position paper on minimal criteria needed to define MSCs [28]. We followed this article to characterize MSCs. Fluorescein-activated cell sorting analysis showed that WJ-MSCs and BM-MSCs were positive for CD105, CD73, and CD90 and negative for CD45, CD34, CD86 and HLA-DR. These data revealed that WJ-MSCs used in this study showed the typical MSC characteristics.

### **III-2 Evaluation of WJ-MSCs adhesion on CHI-HA films**

#### **III-2-1 Proliferation kinetic of WJ-MSCs stained with dye crystal violet**

There are a number of colorimetric methods which can be used for quantitating adherent cells in microwell plates. The method used in our study was the staining cells with crystal violet, a dye which binds to proteins in the cells and colours them deep purple [29]. For CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio, we got relatively close and better growing absorbance values than for collagen, indicating that the cells were well adhered on CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio. For CHI-SH/HA-Mal, only few cells were adhered, which wasn't enough to continue the

manipulation and use them in subsequent differentiation (Figure1). This film is worse than the previous ones and doesn't allow the adhesion of many cells. Finally, with CHI-Alc/HA-N<sub>3</sub>, we had no more adherent cells and the decrease in absorbance indicates that this product is toxic to MSCs.

### **III-2-2 Nuclei staining**

The numeration of nuclei showed an important cell adhesion on CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio compared to CHI-SH/HA-Mal and CHI-Alc/HA-N<sub>3</sub> (Figure 2). These results confirmed the proliferation kinetic study of stained cells with dye crystal violet.

### **III-3 Evaluation of monolayers integrity**

#### **III-3-1 Cytoskeleton staining**

The immunostaining of WJ-MSCs seeded on collagen I, CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio showed spread actin microfilament formation and a fibroblast-like morphology. After two weeks, the cells reach their confluence on these two polyelectrolyte multilayer films compared to the positive control: collagen I. On CH-SH/HA-Mal and CH-Alc/HA-N<sub>3</sub> we observed only very few cells and a predominance of cellular residuals on blades surfaces (Figure 3).

#### **III-3-2 Scanning Electron Microscopy: SEM**

Photos obtained with SEM showed that cells grown on CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio exhibit fibroblast-*like* morphology characteristic of MSCs and identical to that of the control side. On CHI-SH-HA-Mal and CHI-Alc-HA-N<sub>3</sub>, only cellular debris were observed (Figure 4). These observations confirmed cytoskeleton staining results. So we choose CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio as better biocompatible polymers. On these scaffolds, WJ-MSCs could adhere and proliferate in a monolayer aspect conserving the fibroblast-*like* morphology. We selected these polymers to perfect the endothelial differentiation protocol. First we have done a kinetic study to follow cell behavior in differentiation medium. We have perceived that endothelial-like cells, obtained after WJ-MSCs differentiation, seemed to be able to detach after two weeks of culture. This observation allowed us to work out the serum percentage in differentiation medium.

Results showed that the decreasing of serum percentage from 2% to 0,5% avoids the formation of 3D spheroids and then the detachment of cells. Our endothelial medium



formulation (which also has low serum) contains basic fibroblast growth factor (bFGF) and epidermal growth factor (EGF) as well as heparin and hydrocortisone. bFGF has been used as an alternative to stimulate vasculogenesis by endothelial cells (ECs) [30, 31, 32]. It is likely that this factor is the main vasculogenic component in our endothelial medium, and it has been found to itself induce VEGF expression in ECs [33]; if the same is true in MSCs, or the MSCs are directly stimulated towards an endothelial phenotype first by the bFGF, this may be why we have chosen EGM2 medium and not VEGF [34, 35] or VEGF-IGF1 [36] exposure ; to induce endothelial differentiation. Therefore, we evaluated the expression of endothelial markers on day 15 after endothelial stimulation.

#### **III-4 Evaluation of endothelial markers expression**

The three endothelial-specific molecules CD31, VE-cadherin and VEGF-R2 are known to play an important role in the endothelium maturation during angiogenesis process [37]. CD31, also known as platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), is a type I integral membrane glycoprotein that is expressed at high levels on early and mature endothelial cells, platelets, and most leukocyte subpopulations. The expression on endothelial cells is concentrated at junctions between adjacent cells. PECAM-1 is known to have various roles in vascular biology including angiogenesis, platelet function, and thrombosis [38].

VEGFR-2 is expressed on vascular endothelial cells and lymphatic endothelial cells, it regulates vascular endothelial function. VEGF is an important growth factor for the endothelial differentiation. The endothelial-specific cadherin, vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin) is required for new vessel formation in the adult; it was proved to be necessary for vascular genesis and the repair of damaged vascular diseases [39]. In order to evaluate the effect of our different supports on the differentiation of WJ-MSCs in endothelial-*like* cells, we measured the expression of endothelial markers by q-PCR and Western Blot.

##### **III-4-1 Analysis of endothelial-specific marker expression by real-time RT-PCR and western Blot**

The messenger RNA and protein expression of the three endothelial specific markers CD31, VEGF-R2 and VE-cadherin was analyzed by realtime q-PCR and western Blot (Figures 5 and 6). MSCs seeded on CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio and incubated in EBM-2 did not express the three markers (data not shown). Expression of the three molecules was detected, at genic and proteic levels, in WJ-MSCs incubated in EGM-2 for 15 days and was higher on CHI-

SH/HA-Thio than on CHI-HA and collagen compared to HUVECs. On collagen, results showed an expression of VEGF-R2 at mRNA level; however we had not detected the expression of the protein by western blot analysis. Higher genic and proteic expression of these three markers in differentiated WJ-MSCs seeded on CHI-SH/HA-Thio could contribute to more endothelial differentiation as compared with differentiated WJ-MSCs seeded on CHI/HA and collagen. The chemical modification of CHI/HA films done by bearing Thiol to chitosane and thiopyridone to hyaluronane increased films stiffness and then promoted a better cell adhesion and differentiation. However, collagen is a recommended surface allowing MSCs chondrogenic and osteogenic differentiation after 21 days [40]. In our report, we have not detected the expression of VEGF-R2 protein on collagen; maybe we needed more than 15 days to notice the translation of VEGF-R2 gene.

The capacity to differentiate toward an endothelial phenotype is a characteristic of mesenchymal stem cells [41, 42, 43] and our results confirm these data. However, the main purpose of this study was the evaluation of the endothelial potential of WJ-MSCs seeded onto CHI/HA scaffolds. First, we verified the endothelial potential of WJ-MSCs in 2D culture conditions both in proliferation (data not shown) and differentiation media. In proliferation medium, no endothelial differentiation was observed during the entire experimental time (15 days), further confirming the stem origin of isolated cells. In differentiation medium, RT-PCR and Western Blot confirmed a better endothelial potential of these cells on CHI-SH/HA-Thio. The data obtained confirmed biocompatibility results, WJ-MSCs were more spread and organized on CHI-SH/HA-Thio films than CHI/HA films after 15 days of culture which allowed a better differentiation capacity.

### **III-5 Evaluation of endothelial-like cells functionality**

#### **III-5-1 Detection of LDL-uptaking by LDL-uptaking assay**

LDL-uptaking assay is for detection of functional endothelial cells. WJMSCs seeded on CHI/HA, CHI-SH/HA-Thio and collagen could uptake DiI-AcLDL into the cytoplasm after cells were incubated in RPMI medium containing DiI-Ac-LDL for 4 hours. However, MSCs were unable to uptake DiI-Ac-LDL after they were cultured in the growth medium as negative controls (Figure 7). These results confirm that, after two weeks, WJ-MSCs seeded on collagen, CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio exhibit an endothelial cell phenotype. In this connection, Gaffney et al. investigated the lipoprotein uptake by means of flow cytometry and showed that cells in a G2/M (mitosis) phase incorporated about 45% more DiI-Ac-LDL than

those in a G1S (latency) phase [44]. The higher Dil-Ac-LDL uptake of endothelial-like cells on PEMs suggests that more cells are in the G2/M phase on PEMs, a signature for a higher proliferation. These results support the previous data (Crystal violet, nuclei staining, cytoskeleton staining and SEM), in which cells cultivated on CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio multilayers exhibit high proliferation rate.

### **III-5-2 Detection of endothelial-specific marker expression: vWF (von Willebrand Factor) by immunocytochemistry**

The adhesive protein von Willebrand factor (vWF) contributes to platelet function by mediating the initiation and progression of thrombus formation at sites of vascular injury. Moreover, novel findings have been obtained on the link between regulation of VWF multimer size and microvascular thrombosis. This progress in basic research has provided critical information to define with greater precision the role of vWF in vascular biology and pathology, including its possible involvement in the onset of atherosclerosis and its acute thrombotic complications. Therefore we have used the expression of vWF as a functionality test of our endothelial-like cells [45]. Cells were examined for expression of endothelial-specific marker (vWF) by immunocytochemistry.

WJ-MSCs seeded on CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio showed high fluorescent signal of this marker after endothelial differentiation for 15 days. However, the marked cells were more organized on CHI-SH/HA-Thio than CHI/HA.

MSCs did not show any positive signal after they were cultured in the growth medium on these same scaffolds, as negative controls. On collagen, cells were not marked, that was predicted because they needed more culture time to express vWF protein (Figure 8).

These promising results showed the possibility to combine the use of WJ-MSCs and CHI-SH/HA-Thio films in vascular tissue engineering field by evaluating the capacity of WJ-MSCs to differentiate into smooth muscle cells on CHI-SH/HA-Thio and coating the surface of alginate hydrogels with CHI-SH/HA-Thio films and enrolling them in order to form a tubular vascular graft.

## Legends:

### Figure 1: Dye crystal violet staining

Proliferation kinetic of MSCs stained with the dye crystal violet (n=3, mean  $\pm$  SEM).

### Figure 2: Nuclei Number

Variations of nuclei number on the different studied supports (n=3, mean  $\pm$  SEM). \$ collagen versus CHI-SH/HA-Mal, # CHI/HA versus CHI-SH/HA-Mal, \* CHI-SH/HA-Thio versus CHI-SH/HA-Mal. € Collagen versus CHI-Alcyn/HA-N<sub>3</sub>, £ CHI/HA versus CHI-Alcyn/HA-N<sub>3</sub>, & CHI-SH/HA-Thio versus CHI-Alcyn/HA-N<sub>3</sub>.  $p < 0.001$ .

### Figure 3: Cytoskeleton staining

Photos of immunostained WJ-MSCs, after two weeks of culture in  $\alpha$ -MEM medium on different scaffolds,  $\alpha$ -actin filaments (green), and nucleus (blue) (Zeiss Microscope, Objective \*10).

### Figure 4: SEM

WJ-MSCs SEM two weeks after seeding on different scaffolds (JEOL Phillips Microscope, Objective \*150).

### Figure 5: Expression of endothelial markers by q-PCR

Expression of endothelial markers: CD31 (a), CDH5 (b) and KDR (c) at mRNA level in endothelial-like cells seeded on collagen, CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio in differentiation medium (EGM2) for 15 days. Results show relative expression achieved by quantitative PCR, normalized to RP29 expression. In all cases the graphs demonstrate a higher expression of the individual markers on CHI-SH/HA-Thio than CHI/HA and collagen compared to HUVECs (their expression was set as 100) and non-treated cells (data not shown). Results were expressed as the mean of 3 independent experiments  $\pm$  SEM. £ collagen versus CHI-SH/HA-Thio and \$ CHI/HA versus CHI-SH/HA-Thio.  $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ .

### Figure 6: Expression of endothelial markers by Western Blot

CD31, VE-cadherin and VEGF-R2 blot quantifying for stimulated and unstimulated WJ-MSCs seeded on different culture surfaces after 15 days. Western blot normalization was performed to the expression of GAPDH. The expression of HUVECs was set as 100% (relative protein level=1.0). Results were expressed as the mean of 3 independent experiments  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

**Figure 7: LDL-Uptake assay**

WJ-MSCs cellular uptake of labeled acetylated LDLs. Double immunofluorescence of nuclei (blue) and for DI-Ac-LDLs (red) for unstimulated (a, b, c) and stimulated (d, e, f) WJ-MSCs after 15 days of culture on collagen, CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio. Internalized labels were detected by Leica fluorescence microscopy (objective \*40 oil).

**Figure 8: vWF immunostaining**

Double immunofluorescence staining for nuclei (blue), and for prothrombogenic von Willebrand Factor for stimulated (a, b, c) and unstimulated (d, e, f) WJ-MSCs after 15 days of culture on collagen, CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio (Zeiss Microscope, objective\*63 oil). N=3.

**Figure 1:**

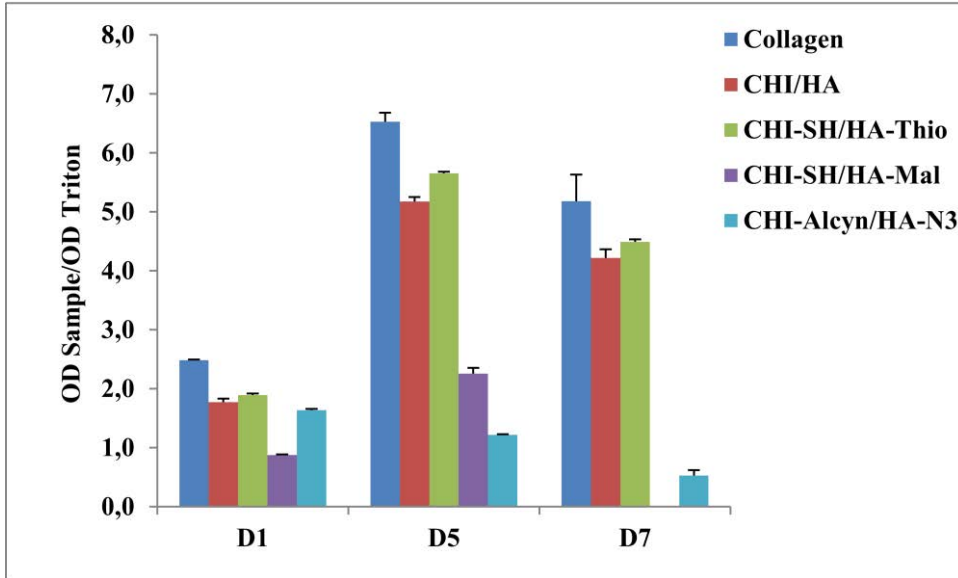


Figure 2:

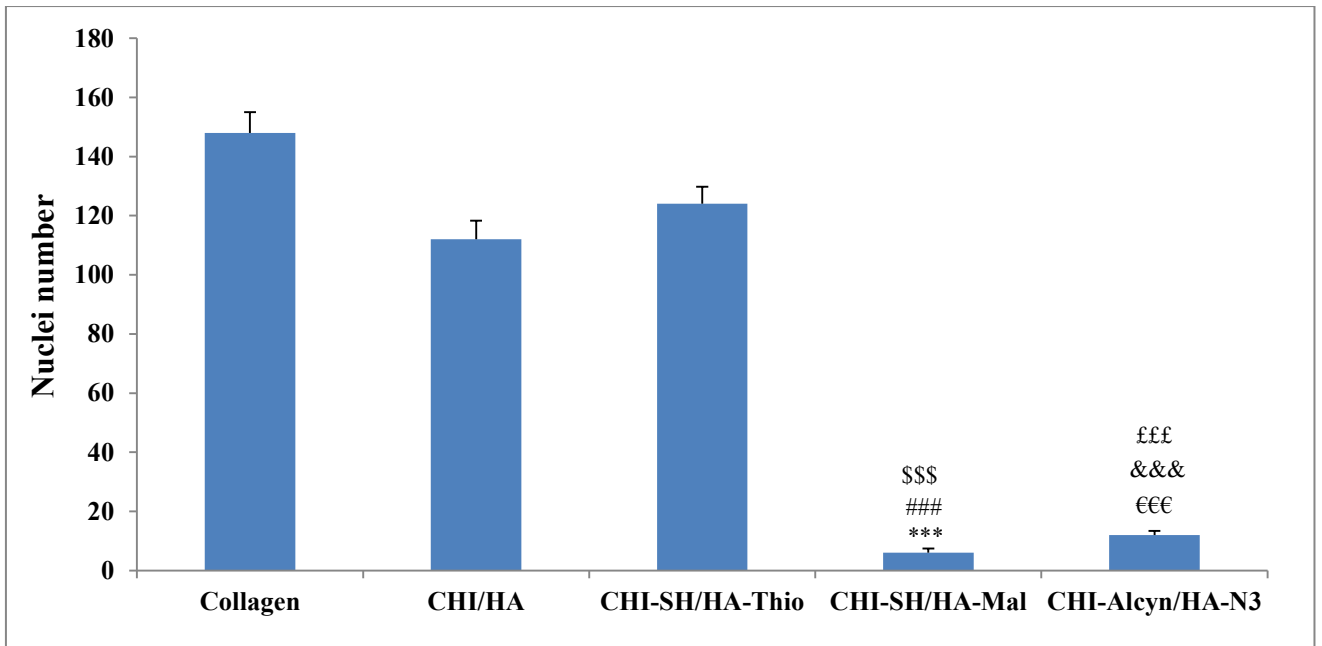


Figure 3:

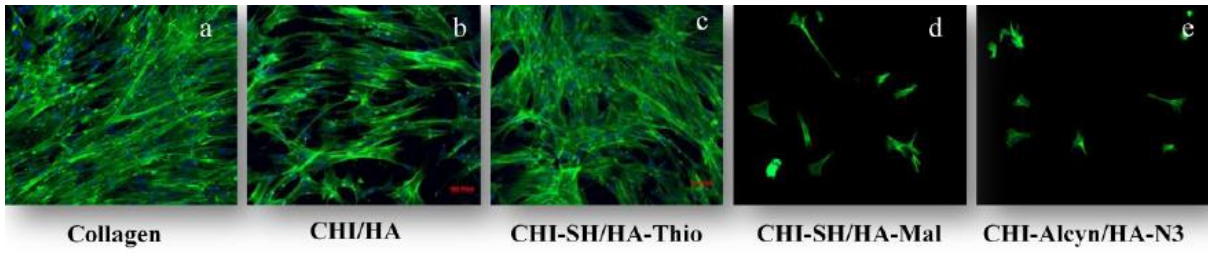


Figure 4:

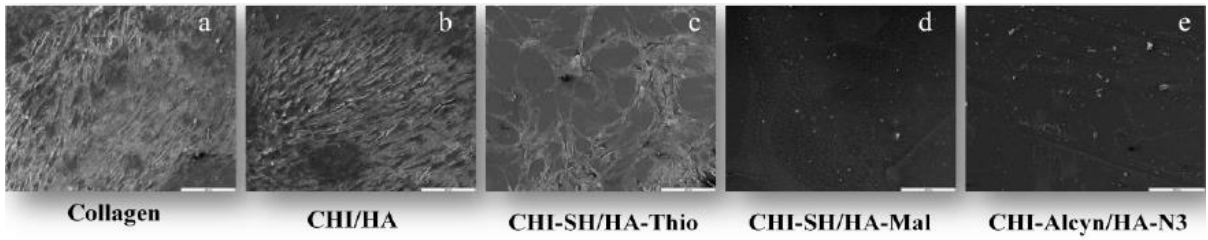
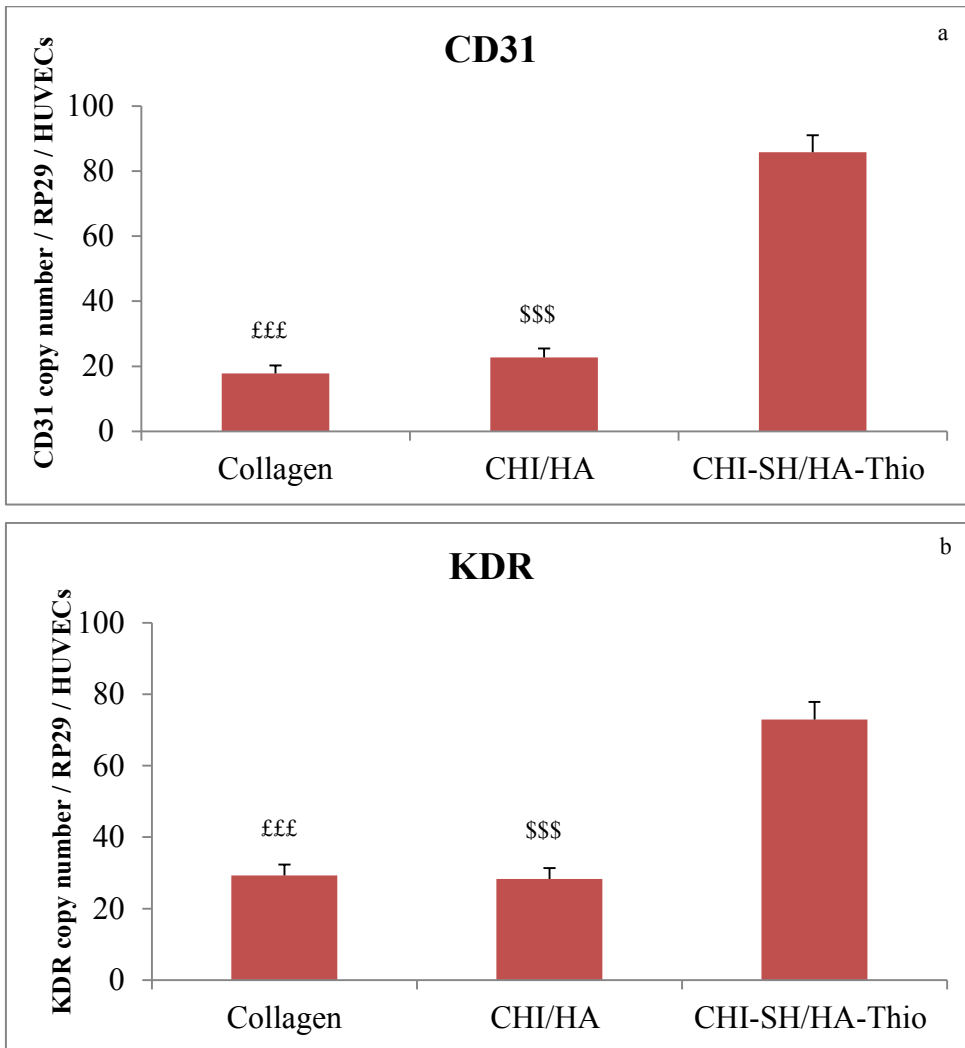


Figure 5:



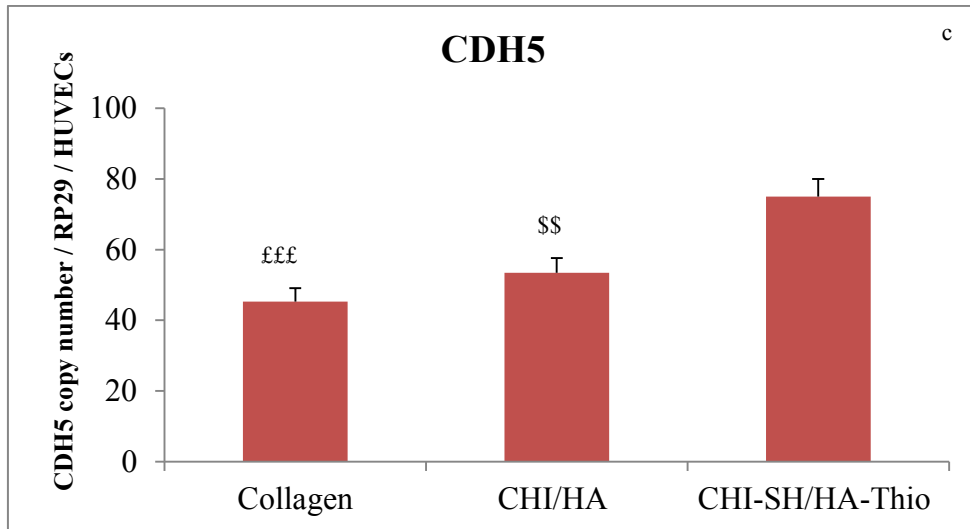


Figure 6:

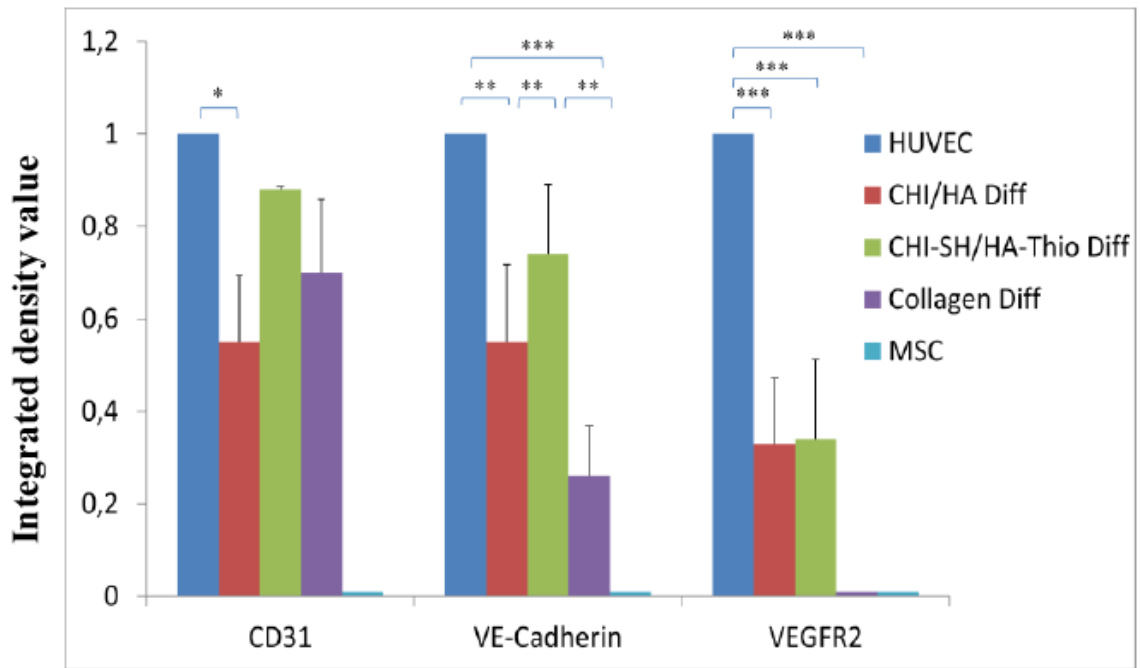


Figure 7:



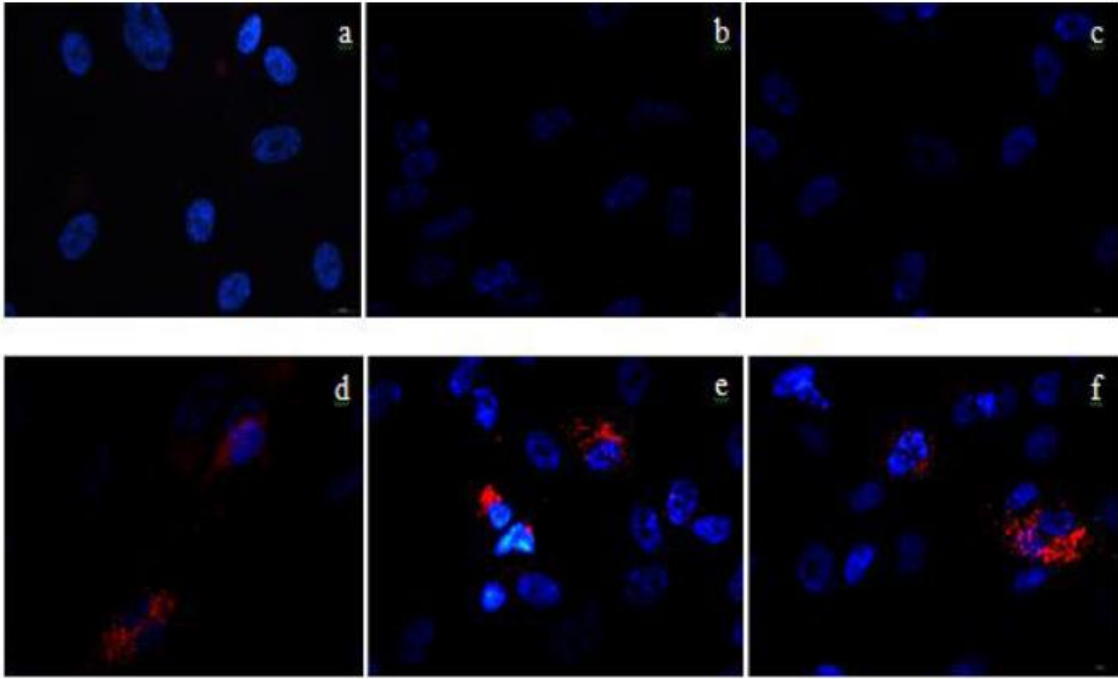
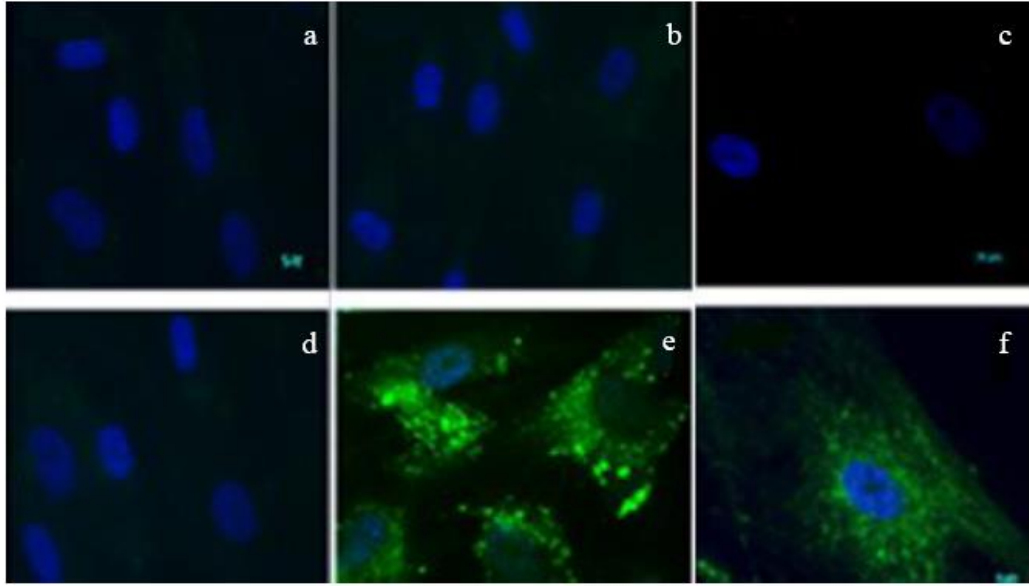


Figure 8:



## References

- [1]. Gribova, V., Auzely-Velty, R., & Picart, C. (2011). Polyelectrolyte multilayer assemblies on materials surfaces: from cell adhesion to tissue engineering. *Chemistry of Materials*, 24(5), 854-869.
- [2]. Moby, V., Boura, C., Kerdjoudj, H., Voegel, J. C., Marchal, L., Dumas, D., & Menu, P. (2007). Poly (styrenesulfonate)/poly (allylamine) multilayers: a route to favor endothelial cell growth on expanded poly (tetrafluoroethylene) vascular grafts. *Biomacromolecules*, 8(7), 2156-2160.
- [3]. Salmon, N., Paternotte, E., Decot, V., Stoltz, J. F., Menu, P., & Labrude, P. (2009). Polyelectrolyte multilayer films promote human cord blood stem cells differentiation into mature endothelial cells exhibiting a stable phenotype. *Bio-medical materials and engineering*, 19(4), 349-354.
- [4]. Moby, V., Boura, C., Kerdjoudj, H., Voegel, J. C., Marchal, L., Dumas, D., & Menu, P. (2007). Poly (styrenesulfonate)/poly (allylamine) multilayers: a route to favor endothelial cell growth on expanded poly (tetrafluoroethylene) vascular grafts. *Biomacromolecules*, 8(7), 2156-2160.
- [5]. Newcomer, R. G., Moussallem, M. D., Keller, T., Schlenoff, J. B., & Sang, Q. X. A. (2010). Human Coronary Artery Smooth Muscle Cell Responses to Bioactive Polyelectrolyte Multilayer Interfaces. *Biotechnology research international*, 2011.
- [6]. Berthelemy, N., Kerdjoudj, H., Gaucher, C., Schaaf, P., Stoltz, J. F., Lacolley, P., & Menu, P. (2008). Polyelectrolyte Films Boost Progenitor Cell Differentiation into Endothelium-like Monolayers. *Advanced Materials*, 20(14), 2674-2678.
- [7]. G. Petzold, K. Petzold-Welcke, H. Qi, K. Stengel, S. Schwarz, and T. Heinze, "The removal of stickies with modified starch and chitosan– highly cationic and hydrophobic types compared with unmodified ones," *Carbohydrate polymers*, 2012.
- [8]. Cado, G., Kerdjoudj, H., Chassepot, A., Lefort, M., Benmlih, K., Hemmerlé, J., & Boulmedais, F. (2012). Polysaccharide Films Built by Simultaneous or Alternate Spray: A Rapid Way to Engineer Biomaterial Surfaces. *Langmuir*, 28(22), 8470-8478.
- [9]. Richert, L., Lavalle, P., Payan, E., Shu, X. Z., Prestwich, G. D., Stoltz, J. F., & Picart, C. (2004). Layer by layer buildup of polysaccharide films: physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir*, 20(2), 448-458.
- [10]. Cado, G., Aslam, R., Séon, L., Garnier, T., Fabre, R., Parat, A., & Boulmedais, F. (2013). Self-Defensive Biomaterial Coating Against Bacteria and Yeasts: Polysaccharide Multilayer Film with Embedded Antimicrobial Peptide. *Advanced Functional Materials*.

- [11]. Liu, Z. M., Gu, Q., Xu, Z. K., & Groth, T. (2010). Synergistic effect of polyelectrolyte multilayers and osteogenic growth medium on differentiation of human mesenchymal stem cells. *Macromolecular bioscience*, 10(9), 1043-1054.
- [12]. Richert, L., Boulmedais, F., Lavalle, P., Mutterer, J., Ferreux, E., Decher, G., & Picart, C. (2004). Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules*, 5(2), 284-294.
- [13]. Schneider, A., Francius, G., Obeid, R., Schwinté, P., Hemmerlé, J., Frisch, B., & Picart, C. (2006). Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus: influence of film stiffness on cell adhesion. *Langmuir*, 22(3), 1193-1200.
- [14]. Cao, Y., Sun, Z., Liao, L., Meng, Y., Han, Q., & Zhao, R. C. (2005). Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, 332(2), 370-379.
- [15]. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., & Verfaillie, C. M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893), 41-49.
- [16]. Wang, H. S., Hung, S. C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J., & Chen, C. C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem cells*, 22(7), 1330-1337.
- [17]. Xu, Y., Huang, S., Ma, K., Fu, X., Han, W., & Sheng, Z. (2012). Promising new potential for mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord Wharton's jelly: sweat gland cell-like differentiative capacity. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6(8), 645-654.
- [18]. Wegmeyer, H., Broeske, A. M., Leddin, M., Kuentzer, K., Nisslbeck, A. K., Hupfeld, J., & Neubauer, M. (2013). Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. *Stem cells and development*, (ja).
- [19]. Giuliani, N., Lisignoli, G., Magnani, M., Racano, C., Bolzoni, M., Dalla Palma, B., & Aversa, F. (2013). New Insights into Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Their Potential Clinical Applications for Bone Regeneration in Pediatric Orthopaedics. *Stem cells international*, 2013.
- [20]. Harmouch, C., El-Omar, R., Labrude, P., Decot, V., Menu, P., & Kerdjoudj, H. (2013). Influence of serum percentage on the behavior of Wharton's jelly mesenchymal stem cells in culture. *Bio-medical materials and engineering*, 23(4), 273-280.
- [21]. Kilian, K. A., Bugarija, B., Lahn, B. T., & Mrksich, M. (2010). Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(11), 4872-4877.
- [22]. Breuls, R. G. M., Helder, M. N., Van Milligen, F. J., & Smit, T. H. (2008). *European Patent No. EP 1908820*. Munich, Germany: European Patent Office.

- [23]. Rodrigues, C. A., Fernandes, T. G., Diogo, M. M., da Silva, C. L., & Cabral, J. (2011). Stem cell cultivation in bioreactors. *Biotechnology advances*, 29(6), 815-829.
- [24]. 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," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 52, no. 11, p. 2745, 1973.
- [25]. R. Taléns-Visconti, A. Bonora, R. Jover, V. Mirabet, F. Carbonell, J. V. Castell, M. J. Gómez-Lechón *et al.*, "Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 12, no. 36, p. 5834, 2006.
- [26]. Kerdjoudj, H., Boulmedais, F., Berthelemy, N., Mjahed, H., Louis, H., Schaaf, P., & Menu, P. (2011). Cellularized alginate sheets for blood vessel reconstruction. *Soft Matter*, 7(7), 3621-3626.
- [27]. N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, C. Gaucher, P. Schaaf, J.-F. Stoltz, P. Lacolley, J.-C. Voegel, and P. Menu, "Polyelectrolyte films boost progenitor cell differentiation into endothelium-like monolayers," *Advanced Materials*, vol. 20, no. 14, pp. 2674–2678, 2008.
- [28] E. Horwitz, K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, R. Deans, D. Krause, and A. Keating, "Clarification of the nomenclature for msc : The international society for cellular therapy position statement," *Cytotherapy*, vol. 7, no. 5, pp. 393–395, 2005.
- [29] H. Yoshimura, T. Muneta, A. Nimura, A. Yokoyama, H. Koga, and I. Sekiya, "Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle," *Cell and tissue research*, vol. 327, no. 3, pp. 449–462, 2007.
- [30] M. A. Engelse, N. Laurens, R. E. Verloop, P. Koolwijk, and V. W. van Hinsbergh, "Differential gene expression analysis of tubule forming and non-tubule forming endothelial cells : Cdc42gap as a counter-regulator in tubule formation," *Angiogenesis*, vol. 11, no. 2, pp. 153–167, 2008.
- [31] G. Finkenzeller, N. Torio-Padron, A. Momeni, A. T. Mehlhorn, and G. B. Stark, "In vitro angiogenesis properties of endothelial progenitor cells : a promising tool for vascularization of ex vivo engineered tissues," *Tissue engineering*, vol. 13, no. 7, pp. 1413–1420, 2007.
- [32] N. Yamamura, R. Sudo, M. Ikeda, and K. Tanishita, "Effects of the mechanical properties of collagen gel on the in vitro formation of microvessel networks by endothelial cells," *Tissue engineering*, vol. 13, no. 7, pp. 1443–1453, 2007.
- [33] G. Seghezzi, S. Patel, C. J. Ren, A. Gualandris, G. Pintucci, E. S. Robbins, R. L. Shapiro, A. C. Galloway, D. B. Rifkin, and P. Mignatti, "Fibroblast growth factor-2 (fgf-2) induces vascular endothelial growth factor (vegf) expression in the endothelial cells of forming capillaries : an autocrine mechanism contributing to angiogenesis," *The Journal of cell biology*, vol. 141, no. 7, pp. 1659–1673, 1998.

- [34] J. Oswald, S. Boxberger, B. Jørgensen, S. Feldmann, G. Ehninger, M. Bornhäuser, and C. Werner, "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro," *Stem cells*, vol. 22, no. 3, pp. 377–384, 2004.
- [35] F. Alviano, V. Fossati, C. Marchionni, M. Arpinati, L. Bonsi, M. Franchina, G. Lanzoni, S. Cantoni, C. Cavallini, F. Bianchi *et al.*, "Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro," *BMC developmental biology*, vol. 7, no. 1, p. 11, 2007.
- [36] S. Gronthos, A. C. Zannettino, S. J. Hay, S. Shi, S. E. Graves, A. Kortessidis, and P. J. Simmons, "Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow," *Journal of cell science*, vol. 116, no. 9, pp. 1827–1835, 2003.
- [37] N. Ferrara, "Vascular endothelial growth factor : basic science and clinical progress," *Endocrine reviews*, vol. 25, no. 4, pp. 581–611, 2004.
- [38] A. Woodfin, M.-B. Voisin, and S. Nourshargh, "Pecam-1 : a multifunctional molecule in inflammation and vascular biology," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 27, no. 12, pp. 2514–2523, 2007.
- [39] S. Gory-Faure, M.-H. Prandini, H. Pointu, V. Roullot, I. Pignot-Paintrand, M. Vernet, and P. Huber, "Role of vascular endothelialcadherin in vascular morphogenesis," *Development*, vol. 126, no. 10, pp. 2093–2102, 1999.
- [40] G. P. Duffy, T. M. McFadden, E. M. Byrne, S.-L. Gill, E. Farrell, F. J. OâAZBrien *et al.*, "Towards in vitro vascularisation of collagen-gag scaffolds," *European cells & materials*, vol. 21, pp. 15–30, 2011.
- [41] B. Strem, M. Zhu, Z. Alfonso, E. Daniels, R. Schreiber, R. Begyui, W. MacLellan, M. Hedrick, and J. Fraser, "Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury," *Cytotherapy*, vol. 7, no. 3, pp. 282–291, 2005.
- [42] M. J. Seo, S. Y. Suh, Y. C. Bae, and J. S. Jung, "Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 328, no. 1, pp. 258–264, 2005.
- [43] H. Goodwin, A. Bicknese, S. Chien, B. Bogucki, D. Oliver, C. Quinn, and D. Wall, "Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood : expression of bone, fat, and neural markers," *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, vol. 7, no. 11, pp. 581– 588, 2001.
- [44] J. Gaffney, D. West, F. Arnold, A. Sattar, and S. Kumar, "Differences in the uptake of modified low density lipoproteins by tissue cultured endothelial cells," *Journal of cell science*, vol. 79, no. 1, pp. 317–325, 1985.
- [45] Z. Ruggeri, "Von willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 1, no. 7, pp. 1335–1342, 2003.

## Figures

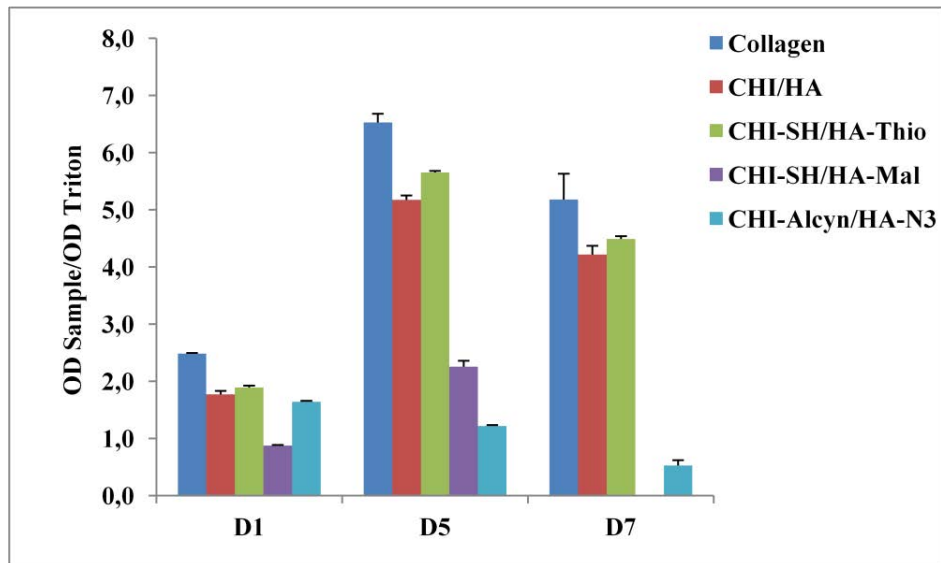


Figure 1: Proliferation kinetic of MSCs stained with the dye crystal violet (n=3, mean ± SD).

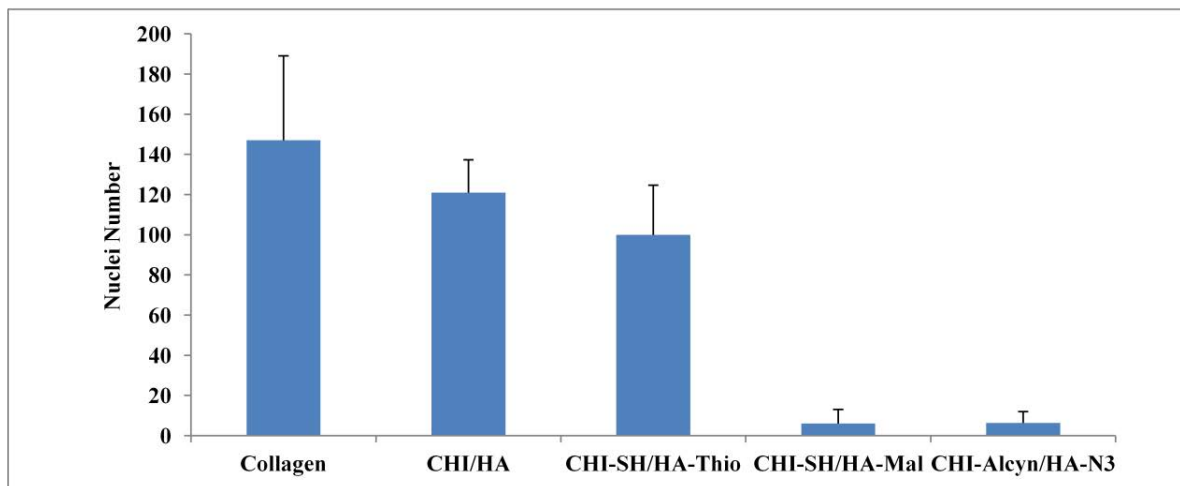


Figure 2: Variations of nuclei number on the different studied supports (n=3, mean ± SD).

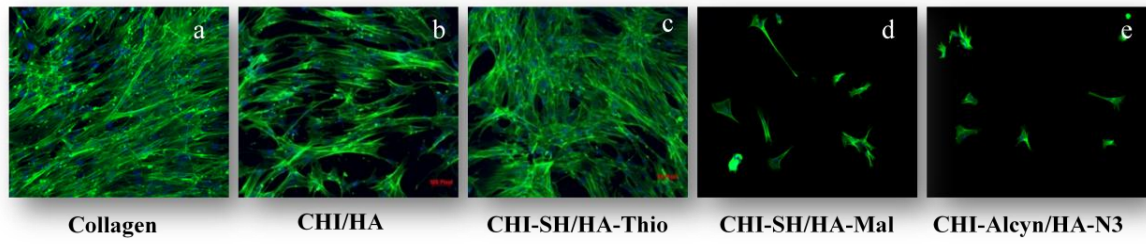


Figure 3: Photos of immunostained MSCs  $\alpha$ -actin filaments (green), and nucleus (blue) on different scaffolds (Zeiss Microscope, Objective \*10).

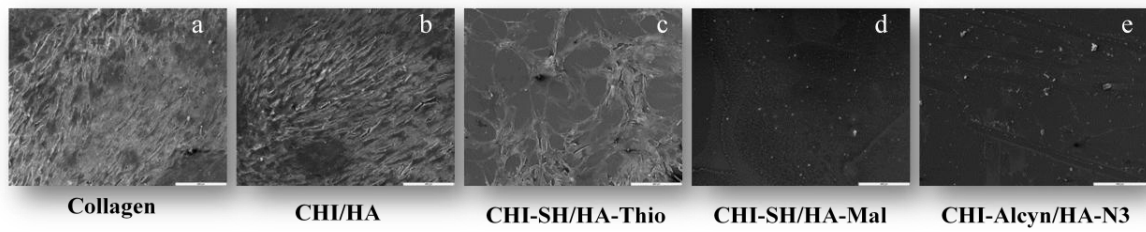
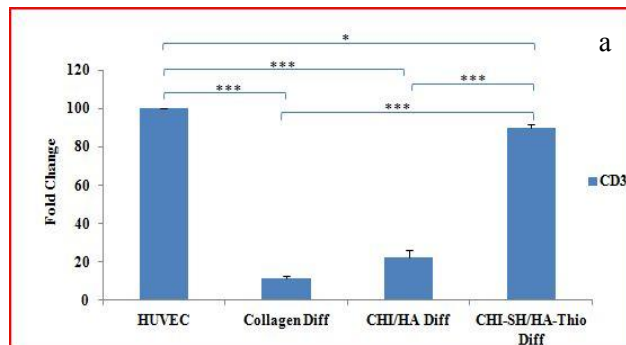


Figure 4: WJ-MSCs SEM two weeks after seeding on different scaffolds (JEOL Phillips Microscope \*150).



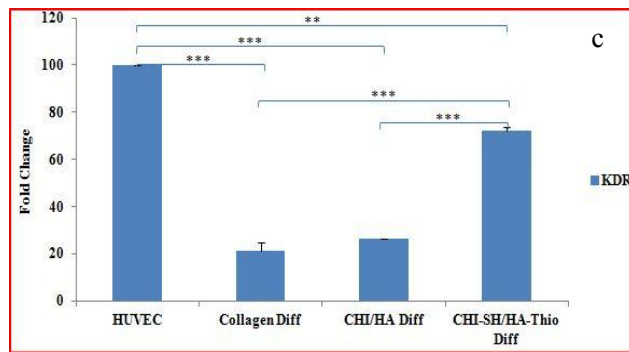
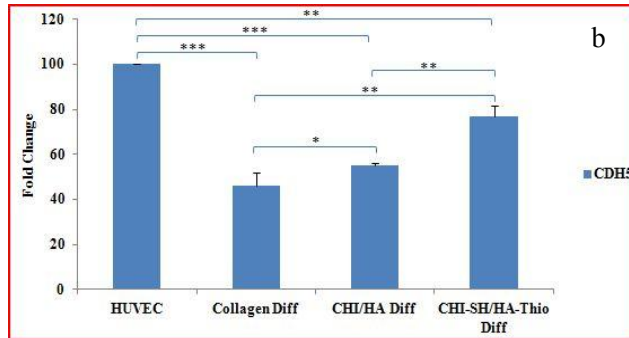


Figure 5: Expression of endothelial markers: CD31 (a), CDH5 (b) and KDR (c) at mRNA level in endothelial-like cells seeded on collagen, CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio in differentiation medium (EGM2) for 15 days. Results show relative expression achieved by quantitative PCR, normalized to RP29 expression, and analyzed by  $\Delta$ CT method. In all cases the graphs demonstrate a higher expression of the individual markers on CHI-SH/HA-Thio than CHI/HA and collagen compared to HUVECs and non-treated cells (data not shown).

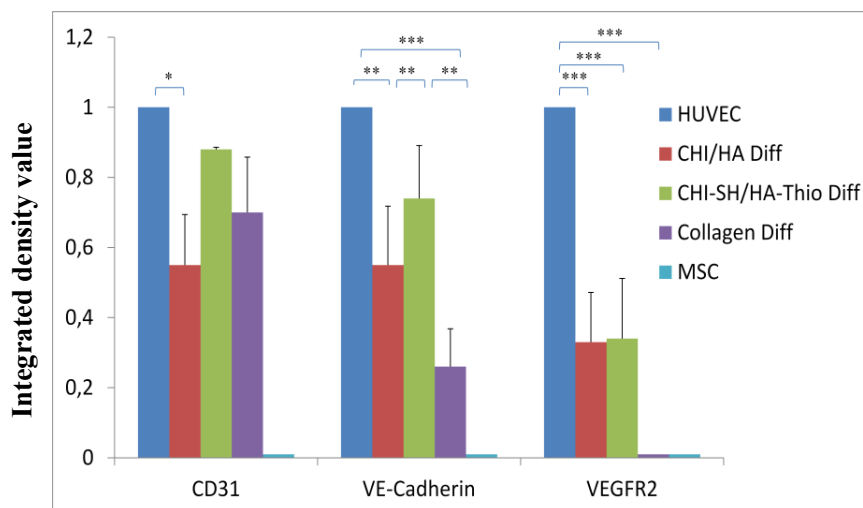




Figure 6: CD31, VE-cadherin and VEGF-R2 blot quantifying for stimulated and unstimulated WJ-MSCs seeded on different culture surfaces after 15 days. Western blot normalization was performed to the expression of GAPDH. The expression of HUVECs was set as 100% (relative protein level=1.0). Results were expressed as mean $\pm$  SEM of three independent experiments.

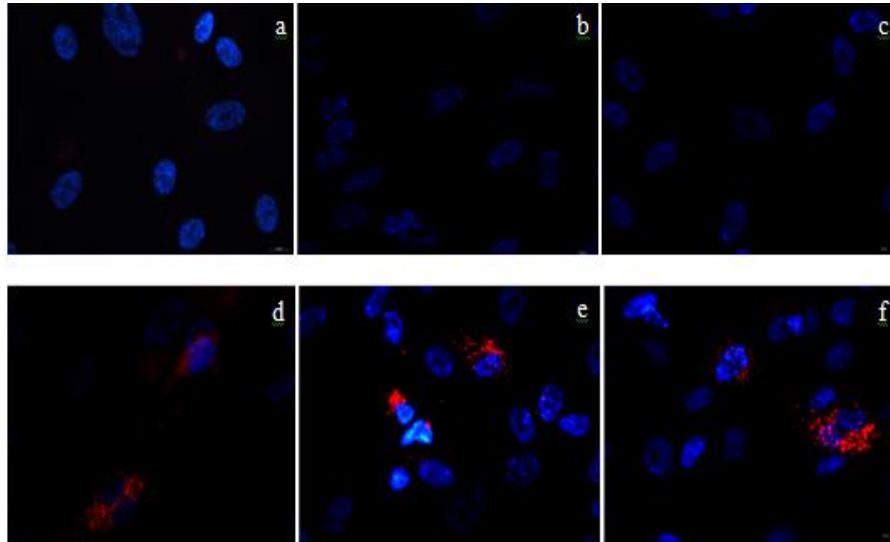


Figure 7: WJ-MSCs cellular uptake of labeled acetylated LDLs. Double immunofluorescence of nuclei (blue) and for DI-Ac-LDLs (red) for unstimulated (a, b, c) and stimulated (d, e, f) WJ-MSCs after 15 days of culture on collagen, CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio. Internalized labels were detected by Leica fluorescence microscopy (objective \*40 oil).

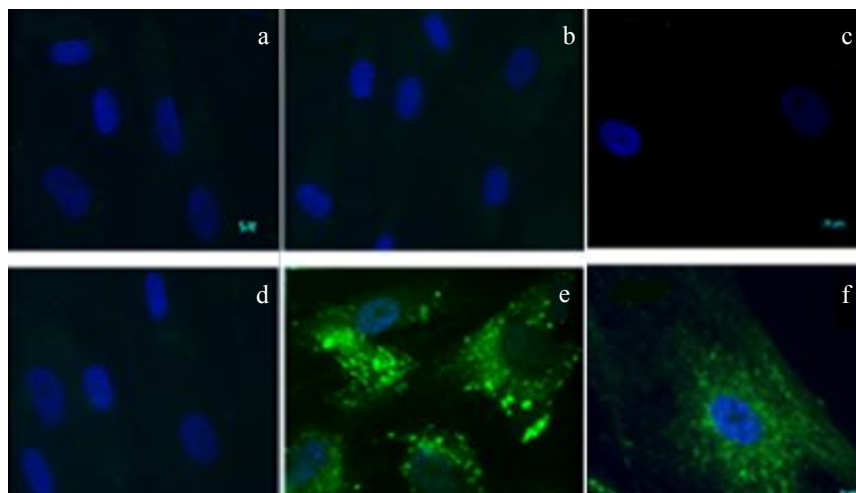


Figure 8: Double immunofluorescence staining for nuclei (blue), and for prothrombogenic von Willebrand Factor for stimulated (a, b, c) and unstimulated (d, e, f) WJ-MSCs after 15 days of culture on collagen, CHI/HA and CHI-SH/HA-Thio (Zeiss Microscope, objective\*63 oil). N=3.



### 7.3.3 Résultats et discussion de l'article

Nous avons montré que le film multicouche de polyélectrolytes (CHI-SH/HA-Thio)<sub>10</sub> représente un moyen simple et efficace pour modifier la surface de culture en vue de la différenciation endothéliale des CSMs issues de la gelée de Wharton des cordons ombilicaux humains, en comparaison avec le collagène et avec d'autres films obtenus à partir de polymères commerciaux ou modifiés.

Après deux semaines de culture, les résultats des tests de bicompatibilité ont montré : une meilleure adhésion, une morphologie fibroblastique et un étalement du cytosquelette des CSMs ensemencées sur le CHI/HA et le CHI-SH/HA-Thio en comparaison avec le contrôle positif conventionnel : le collagène. Au contraire, sur les supports de type CHI-SH/HA-Mal et CHI-Alcyne/HA-N<sub>3</sub>, nous n'avons observé que des débris cellulaires.

Pour cette raison, nous avons retenu CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio comme polymères biocompatibles. Sur ces supports, les CSMs pourraient adhérer et proliférer en monocouches, en conservant une morphologie fibroblastique. Ces polymères ont servi pour perfectionner le protocole de différenciation endothéliale.

Nous avons commencé par la mise au point de ce protocole par une étude cinétique du comportement des CSMs dans le milieu de différenciation. Nous avons observé que les cellules endothéliales-*like*, obtenues après différenciation des CSMs, semblaient se détacher après deux semaines de culture. Cette observation nous a permis d'évaluer l'influence du pourcentage de sérum dans le milieu de différenciation. Les résultats montrent que la diminution du pourcentage de sérum de 2% à 0,5% évite la formation de sphéroïdes 3D et le détachement des cellules. Ce pourcentage de sérum a donc été fixé à 0,5% dans le milieu de différenciation pour passer à l'évaluation de l'expression des marqueurs endothéliaux aux niveaux génique et protéique ainsi qu'à celle de la fonctionnalité des cellules différenciées sur les films CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio en comparaison avec les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECs).

Les résultats de western blot et de q-RT-PCR montrent que l'expression des trois marqueurs endothéliaux : CD31, VE-cadhérine et VEGF-R2 dans les CMSs incubées en présence du milieu de différenciation endothéliale pendant 15 jours, est plus importante sur CHI-SH/HA-Thio que sur CHI/HA et sur le collagène en comparaison avec les HUVECs. Le collagène montre une expression de VEGF-R2 au niveau de l'ARNm, mais nous n'avons pas détecté l'expression de cette protéine par western blot. Cependant, le collagène est une surface recommandée permettant la

différenciation chondrogénique et ostéogénique des CSMs après 21 jours ( Duffy GP et al ; . 2011). Dans notre étude, nous n'avons pas détecté l'expression de la protéine VEGF-R2 sur le collagène. Plus de 15 jours sont peut-être nécessaires pour atteindre la traduction de l'ARNm du VEGF-R2.

La modification chimique des films CHI/HA réalisée par palier le groupement Thiol pour le chitosane et le groupement Thiopyridone pour l'hyaluronane assure une augmentation de la rigidité des films et la promotion d'une meilleure adhésion et d'une meilleure différenciation cellulaire. Ces données obtenues confirment celles de la biocompatibilité, les CSMs sont plus étalées et organisées sur les films CHI-SH/HA-Thio que sur les films CHI/HA après 15 jours de culture, leur conférant une meilleure capacité de différenciation.

L'évaluation de la fonctionnalité des cellules obtenues après différenciation a été effectuée au cours du temps, à travers l'expression du marqueur endothélial spécifique : vWF et l'incorporation de LDL. Ces observations effectuées en microscopie à fluorescence, ont montré, après 15 jours de culture, la fonctionnalité de ces cellules grâce à l'expression du marqueur spécifique, le vWF, et l'incorporation de LDL. La mesure de l'intensité de fluorescence de ces marqueurs pour les CSMs cultivées sur CHI-SH/HA-Thio est plus importante que celle pour les CSMs cultivées sur CHI/HA. Avec les CSMs différenciées sur le collagène, support conventionnel, les observations au microscope à fluorescence montrent une incorporation de LDL beaucoup plus faible que celle des CSMs ensemencés sur les films. Par contre nous n'avons détecté aucune expression cytoplasmique de vWF. Sur ce support conventionnel, des résultats identiques à ceux obtenus sur les film de polyélectrolytes ne seront peut-être observés qu'après un temps de culture plus avancé.

Ces premiers résultats très encourageants ont montrer qu'il était possible d'obtenir des CEs-*like* de façon non traumatisante (à partir de la gelée de Wharton des cordons ombilicaux humains) et dans un temps court (15 jours). Le recouvrement d'hydrogels d'alginate par ces films multicouche de polyélectrolytes peut servir pour reconstituer *in vitro* une surface anti-thrombogénique. Notre technique, basée sur l'utilisation de films de polyélectrolytes, pourrait donc être utilisée dans le domaine de l'ingénierie vasculaire pour le développement de substituts vasculaires fonctionnels comprenant un endothélium issu de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses, ce qui limiterait les risques de rejet du greffon et pourrait être appliquée à des patients qui nécessitent le remplacement de vaisseaux malades.



# Evaluation de l'effet des films CHI/HA sur la prolifération de quelques souches bactériennes

---

Dans le chapitre 2 de notre travail, nous avons décrit l'une des principales propriétés biologiques du chitosane : son activité antibactérienne. L'interaction entre le groupement  $\text{NH}_3^+$  caractéristique du chitosane et la couche de peptidoglycane des bactéries Gram+ ou la membrane externe lipopolysaccharidique des bactéries Gram-, provoque une altération de la perméabilité de ces bactéries et une inhibition de leur croissance bactérienne.

Dans ce chapitre, nous évaluons l'effet des films multicouche de chitose/hyaluronane sur la prolifération de certaines souches de bactéries : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (1 et 2), *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis*.

## 8.1 Matériel et méthodes

### 8.1.1 Matériel et réactifs

- \* Seringue de 10, 20 ou 50 mL
- \* Filtres 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, France)
- \* Tubes Falcon 15 et 50 mL
- \* Géloses Mueller Hinton (MHA, Difco, France)
- \* Bouillons Mueller Hinton (MHB, Difco, France)
- \* Eau distillée stérile

### 8.1.2 Souches bactériennes étudiées

Cinq souches de référence ont été utilisées : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (1 et 2), *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis*.

### 8.1.2.1 Mode opératoire

#### J-1 : Mise en culture des bactéries sur gélose MH

Incuber 24h à 35°C.

#### J0 : Ensemencement d'un bouillon MH

Prélever une colonie "moyenne" sur la gélose J-1 et ensemer 5 mL de bouillon MH.

Incuber 24h à 35°C.

#### J1 : Préparation des films multicouche CHI/HA et des inoculums

Les films multicouche CHI/HA sont préparés dans des plaques 24 puits comme décrit précédemment dans le chapitre "Techniques et matériels utilisés lors de cette thèse".

La suspension bactérienne est transférée dans un tube Falcon de 15 mL, centrifugée 10 min à 4500 g puis le culot est remis en suspension dans 1 mL d'eau distillée stérile. Les dilutions adéquates sont ensuite réalisées afin d'obtenir un inoculum bactérien entre  $5 \times 10^5$  et  $5 \times 10^6$  UFC/mL.

Le volume final contenu dans chacun des puits doit être 200  $\mu$ L.

#### Trois témoins doivent être présents sur la chaque plaque :

- \* Témoin négatif (verre + eau)
- \* Témoin négatif (films + eau)
- \* Témoin positif

#### Distribution du milieu MH :

- \* 200  $\mu$ L de milieu dans les 2 puits (témoin milieu et témoin films + milieu)
- \* 100  $\mu$ L dans les autres puits

**Distribution de la suspension bactérienne :** 50  $\mu$ L dans chacun des puits sauf les témoins sans bactéries.

**J2 : Lecture de la turbidité à 540 nm** La turbidité d'un milieu est proportionnelle au nombre de bactéries présents dans ce milieu. Ainsi l'absorbance d'une suspension bactérienne à une longueur d'onde supérieure ou égale à 540 nm varie linéairement jusqu'à des valeurs inférieures ou égales à 0,8 avec le nombre de germes.

La lecture photométrique des plaques à 540 nm nous génère les résultats suivants.

## 8.2 Résultats

Les histogrammes ci-dessous montrent l'évaluation de la croissance bactérienne des différentes souches étudiées : *E. coli* Fig 8.1, *S. aureus 1* Fig 8.2, *S. aureus 2* Fig 8.3, *P. aeruginosa* Fig 8.4 et *E. faecalis* Fig 8.5.

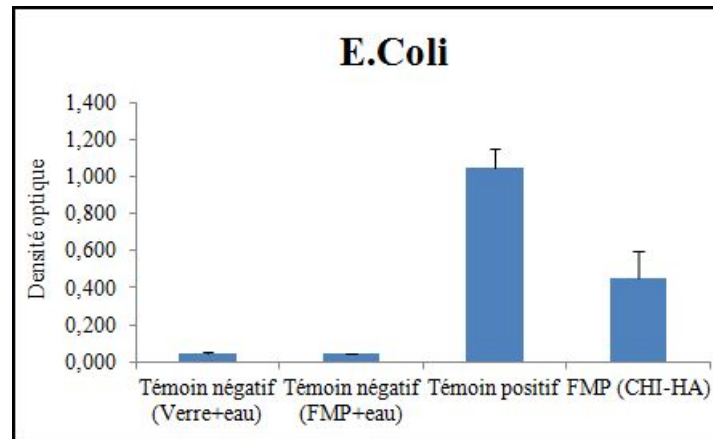


FIGURE 8.1 – Histogrammes montrant l'évaluation de la croissance bactérienne de la souche *E. coli* sur des films de type CHI/HA et du verre comme témoin positif. Moyenne  $\pm$  écart-type, n=3

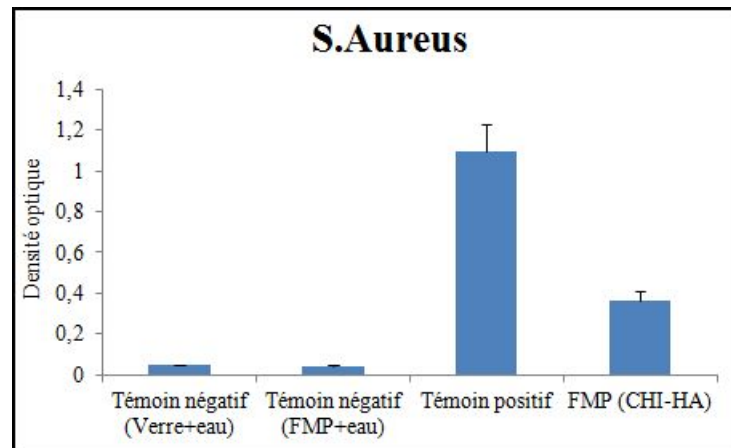


FIGURE 8.2 – Histogrammes montrant l'évaluation de la croissance bactérienne de la souche *S. aureus 1* sur des films de type CHI/HA et du verre comme témoin positif. Moyenne  $\pm$  écart-type, n=3

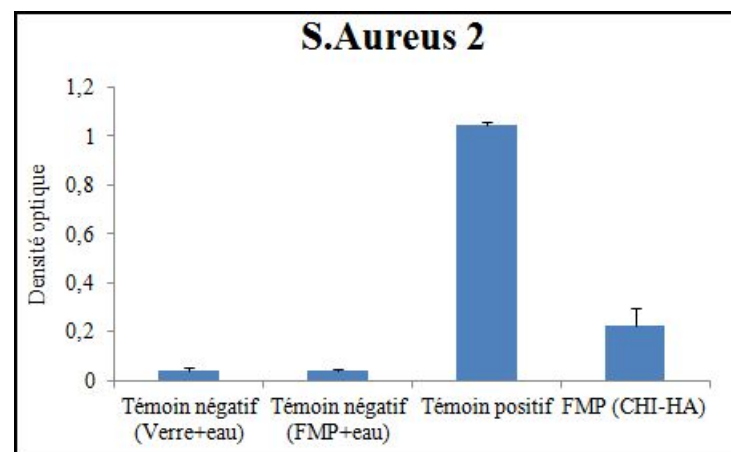


FIGURE 8.3 – Histogrammes montrant l'évaluation de la croissance bactérienne de la souche *S. aureus 2* sur des films de type CHI/HA et du verre comme témoin positif. Moyenne  $\pm$  écart-type, n=3



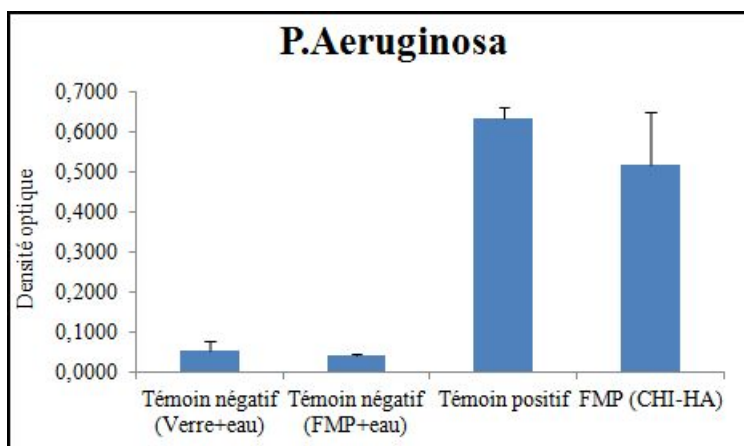


FIGURE 8.4 – Histogrammes montrant l'évaluation de la croissance bactérienne de la souche *P. aeruginosa* sur des films de type CHI/HA et du verre comme témoin positif. Moyenne ± écart-type, n=3

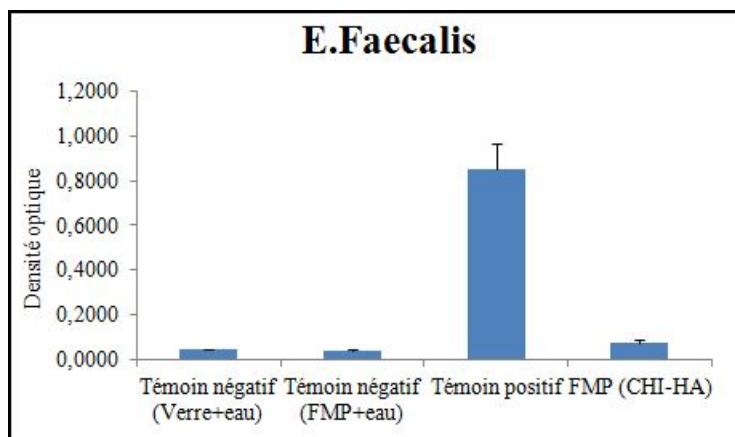


FIGURE 8.5 – Histogrammes montrant l'évaluation de la croissance bactérienne de la souche *E. faecalis* sur des films de type CHI/HA et du verre comme témoin positif. Moyenne ± écart-type, n=3

Le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne a été calculé par la règle suivante :  $x\% = \frac{DO(\text{Echantillon}) - DO(\text{Témoin négatif (films + eau)})}{DO(\text{Témoin positif}) - DO(\text{Témoin négatif (Verre+eau)})}$ . Les résultats sont présentés dans le tableau 8.1. Des observations en MEB ont été faites pour visualiser les colonies de bactéries et leur répartition sur les films CHI/HA en comparaison avec le verre. Les photographies obtenues (Fig 8.6) confirment l'effet inhibiteur de la croissance bactérienne des films multicouche de CHI/HA par rapport au témoin positif : le verre.

Les résultats montrent un effet inhibiteur de la croissance bactérienne des 5 souches fondamentales, mais l'effet de nos films de CHI/HA était moins important pour la souche *P. aeruginosa*, comme on l'a déjà expliqué dans la partie bibliographique, certains auteurs ont affirmé que le chitosane montre généralement des effets plus importantes pour les bactéries gram-positives que pour les bactéries gram-

Souche bactérienne	Pourcentage d'inhibition
<i>E.coli</i>	40%
<i>S. aureus 1</i>	70%
<i>S. aureus 2</i>	80%
<i>P. aeruginosa</i>	20%
<i>E. faecalis</i>	90%

TABLE 8.1 – Pourcentages d'inhibition de la croissance bactérienne

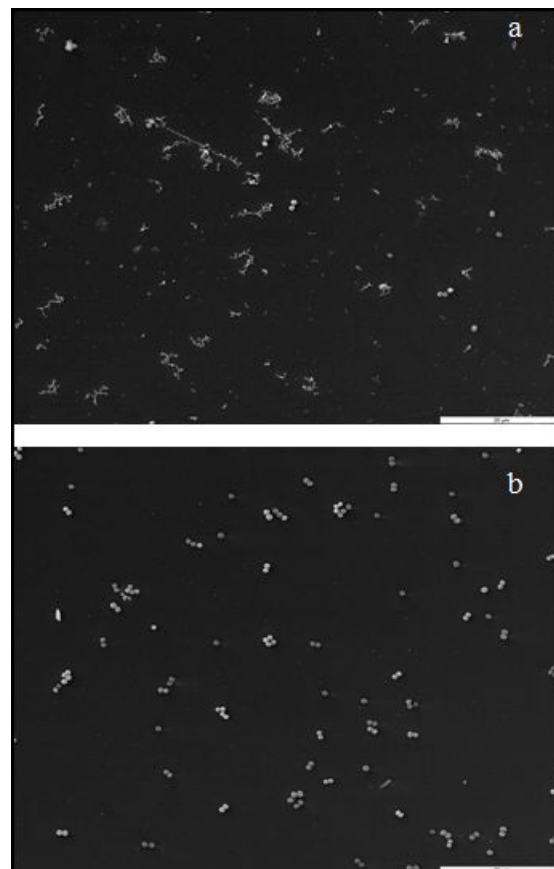


FIGURE 8.6 – Photos en MEB des colonies bactériennes ensemencées pendant 4h à 37°C sur : a : CHI/HA et b : verre. JEOL Phillips Microscope\*1500, n=3

négatives, ce qui peut expliquer l'effet mineur des films CHI/HA sur l'inhibition de la croissance de *P. aeruginosa*; bien que le mécanisme exact n'est pas entièrement compris et que plusieurs autres facteurs peuvent contribuer à cette action antibacté-

rienne.

# Conclusion générale

---

L'ingénierie tissulaire associe aux cellules souches un environnement extracellulaire propice au développement et à la différenciation cellulaire. En effet, des études ont montré que la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) est fortement tributaire du milieu de culture (facteurs de croissance, contenu du sérum), de la densité d'ensemencement, de l'environnement mécanique des matrices et des contraintes mécaniques (bioréacteur). Afin d'améliorer l'adhésion et la différenciation cellulaires, plusieurs protocoles proposent de recouvrir les supports conventionnels de culture par des molécules de la matrice extracellulaire telles que : la fibronectine, le collagène de type I, la gélatine ....

Depuis une dizaine d'années, les travaux du laboratoire se focalisent sur l'évaluation de l'effet des multicouche de polyélectrolytes type : chlorhydrate de polyallylamine (PAH) et de polystyrène sulfonate (PSS), sur la différenciation des progéniteurs circulant en cellules vasculaires. L'équipe a mis en évidence une accélération notable de la différenciation au contact du film, en comparaison de celle observée sur une surface contrôlée de fibronectine ou de collagène de type I. Si le système PSS/PAH répond parfaitement à tous les aspects de différenciation cellulaire, son utilisation chez l'homme pourrait se heurter à des aspects réglementaires (absence d'autorisation de mise sur le marché des polymères).

L'ensemble de ce travail de thèse nous a permis d'ouvrir de nouvelles voies dans le domaine de l'ingénierie tissulaire vasculaire actuelle. Le travail bibliographique effectué nous a permis de définir les points susceptibles d'être améliorés dans le but de concevoir de nouveaux moyens pour le traitement des pertes vasculaires.

Nous nous sommes intéressés en premier lieu à la qualité de l'adhésion et la prolifération des CSMs associées à des films multicouche de polyélectrolytes naturels CHI/HA. Les propriétés mécaniques insuffisantes des multicouches CHI/HA, fortement hydratées et donc de faible module d'élasticité, sont à l'origine de l'absence d'adhésion des cellules sur cette multicouche. Afin d'augmenter le module d'élasticité de cette multicouche et par conséquent d'améliorer l'adhésion et la prolifération cellulaires, nous avons utilisé des polymères modifiés par différents groupements et

dont la post-réticulation ne fait appel à aucun agent chimique.

L'évaluation de la biocompatibilité de ces différents films nous a permis de fixer deux types : CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio comme meilleurs supports permettant une bonne adhésion des CSMs en conservant une morphologie fibroblastique, caractéristique des cellules mésenchymateuses.

Puis nous nous sommes focalisés sur le protocole de différenciation endothéliale des CSMs associées aux biomatériaux : CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio. Ceci nous a permis de développer un milieu de culture induisant de façon rapide (15 jours) et efficace la différenciation des CSMs en cellules endothéliales-*like* fonctionnelles. L'utilisation des facteurs pro-angiogéniques présents dans le milieu EGM2 associés à une faible teneur en SVF (0,5% au lieu de 5% (instructions du fournisseur)) a permis d'améliorer significativement la différenciation endothéliale des CSMs par rapport au milieu traditionnellement utilisé dans l'équipe (avec 5% SVF).

Ensuite, nous avons détecté l'expression des principaux marqueurs endothéliaux aux niveaux : génique et protéique. Nous avons remarqué une meilleure expression de ces marqueurs pour les CSMs sur CHI-SH/HA-Thio par rapport au CHI/HA et à notre témoin positif de surface : le collagène. Cela nous assure que les films CHI-SH/HA-Thio peuvent servir comme support de culture capable de générer des cellules endothéliales-*like* au bout de 2 semaines de culture, à partir de CSMs issues de la gelée de Wharton des cordons ombilicaux humains. De plus, l'évaluation de la fonctionnalité cellulaire montre bien que les cellules différenciées sont également fonctionnelles et capables d'incorporer le Dil-Ac-LDL (caractéristique des cellules endothéliales) et d'exprimer le facteur pro-thrombogénique vWF.

Les tests bactériens complémentaires d'évaluation de l'activité anti-bactérienne des films CHI/HA nous ouvrent de nouvelles opportunités concernant la création d'une surface capables d'inhiber la croissance bactérienne et donc favorables pour l'utilisation clinique. Cependant, après confirmation que le chitosane garde son activité anti-bactérienne dans des films CHI/HA, il sera utile de savoir si la modification chimique du chitosane par le groupement Thiol et celle de l'hyaluronane par le groupement Thiopyridone pourra affecter cette activité !

L'ingénierie tissulaire vasculaire pourra s'inspirer de ces études qui démontrent que des hybrides associant CSMs et CHI-SH/HA-Thio, mimant l'environnement endothélial, peuvent posséder un potentiel important dans la génération de cellules endothéliales pouvant servir dans le cas des pathologies de l'endothélium vasculaire.

Des études supplémentaires doivent être faites pour évaluer la capacité des CSMs à se différencier en CMLs et ainsi, en associant une média (CMLs) et une intima (CEs), il pourra devenir possible de créer un substitut vasculaire fondé sur le principe de la couverture d'une surface d'alginate (hydrogel utilisé dans des études antérieures de l'équipe) par des films multicouche de type CHI-SH/HA-Thio sur lesquelles sontensemencées les CSMs en cours de différenciation endothéliale et musculaire lisse. Enfin on arrivera à avoir le substitut vasculaire recherché depuis longtemps.



ANNEXE A

# Synthèse du HA-Maléimide

---



## Design and Synthesis of Thiol-Reactive Lipopeptides

Christophe Boeckler, Benoît Frisch and Francis Schuber\*

Laboratoire de Chimie Bioorganique, CNRS - UMR 7514, Université Louis Pasteur, Faculté de Pharmacie,  
74 route du Rhin, 67400 - Illkirch, France.

Received 5 January 1998; accepted 2 July 1998

**Abstract:** Lipopeptides are potent adjuvants that trigger an immune response against covalently conjugated low molecular mass antigens. We report here the design and synthesis of thiol-reactive lipopeptides (6, 7) which can be incorporated into liposomes and react, under mild conditions, with synthetic peptides carrying a thiol function. © 1998 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Synthetic lipopeptide analogs of *Escherichia coli* lipoprotein, such as Pam<sub>3</sub>CysAlaGly (Scheme 3) or Pam<sub>3</sub>CysSerSer, are potent immunoadjuvants able to induce an immune response against low molecular mass antigens<sup>1</sup> when injected either as an admixture<sup>2</sup> or as covalent conjugates.<sup>3</sup> Importantly, strong humoral and cellular immune responses could be obtained against peptide antigens covalently coupled to such lipopeptides.<sup>4</sup> Our aim is the design of synthetic peptide-based vaccines using liposomes as carriers.<sup>5</sup> We have previously shown that intense and long lasting immune responses could be triggered against peptide antigens conjugated, via a phospholipid anchor, to the surface of small unilamellar vesicles that incorporated in their bilayer amphiphilic adjuvants such as monophosphoryl lipid A<sup>6</sup> or lipopeptides.<sup>7</sup> We have now developed a second generation of liposomal constructs in which a single vesicle carries two different peptides, such as B-cell and T-helper cell epitopes, one of the epitopes being specifically conjugated to a lipopeptide.<sup>8</sup> This strategy required the design of lipopeptide derivatives which, after incorporation into preformed liposomes, could be conjugated to the peptides.

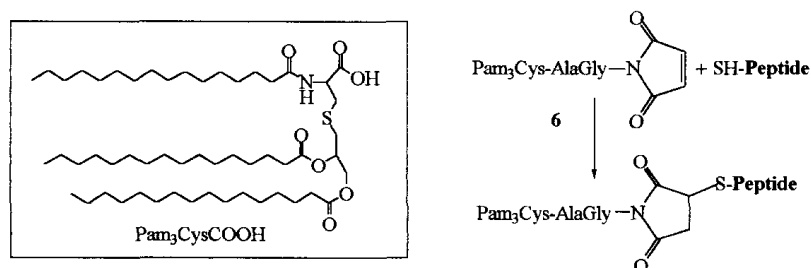


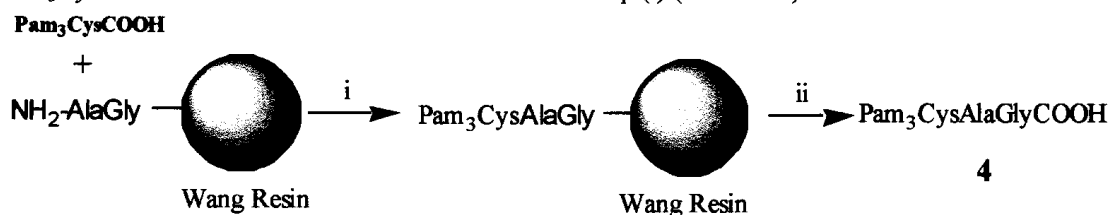
Figure 1: Coupling of a peptide-SH to a thiol-reactive lipopeptide.

The classical approach for the design of lipopeptide-peptide antigen conjugates is based on solid phase synthesis for each desired structure.<sup>9</sup> To improve the flexibility of this strategy, the C-terminal functions of lipopeptides were modified with e.g. *N*-hydroxysuccinimido esters<sup>10</sup> to react with the N-terminal function of a free peptide. But this procedure is not exempt of limitations, at least for our purpose. For example these esters,

Fax: 33 3 88 67 88 91; e-mail: schuber@pharma.u-strasbg.fr

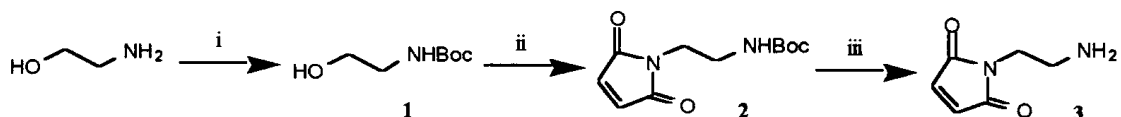
besides their lability in aqueous media, may also react with the  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> of lysine residues present in peptides and yield a mixture of different products. We adopted a different strategy and designed a “universal” thiol-reactive lipopeptide (TRLP), whose C-terminal amino acid was modified with a maleimide group (**Figure 1**), that could be incorporated into liposomes. This approach allows the specific coupling under mild conditions, and in aqueous environments, of peptide epitopes carrying free thiol functions either at their N- or C-terminus, to the surface of preformed vesicles via a lipopeptide anchor (**Figure 1**). Moreover, because of the high reactivity of the maleimide group of such TRLP with peptides-SH, one can envisage the incorporation into the same liposomes of another, but lesser reactive, thiol-reactive amphiphilic anchor (e.g. bromoacetyl derivative of phosphatidylethanolamine) and thus perform a controlled sequential coupling of a second epitope<sup>11</sup> giving access to diepitope constructs.<sup>8</sup>

The synthesis of the TRLP **6** and **7** first required the production of lipopeptides **4** and **5** (**Scheme 3**). This was achieved by solid-phase synthesis on a Wang resin. *N*<sup>α</sup>-palmitoyl-*S*-(2,3-bis-palmitoyloxy-(2*RS*)-propyl)-(*R*)-cysteine (Pam<sub>3</sub>CysCOOH; **Figure 1**), obtained in 6 steps following the procedure of Wiesmüller et al,<sup>12</sup> was coupled in the last step to the dipeptides AlaGly (**Scheme 1**) and SerSer previously prepared as resin conjugates according to conventional *N*- $\alpha$ -Fmoc amino acid methodologies. Compounds **4** and **5** were finally isolated, after cleavage from the resin by a simple treatment with TFA (**Scheme 1**; step ii), by precipitation in a mixture of CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:5) at -20°C (total yield : 40 to 60%). Compared to the liquid phase synthesis, this strategy gave much better yields of pure compounds mostly because it allowed a straightforward removal of reagents and Pam<sub>3</sub>CysCOOH which were used in a 3-fold excess in step (i) (**Scheme 1**).



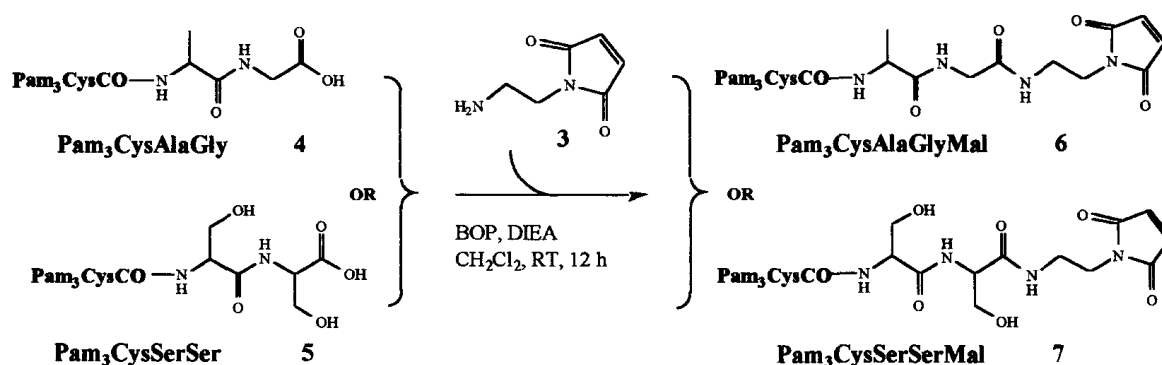
**Scheme 1:** i) BOP, DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 12 h; ii) TFA (100%), RT, 1h, (yield: 40 to 60 %).

The last step consisted in the introduction of the maleimido group on the lipopeptides (**Scheme 3**). This was accomplished by coupling to the C-terminal carboxylic groups of **4** and **5** the bifunctional molecule 1-(2-aminoethyl)-pyrrole-2,5-dione (**3**) that contains a free amino group and a maleimide group (**Scheme 2**). The synthesis of compound **3** is given in **Scheme 2**. In a first step, ethanolamine was protected with Boc. Then a Mitsunobu reaction was carried out in the presence of 1.2 eq. of maleimide; this reaction allows the convenient transformation of the alcohol into a maleimide group in a single step, and in good yields, under particularly mild conditions (neutral and at room temperature). The same approach has been described recently for the preparation of bifunctional maleimide cross-linkers.<sup>13</sup> After deprotection of the amino group, product **3** was isolated. Other attempts to obtain **3**, such as via the classical introduction of the maleimide group on monoprotected diaminoethane by reaction of the free amine with maleic anhydride, either under acidic conditions or by dehydration,<sup>14</sup> gave comparatively poor yields.



**Scheme 2:** i) Boc<sub>2</sub>O, Dioxane/H<sub>2</sub>O/NaOH 1M, 0°C to RT, 30 min.; ii) Ph<sub>3</sub>P, DIAD, Maleimide, THF, RT, 1h; iii) TFA (40% in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 0°C, 1h.

To achieve the synthesis of molecules **6** and **7** (Scheme 3), the carboxylic acid functions of the lipopeptides **4** and **5** were activated with benzotriazol-*N*-oxytrisdimethylaminophosphonium hexafluorophosphate (BOP) at room temperature in the presence of diisopropylethylamine. Compound **3** was then added and the reaction was carried out for 12 hours. The final products **6,7** were obtained in about 70 to 80% yield.<sup>15</sup>



Scheme 3: Synthesis of the thiol-reactive lipopeptides Pam<sub>3</sub>CysAlaGlyMal **6** and Pam<sub>3</sub>CysSerSerMal **7**.

The amphiphilic properties of the TRLPs allowed their easy incorporation into liposomes,<sup>16</sup> which were then reacted with peptides-SH to form peptide-based vaccines (Figure 3).

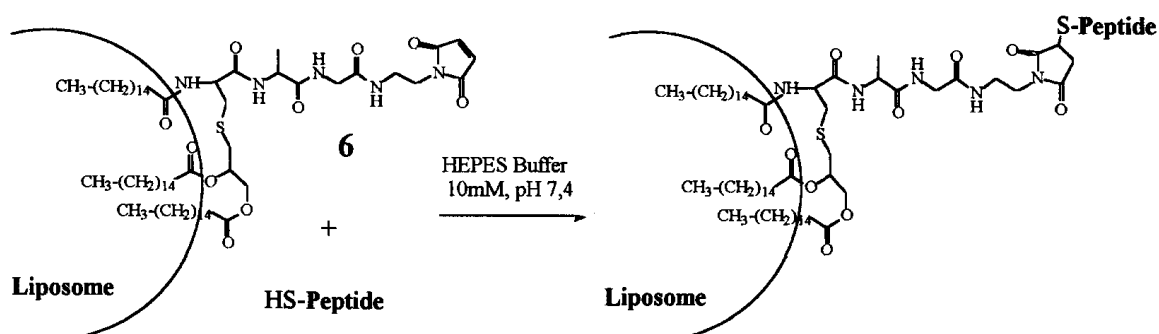


Figure 3: Coupling of Peptide-SH on preformed liposomes incorporating Pam<sub>3</sub>CysAlaGlyMal **6**.

*In conclusion*, the synthesis described here introduces the notion of “universal” lipopeptides. Molecules such as Pam<sub>3</sub>CysAlaGlyMal **6** and Pam<sub>3</sub>CysSerSerMal **7** react readily, under chemically defined conditions, with peptides-SH to provide lipopeptide-antigen conjugates. These novel thiol-reactive lipopeptides, when incorporated into liposomes, provide very versatile tools for the coupling of many different peptides that can be used for the preparation of synthetic vaccines. For example, constructs in which a B-cell epitope (from *Streptococcus mutans* adhesin I/II) and a “universal” Th-epitope (from tetanus toxin) were conjugated respectively to a functionalized phospholipid<sup>6a</sup> and to **6** gave, in BALB/c mice, remarkably potent and long lasting (over a year) humoral immune responses.<sup>8</sup>

## References and Notes

- (a) Jung, G.; Bessler, W.G. in Zeegers, N.D.; Boersma, W.J.A.; Claasen, E. (eds.) *Immunological Recognition of Peptides in Medicine and Biology* 1995, 159, CRC, Boca Raton (b) Prass, W.; Ringsdorf, H.; Bessler, W.; Wiesmüller, K.H.; Jung, G. *Biochim. Biophys. Acta* 1987, 900, 116. (c) Reitermann, A.; Metzger, J.; Wiesmüller, K.H.; Jung, G.; Bessler, W.G. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1989, 370, 343.
- (a) Lex, A.; Wiesmüller, K.H.; Jung, G.; Bessler, W.G. *J. Immunol.* 1986, 137, 2676. (b) Wiesmüller, K.H.; Jung, G.; Hess, G. *Vaccine* 1989, 7, 259.
- (a) Deres, K.; Schild, H.; Wiesmüller, K.H.; Jung, G.; Rammensee, H.G. *Nature* 1989, 342, 561. (b) Loleit, M.; Tröger, W.; Wiesmüller, K.H.; Jung, G.; Strecker, M.; Bessler, W.G. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1990, 371, 967. (c) Loleit, M.; Ihlenfeldt, H.G.; Brunjes, J.; Jung, G.; Muller, B.; Hoffmann, P.; Bessler, W.G.; Pierres, M.; Haas, G. *Immunobiology* 1996, 195, 61.
- (a) Deres, K.; Schild, H.; Wiesmüller, K.H.; Jung, G.; Rammensee, H.G. *Nature* 1989, 342, 561. (b) Loleit, M.; Tröger, W.; Wiesmüller, K.H.; Jung, G.; Strecker, M.; Bessler, W.G. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1990, 371, 967. (c) Loleit, M.; Ihlenfeldt, H.G.; Brunjes, J.; Jung, G.; Muller, B.; Hoffmann, P.; Bessler, W.G.; Pierres, M.; Haas, G. *Immunobiology* 1996, 195, 61.
- Alving, C.R.; Koulichin, V.; Glenn, G.M.; Rao, M. *Immunol. Rev.* 1995, 145, 5.
- (a) Frisch, B.; Muller, S.; Briand, J.-P.; Van Regenmortel, M.H.V.; Schuber, F. *Eur. J. Immunol.* 1991, 21, 185. (b) Friede, M.; Muller, S.; Briand, J.-P.; Van Regenmortel, M.H.V.; Schuber, F. *Mol. Immunol.* 1993, 30, 539. (c) Friede, M.; Muller, S.; Briand, J.-P.; Plaué, S.; Fernandes, I.; Frisch, F.; Schuber, F.; Van Regenmortel, M.H.V. *Vaccine* 1994, 12, 791. (d) Schuber, F.; Kichler, A.; Boeckler, C.; Frisch, B. *Pure Appl. Chem.* 1998, 70, 89.
- Fernandes, I.; Frisch, B.; Muller, S.; Schuber, F. *Mol. Immunol.* 1997, 34, 569.
- Boeckler, C.; Dautel, D.; Schelté, P.; Frisch, B.; Wachsmann, D.; Klein J.P.; Schuber F. (*in preparation*).
- (a) Metzger, J.; Wiesmüller, K.H.; Schaudé, R.; Bessler, W.G.; Jung, G. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1991, 37, 46. (b) Metzger, J.; Jung, G.; Bessler, W.G.; Hoffmann, P.; Strecker, M.; Lieberknecht, A.; Schmidt, U. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 1969. (c) Borges, E.; Wiesmüller, K.H.; Jung, G.; Walden, P. *J. Immunol. Methods* 1994, 173, 253.
- Metzger, J.; Wiesmüller, K.H.; Schaudé, R.; Bessler, W.G.; Jung, G. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1991, 37, 46.
- Frisch, B.; Boeckler, C.; Schuber, F. *Bioconjugate Chem.* 1996, 7, 180.
- Wiesmüller, K.H.; Bessler, W.G.; Jung, G. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1983, 364, 593.
- Walker, M. A. *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 665.
- (a) Rich, D.H.; Gesellchen, P.D.; Tong, A.; Cheung, A.; Buchner, C.K. *J. Med. Chem.* 1975, 18, 1004. (b) Witter, A.; Tuppy, H. *Biochim. Biophys. Acta* 1960, 45, 429. (c) Coleman, L.E.; Bork, J.F.; Dunn, H. *J. Org. Chem.* 1959, 24, 135.
- All new compounds gave spectroscopic data in agreement with the assigned structures. Compound 3 had  $^1\text{H NMR } \delta$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 6,93 (s, 2H, Mal), 3,86 (t,  $J=5,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{Mal}$ ), 3,20 (t,  $J=6,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ). Compound 6 had  $^1\text{H NMR } \delta$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) 6,73 (s, 2H, Mal), 5,19-5,13 (m, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{S}$ ), 4,56-4,51 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4,48-4,45 (m, 1H,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 4,39-4,12 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}$ ), 4,01-3,83 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CO}$ ), 3,95 (br, 2H,  $\text{CH}_2\text{Mal}$ ), 3,05-2,82 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CHNH}$ ), 2,97 (t,  $J=4,5$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Mal}$ ), 2,79-2,73 (m, 2H,  $\text{OCHCH}_2\text{S}$ ), 2,35-2,29 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 2,24 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 1,70-1,63 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1,39 (d,  $J=7,1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 1,29-1,22 (m, 72H,  $\text{CH}_2$ ), 0,87 (t,  $J=6,8$  Hz, 9H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); FAB MS (4-nitrobenzylic alcohol matrix): mass calculated for  $\text{C}_{65}\text{H}_{117}\text{O}_{10}\text{N}_5\text{S}$ :  $m$  1160;  $m/z$  1161 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]. Compound 7 had  $^1\text{H NMR } \delta$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) 6,73 (s, 2H, Mal), 5,19-5,13 (m, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{S}$ ), 4,56-4,51 (m, 1H,  $\text{NHCHCO}$ ), 4,48-4,45 (m, 2H,  $\text{CHCH}_2\text{OH}$ ), 4,39-4,12 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}$ ), 4,00-3,79 (m, 4H,  $\text{CHCH}_2\text{OH}$ ), 3,95 (br, 2H,  $\text{CH}_2\text{Mal}$ ), 3,05-2,82 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CHNH}$ ), 2,97 (t,  $J=4,5$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Mal}$ ), 2,79-2,73 (m, 2H,  $\text{OCHCH}_2\text{S}$ ), 2,35-2,29 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 2,24 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 1,70-1,63 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1,29-1,22 (m, 72H,  $\text{CH}_2$ ), 0,87 (t,  $J=6,8$  Hz, 9H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); FAB MS (4-nitrobenzylic alcohol matrix): mass calculated for  $\text{C}_{65}\text{H}_{119}\text{O}_{12}\text{N}_5\text{S}$ :  $m$  1206;  $m/z$  1207 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ].
- In brief, 6 was mixed with egg phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol and cholesterol (10/55/25/50 molar ratio) in chloroform. The solvent was evaporated to dryness under high vacuum and the lipid film was rehydrated in a 10 mM HEPES buffer containing 145 mM NaCl, pH 7.4, and sonicated. The liposomes obtained were reacted with the free peptide-SH for 12 hours at 4°C (100% yield as measured by the disappearance of maleimide group on the surface of the vesicles).



# Potentiel ostéogénique des CSMs sur CHI/HA

---

L'hypothèse que nous avons émise à propos de la formation des nodules sur les films CHI/HA, nous a incité à évaluer l'expression au sein de ces structures de certains marqueurs ostéoblastiques comme l'ostéopontine et l'ostéocalcine et dans cette perspective, d'avoir recours à une technique de coloration au Rouge d'alizarine pour confirmer que cet aspect tridimensionnel est dû à l'engagement de nos cellules dans une voie de différenciation ostéoblastique. Bien que cela ne soit pas notre thématique de recherche, nous avons essayé de profiter des moyens qui nous ont été apportés par l'équipe d'accueil EA BioS 4691, SFR Cap-Santé de la Faculté d'odontologie de l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

## B.1 Matériel et méthodes

La différenciation ostéoblastique a été induite par un mélange réalisé au sein de l'équipe, de  $\alpha$ -MEM contenant 10% SVE, 100 U/mL d'antibiotiques, 10 mM de  $\beta$ -glycérophosphate de sodium, 100 nM de dexaméthasone et 0,25 mM d'ascorbate de sodium. Ces produits ont été obtenus chez Sigma-Aldrich. Le milieu de culture était renouvelé tous les 3 jours pendant une période de culture de 15 jours. Après cette période de culture, les cellules ont été fixées dans du PBS 1X contenant 4% de PAF pendant 10 min à 4°C puis rincées au PBS.

L'immunomarquage ciblait les principales protéines non collagéniques constituant la partie organique de la matrice extracellulaire du tissu osseux : l'ostéopontine (marqueur précoce) et l'ostéocalcine (marqueur tardif), et il a été effectué selon le protocole décrit précédemment dans le chapitre matériel et méthodes. La révélation de la différenciation ostéogénique a été aussi réalisée par la coloration au rouge d'alizarine. Elle est utilisée pour identifier les dépôts calciques durant le processus de différenciation ostéogénique et donc la minéralisation de la matrice extracellulaire. Le calcium forme un complexe rouge avec le rouge d'alizarine par chélation.

Une solution aqueuse de rouge d'alizarine à 1% (v/v) ajustée avec de la soude à un pH 4.2 a été ajoutée dans chacun des puits durant une période de 30 sec à 5 min en fonction de l'apparition d'une coloration rouge/orangée. Les échantillons étaient ensuite

abondamment rincés au PBS puis observés par microscopie à fluorescence.

## B.2 Résultats

Les figures (Fig B.1) et (Fig B.2) ont été obtenues après observation au microscope à fluorescence. Les résultats montrent un marquage positif d'ostéocalcine et d'ostéopontine pour les CSMs stimulées sur CHI/HA alors qu'il n'y a pas de marquage pour les CSMs non stimulées.

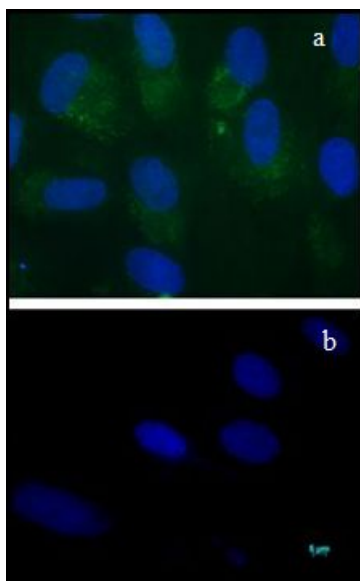


FIGURE B.1 – Photos du double marquage par immunofluorescence des noyaux (bleu) et d'ostéocalcine (FITC) des CSMs stimulées (a) et non stimulées (b) après 15 jours de culture sur CHI/HA (Zeiss Microscope, objectif\*63 oil), n=3

Les résultats de la coloration au rouge d'alizarines (Fig B.3) ont confirmé le potentiel ostéogénique des CSMsensemencées sur CHI/HA après 15 jours de différenciation ostéocytaire par révélation de la présence de dépôts calciques au sein de la matrice extracellulaire.

Nos résultats montrent que les CSMsensemencées sur CHI/HA sont capables de se différencier dans une voie ostéogénique. Des études supplémentaires sont bien sûr nécessaires pour confirmer ces données.

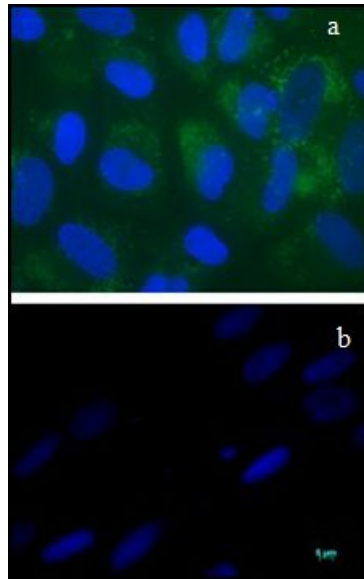


FIGURE B.2 – Photos du double marquage par immunofluorescence des noyaux (bleu) et d'ostéopontine (FITC) des CSMs stimulées (a) et non stimulées (b) après 15 jours de culture sur CHI/HA (Zeiss Microscope, objectif\*63 oil), n=3

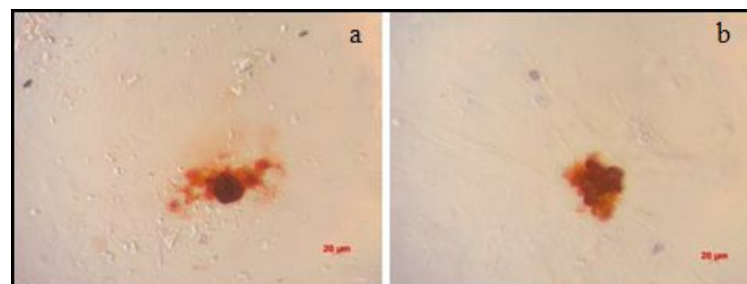


FIGURE B.3 – Evaluation des dépôts de minéralisation calcique après 15 jours de différenciation ostéogénique (culture en monocouche), après coloration par le rouge d'alizarine (Zeiss Microscope, objectif\*63 oil), n=3





# Bibliographie

- [Advincula et al., 1996] Advincula, R., Aust, E., Meyer, W., and Knoll, W. (1996). In situ investigations of polymer self-assembly solution adsorption by surface plasmon spectroscopy. *Langmuir*, 12(15) :3536–3540.
- [Agard et al., 2006] Agard, N. J., Baskin, J. M., Prescher, J. A., Lo, A., and Bertozzi, C. R. (2006). A comparative study of bioorthogonal reactions with azides. *ACS Chemical Biology*, 1(10) :644–648.
- [Aggarwal and Pittenger, 2005] Aggarwal, S. and Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4) :1815–1822.
- [Altman et al., 2002] Altman, G. H., Horan, R. L., Martin, I., Farhadi, J., Stark, P., Volloch, V., Richmond, J. C., Vunjak-Novakovic, G., and Kaplan, D. L. (2002). Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(2) :270–272.
- [Amaral et al., 2007] Amaral, I., Cordeiro, A., Sampaio, P., and Barbosa, M. (2007). Attachment, spreading and short-term proliferation of human osteoblastic cells cultured on chitosan films with different degrees of acetylation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(4) :469–485.
- [Anderson et al., 2011] Anderson, S. B., Lin, C.-C., Kuntzler, D. V., and Anseth, K. S. (2011). The performance of human mesenchymal stem cells encapsulated in cell-degradable polymer-peptide hydrogels. *Biomaterials*, 32(14) :3564–3574.
- [Autio et al., 1989] Autio, I., Malo-Ranta, U., Kallioniemi, O., and Nikkari, T. (1989). Cultured bovine aortic endothelial cells secrete factor (s) chemotactic for aortic smooth muscle cells. *Artery*, 16(2) :72.
- [Badylak et al., 2012] Badylak, S. F., Weiss, D. J., Caplan, A., and Macchiarini, P. (2012). Engineered whole organs and complex tissues. *The Lancet*, 379(9819) :943–952.
- [Balazs, 1966] Balazs, E. A. (1966). Sediment volume and viscoelastic behavior of hyaluronic acid solutions. In *Federation proceedings*, volume 25, page 1817.
- [Balguid et al., 2009] Balguid, A., Mol, A., van Vlimmeren, M. A., Baaijens, F. P., and Bouten, C. V. (2009). Hypoxia induces near-native mechanical properties in engineered heart valve tissue. *Circulation*, 119(2) :290–297.
- [Bartosh et al., 2010] Bartosh, T. J., Ylöstalo, J. H., Mohammadipoor, A., Bazhanov, N., Coble, K., Claypool, K., Lee, R. H., Choi, H., and Prockop, D. J. (2010). Aggregation of human mesenchymal stromal cells (mscs) into 3d spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31) :13724–13729.

- [Batten et al., 2006] Batten, P., Sarathchandra, P., Antoniow, J. W., Tay, S. S., Lowdell, M. W., Taylor, P. M., and Yacoub, M. H. (2006). Human mesenchymal stem cells induce t cell anergy and downregulate t cell allo-responses via the th2 pathway : relevance to tissue engineering human heart valves. *Tissue engineering*, 12(8) :2263–2273.
- [Berbis, 2010] Berbis, P. (2010). Acide hyaluronique et pathologie inflammatoire, auto-immune et cardio-vasculaire. In *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, volume 137, pages S40–S43. Elsevier.
- [Berger et al., 1972] Berger, K., Sauvage, L. R., Rao, A. M., and Wood, S. J. (1972). Healing of arterial prostheses in man : its incompleteness. *Annals of surgery*, 175(1) :118.
- [Berthelemy et al., 2008] Berthelemy, N., Kerdjoudj, H., Gaucher, C., Schaaf, P., Stoltz, J.-F., Lacolley, P., Voegel, J.-C., and Menu, P. (2008). Polyelectrolyte films boost progenitor cell differentiation into endothelium-like monolayers. *Advanced Materials*, 20(14) :2674–2678.
- [Blix, 1951] Blix, G. (1951). Hyaluronic acid in the pleural and peritoneal fluids from a case of mesothelioma. *Acta Societatis Medicorum Upsaliensis*, 56(1-2) :47.
- [Blodgett, 1934] Blodgett, K. B. (1934). Monomolecular films of fatty acids on glass. *Journal of the American Chemical Society*, 56(2) :495–495.
- [Blodgett and Langmuir, 1937] Blodgett, K. B. and Langmuir, I. (1937). Built-up films of barium stearate and their optical properties. *Physical Review*, 51(11) :964.
- [Boeckler et al., 1998] Boeckler, C., Frisch, B., and Schuber, F. (1998). Design and synthesis of thiol-reactive lipopeptides. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 8(15) :2055–2058.
- [Boldrin et al., 2010] Boldrin, L., Muntoni, F., and Morgan, J. E. (2010). Are human and mouse satellite cells really the same? *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 58(11) :941–955.
- [Bornhäuser et al., 2004] Bornhäuser, M., Eger, L., Oelschlaegel, U., Auffermann-Gretzinger, S., Kiani, A., Schetelig, J., Illmer, T., Schaich, M., Corbeil, D., Thiede, C., et al. (2004). Rapid reconstitution of dendritic cells after allogeneic transplantation of cd133+ selected hematopoietic stem cells. *Leukemia*, 19(1) :161–165.
- [Bot et al., 2008] Bot, P. T., Hofer, I. E., Piek, J. J., and Pasterkamp, G. (2008). Hyaluronic acid : targeting immune modulatory components of the extracellular matrix in atherosclerosis. *Current medicinal chemistry*, 15(8) :786–791.
- [Bottaro et al., 2002] Bottaro, D. P., LIEBMANN-VINSON, A., and Heidarani, M. A. (2002). Molecular signaling in bioengineered tissue microenvironments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961(1) :143–153.

- [Bourguignon et al., 2008] Bourguignon, L. Y., Peyrollier, K., Xia, W., and Gilad, E. (2008). Hyaluronan-cd44 interaction activates stem cell marker nanog, stat-3-mediated mdrl gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(25) :17635–17651.
- [Brine and Austin, 1981] Brine, C. J. and Austin, P. R. (1981). Chitin variability with species and method of preparation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Comparative Biochemistry*, 69(2) :283–286.
- [Buijtenhuijs et al., 2004] Buijtenhuijs, P., Buttafoco, L., Poot, A. A., Daamen, W. F., Van Kuppevelt, T. H., Dijkstra, P. J., De Vos, R. A., Sterk, L. M. T., Geelkerken, B. R., Feijen, J., et al. (2004). Tissue engineering of blood vessels : characterization of smooth-muscle cells for culturing on collagen-and-elastin-based scaffolds. *Biotechnology and applied biochemistry*, 39(2) :141–149.
- [Butler et al., 2009] Butler, L. M., Rainger, G., and Nash, G. B. (2009). A role for the endothelial glycosaminoglycan hyaluronan in neutrophil recruitment by endothelial cells cultured for prolonged periods. *Experimental cell research*, 315(19) :3433–3441.
- [Cao et al., 1992] Cao, G., Hong, H. G., and Mallouk, T. E. (1992). Layered metal phosphates and phosphonates : from crystals to monolayers. *Accounts of chemical research*, 25(9) :420–427.
- [Caruso et al., 1998] Caruso, F., Furlong, D. N., Ariga, K., Ichinose, I., and Kunitake, T. (1998). Characterization of polyelectrolyte-protein multilayer films by atomic force microscopy, scanning electron microscopy, and fourier transform infrared reflection-absorption spectroscopy. *Langmuir*, 14(16) :4559–4565.
- [Chatelet et al., 2001] Chatelet, C., Damour, O., and Domard, A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, 22(3) :261–268.
- [Chen et al., 2012] Chen, C.-W., Corselli, M., Péault, B., and Huard, J. (2012). Human blood-vessel-derived stem cells for tissue repair and regeneration. *BioMed Research International*, 2012.
- [Chen et al., 2004] Chen, S.-l., Fang, W.-w., Ye, F., Liu, Y.-H., Qian, J., Shan, S.-j., Zhang, J.-j., Chunhua, R. Z., Liao, L.-m., Lin, S., et al. (2004). Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*, 94(1) :92–95.
- [Chun et al., 2008] Chun, H. J., Kim, G.-W., and Kim, C.-H. (2008). Fabrication of porous chitosan scaffold in order to improve biocompatibility. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 69(5) :1573–1576.

- [Chung et al., 2004] Chung, Y.-C., Su, Y.-P., Chen, C.-C., Jia, G., Wang, H.-l., Wu, J. G., Lin, J.-G., et al. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25 :932–936.
- [Colavitti et al., 2002] Colavitti, R., Pani, G., Bedogni, B., Anzevino, R., Borrello, S., Waltenberger, J., and Galeotti, T. (2002). Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/kdr. *Journal of Biological Chemistry*, 277(5) :3101–3108.
- [Coma, 2008] Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78(1) :90–103.
- [Conte, 1998] Conte, M. S. (1998). The ideal small arterial substitute : a search for the holy grail? *The FASEB journal*, 12(1) :43–45.
- [Correia et al., 2011] Correia, C. R., Moreira-Teixeira, L. S., Moroni, L., Reis, R. L., van Blitterswijk, C. A., Karperien, M., and Mano, J. F. (2011). Chitosan scaffolds containing hyaluronic acid for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering Part C : Methods*, 17(7) :717–730.
- [Cummings et al., 2004] Cummings, C. L., Gawlitta, D., Nerem, R. M., and Stegemann, J. P. (2004). Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen–fibrin mixtures. *Biomaterials*, 25(17) :3699–3706.
- [Dahl et al., 2003] Dahl, S. L., Koh, J., Prabhakar, V., and Niklason, L. E. (2003). Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell transplantation*, 12(6) :659–666.
- [Das et al., 2008] Das, S., Bonaguidi, M., Muro, K., and Kessler, J. A. (2008). Generation of embryonic stem cells : limitations of and alternatives to inner cell mass harvest. *Neurosurgical focus*, 24(3-4) :E4.
- [Decher et al., 1992] Decher, G., Hong, J., and Schmitt, J. (1992). Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process : iii. consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin solid films*, 210 :831–835.
- [Delorme et al., 2009] Delorme, B., Ringe, J., Pontikoglou, C., Gaillard, J., Langonne, A., Sensebe, L., Noel, D., Jorgensen, C., Häupl, T., and Charbord, P. (2009). Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem cells*, 27(5) :1142–1151.
- [Denis, 2002] Denis, C. V. (2002). Molecular and cellular biology of von willebrand factor. *International journal of hematology*, 75(1) :3–8.
- [Deutsch et al., 1999] Deutsch, M., Meinhart, J., Fischlein, T., Preiss, P., and Zilla, P. (1999). Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal eptfe grafts in 100 patients : a 9-year experience. *Surgery*, 126(5) :847–855.

- [Deutsch et al., 2009] Deutsch, M., Meinhart, J., Zilla, P., Howanietz, N., Gorlitzer, M., Froeschl, A., Stuempflen, A., Bezuidenhout, D., and Grabenwoeger, M. (2009). Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal eptfe grafts. *Journal of vascular surgery*, 49(2) :352–362.
- [Devlieghere et al., 2004] Devlieghere, F., Vermeulen, A., and Debevere, J. (2004). Chitosan : antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6) :703–714.
- [Duijvestein et al., 2010] Duijvestein, M., Vos, A. C. W., Roelofs, H., Wildenberg, M. E., Wendrich, B. B., Verspaget, H. W., Kooy-Winkelaar, E. M., Koning, F., Zwaginga, J. J., Fidder, H. H., et al. (2010). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal crohn's disease : results of a phase i study. *Gut*, 59(12) :1662–1669.
- [Durrieu, 2005] Durrieu, M.-C. (2005). Conception, élaboration et caractérisation de matériaux bioactifs. *ITBM-RBM*, 26(3) :229–237.
- [Eliasson and Jönsson, 2010] Eliasson, P. and Jönsson, J.-I. (2010). The hematopoietic stem cell niche : low in oxygen but a nice place to be. *Journal of cellular physiology*, 222(1) :17–22.
- [Elsabee et al., 2008] Elsabee, M. Z., Abdou, E. S., Nagy, K. S., and Eweis, M. (2008). Surface modification of polypropylene films by chitosan and chitosan/pectin multilayer. *Carbohydrate polymers*, 71(2) :187–195.
- [Estes et al., 2004] Estes, B. T., Gimble, J. M., and Guilak, F. (2004). Mechanical signals as regulators of stem cell fate. *Current topics in developmental biology*, 60 :91–126.
- [Ezashi et al., 2005] Ezashi, T., Das, P., and Roberts, R. M. (2005). Low o<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hes cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(13) :4783–4788.
- [Fang et al., 1994] Fang, S. W., Li, C. F., and Shih, D. Y. (1994). Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. *Journal of Food Protection®*, 57(2) :136–140.
- [Fawzi-Grancher, 2006] Fawzi-Grancher, S. (2006). *Influence des facteurs biochimiques et mécaniques in vitro sur la prolifération cellulaire et la synthèse matricielle de fibroblastes. Applications en Ingénierie tissulaire*. PhD thesis.
- [Feaver et al., 2010] Feaver, R. E., Gelfand, B. D., Wang, C., Schwartz, M. A., and Blackman, B. R. (2010). Atheroprone hemodynamics regulate fibronectin deposition to create positive feedback that sustains endothelial inflammation. *Circulation research*, 106(11) :1703–1711.
- [Fermor et al., 1998] Fermor, B., Urban, J., Murray, D., Pocock, A., Lim, E., Francis, M., and Gage, J. (1998). Proliferation and collagen synthesis of human anterior cruciate

- ligament cells in vitro : Effects of ascorbate-2-phosphate, dexamethasone and oxygen tension. *Cell biology international*, 22(9-10) :635–640.
- [Foster and Kranc, 1989] Foster, E. and Kranc, M. (1989). Alternative conduits for aortocoronary bypass grafting. *Circulation*, 79(6 Pt 2) :I34.
- [Fouissac et al., 1992] Fouissac, E., Milas, M., Rinaudo, M., and Borsali, R. (1992). Influence of the ionic strength on the dimensions of sodium hyaluronate. *Macromolecules*, 25(21) :5613–5617.
- [Francis Suh and Matthew, 2000] Francis Suh, J.-K. and Matthew, H. W. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering : a review. *Biomaterials*, 21(24) :2589–2598.
- [Freed and Vunjak-Novakovic, 2002] Freed, L. E. and Vunjak-Novakovic, G. (2002). Spaceflight bioreactor studies of cells and tissues. *Advances in Space Biology and Medicine*, 8 :177–195.
- [Friedenstein et al., 1976] Friedenstein, A. J., Gorskaja, J., Kulagina, N., et al. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*, 4(5) :267–274.
- [Friedman et al., 2012] Friedman, A. J., Phan, J., Schairer, D. O., Champer, J., Qin, M., Pirouz, A., Blecher-Paz, K., Oren, A., Liu, P. T., Modlin, R. L., et al. (2012). Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan–alginate nanoparticles : A targeted therapy for cutaneous pathogens. *Journal of Investigative Dermatology*.
- [Furchgott and Zawadzki, 1980] Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.
- [Gaffney et al., 1985] Gaffney, J., West, D., Arnold, F., Sattar, A., and Kumar, S. (1985). Differences in the uptake of modified low density lipoproteins by tissue cultured endothelial cells. *Journal of cell science*, 79(1) :317–325.
- [Galley and Webster, 2004] Galley, H. and Webster, N. (2004). Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia*, 93(1) :105–113.
- [Gao et al., 2012] Gao, W., Lai, J. C., and Leung, S. W. (2012). Functional enhancement of chitosan and nanoparticles in cell culture, tissue engineering, and pharmaceutical applications. *Frontiers in physiology*, 3.
- [Gatej et al., 2005] Gatej, I., Popa, M., and Rinaudo, M. (2005). Role of the pH on hyaluronan behavior in aqueous solution. *Biomacromolecules*, 6(1) :61–67.
- [Gerecht et al., 2007] Gerecht, S., Burdick, J. A., Ferreira, L. S., Townsend, S. A., Langer, R., and Vunjak-Novakovic, G. (2007). Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27) :11298–11303.

- [Gottschling et al., 2007] Gottschling, S., Saffrich, R., Seckinger, A., Krause, U., Horsch, K., Miesala, K., and Ho, A. D. (2007). Human mesenchymal stromal cells regulate initial self-renewing divisions of hematopoietic progenitor cells by a  $\beta$ 1-integrin-dependent mechanism. *Stem Cells*, 25(3) :798–806.
- [Groh et al., 2005] Groh, M. E., Maitra, B., Szekely, E., and Koç, O. N. (2005). Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress allo-reactive t cells. *Experimental hematology*, 33(8) :928–934.
- [Guiducci et al., 2010] Guiducci, S., Porta, E., Saccardi, R., Guidi, S., Ibba-Manneschi, L., Manetti, M., Mazzanti, B., Dal Pozzo, S., Milia, A. F., Bellando-Randone, S., et al. (2010). Autologous mesenchymal stem cells foster revascularization of ischemic limbs in systemic sclerosis case report. *Annals of internal medicine*, 153(10) :650–654.
- [Hadidian and Pirie, 1948] Hadidian, Z. and Pirie, N. (1948). The preparation and some properties of hyaluronic acid from human umbilical cord. *Biochemical Journal*, 42(2) :260.
- [Hadwiger et al., 1994] Hadwiger, L. A., Ogawa, T., Kuyama, H., et al. (1994). Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 7(4) :531–533.
- [Hahn et al., 1999] Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., and Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400(6743) :464–468.
- [Hamilton et al., 2007] Hamilton, V., Yuan, Y., Rigney, D. A., Chesnutt, B. M., Puckett, A. D., Ong, J. L., Yang, Y., Haggard, W. O., Elder, S. H., and Bumgardner, J. D. (2007). Bone cell attachment and growth on well-characterized chitosan films. *Polymer International*, 56(5) :641–647.
- [Han et al., 2013] Han, F., Jia, X., Dai, D., Yang, X., Zhao, J., Zhao, Y., Fan, Y., and Yuan, X. (2013). Performance of a multilayered small-diameter vascular scaffold dual-loaded with vegf and pdgf. *Biomaterials*.
- [Harb et al., 2008] Harb, N., Archer, T. K., and Sato, N. (2008). The rho-rock-myosin signaling axis determines cell-cell integrity of self-renewing pluripotent stem cells. *PLoS One*, 3(8) :e3001.
- [Harrison et al., 2002] Harrison, J. S., Rameshwar, P., Chang, V., and Bandari, P. (2002). Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood*, 99(1) :394–394.
- [Haynie et al., 2005] Haynie, D. T., Zhang, L., Rudra, J. S., Zhao, W., Zhong, Y., and Palath, N. (2005). Polypeptide multilayer films. *Biomacromolecules*, 6(6) :2895–2913.



- [Heinis et al., 2010] Heinis, M., Simon, M.-T., Ilc, K., Mazure, N. M., Pouysségur, J., Scharfmann, R., and Duvillié, B. (2010). Oxygen tension regulates pancreatic  $\beta$ -cell differentiation through hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Diabetes*, 59(3) :662–669.
- [Hejazi and Amiji, 2003] Hejazi, R. and Amiji, M. (2003). Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 89(2) :151–165.
- [Herrero and Pérez-Simón, 2010] Herrero, C. and Pérez-Simón, J. (2010). Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(5) :425–430.
- [Herring, 1978] Herring, M. (1978). A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery*, 84 :498–504.
- [Herring et al., 1994] Herring, M., Smith, J., Dalsing, M., Glover, J., Compton, R., Etchberger, K., and Zollinger, T. (1994). Endothelial seeding of polytetrafluoroethylene femoral popliteal bypasses : the failure of low-density seeding to improve patency. *Journal of vascular surgery*, 20(4) :650–655.
- [Hibi et al., 2006] Hibi, H., Yamada, Y., Ueda, M., and Endo, Y. (2006). Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 35(6) :551–555.
- [Hirai et al., 1994] Hirai, J., Kanda, K., Oka, T., and Matsuda, T. (1994). Highly oriented, tubular hybrid vascular tissue for a low pressure circulatory system. *ASAIO journal*, 40(3) :M383–M388.
- [Hoogeveen et al., 1996] Hoogeveen, N. G., Cohen Stuart, M. A., Fler, G. J., and Böhrmer, M. R. (1996). Formation and stability of multilayers of polyelectrolytes. *Langmuir*, 12(15) :3675–3681.
- [Hori et al., 2001] Hori, Y., Nakamura, T., Matsumoto, K., Kurokawa, Y., Satomi, S., and Shimizu, Y. (2001). Tissue engineering of the small intestine by acellular collagen sponge scaffold grafting. *The International journal of artificial organs*, 24(1) :50–54.
- [Hsu et al., 2004] Hsu, S.-h., Whu, S. W., Hsieh, S.-C., Tsai, C.-L., Chen, D. C., and Tan, T.-S. (2004). Evaluation of chitosan-alginate-hyaluronate complexes modified by an rgd-containing protein as tissue-engineering scaffolds for cartilage regeneration. *Artificial organs*, 28(8) :693–703.
- [Hu et al., 2012] Hu, J., Xie, C., Ma, H., Yang, B., Ma, P. X., and Chen, Y. E. (2012). Construction of vascular tissues with macro-porous nano-fibrous scaffolds and smooth muscle cells enriched from differentiated embryonic stem cells. *PloS one*, 7(4) :e35580.
- [Huang et al., 2011] Huang, G.-S., Dai, L.-G., Yen, B. L., and Hsu, S.-h. (2011). Spheroid formation of mesenchymal stem cells on chitosan and chitosan-hyaluronan membranes. *Biomaterials*, 32(29) :6929–6945.

- [Hussain et al., 2013] Hussain, A., Collins, G., Yip, D., and Cho, C. H. (2013). Functional 3-d cardiac co-culture model using bioactive chitosan nanofiber scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(2) :637–647.
- [Hutmacher et al., 2001] Hutmacher, D., Goh, J., and Teoh, S. (2001). An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 30(2) :183–191.
- [Hutmacher et al., 2007] Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Lam, C. X. F, Tan, K. C., and Lim, T. C. (2007). State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1(4) :245–260.
- [Iler, 1966] Iler, R. (1966). Multilayers of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 21(6) :569–594.
- [Isenberg et al., 2006] Isenberg, B. C., Williams, C., and Tranquillo, R. T. (2006). Small-diameter artificial arteries engineered in vitro. *Circulation research*, 98(1) :25–35.
- [Ishihara et al., 2012] Ishihara, M., Fujita, M., Kishimoto, S., Hattori, H., and Kanatani, Y. (2012). Biological, chemical, and physical compatibility of chitosan and biopharmaceuticals. *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals : Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics*, pages 93–106.
- [Ishii et al., 2008] Ishii, K., Yoshida, Y., Akechi, Y., Sakabe, T., Nishio, R., Ikeda, R., Terabayashi, K., Matsumi, Y., Gonda, K., Okamoto, H., et al. (2008). Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3 $\beta$ . *Hepatology*, 48(2) :597–606.
- [James et al., 1992] James, N. L., Schindhelm, K., Slowiaczek, P., Milthorpe, B., Graham, A. R., Munro, V. E., Johnson, G., and Steele, J. G. (1992). In vivo patency of endothelial cell-lined expanded polytetrafluoroethylene prostheses in an ovine model. *Artificial organs*, 16(4) :346–353.
- [Jeanloz and Flowers, 1962] Jeanloz, R. W. and Flowers, H. M. (1962). The isolation and synthesis of the methyl ester-methyl  $\alpha$ -glycoside of 3-o- $\beta$ -d-glucuronosyl-n-acetyl-d-glucosamine (hyalobiuronic acid). *Journal of the American Chemical Society*, 84(15) :3030–3030.
- [Jing et al., 2010] Jing, D., Fonseca, A.-V., Alakel, N., Fierro, F. A., Muller, K., Bornhauser, M., Ehninger, G., Corbeil, D., and Ordemann, R. (2010). Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells-modeling the niche compartments in vitro. *haematologica*, 95(4) :542–550.
- [Jockenhoevel et al., 2001] Jockenhoevel, S., Zund, G., Hoerstrup, S. P., Chalabi, K., Sachweh, J. S., Demircan, L., Messmer, B. J., and Turina, M. (2001). Fibrin gel-advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *European journal of cardio-thoracic surgery*, 19(4) :424–430.

- [Kale et al., 2003] Kale, S., Karihaloo, A., Clark, P. R., Kashgarian, M., Krause, D. S., Cantley, L. G., et al. (2003). Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *Journal of Clinical Investigation*, 112(1) :42–49.
- [Kanda et al., 1993] Kanda, K., Matsuda, T., and Oka, T. (1993). Mechanical stress induced cellular orientation and phenotypic modulation of 3-d cultured smooth muscle cells. *ASAIO journal*, 39(3) :M691.
- [Kang et al., 2012] Kang, Y., Kim, S., Bishop, J., Khademhosseini, A., and Yang, Y. (2012). The osteogenic differentiation of human bone marrow mscs on huvec-derived ecm and  $\beta$ -tcp scaffold. *Biomaterials*.
- [Karageorgiou and Kaplan, 2005] Karageorgiou, V. and Kaplan, D. (2005). Porosity of 3d biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27) :5474–5491.
- [Kasahara et al., 2003] Kasahara, H., Tanaka, E., Fukuyama, N., Sato, E., Sakamoto, H., Tabata, Y., Ando, K., Iseki, H., Shinozaki, Y., Kimura, K., et al. (2003). Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(6) :1056–1062.
- [Kelm et al., 2010] Kelm, J. M., Lorber, V., Snedeker, J. G., Schmidt, D., Broggini-Tenzer, A., Weisstanner, M., Odermatt, B., Mol, A., Zund, G., and Hoerstrup, S. P. (2010). A novel concept for scaffold-free vessel tissue engineering : self-assembly of microtissue building blocks. *J. Biotechnol.*, 148(1) :46–55.
- [Khoo et al., 2008] Khoo, M. L., Shen, B., Tao, H., and Ma, D. D. (2008). Long-term serial passage and neuronal differentiation capability of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 17(5) :883–896.
- [Kiatpongsan, 2007] Kiatpongsan, S. (2007). From embryonic stem cells to functioning germ cells : science, clinical and ethical perspectives. *JOURNAL-MEDICAL ASSOCIATION OF THAILAND*, 90(10) :2233.
- [Kim et al., 2008] Kim, I.-Y., Seo, S.-J., Moon, H.-S., Yoo, M.-K., Park, I.-Y., Kim, B.-C., and Cho, C.-S. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26(1) :1–21.
- [Kim et al., 2009] Kim, J. B., Sebastiano, V., Wu, G., Araúzo-Bravo, M. J., Sasse, P., Gentile, L., Ko, K., Ruau, D., Ehrich, M., van den Boom, D., et al. (2009). Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 136(3) :411–419.
- [Kim et al., 2002] Kim, Y.-S., Kown, S.-Y., Park, Y.-G., and Chung, K.-R. (2002). Clinical application of the tongue elevator. *Journal of clinical orthodontics : JCO*, 36(2) :104.
- [Kishimoto, 1998] Kishimoto, T. (1998). *Leucocyte Typing VI : White Cell Differentiation Antigens : Proceedings of the Sixth International Workshop and Conference Held in Kobe, Japan, 10-14 November 1996*. Garland Pub.

- [Kiyozumi et al., 2007] Kiyozumi, T., Kanatani, Y., Ishihara, M., Saitoh, D., Shimizu, J., Yura, H., Suzuki, S., Okada, Y., and Kikuchi, M. (2007). The effect of chitosan hydrogel containing dmem/f12 medium on full-thickness skin defects after deep dermal burn. *Burns*, 33(5) :642–648.
- [Kleinman et al., 2003] Kleinman, H. K., Philp, D., and Hoffman, M. P. (2003). Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Current opinion in biotechnology*, 14(5) :526–532.
- [Klinkert et al., 2004] Klinkert, P., Post, P., Breslau, P., and Van Bockel, J. (2004). Saphenous vein versus ptfе for above-knee femoropopliteal bypass. a review of the literature. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 27(4) :357–362.
- [Kolodgie et al., 2004] Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Wight, T. N., and Virmani, R. (2004). The accumulation of specific types of proteoglycans in eroded plaques : a role in coronary thrombosis in the absence of rupture. *Current opinion in lipidology*, 15(5) :575–582.
- [Kondo et al., 2003] Kondo, M., Wagers, A. J., Manz, M. G., Prohaska, S. S., Scherer, D. C., Beilhack, G. F., Shizuru, J. A., and Weissman, I. L. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors : implications for clinical application. *Annual review of immunology*, 21(1) :759–806.
- [Korossis et al., 2005] Korossis, S., Wilcox, H., Watterson, K., Kearney, J., Ingham, E., and Fisher, J. (2005). In-vitro assessment of the functional performance of the decellularized intact porcine aortic root. *The Journal of heart valve disease*, 14(3) :408.
- [Krijgsman et al., 2002] Krijgsman, B., Seifalian, A. M., Salacinski, H. J., Tai, N. R., Punshon, G., Fuller, B. J., and Hamilton, G. (2002). An assessment of covalent grafting of rgd peptides to the surface of a compliant poly (carbonate-urea) urethane vascular conduit versus conventional biological coatings : its role in enhancing cellular retention. *Tissue engineering*, 8(4) :673–680.
- [Krupinski et al., 2007] Krupinski, J., Ethirajan, P., Font, M. A., Turu, M. M., Gaffney, J., Kumar, P., and Slevin, M. (2007). Changes in hyaluronan metabolism and rhamn receptor expression accompany formation of complicated carotid lesions and may be pro-angiogenic mediators of intimal neovessel growth. *Biomarker insights*, 2 :361.
- [Kubota et al., 2008] Kubota, Y., Takubo, K., and Suda, T. (2008). Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche. *Biochemical and biophysical research communications*, 366(2) :335–339.
- [Kuilman et al., 2010] Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes & development*, 24(22) :2463–2479.
- [Kujawa et al., 2005] Kujawa, P., Moraille, P., Sanchez, J., Badia, A., and Winnik, F. M. (2005). Effect of molecular weight on the exponential growth and morphology of

- hyaluronan/chitosan multilayers : A surface plasmon resonance spectroscopy and atomic force microscopy investigation. *Journal of the American Chemical Society*, 127(25) :9224–9234.
- [Kumar et al., 2004] Kumar, M. R., Muzzarelli, R., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., and Domb, A. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews*, 104(12) :6017–6084.
- [Ladam et al., 2000] Ladam, G., Schaad, P., Voegel, J., Schaaf, P., Decher, G., and Cuisinier, F. (2000). In situ determination of the structural properties of initially deposited polyelectrolyte multilayers. *Langmuir*, 16(3) :1249–1255.
- [Laflamme et al., 2000] Laflamme, P., Benhamou, N., Bussi eres, G., and Dessureault, M. (2000). Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Canadian journal of botany*, 77(10) :1460–1468.
- [Lamm et al., 2001] Lamm, P., Juchem, G., Milz, S., Schuffenhauer, M., and Reichart, B. (2001). Autologous endothelialized vein allograft a solution in the search for small-caliber grafts in coronary artery bypass graft operations. *Circulation*, 104(suppl 1) :I–108.
- [Langer, 2013] Langer, R. (2013). Biomaterials and biotechnology : From the discovery of the first angiogenesis inhibitors to the development of controlled drug delivery systems and the foundation of tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*.
- [Laurencin et al., 2008] Laurencin, C. T., Jiang, T., Kumbar, S. G., and Nair, L. S. (2008). Biologically active chitosan systems for tissue engineering and regenerative medicine. *Current topics in medicinal chemistry*, 8(4) :354–364.
- [Le Blanc et al., 2008] Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M. E., Remberger, M., et al. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease : a phase ii study. *The Lancet*, 371(9624) :1579–1586.
- [Le D ev edec et al., 2008] Le D ev edec, F., Bazinet, L., Furtos, A., Venne, K., Brunet, S., and Mateescu, M. A. (2008). Separation of chitosan oligomers by immobilized metal affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1194(2) :165–171.
- [Lee et al., 2009] Lee, R. H., Pulin, A. A., Seo, M. J., Kota, D. J., Ylostalo, J., Larson, B. L., Semprun-Prieto, L., Delafontaine, P., and Prockop, D. J. (2009). Intravenous hmscs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein tsg-6. *Cell Stem Cell*, 5(1) :54–63.
- [Lertsutthiwong et al., 2002] Lertsutthiwong, P., How, N. C., Chandkrachang, S., and Stevens, W. F. (2002). Effect of chemical treatment on the characteristics of shrimp chitosan. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 12(1) :11–18.

- [Levy et al., 1998] Levy, N. S., Chung, S., Furneaux, H., and Levy, A. P. (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mrna by the rna-binding protein hur. *Journal of Biological Chemistry*, 273(11) :6417–6423.
- [L'Heureux et al., 2007a] L'Heureux, N., Dusserre, N., Marini, A., Garrido, S., de la Fuente, L., and McAllister, T. (2007a). Technology insight : the evolution of tissue-engineered vascular grafts—from research to clinical practice. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 4(7) :389–395.
- [L'Heureux et al., 1993] L'Heureux, N., Germain, L., Labbé, R., and Auger, F. A. (1993). In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells : a morphologic study. *Journal of vascular surgery*, 17(3) :499–509.
- [L'Heureux et al., 2007b] L'Heureux, N., McAllister, T. N., and de la Fuente, L. M. (2007b). Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *New England Journal of Medicine*, 357(14) :1451–1453.
- [L'heureux et al., 1998] L'heureux, N., Pâquet, S., Labbé, R., Germain, L., and Auger, F. A. (1998). A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *The FASEB Journal*, 12(1) :47–56.
- [Li et al., 2009] Li, G., Zhang, X.-a., Wang, H., Wang, X., Meng, C.-l., Chan, C.-y., Yew, D. T. W., Tsang, K. S., Li, K., Tsai, S.-n., et al. (2009). Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta : implication in the migration. *Proteomics*, 9(1) :20–30.
- [Li and Xie, 2005] Li, L. and Xie, T. (2005). Stem cell niche : structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21 :605–631.
- [Limam et al., 2011] Limam, Z., Selmi, S., Sadok, S., and El Abed, A. (2011). Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products : Biological and physicochemical properties. *African journal of biotechnology*, 10(4) :640–647.
- [Liu et al., 2011] Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G., Chen, J., et al. (2011). Microbial production of hyaluronic acid : current state, challenges, and perspectives. *Microbial cell factories*, 10(1) :1–9.
- [Liu et al., 2010] Liu, Z.-M., Gu, Q., Xu, Z.-K., and Groth, T. (2010). Synergistic effect of polyelectrolyte multilayers and osteogenic growth medium on differentiation of human mesenchymal stem cells. *Macromolecular bioscience*, 10(9) :1043–1054.
- [Lo et al., 2003] Lo, T., Chay, S., Cao, T., Lim, J., and Teoh, S. (2003). Osteogenic role of vascular endothelial growth factor in bone regeneration. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 32(5 Suppl) :S50.
- [Lutolf and Hubbell, 2005] Lutolf, M. and Hubbell, J. (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature biotechnology*, 23(1) :47–55.

- [Lvov et al., 1999] Lvov, Y., Ariga, K., Onda, M., Ichinose, I., and Kunitake, T. (1999). A careful examination of the adsorption step in the alternate layer-by-layer assembly of linear polyanion and polycation. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 146(1) :337–346.
- [M Carvalho et al., 2011] M Carvalho, M., G Teixeira, F., L Reis, R., Sousa, N., and J Salgado, A. (2011). Mesenchymal stem cells in the umbilical cord : phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 6(3) :221–228.
- [Majesky et al., 2011] Majesky, M. W., Dong, X. R., Hognlund, V., Mahoney, W. M., and Daum, G. (2011). The adventitia a dynamic interface containing resident progenitor cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(7) :1530–1539.
- [Mammoto et al., 2012] Mammoto, A., Mammoto, T., and Ingber, D. E. (2012). Mechanosensitive mechanisms in transcriptional regulation. *Journal of cell science*, 125(13) :3061–3073.
- [Margossian et al., 2012] Margossian, T., Reppel, L., Makdissy, N., Stoltz, J.-F., Bensoussan, D., and Huselstein, C. (2012). Mesenchymal stem cells derived from wharton's jelly : Comparative phenotype analysis between tissue and in vitro expansion. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 22(4) :243–254.
- [Marin et al., 2001] Marin, V., Kaplanski, G., Gres, S., Farnarier, C., and Bongrand, P. (2001). Endothelial cell culture : protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *Journal of immunological methods*, 254(1) :183–190.
- [Marui et al., 1997] Marui, T., Niyibizi, C., Georgescu, H. I., Cao, M., Kavalkovich, K. W., Levine, R. E., and Woo, S. L.-Y. (1997). Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts. *Journal of orthopaedic research*, 15(1) :18–23.
- [Maurstad et al., 2013] Maurstad, G., Stokke, B. T., Vårum, K. M., and Strand, S. P. (2013). Pegylated chitosan complexes dna while improving polyplex colloidal stability and gene transfection efficiency. *Carbohydrate polymers*, 94(1) :436–443.
- [Mazzucotelli et al., 1994] Mazzucotelli, J., Moczar, M., Zede, L., Bambang, L., and Loisanche, D. (1994). Human vascular endothelial cells on expanded ptfe precoated with an engineered protein adhesion factor. *The International journal of artificial organs*, 17(2) :112.
- [McAllister et al., 2009] McAllister, T. N., Maruszewski, M., Garrido, S. A., Wystrychowski, W., Dusserre, N., Marini, A., Zagalski, K., Fiorillo, A., Avila, H., Manglano, X., et al. (2009). Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft : a multicentre cohort study. *The Lancet*, 373(9673) :1440–1446.

- [McGuigan and Sefton, 2007] McGuigan, A. P. and Sefton, M. V. (2007). The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity. *Biomaterials*, 28(16) :2547–2571.
- [McLaren, 2001] McLaren, A. (2001). Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature*, 414(6859) :129–131.
- [Meisel et al., 2004] Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., and Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic t-cell responses by indoleamine 2, 3-dioxygenase–mediated tryptophan degradation. *Blood*, 103(12) :4619–4621.
- [Menasché, 2012] Menasché, P. (2012). Ingénierie des conduits vasculaires. *e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie*, 11(3) :037–041.
- [Meyer and Palmer, 1934] Meyer, K. and Palmer, J. W. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 107(3) :629–634.
- [Minagawa et al., 2007] Minagawa, T., Okamura, Y., Shigemasa, Y., Minami, S., and Okamoto, Y. (2007). Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 67(4) :640–644.
- [Mironov et al., 2009] Mironov, V., Visconti, R. P., Kasyanov, V., Forgacs, G., Drake, C. J., and Markwald, R. R. (2009). Organ printing : tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*, 30(12) :2164–2174.
- [Montebault et al., 2006] Montebault, A., Tahiri, K., Korwin-Zmijowska, C., Chevalier, X., Corvol, M.-T., and Domard, A. (2006). A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels : application to cartilage tissue engineering. *Biochimie*, 88(5) :551–564.
- [Mooney et al., 1996] Mooney, D., Mazzoni, C., Breuer, C., McNamara, K., Hern, D., Vacanti, J., and Langer, R. (1996). Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering. *Biomaterials*, 17(2) :115–124.
- [Moreau et al., 2005] Moreau, J. E., Chen, J., Horan, R. L., Kaplan, D. L., and Altman, G. H. (2005). Sequential growth factor application in bone marrow stromal cell ligament engineering. *Tissue engineering*, 11(11-12) :1887–1897.
- [Moriyama et al., 2011] Moriyama, M., Kubota, S., Tashiro, H., and Tonami, H. (2011). Evaluation of prosthetic venous valves, fabricated by electrospinning, for percutaneous treatment of chronic venous insufficiency. *Journal of Artificial Organs*, 14(4) :294–300.
- [Morrison and Spradling, 2008] Morrison, S. J. and Spradling, A. C. (2008). Stem cells and niches : mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 132(4) :598–611.



- [Muzzarelli et al., 2004] Muzzarelli, C., Stanic, V., Gobbi, L., Tosi, G., and Muzzarelli, R. A. (2004). Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterisation of the microspheres. *Carbohydrate Polymers*, 57(1) :73–82.
- [Muzzarelli, 2011] Muzzarelli, R. A. (2011). Biomedical exploitation of chitin and chitosan via mechano-chemical disassembly, electrospinning, dissolution in imidazolium ionic liquids, and supercritical drying. *Marine drugs*, 9(9) :1510–1533.
- [Muzzarelli and Rocchetti, 1985] Muzzarelli, R. A. and Rocchetti, R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 5(6) :461–472.
- [Nagapudi et al., 2005] Nagapudi, K., Brinkman, W. T., Thomas, B. S., Park, J. O., Srinivasarao, M., Wright, E., Conticello, V. P., and Chaikof, E. L. (2005). Viscoelastic and mechanical behavior of recombinant protein elastomers. *Biomaterials*, 26(23) :4695–4706.
- [Nekanti et al., 2010] Nekanti, U., Dastidar, S., Venugopal, P., Totey, S., and Ta, M. (2010). Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. *International journal of biological sciences*, 6(5) :499.
- [Nettles et al., 2002] Nettles, D. L., Elder, S. H., and Gilbert, J. A. (2002). Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. *Tissue engineering*, 8(6) :1009–1016.
- [Netzer and Sagiv, 1983] Netzer, L. and Sagiv, J. (1983). A new approach to construction of artificial monolayer assemblies. *Journal of the American Chemical Society*, 105(3) :674–676.
- [Niklason et al., 1999] Niklason, L., Gao, J., Abbott, W., Hirschi, K., Houser, S., Marini, R., and Langer, R. (1999). Functional arteries grown in vitro. *Science*, 284(5413) :489–493.
- [Nishibe et al., 2001] Nishibe, T., O'Donnell, S., Pikoulis, E., Rich, N., Okuda, Y., Kumada, T., Kudo, F., Tanabe, T., and Yasuda, K. (2001). Effects of fibronectin bonding on healing of high porosity expanded polytetrafluoroethylene grafts in pigs. *The Journal of cardiovascular surgery*, 42(5) :667.
- [No et al., 2002] No, H. K., Young Park, N., Ho Lee, S., and Meyers, S. P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International journal of food microbiology*, 74(1) :65–72.
- [Nugent and Edelman, 2003] Nugent, H. M. and Edelman, E. R. (2003). Tissue engineering therapy for cardiovascular disease. *Circulation research*, 92(10) :1068–1078.

- [Oliveira et al., 2008] Oliveira, S. M., Amaral, I. F., Barbosa, M. A., and Teixeira, C. C. (2008). Engineering endochondral bone : in vitro studies. *Tissue Engineering Part A*, 15(3) :625–634.
- [Orr et al., 2009] Orr, A. W., Hastings, N. E., Blackman, B. R., and Wamhoff, B. R. (2009). Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis. *Journal of vascular research*, 47(2) :168–180.
- [Papineau et al., 1991] Papineau, A. M., Hoover, D. G., Knorr, D., and Farkas, D. F. (1991). Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*, 5(1) :45–57.
- [Petzold et al., 2012] Petzold, G., Petzold-Welcke, K., Qi, H., Stengel, K., Schwarz, S., and Heinze, T. (2012). The removal of stickies with modified starch and chitosan—highly cationic and hydrophobic types compared with unmodified ones. *Carbohydrate polymers*.
- [Platt, 2004] Platt, J. L. (2004). Preface : future approaches to replacement of organs. *American Journal of Transplantation*, 4(s6) :5–6.
- [Pucéat, 2008] Pucéat, M. (2008). Protocols for cardiac differentiation of embryonic stem cells. *Methods*, 45(2) :168–171.
- [Raafat and Sahl, 2009] Raafat, D. and Sahl, H.-G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2(2) :186–201.
- [Radisic et al., 2006] Radisic, M., Park, H., Chen, F., Salazar-Lazzaro, J. E., Wang, Y., Dennis, R., Langer, R., Freed, L. E., and Vunjak-Novakovic, G. (2006). Biomimetic approach to cardiac tissue engineering : oxygen carriers and channeled scaffolds. *Tissue engineering*, 12(8) :2077–2091.
- [Ramsden et al., 1995] Ramsden, J., Lvov, Y. M., and Decher, G. (1995). Determination of optical constants of molecular films assembled via alternate polyion adsorption. *Thin Solid Films*, 254(1) :246–251.
- [Ravi and Chaikof, 2010] Ravi, S. and Chaikof, E. L. (2010). Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regenerative medicine*, 5(1) :107–120.
- [Ravi Kumar, 2000] Ravi Kumar, M. N. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 46(1) :1–27.
- [Remunan-Lopez and Bodmeier, 1996] Remunan-Lopez, C. and Bodmeier, R. (1996). Effect of formulation and process variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates. *International Journal of pharmaceuticals*, 135(1) :63–72.
- [Ren et al., 2009] Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L’huillie, A., Zhang, J., Lu, Y., Roberts, A. I., Ji, W., et al. (2009). Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*, 27(8) :1954–1962.

- [Richert et al., 2004] Richert, L., Lavalle, P., Payan, E., Shu, X. Z., Prestwich, G. D., Stoltz, J.-F., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Picart, C. (2004). Layer by layer buildup of polysaccharide films : physical chemistry and cellular adhesion aspects. *Langmuir*, 20(2) :448–458.
- [Rinaudo, 2006] Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan : properties and applications. *Progress in polymer science*, 31(7) :603–632.
- [Roeder et al., 1999] Roeder, R., Wolfe, J., Lianakis, N., Hinson, T., Geddes, L., and Obermiller, J. (1999). Compliance, elastic modulus, and burst pressure of small-intestine submucosa (sis), small-diameter vascular grafts. *Journal of biomedical materials research*, 47(1) :65–70.
- [Roller and Covill, 1999] Roller, S. and Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 47(1) :67–77.
- [Rosenman et al., 1985] Rosenman, J., Kempczinski, R., Pearce, W., and Silberstein, E. B. (1985). Kinetics of endothelial cell seeding. *Journal of vascular surgery*, 2(6) :778–784.
- [Rosova et al., 2008] Rosova, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D., and Nolte, J. A. (2008). Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem cells*, 26(8) :2173–2182.
- [Ross, 1993] Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s.
- [Sato et al., 2007] Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of t-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*, 109(1) :228–234.
- [Schneider et al., 1988] Schneider, P. A., Hanson, S. R., Price, T. M., and Harker, L. A. (1988). Preformed confluent endothelial cell monolayers prevent early platelet deposition on vascular prostheses in baboons. *Journal of vascular surgery*, 8(3) :229–235.
- [Seliktar et al., 2000] Seliktar, D., Black, R. A., Vito, R. P., and Nerem, R. M. (2000). Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro. *Annals of biomedical engineering*, 28(4) :351–362.
- [Sell, 2001] Sell, S. (2001). Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology*, 33(3) :738–750.
- [Seyfarth et al., 2008] Seyfarth, F., Schliemann, S., Elsner, P., and Hipler, U.-C. (2008). Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and *n*-acetyl-d-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *International journal of pharmaceuticals*, 353(1) :139–148.

- [Shakesheff and Rose, 2012] Shakesheff, K. M. and Rose, F. R. (2012). Tissue engineering in the development of replacement technologies. In *New Technologies for Toxicity Testing*, pages 47–57. Springer.
- [Shum-Tim et al., 1999] Shum-Tim, D., Stock, U., Hrkach, J., Shinoka, T., Lien, J., Moses, M. A., Stamp, A., Taylor, G., Moran, A. M., Landis, W., et al. (1999). Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. *The Annals of thoracic surgery*, 68(6) :2298–2304.
- [Sorrentino, 2004] Sorrentino, B. P. (2004). Clinical strategies for expansion of haematopoietic stem cells. *Nature Reviews Immunology*, 4(11) :878–888.
- [Stappenbeck and Miyoshi, 2009] Stappenbeck, T. S. and Miyoshi, H. (2009). The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science*, 324(5935) :1666–1669.
- [Stoffyn and Jeanloz, 1954] Stoffyn, P. J. and Jeanloz, R. W. (1954). Identification of amino sugars by paper chromatography. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 52(2) :373–379.
- [Stroka et al., 2001] Stroka, D. M., BURKHARDT, T., DESBAILLETS, I., WENGER, R. H., NEIL, D. A., BAUER, C., Gassmann, M., and CANDINAS, D. (2001). Hif-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *The FASEB Journal*, 15(13) :2445–2453.
- [Sudarshan et al., 1992] Sudarshan, N., Hoover, D., and Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6(3) :257–272.
- [Sun et al., 2010] Sun, L., Wang, D., Liang, J., Zhang, H., Feng, X., Wang, H., Hua, B., Liu, B., Ye, S., Hu, X., et al. (2010). Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 62(8) :2467–2475.
- [Sun et al., 2012] Sun, Y., Chen, C. S., and Fu, J. (2012). Forcing stem cells to behave : a biophysical perspective of the cellular microenvironment. *Annual review of biophysics*, 41 :519–542.
- [Swartz et al., 2005] Swartz, D. D., Russell, J. A., and Andreadis, S. T. (2005). Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 288(3) :H1451–H1460.
- [Syedain et al., 2011] Syedain, Z. H., Meier, L. A., Bjork, J. W., Lee, A., and Tranquillo, R. T. (2011). Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flow-stretch bioreactor with noninvasive strength monitoring. *Biomaterials*, 32(3) :714–722.
- [Tabata, 2003] Tabata, Y. (2003). Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue engineering*, 9(4, Supplement 1) :5–15.

- [Tai et al., 2012] Tai, H.-Y., Fu, E., and Don, T.-M. (2012). Calcium phosphates synthesized by reverse emulsion method for the preparation of chitosan composite membranes. *Carbohydrate Polymers*, 88(3) :904–911.
- [Takahashi et al., 2007] Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*, 131(5) :861–872.
- [Takahashi and Yamanaka, 2006] Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126(4) :663–676.
- [Takeda et al., 2011] Takeda, N., Jain, R., LeBoeuf, M. R., Wang, Q., Lu, M. M., and Epstein, J. A. (2011). Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science*, 334(6061) :1420–1424.
- [Tamura et al., 2003] Tamura, N., Nakamura, T., Terai, H., Iwakura, A., Nomura, S., Shimizu, Y., and Komeda, M. (2003). A new acellular vascular prosthesis as a scaffold for host tissue regeneration. *The International journal of artificial organs*, 26(9) :783–792.
- [Taniyama et al., 2001] Taniyama, Y., Morishita, R., Hiraoka, K., Aoki, M., Nakagami, H., Yamasaki, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y., and Ogihara, T. (2001). Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model molecular mechanisms of delayed angiogenesis in diabetes. *Circulation*, 104(19) :2344–2350.
- [Taylor and Gallo, 2006] Taylor, K. R. and Gallo, R. L. (2006). Glycosaminoglycans and their proteoglycans : host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *The FASEB Journal*, 20(1) :9–22.
- [Thierry et al., 2003a] Thierry, B., Winnik, F. M., Merhi, Y., Silver, J., and Tabrizian, M. (2003a). Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules*, 4(6) :1564–1571.
- [Thierry et al., 2003b] Thierry, B., Winnik, F. M., Merhi, Y., and Tabrizian, M. (2003b). Nanocoatings onto arteries via layer-by-layer deposition : toward the in vivo repair of damaged blood vessels. *Journal of the American Chemical Society*, 125(25) :7494–7495.
- [Tikhonov et al., 2006] Tikhonov, V. E., Stepnova, E. A., Babak, V. G., Yamskov, I. A., Palma-Guerrero, J., Jansson, H.-B., Lopez-Llorca, L. V., Salinas, J., Gerasimenko, D. V., Avdienko, I. D., et al. (2006). Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its *N*-(3)-(dodec-2-enyl) succinoyl-derivatives. *Carbohydrate polymers*, 64(1) :66–72.

- [Tiwari et al., 2001] Tiwari, A., Salacinski, H., Hamilton, G., and Seifalian, A. (2001). Tissue engineering of vascular bypass grafts : role of endothelial cell extraction. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 21(3) :193–201.
- [Tokoyoda et al., 2010] Tokoyoda, K., Hauser, A. E., Nakayama, T., and Radbruch, A. (2010). Organization of immunological memory by bone marrow stroma. *Nature Reviews Immunology*, 10(3) :193–200.
- [Toole and Slomiany, 2008] Toole, B. P. and Slomiany, M. G. (2008). Hyaluronan, cd44 and emmprin : partners in cancer cell chemoresistance. *Drug Resistance Updates*, 11(3) :110–121.
- [Torre et al., 2010] Torre, C., Wang, S. J., Xia, W., and Bourguignon, L. Y. (2010). Reduction of hyaluronan-cd44-mediated growth, migration, and cisplatin resistance in head and neck cancer due to inhibition of rho kinase and pi-3 kinase signaling. *Archives of Otolaryngology—Head & Neck Surgery*, 136(5) :493.
- [Tsai and Su, 1999] Tsai, G.-J. and Su, W.-H. (1999). Antibacterial activity of shrimp chitosan against escherichia coli. *Journal of Food Protection*®, 62(3) :239–243.
- [Uchimura et al., 2003] Uchimura, E., Sawa, Y., Taketani, S., Yamanaka, Y., Hara, M., Matsuda, H., and Miyake, J. (2003). Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with poly (ethylene glycol). *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67(3) :834–837.
- [Ulloa-Montoya et al., 2005] Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, C. M., and Hu, W.-S. (2005). Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(1) :12–27.
- [Unwin et al., 2006] Unwin, R. D., Smith, D. L., Blinco, D., Wilson, C. L., Miller, C. J., Evans, C. A., Jaworska, E., Baldwin, S. A., Barnes, K., Pierce, A., et al. (2006). Quantitative proteomics reveals posttranslational control as a regulatory factor in primary hematopoietic stem cells. *Blood*, 107(12) :4687–4694.
- [Vachoud et al., 2001] Vachoud, L., Chen, T., Payne, G. F., and Vazquez-Duhalt, R. (2001). Peroxidase catalyzed grafting of gallate esters onto the polysaccharide chitosan. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(6) :380–385.
- [Vara et al., 2005] Vara, D. S., Salacinski, H. J., Kannan, R. Y., Bordenave, L., Hamilton, G., and Seifalian, A. M. (2005). Cardiovascular tissue engineering : state of the art. *Pathologie Biologie*, 53(10) :599–612.
- [Voinova et al., 2002] Voinova, M., Jonson, M., and Kasemo, B. (2002). ‘missing mass’ effect in biosensor’s qcm applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(10) :835–841.
- [Vojtassak et al., 2006] Vojtassak, J., Danisovic, L., Kubes, M., Bakos, D., Jarabek, L., Ulicna, M., and Blasko, M. (2006). Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot. *Neuro endocrinology letters*, 27 :134–137.

- [Wagers and Weissman, 2004] Wagers, A. J. and Weissman, I. L. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116(5) :639–648.
- [Wang et al., 1995] Wang, I.-W., Anderson, J. M., Jacobs, M. R., and Marchant, R. E. (1995). Adhesion of staphylococcus epidermidis to biomedical polymers : contributions of surface thermodynamics and hemodynamic shear conditions. *Journal of biomedical materials research*, 29(4) :485–493.
- [Wang et al., 2000] Wang, J. H.-C., Grood, E. S., Florer, J., and Wenstrup, R. (2000). Alignment and proliferation of mc3t3-e1 osteoblasts in microgrooved silicone substrata subjected to cyclic stretching. *Journal of biomechanics*, 33(6) :729–735.
- [Wang et al., 2004] Wang, J. H.-C., Yang, G., Li, Z., and Shen, W. (2004). Fibroblast responses to cyclic mechanical stretching depend on cell orientation to the stretching direction. *Journal of biomechanics*, 37(4) :573–576.
- [Wang et al., 2008] Wang, J.-P., Chen, Y.-Z., Zhang, S.-J., and Yu, H.-Q. (2008). A chitosan-based flocculant prepared with gamma-irradiation-induced grafting. *Bio-resource Technology*, 99(9) :3397–3402.
- [Wang et al., 2009] Wang, W., Itaka, K., Ohba, S., Nishiyama, N., Chung, U.-i., Yamasaki, Y., and Kataoka, K. (2009). 3d spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 30(14) :2705–2715.
- [Wang et al., 2010] Wang, Y., Mah, N., Prigione, A., Wolfrum, K., Andrade-Navarro, M. A., and Adjaye, J. (2010). A transcriptional roadmap to the induction of pluripotency in somatic cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 6(2) :282–296.
- [Wehrle-Haller, 2012] Wehrle-Haller, B. (2012). Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Current opinion in cell biology*.
- [Weinberg and Bell, 1986] Weinberg, C. B. and Bell, E. (1986). A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*, 231(4736) :397–400.
- [Westerweel and Verhaar, 2008] Westerweel, P. E. and Verhaar, M. C. (2008). Directing myogenic mesenchymal stem cell differentiation. *Circulation research*, 103(6) :560–561.
- [Widner et al., 2005] Widner, B., Behr, R., Von Dollen, S., Tang, M., Heu, T., Sloma, A., Sternberg, D., DeAngelis, P. L., Weigel, P. H., and Brown, S. (2005). Hyaluronic acid production in bacillus subtilis. *Applied and environmental microbiology*, 71(7) :3747–3752.
- [Wilcox and Scott, 1996] Wilcox, J. N. and Scott, N. A. (1996). Potential role of the adventitia in arteritis and atherosclerosis. *International Journal of Cardiology*, 54 :S21–S35.

- [Williams, 1987] Williams, D. F. (1987). *Definitions in biomaterials : proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986*, volume 4. Elsevier Science Ltd.
- [Xu et al., 2004] Xu, W., Zhang, X., Qian, H., Zhu, W., Sun, X., Hu, J., Zhou, H., and Chen, Y. (2004). Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Experimental Biology and Medicine*, 229(7) :623–631.
- [Yamamoto et al., 2006] Yamamoto, M., Cui, L., Johkura, K., Asanuma, K., Okouchi, Y., Ogiwara, N., and Sasaki, K. (2006). Branching ducts similar to mesonephric ducts or ureteric buds in teratomas originating from mouse embryonic stem cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 290(1) :F52–F60.
- [Yang et al., 2005] Yang, J., Yamato, M., Kohno, C., Nishimoto, A., Sekine, H., Fukai, F., and Okano, T. (2005). Cell sheet engineering : recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials*, 26(33) :6415–6422.
- [Yao and Wu, 2011] Yao, Z.-A. and Wu, H.-G. (2011). Characterization of chitosan-hyaluronic acid blended membranes and their effects on the growth of keratocytes. *Polymers & polymer composites*, 19(7) :573–580.
- [Ye et al., 2000] Ye, Q., Zünd, G., Benedikt, P., Jockenhoevel, S., Hoerstrup, S. P., Sakayama, S., Hubbell, J. A., and Turina, M. (2000). Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 17(5) :587–591.
- [Zaragoza et al., 2011] Zaragoza, C., Gomez-Guerrero, C., Martin-Ventura, J. L., Blanco-Colio, L., Lavin, B., Mallavia, B., Tarin, C., Mas, S., Ortiz, A., and Egido, J. (2011). Animal models of cardiovascular diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- [Zeng and Nusse, 2010] Zeng, Y. A. and Nusse, R. (2010). Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture. *Cell stem cell*, 6(6) :568–577.
- [Zhang et al., 2002] Zhang, H., Alsarra, I. A., and Neau, S. H. (2002). An in vitro evaluation of a chitosan-containing multiparticulate system for macromolecule delivery to the colon. *International journal of pharmaceuticals*, 239(1) :197–205.
- [Zhang et al., 2005] Zhang, J., Senger, B., Vautier, D., Picart, C., Schaaf, P., Voegel, J.-C., and Lavallo, P. (2005). Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid. *Biomaterials*, 26(16) :3353–3361.
- [Zhang, 2003] Zhang, S. (2003). Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature biotechnology*, 21(10) :1171–1178.
- [Zhao et al., 2008] Zhao, L., Lee, E., Zukas, A. M., Middleton, M. K., Kinder, M., Acharya, P. S., Hall, J. A., Rader, D. J., and Puré, E. (2008). Cd44 expressed on both bone



- marrow-derived and non-bone marrow-derived cells promotes atherogenesis in apoe-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(7) :1283–1289.
- [Zhong et al., 2011] Zhong, X., Ji, C., Chan, A. K., Kazarian, S. G., Ruys, A., and Dehghani, F. (2011). Fabrication of chitosan/poly ( $\epsilon$ -caprolactone) composite hydrogels for tissue engineering applications. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, 22(2) :279–288.
- [Zilla et al., 1994] Zilla, P., Deutsch, M., Meinhart, J., Puschmann, R., Eberl, T., Minar, E., Dudczak, R., Lugmaier, H., Schmidt, P., Noszian, I., et al. (1994). Clinical in vitro endothelialization of femoropopliteal bypass grafts : an actuarial follow-up over three years. *Journal of vascular surgery*, 19(3) :540–548.