



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



Ecole Doctorale BioSE (Biologie Santé Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

MENTION « Science de la Vie et de la Santé »

Par Jacqueline BEROUD

**Différenciation de cellules mésenchymateuses
périnatales vers un phénotype musculaire lisse : base
de la construction d'un feuillet vasculaire**

Le 28 septembre 2015

Membres du Jury :

Rapporteurs : M. Didier LETOURNEUR UMR_S1148-INSERM, Paris

Mme Sophie GANGLOFF EA 4691 BIOS, Reims

Examinateurs : M. Patrick MENU UMR 7365 IMoPA-UL, Nancy

Directeur de Thèse

Mme Emilie VELOT UMR 7365 IMoPA-UL, Nancy

Co-directrice de Thèse

Membre invité : Mme Caroline GAUCHER EA 3452-UL CITHEFOR, Nancy

Je dédicace ce manuscrit à mon fils, mon amour, ma vie et qui a fait de moi une Maman comblée de bonheur et d'amour...

Tu es ma source de motivation. Maman t'aime très fort ! Je dédicace aussi cette thèse à ma maman, ma sœur, mon frère et ainsi qu'à toute ma famille pour leur soutien permanent et leurs encouragements.

Je vous aime.

REMERCIEMENTS

Mes travaux ont été élaborés au sein de l'équipe ingénierie vasculaire du laboratoire de d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA) UMR CNRS 7365 Université de Lorraine. Ces années m'ont amenée à rencontrer de nombreuses personnes que je souhaiterais remercier dans ce manuscrit.

En premier lieu, je remercie le Professeur **Jean-Yves Jouzeau** de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Ses encouragements tant au niveau professionnel que sportif ont été permanents et agréables durant ces quatre années.

Je remercie profondément **Patrick Menu**, Professeur à la faculté de pharmacie de Nancy et directeur de thèse, qui m'a toujours soutenue pendant ce travail de thèse. Son grand humanisme, sa disponibilité, sa compréhension et nos nombreuses réunions m'ont aidée à persévérer dans les moments plus difficiles. Il m'a permis de mener à bien mes projets de sportive de haut niveau et mes projets professionnels, pour ça, je souhaite lui adresser mon entière reconnaissance.

Je remercie également **Emilie Velot**, Maître de conférences à la faculté de pharmacie de Nancy et ma co-directrice de thèse, pour son rôle majeur au cours de ce travail. Suite à nos nombreux échanges cette thèse a pu avancer convenablement et je la remercie pour son aide.

Je suis fière et heureuse de compter parmi les membres du jury **M. Didier Letourneur**, directeur de recherche de l'UMR_S1148-INSERM à Paris et **Mme Sophie Gangloff**, Directrice de l'EA 4691 « BIOS » à Reims, qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit de thèse. Je remercie aussi **Caroline Gaucher** pour son soutien et d'avoir accepté de faire partie des membres du jury de cette thèse.

Une thèse dans un laboratoire, c'est aussi voir partir de nombreuses personnes, des étudiants ou des personnels et en arriver d'autres. Je souhaiterais remercier toutes ces personnes que j'ai croisées et avec qui j'ai pu travailler et passer de très bons moments.

Un grand merci à nos secrétaires **Nadia, Valérie, Karine, Olinda, Aline, Christine, Hélène et Merryl** pour leur disponibilité et leur patience et un remerciement particulier à **Ghislaine Charpentier** pour son dévouement sincère et nos différents échanges fort sympathiques.

Je remercie également **M. Naceur Charif** pour ses conseils scientifiques sur des sujets diverses et variés, et **Brigitte Guerbe** pour sa gentillesse à mon égard et son soutien constant.

Je tiens à remercier de tout cœur **Ghislaine Cauchois** avec qui j'ai eu de nombreuses discussions tant au niveau professionnel que personnel.

Un grand merci à « ma maman de laboratoire », **Monique Gentils**, qui a toujours été présente pour m'écouter, me consoler et me conseiller dans les moments délicats. Une confidente mais aussi une assistante ingénieur en or toujours prête à rendre service et me soutenir dans mon travail.

Je remercie **Halima Kerdjoudj** pour son soutien et son aide pour la préparation de ma soutenance à l'école doctorale.

Je tiens aussi présent mes remerciements à **Didier Rouxel**, avec qui nous avons pu collaborer. Ce fut un réel plaisir et une publication a vu le jour.

Je remercie les personnes ayant pu m'apporter leur aide ponctuellement pour diverses raisons, je pense en particulier à **Arnaud, Astrid, Sébastien, Christophe, Meriem, Catherine, Vanessa** (tu sauras pourquoi je te remercie tout particulièrement).

Un grand merci aux personnes avec qui je partageais souvent mes repas dans la cuisine du laboratoire. Je pense à **Cécile, Marie-Hélène, Jean-Marc, Alice, Sandrine, Isabelle** ce fut d'excellents moments de partage et de rigolade.

Et comment oublier ce stagiaire, pour lequel j'ai pu participer à l'encadrer lors de son stage de SIR **M. Frédéric Klein**, maintenant interne en Pharmacie. Un énorme merci pour ces fous-rires répétitifs. Des moments studieux mais toujours dans la bonne humeur.

Je tiens aussi à remercier **David Moulin, Laurent Grossin, et Alexandre Kriznik** des personnes serviables et avec qui j'ai pu discuter à plusieurs reprises pour diverses raisons. Je vous remercie pour votre gentillesse et ces moments très agréables.

Un grand merci à mes collègues doctorants : **Loïc, Lina, Victor, Yueying, Gabi, Chaza, Emilie, Léo, Irfan, mél, Mathilde, Anne-sophie, Gauthier** pour m'avoir supportée durant toutes ces années et m'avoir fait partager d'excellents moments.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe (**Nati, Véronique, Céline, Danièle, Dominique, Pierre Labrude**) et tout le personnel du laboratoire que je ne citerais pas en détail

car la liste serait trop longue. Je n'oublie pas non plus de remercier **Sébastien Hupont** pour son aide et son investissement pour nos caractérisations en macroscopie de fluorescence.

Je ne peux continuer ces remerciements sans citer mes camarades doctorants faisant aujourd’hui parti de mon cercle d’amis :

- **Mat’** (Mathieu), mon confident, protecteur, et compagnon dans des grands moments de folie et de délire. Tu vas énormément me manquer ! ET un GRAND Merci pour la place dans le cellier, je n’oublierai jamais. Merci aussi de m’avoir offert l’occasion de découvrir une personne en or que j’apprécie beaucoup aujourd’hui, **Sara** merci pour TOUT.
- **Guitoun** (Guillaume), un homme bizarre mais plutôt sympa quand on apprend à le connaître.
- **Toinou** (Antoine), l’homme distant, discret et mystérieux mais avec un grand cœur.
- **Sam’** (Samia), une rencontre inattendue, une fille géniale et spontanée, surtout ne change pas !
- **Hassan**, le « gros nounours » au cœur tendre toujours prêt à rendre service.
- **Reine**, la gentillesse incarnée et la préférée de Lyam, mon fils.
- **Pan**, je ne pourrais pas t’oublier mon « petit » bonhomme. Un homme petit par la taille (ça c’est certain) mais grand par l’esprit (ça j’en suis convaincue).

Pour finir avec les personnes rencontrées au laboratoire, j’adresse un remerciement particulier à **Caroline Gauche**, alias **Prooty**, ma chewie, toujours là pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments. Tu m’as fait découvrir la féminité, un monde que je ne connaissais pas ou peu, pour ça merci. On s’est connu pendant ces années de galère, mais ce n’est que le début d’une longue et belle amitié !

Pour clôturer ces remerciements je tiens à les adresser à mes amis proches **Johan** (*merci d’avoir été là à ta manière*), **Boris** (*La véritable amitié ce n'est pas d'être inséparable, c'est d'être séparé et que rien ne change*), et **Jérôme** (*un ami comme on en trouve rarement, aucun mot ne serait à la hauteur de notre amitié*) qui m’ont toujours soutenue pendant les phases difficiles que peut connaître la thèse et qui me permettent d’avancer au quotidien. Merci d’être toujours là pour moi. Je n’oublie pas non plus de remercier mon coach **Franck Aigle** qui a toujours adapté mon programme d’entraînement à mon projet de thèse afin que je puisse mener de front mes deux projets.

Et enfin, une nouvelle rencontre et une nouvelle amitié, une complicité rare, merci **chaton** (**Amandine**) pour le soutien que tu m'apportes pour terminer ce manuscrit et surtout aller de l'avant vers de nouveaux horizons ».

Pour conclure, je voudrais dire qu'une thèse représente un investissement important et n'est pas toujours facile, je pense notamment aux différentes frustrations quand les manips ne fonctionnent pas comme on l'espérait. Cependant, le soutien de ses collègues, ses amis et ses proches en font une très belle aventure et on en ressort grandi avec plein de nouvelles perspectives en tête !

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
LISTE DES PUBLICATIONS	11
COMMUNICATIONS	11
INTRODUCTION GENERALE	13
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	16
I Le système artériel et la media vasculaire	16
I.1 La paroi artérielle.....	17
I.2 Les différents types de vaisseaux.....	18
I.3 La media vasculaire et la CML	20
I.3.1 Implication de la CML dans la media vasculaire	20
I.3.2 La cellule musculaire lisse	20
I.3.2.1 Structure, fonction et implication dans la paroi vasculaire	20
I.3.2.2 Mécanisme de la contraction/ dilatation de la CML	21
I.3.2.3 Hétérogénéité phénotypique des cellules musculaires lisses	23
I.3.2.4 Marqueurs Moléculaires et état de différenciation des CML	24
I.4 Les pathologies vasculaires : besoin en substituts vasculaires	26
I.4.1 L'athérosclérose	26
I.4.2 Traitements associés à l'athérosclérose.....	27
II L'ingénierie tissulaire vasculaire	28
II.1 Les matrices : « Biomatériaux Scaffolds »	29
II.1.1 Biomatériaux en ingénierie vasculaire : principales caractéristiques souhaitées	29
II.1.2 Les hydrogels d'alginate et leurs application en ingénierie tissulaire	30
II.1.2.1 Composition de l'alginate et processus de gélification	30

II.1.2.2 Propriétés des hydrogels d’alginat et application en ingénierie tissulaire ...	31
II.1.3 Fonctionnalisation de surface.....	32
II.2 La cellularisation des biomatériaux	33
II.2.1 Les types cellulaires utilisés	33
II.2.1.1 Les cellules souches.....	33
a Les cellules souches mésenchymateuses.....	34
b Le cordon ombilical humain : source prometteuse de cellules souches mésenchymateuses (revue)	35
II.2.2 Les stratégies d’obtention de CML	36
a La culture sans sérum.....	36
b L’influence des facteurs de croissance	36
OJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	38
Chapitre 1 : Différenciation des CSM GW en CML en réponse à différents facteurs environnementaux.....	39
Chapitre 2 : influence de la charge de surface sur le comportement « spatial » des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton en culture.....	67
Chapitre 3 : Elaboration d’un biomatériaux « scaffold » à base d’hydrogel d’alginat pour l’ingénierie vasculaire.....	69
I Partie 1 : Mise au point de l’architecture 2D du biomatériaux à base d’hydrogel d’alginat et caractérisation biologique	70
I.1 MATERIELS ET METHODES.....	70
I.2 RESULTATS OBTENUS POUR CETTE PREMIERE PARTIE.....	80
I.3 CONCLUSION et PERSPECTIVES (PARTIE 1).....	83
II Partie 2 : Mise au point de l’architecture 3D du biomatériaux à base d’hydrogel d’alginat et formation d’un cylindre cellularisé recréant la media vasculaire	83
DISCUSSION - CONCLUSION GENERALE.....	84
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	89
ANNEXES	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Expression des protéines contractiles selon le phénotype des CML (18).....	26
Tableau 2 : Travaux de différenciation de CSMs en CML.....	37
Tableau 3 : Méthodologie permettant la construction de l'hydrogel d'alginate par pulvérisation	73
Tableau 4 : Méthodologie permettant la construction de l'hydrogel d'alginate par Dip-coating.....	74
Tableau 5 : Gamme étalon élaborée à partir de thymus de veau	80

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma général représentant la disposition des différents vaisseaux au sein de l'arbre vasculaire	17
Figure 2 : Structure générale de la paroi vasculaire.....	18
Figure 3 : Structure, composition et fonction des différents vaisseaux de l'arbre vasculaire.....	19
Figure 4 : Schéma de CML vues en coupe transversale	21
Figure 5 : Schéma simplifié de l'initiation de la contraction de la CML.....	22
Figure 6 : Schéma des 3 différentes approches en ingénierie vasculaire pour la fabrication de substituts vasculaires (21).....	29
Figure 7 : Caractéristiques structurales des alginates	30
Figure 8 : Schéma représentation le réseau tridimensionnel de type « egg-box » qui se forme lors de la gélification de l'alginate en présence de calcium (22).....	31
Figure 9 : Principe de construction des FMP	33
Figure 10: Les différents types de cellules souches	34
Figure 11 : Composition et architecture complète du biomatériau.....	72
Figure 12 : Dispositif utilisé pour l'élaboration des hydrogels d'alginate par Dip-coating	74
Figure 13 : Dispositif utilisé pour l'élaboration des hydrogels d'alginate par Spin coating	75
Figure 14 : Aspect morphologie de CSM GW en P4 cultivées 7 jours	80
Figure 15 : Aspect morphologie de CSM GW en P4 cultivées 7 jours sur les hydrogels d'alginate	81
Figure 16 : Activité métabolique des CSM GW cultivées pendant 7 jours sur des hydrogels d'alginate.....	82

LISTE DES ABREVIATIONS

BSA : Bovine Serum Albumine

CE : Cellule endothéliale

CML : cellule musculaire lisse

CSHs : cellules souches hématopoïétiques

CSMs: Cellules souches mésenchymateuses

DMSO: Diméthylsulfoxyde

EDTA : Acide éthylène diamino tétra acétique

HBSS: Hank's Balanced Salts Solution

PSS : Poly (4-styrène sulfonate de sodium)

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SVF : Sérum de Veau Foetal

PAF : Paraformaldéhyde

PAH : Chlorhydrate de polyallylamine

PBS : Phosphate Buffer Saline

MEC : Matrice extra-cellulaire

FMP : Films Multicouches de Polyélectrolytes

α-MEM : minimum essential medium- α

DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

SMA : smooth muscle actin

SM22 α : smooth muscle 22 α

SMMHC : smooth muscle myosin heavy chain

SMTN : smoothelin

RS : réticulum sacroplasmique

PAH : polly allylamine

PSS : polystyrène sulfonate

LISTE DES PUBLICATIONS

- **J Beroud**, B Vincent, E Paternotte, V-S Nguyen, H Kerdjoudj, E Velot, D Rouxel, and P Menu. « Brillouin spectroscopy: A new tool to decipher viscoelastic properties of biological scaffold functionalized with nanoscale films ». *Bio-medical materials and engineering* 23, n° 4 (1 janvier 2013): 251-261.
- H Rammal*, **J Beroud***, M Gentils, P Labrude, P Menu, H Kerdjoudj, and E Velot. « Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films ». *Bio-medical materials and engineering* 23, n° 4 (1 janvier 2013): 299-309.
**Both authors contributed equally to this work*
- R El Omar*, **J Beroud***, J-F Stoltz, P Menu, E Velot, V Decot. « Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell based therapies? » *Tissue engineering. Part B, Reviews* (19 février 2014).
**Both authors contributed equally to this work*
- **J Beroud**, Sébastien Hupont, Monique Gentils, Patrick Menu, Emilie Velot. « Valorisation de biomatériaux hybrides par mosaïquage d'images en macroscopie à fluorescence : Application à l'étude de la colonisation cellulaire de biomatériaux au potentiel de greffons vasculaires ». Revue IAFH
- **J Beroud**, M Gentils, P Menu, E Velot. « Wharton's jelly mesenchymal stem cells express inherently smooth muscle contractile protein which can be up-regulated under hypoxic conditions. » *Stem cells and development*. (en cours de soumission).
- **J Beroud**, M Gentils, P Menu, E Velot. “The effects of polyelectrolyte multilayer films on the differentiation of Wharton’s Jelly mesenchymal stem cells into Smooth muscle cells in response to hypoxia.” *Stem cells report/regenerative medicine/stem cells translational medicine*. (En rédaction).

COMMUNICATIONS

Présentations orales :

J Beroud, A-S. Willemin, P Menu et E. Velot. « Obtention de cellules musculaires lisses à partir de cellules souches de la gelée de Wharton ». 9ème journée de la recherche biomédicale. *Nancy, le 21 mars 2014*

J Beroud, E Velot et P. Menu. « Différenciation de cellules souches issues du cordon ombilical en cellules musculaires lisses en vue de construire une « media vasculaire ». Journée des doctorants en biologie et santé. *Nancy, le 01 avril 2014*

J. Beroud, « Vaisseaux défectueux... on a la solution ! », concours de vulgarisation scientifique (exposé clair, concis, et néanmoins convaincant sur son projet de recherche) : « Ma thèse en 180 secondes », *avril 2014. 2^{ème} Prix du Jury en région Lorraine.*

J Beroud, S. Hupont, P Menu et E. Velot. « Valorisation de biomatériaux hybrides par mosaïquage d'images en macroscopie de fluorescence». Journée de la FR CNRS-UL 3209 BMCT. « Ingénierie cellulaire et thérapeutique » *Nancy, septembre 2014.*

Présentations par affiches :

J Beroud, H Rammal, M Gentils, P Labrude, P Menu, H Kerdjoudj, E Velot. « Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films». 7e journées du pôle Lorrain d'ingénierie du cartilage, Nancy, 18-19 octobre 2012.

J Beroud, B Vincent, E Paternotte, V-S Nguyen, H Kerdjoudj, E Velot, P Menu, D Rouxel. « Brillouin spectroscopy: A new tool to decipher viscoelastic properties of biological scaffold functionalized with nanoscale films ». 7e journées du pôle Lorrain d'ingénierie du cartilage, Nancy, 18-19 octobre 2012.

V-S Nguyen, **J Beroud**, D Rouxel, E Velot, P Menu. « Preparation of novel polyelectrolyte/ZnO nanoparticule multilayer nanocomposite films for tissue engineering. ». 7e journées du pôle Lorrain d'ingénierie du cartilage, Nancy, 18-19 octobre 2012.

J Beroud, Sébastien Hupont, Patrick Menu, Emilie Velot. « Biomatériaux et substituts vasculaires : comment exploiter/valoriser des résultats en macroscopie ? ». Congrès de l'Association Française d'Histologie, Nancy, 12-13 juin 2014.

H Rammal, C. Harmoush, **J Beroud**, M Gentils, F. Boulmedais, E. Velot, H Kerdjoudj, 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.

INTRODUCTION GENERALE

Selon l'Organisation mondiale de la santé, les maladies cardio-vasculaires représentent aujourd'hui, 30% de la mortalité totale mondiale.

La plupart du temps, les signes d'une défaillance vasculaire ne sont visibles que lorsque la pathologie s'est déjà développée de façon significative. L'athérosclérose est l'une des pathologies vasculaires les plus répandues. Elle se développe sur plusieurs années et les premiers symptômes apparaissent seulement à un stade très avancé. Celle-ci conduit en fait à une obstruction progressive des vaisseaux de gros et de petits calibres, responsable d'une perturbation locale ou générale de la circulation sanguine. A ce jour, des solutions thérapeutiques telles que l'angioplastie ont fait leurs preuves en chirurgie vasculaires. Cependant, dans des cas plus avancés, les spécialistes ont recours au pontage vasculaire. Le remplacement artériel nécessite un vaisseau fonctionnel et disponible, qui présente des limites quand il s'agit de vaisseaux de petits calibres notamment les artères coronaires. En effet, la vitesse d'écoulement du sang s'en trouve réduite et les matériaux synthétiques classiques utilisés et efficaces pour les greffes de vaisseaux de gros calibre (diamètre > 6 mm), sont inefficaces pour maintenir le tonus vasculaires à long terme.

Bien que les vaisseaux autologues soient privilégiés pour les greffes de petit diamètre, les vaisseaux de nombreux patients ne sont pas utilisables, en raison d'antécédents de pathologies vasculaires, d'amputations, ou encore parce que leurs vaisseaux ont déjà été utilisés pour des interventions chirurgicales précédentes. Face à cette pénurie de greffons fonctionnels, l'ingénierie tissulaire a émergé comme une approche prometteuse pour combler les lacunes des traitements actuels. C'est un domaine pluridisciplinaire rapprochant des scientifiques de tous environs (biologie, médecine, physique, chimie, science des matériaux...) pour combiner leurs savoirs faire et développer *in vitro* des tissus adaptés fonctionnels et implantables. Cette approche repose sur la combinaison d'une triade : une **matrice tridimensionnelle** qui sera utilisée comme support où nicheront les cellules, des **cellules fonctionnelles** et non immunogènes, le tout régulé par **des signaux physiques et/ou chimiques** afin de construire le tissu d'intérêt.

Les cellules musculaires lisses (CML), tissu essentiel de la paroi vasculaire, jouent un rôle important pour le maintien du flux sanguin. Elles régulent la pression sanguine par un mécanisme de contraction/relaxation en réponse à l'environnement. Ainsi, l'obtention d'une multicouche de CML fonctionnelle, ou « média vasculaire », est une condition préalable dans

la construction réussie d'un vaisseau sanguin par ingénierie tissulaire. Diverses études se sont d'abord intéressées à l'isolement et l'expansion *in vitro* de CML matures (1).

Cependant, ces cellules présentent une capacité de prolifération limitée et perdent progressivement, au cours de leur amplification *in vitro*, leur phénotype contractile en acquérant un phénotype dit « synthétique ». Ce dernier est essentiellement caractérisé par une forte capacité de prolifération et par la synthèse de matrice extracellulaire, au détriment de l'activité contractile, essentielle pour la vasomotion et le maintien de la pression artérielle. Ces observations rendent nécessaire l'exploration d'une source alternative de cellules capables de s'organiser en une multicouche fonctionnelle de CML afin de recréer la paroi vasculaire.

Leurs capacités de prolifération, d'auto-renouvellement et leur potentiel de différenciation en divers types cellulaires ont fait des cellules souches mésenchymateuses (CSM), d'excellents candidats en ingénierie tissulaire. Les sources disponibles de CSM sont nombreuses et variées. Elles peuvent-être d'origine adulte, par exemple lorsqu'elles sont issues de la moelle osseuse ou encore du tissu adipeux, mais peuvent aussi être isolées à partir de tissus d'origine périnatal comme le placenta ou encore le cordon ombilical. Des études récentes au sein de notre équipe ont montré que des CSM extraites du cordon ombilical, plus précisément de son tissu conjonctif (la gelée de Wharton : GW), sont capables de se différencier en cellules endothéliales utilisables pour le recouvrement de la surface interne d'un substitut vasculaire et recréer ainsi la couche de la paroi vasculaire au contact de la circulation sanguine, appelée intima (thèse de Hassan Rammal., 2014).

Si nous sommes capables de produire des cellules endothéliales, il était légitime, dans l'optique de la thématique du laboratoire, de développer une approche visant à produire des CML vasculaires fonctionnelles. L'association de ces deux lignées cellulaires devrait permettre, à plus ou moins long terme, de construire des greffons vasculaires afin d'alimenter une banque de vaisseaux.

La finalité des travaux de cette thèse vise à obtenir une « media-vasculaire » fonctionnelle capable de maintenir du tonus vasculaire. Ainsi, nos études se sont focalisées en priorité sur la possibilité d'obtenir des CML vasculaires à partir des CSM-GW. Pour cela, certains paramètres sont importants à prendre en compte. Nous avons évalué l'impact de différents paramètres environnementaux (oxygène, facteurs de croissance, sérum) sur la différenciation des CSM-GW vers un phénotype contractile. De plus, nous avons utilisé des films multicouches de polyéléctrolytes (FMP) pour recouvrir les surfaces de culture et optimiser cette différenciation

(2,3). Ces films constituent un moyen facile et efficace de fonctionnaliser les surfaces de biomatériaux afin d'en améliorer la culture cellulaire. Ils sont construits par dépôt alterné de polycations et polyanions, et modifient les propriétés de surfaces des substrats ainsi fonctionnalisées en favorisant le comportement (prolifération et différenciation) des cellules à leur contact.

Ce manuscrit de thèse se divise en 4 parties :

- ✚ La première partie, bibliographique, expose les notions importantes du système vasculaire et se focalise sur les CML, ses caractéristiques et leurs implications dans la paroi des vaisseaux pour le maintien du tonus vasculaire. L'état de l'art de cette introduction permettra de mettre en évidence les connaissances actuelles et les problématiques de recherche pour la reconstruction de la paroi vasculaire et notamment l'obtention de CML fonctionnelles dans le domaine de l'ingénierie vasculaire. Dans cette partie, nous avons aussi présenté les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton sous forme de revue de la littérature que nous avons publiée. Ainsi, au travers de cet article, nous avons mis en évidence leur potentiel d'utilisation en ingénierie vasculaire.
- ✚ Après la présentation des objectifs du travail de thèse qui constitue la deuxième partie, la troisième partie regroupe les résultats obtenus sous forme d'articles scientifiques. Le premier article (soumis) aborde la différenciation de cellules mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton en CML et de l'effet des facteurs environnementaux sur leur phénotype. Le deuxième article traite de la culture de ces cellules sur des surfaces fonctionnalisées par des FMP pour obtenir un feuillet cellulaire adapté à l'ingénierie cellulaire. Cet article met ainsi en évidence l'effet de la charge de surface sur la culture des CSM GW. Enfin, un troisième article accompagné par des résultats présentés de façon classique traite d'un autre élément de la triade de l'ingénierie tissulaire : le biomatériau. Il s'agit d'un scaffold élaboré à partir d'alginate (polysaccharide extrait d'algue) et colonisé par nos cellules pour la construction de la « media vasculaire ». Les premiers résultats obtenus y seront d'ailleurs présentés accompagnés par des perspectives de travail.
- ✚ La dernière partie concerne la discussion et conclusion générale de ces travaux accompagnées par des perspectives dans l'élaboration d'un substitut vasculaire cellularisé.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Le but principal de ce travail est de construire une monocouche de cellules musculaires lisses susceptibles de constituer la couche médiane d'un substitut vasculaire potentiel. Dans la littérature, différentes stratégies ont été utilisées afin d'obtenir une couche similaire. Ces différentes approches seront abordées dans cette partie bibliographique, et nous permettra de situer et comprendre notre démarche. Elle se divise en plusieurs parties. Après avoir fait un rappel sur les caractéristiques de la paroi vasculaire, de ses composants et des pathologies afférentes, nous évoquerons différentes étapes utilisées en ingénierie cellulaire pour construire un substitut vasculaire, en particulier les différentes stratégies pour obtenir des cellules musculaires lisses. Nous préciserons aussi les avantages des cellules souches mésenchymateuses susceptibles de se différencier en CML selon l'environnement dans lequel elles sont cultivées. Nous présenterons enfin les différentes fonctionnalisations des surfaces nécessaires pour construire nos substituts vasculaires.

I Le système artériel et la media vasculaire

Le système circulatoire forme un réseau fermé d'artères, de veines et de capillaires avec des tailles et des propriétés mécaniques et biochimiques différentes (figure 1). En effet, le vaisseau doit, suivant sa localisation, permettre et contrôler la diffusion des substances depuis le sang vers les tissus et inversement. Ce vaisseau doit de surcroît posséder une élasticité suffisante pour répondre aux déformations imposées par le flux sanguin pulsatile induit par le cœur ; il doit également opposer des forces de tension suffisantes pour résister aux pressions qui s'exercent, surtout dans le système artériel afin de permettre la propagation de l'onde de pouls. L'organisation des vaisseaux varie donc suivant les différents niveaux de l'arbre vasculaire : du cœur émergent les grosses artères élastiques dont le large diamètre diminue peu à peu et se poursuit par des artères musculaires puis les artérioles, débouchant sur le lit vasculaire périphérique que forme, au niveau de chaque tissu constitutif des organes, le réseau de capillaires. Le retour de la circulation des organes vers le cœur est assuré par des veinules, puis des veines de calibre de plus en plus large, aboutissant aux veines caves, qui assurent le retour vers le cœur.

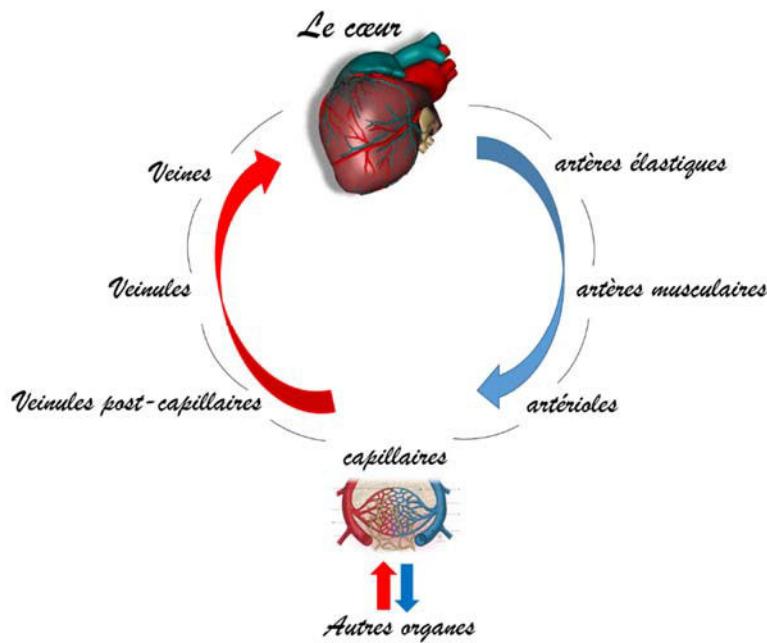


Figure 1 : Schéma général représentant la disposition des différents vaisseaux au sein de l'arbre vasculaire

I.1 La paroi artérielle

La paroi des vaisseaux (figure 2) possède une organisation caractéristique quel que soit le territoire vasculaire (excepté les micro-vaisseaux). Celle-ci est constituée de trois tuniques concentriques qui sont dénommées de l'intérieur vers l'extérieur : intima, média et adventice.

L'intima est la tunique la plus interne et la plus fine. Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) et d'une fine couche de tissu conjonctif (membrane basale des CE). En continuité avec celles du cœur, les cellules endothéliales sont directement en contact avec le sang circulant et donc avec les métabolites, les hormones, et tout ce que peut transporter le sang.

La media est la tunique impliquée dans les phénomènes de contraction et de dilatation. Elle est presque exclusivement constituée de couches concentriques de cellules musculaires lisses (CML) associées à des constituants extracellulaires : fibres de collagène, fibres élastiques et protéoglycans dont les proportions relatives varient selon qu'il s'agit d'artères élastiques ou musculaires. Les forces auxquelles sont soumis les vaisseaux conditionnent largement l'épaisseur de la media.

L'adventice est constitué d'un tissu conjonctif dense composé de fibroblastes, de fibres de collagène et de quelques fibres élastiques. Dans les grosses artères, elle est traversée par des vaisseaux nourriciers, les *vasa vasorum*, des vaisseaux lymphatiques et des fibres nerveuses. Son épaisseur est très variable selon sa localisation, et sa structure varie avec l'âge. Elle assure

l'ancrage du vaisseau aux tissus environnants, la nutrition de la paroi et participe au contrôle du calibre vasculaire.

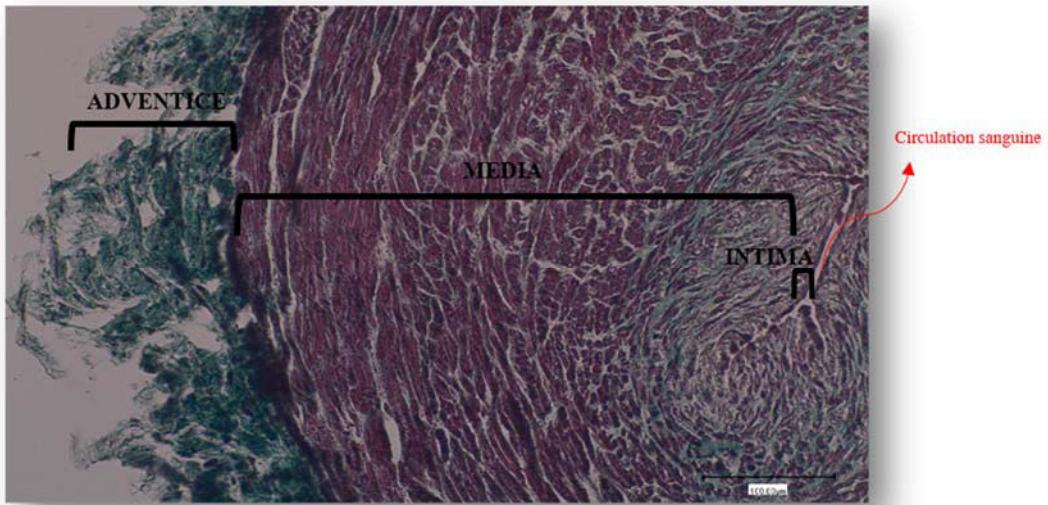


Figure 2 : Structutre générale de la paroi vasculaire

Visualisation sur une coupe d'artère de cordon ombilical colorée au trichrome de Masson. Le noyau et les substances basophiles apparaissent en bleu-violet, le cytoplasme en rouge-rosé, et les fibres conjonctives en vert

Une couche élastique bien plus fine que les trois tuniques fines appelée **limitante élastique externe** fait le lien entre la media et l'adventice, puis l'intima et la media sont reliées par une mince membrane élastique appelé **limitante élastique interne**.

I.2 Les différents types de vaisseaux

Chaque région de l'arbre vasculaire a une morphologie et une composition adaptées à son environnement et à son rôle. Ce sont les proportions des constituants de chaque couche qui varient pour répondre aux exigences fonctionnelles du territoire vasculaire en question.

On dénombre trois grandes catégories de vaisseaux sanguins de tailles et structures adéquates qui constituent « l'arbre vasculaire » dans lequel structure et fonction vasculaires sont étroitement liées (Figure 3).

Parmi les trois catégories d'artères, on retrouve :

Les **artères élastiques** correspondent aux plus gros vaisseaux (artère pulmonaire, aorte, carotides...). La paroi est riche en structures élastiques pour propager puis transformer le flux sanguin discontinu en un flux semi-continu et ainsi assurer le débit cardiaque.

Les **artères musculaires** jouent un rôle différent, puisque qu'elles doivent distribuer le sang dans les différents territoires en adaptant le débit.

Les **artérioles** ont un calibre fin et leur composition histologique est considérablement modifiée.

Au cours de ce chapitre, nous allons d'avantage nous intéresser à la média, cœur de notre travail.



Figure 3 : Structure, composition et fonction des différents vaisseaux de l'arbre vasculaire

I.3 La media vasculaire et la CML

I.3.1 Implication de la CML dans la media vasculaire

La **media** est essentiellement constitué de CML et de constituants extracellulaires tels que les fibres élastiques et les protéoglycans. Cette tunique est très variable selon les différents territoires vasculaires, et la présence et l'organisation aussi bien des fibres élastiques que des CML varient selon la fonction des vaisseaux. La media des artères élastiques est constituée de lames élastiques concentriques, composées essentiellement de fibres élastiques entre lesquelles se situent les CML, des fibres de collagène, des microfibrilles d'élastine. Cet ensemble est appelé « unité lamellaire ». Le nombre d'unités lamellaires dépend du diamètre du vaisseau. L'aorte humaine, par exemple, en comporte 40 à 60 selon l'âge. Les artères musculaires ont une media quasiment entièrement composée de muscles lisses. Elles se trouvent dans le prolongement des artères élastiques qui ont perdu la majorité des lames élastiques ne laissant qu'une lame limitante externe à la jonction avec l'aventice et une lame limitante interne bien visible à la jonction avec l'intima. La composition de ces artères les rend très contractile et elles peuvent ainsi modifier, selon les stimulations environnementales, le diamètre du vaisseau. En revanche, la media des artéries est beaucoup plus fine. Elle se compose en général d'une à quatre couches de CML.

Au sein de la media, les cellules musculaires lisses occupent environ 30% du volume. Elles jouent un double rôle :

- Elles synthétisent les composants de la paroi vasculaire
- Elles assurent, de par leurs propriétés contractiles, l'élasticité de la paroi.

Ainsi, les CML jouent un rôle majeur pour le maintien du tonus vasculaire. C'est pourquoi, nos travaux se sont focalisés sur l'utilisation de ces cellules pour recréer la paroi vasculaire

I.3.2 La cellule musculaire lisse

I.3.2.1 Structure, fonction et implication dans la paroi vasculaire

Les CML vasculaires sont des cellules issues du mésoderme, elles se situent dans la paroi vasculaire (media) et régulent le flux sanguin dans les différents organes. Ce sont des cellules allongées (20-50 μ m de long et 5 μ m de diamètre) mononucléées (noyau central et allongé) et entourées d'une lame basale (figure 4). Elles sont associées entre elles par une charpente de tissu conjonctif essentiellement constituée de collagène et d'élastine. Les CML présentes dans la media jouent un double rôle. D'une part elles synthétisent les composants de la paroi

vasculaire, et d'autre part s'adaptent de façon active aux variations du flux sanguin grâce à leurs propriétés contractiles. Le tonus vasculaire est alors étroitement lié à l'état de contraction des CML.

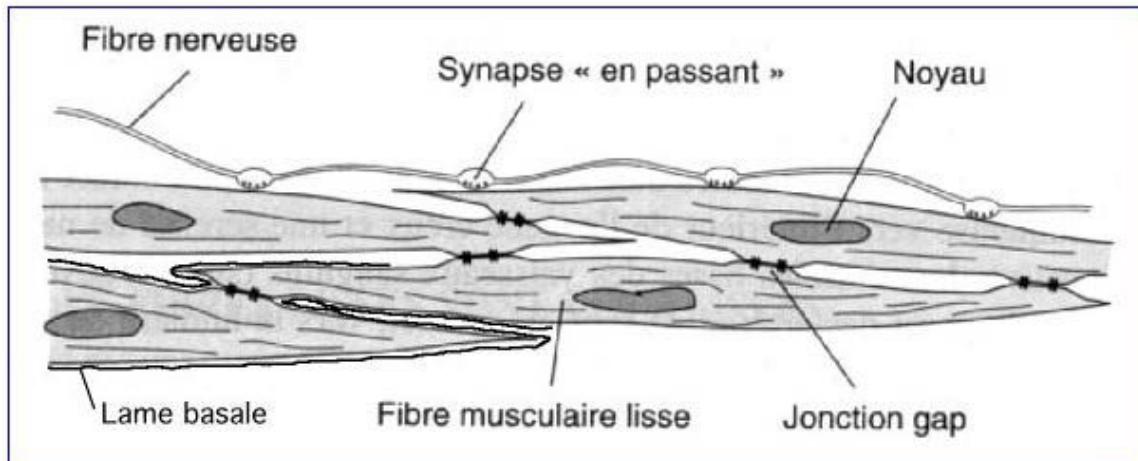


Figure 4 : Schéma de CML vues en coupe transversale

Des substances dites vasoactives vont influencer cet état de contraction. Parmi celles-ci, on distingue les molécules vasodilatatrices qui vont provoquer une relaxation des CML et ainsi augmenter le diamètre du vaisseau (dilatation), des molécules vasoconstrictrices, qui au contraire, vont déclencher la constriction du vaisseau.

I.3.2.2 Mécanisme de la contraction/ dilatation de la CML

Le mécanisme de contraction de la CML dépend essentiellement de la variation du taux de calcium intracellulaire. Les substances vasoconstrictrices augmentent la concentration cytoplasmique de calcium alors que les vasodilatateurs la diminuent. Les variations de calcium intracellulaire cytoplasmique sont les résultats d'un équilibre entre les sorties et les entrées de calcium vers le cytosol. Ces flux de calcium peuvent se produire entre la cellule et le milieu extracellulaire mais aussi provenir des compartiments intracellulaires.

Les entrées de Ca^{2+} d'origine extracellulaire, sont essentiellement modulées par le potentiel de membrane et les compartiments intracellulaires. Cependant les deux sont étroitement liés.

Une augmentation de Ca^{2+} peut donc être due soit à une modification du potentiel de membrane (stimulation électromécanique) qui va provoquer l'ouverture de canaux calciques voltage dépendants et permettre l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire. Mais la hausse de Ca^{2+} engendre l'ouverture des compartiments intracellulaires, principalement du réticulum sacroplasmique (RS) (stimulation pharmacomécanique), ce qui augmente le taux de Ca^{2+} par la libération du

calcium de ces derniers. Le flux de Ca^{2+} du RS au cytosol se fait soit par l'ouverture des canaux-récepteurs de la ryanodine, soit par les canaux-récepteurs de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3).

Quand la concentration de Ca^{2+} cytosolique devient supérieure à 1 μM (état basal) (4), la cellule se contracte. Le mécanisme est décrit de façon schématisé sur la figure 5.

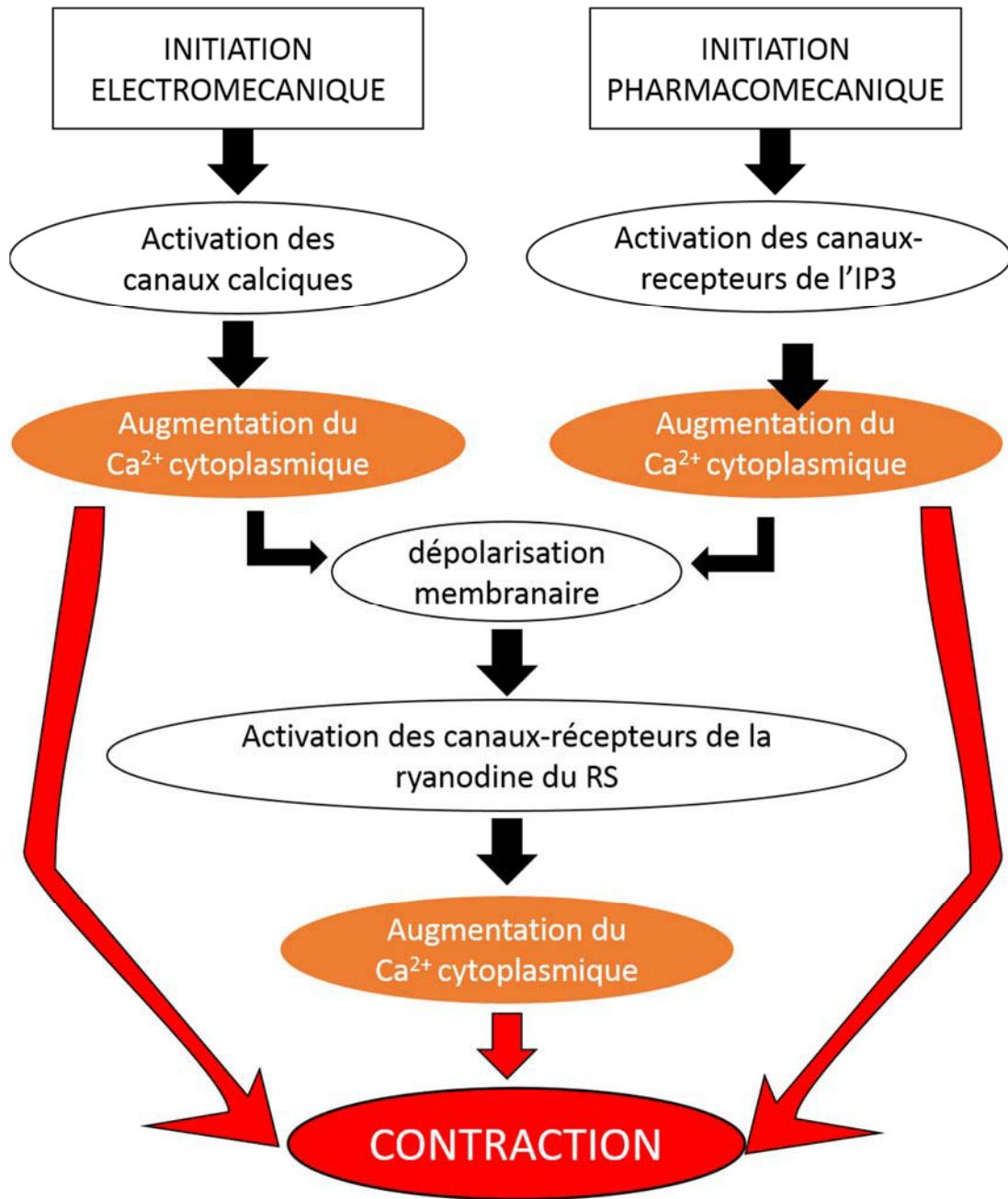


Figure 5 : Schéma simplifié de l'initiation de la contraction de la CML

(<http://www.db-gersite.com/HISTOLOGIE/HISTGENE/histgen1/histgen6/histgen6.htm>; [En ligne], mai 2015)

Mécanisme moléculaire de la contraction de la CML

Le Ca^{2+} libéré dans le milieu cytoplasmique va pouvoir s'associer à des molécules telle que la calmoduline, et former ainsi des complexes Ca^{2+} /calmoduline. Ceci engendre un changement de conformation de la protéine qui va ainsi permettre l'interaction avec la kinase de la chaîne légère de la myosine. Le complexe Ca^{2+} /calmoduline va activer une kinase et ensuite phosphoryler la chaîne légère de la myosine. La phosphorylation de la chaîne légère de la myosine est nécessaire à l'interaction actine-myosine et donc à la contraction de la CML (5).

I.3.2.3 Hétérogénéité phénotypique des cellules musculaires lisses

Les CML dites « matures » ou « différenciées » dans les vaisseaux adultes sont des cellules caractérisées par un taux de prolifération extrêmement faible, qui ne secrètent que de faibles quantités de protéines constitutives de la MEC et expriment un répertoire unique de protéines contractiles et du cytosquelette, de canaux ioniques, et de molécules de signalisation indispensables à leur propriété contractile. (6–8)

Contrairement au muscle squelettique ou cardiaque, les cellules musculaires lisses vasculaires adultes peuvent subir des modifications phénotypiques réversibles en réponse à des changements environnementaux locaux qui régissent normalement le phénotype : on parle de modulation phénotypique ou « switching ». Ces cellules peuvent ainsi assimiler différents phénotypes en réponse à une stimulation physiologique ou pathologique. Durant le développement vasculaire, les CML exhibent déjà cette capacité d'adaptation. En effet, elles jouent, d'une part, un rôle essentiel dans la production de matrice extracellulaire telle que le collagène, l'élastine, ou les protéoglycans qui sont en proportion majeure dans la paroi vasculaire et d'autre part sont capables d'acquérir les propriétés contractiles nécessaires au maintien du flux sanguin.

Les CML évoluent ainsi d'un phénotype dit « synthétique », caractérisé par l'expression faible de protéines contractiles et une capacité sécrétoire importante vers un phénotype dit « contractile », prédominant dans les vaisseaux adultes normaux. Ainsi les cellules s'adaptent à l'environnement et contribuent ainsi au bon fonctionnement de la circulation sanguine. En revanche, cette plasticité accrue des CML n'est pas toujours un avantage puisqu'elles sont prédisposées à ces « switching » phénotypiques dès lors qu'un signal environnemental anormal est détecté, et ces modulations peuvent, dans certains cas, contribuer au développement ou à la progression de pathologies vasculaires. Plusieurs critères permettent l'identification des CML, dont leur morphologie, l'expression de leurs marqueurs moléculaires et leur fonctionnalité (6,9).

Dans notre travail, nous cherchons à développer une « media vasculaire fonctionnelle » susceptible de maintenir le flux sanguin. Il est important que cette couche soit constituée de CML contractiles dont le phénotype serait maintenu.

I.3.2.4 Marqueurs Moléculaires et état de différenciation des CML

Les CML dans une artère « normale et fonctionnelle » sont des cellules dont la fonction est essentiellement tournée vers la vasomotricité. Elles sont dans un état différencié mature et contractile (10).

Les Protéines de l'appareil contractile

L'α-actine du muscle lisse (α -SMA)

α -SMA est une protéine de 42 kDa, représentant l'un des 6 isoformes de l'actine (isoactine) exprimés par les cellules des mammifères (11). Elle est exprimée de façon prédominante dans les CML matures des artères (12) et constitue 40% des protéines totales de la CML. La capacité de contraction de la CML requiert une forte teneur en α -actine. C'est une protéine normalement caractéristique du muscle lisse mais n'est pas spécifique car elle est exprimée par d'autres types cellulaires, notamment les myofibroblastes.

La protéine du muscle lisse 22 α (SM22- α)

SM22- α est une protéine de 22 kDa, peu connue voir mal identifiée. Elle est presque exclusivement exprimée dans les CML (13).

La calponine

Calponine est une protéine de poids moléculaire de 28 à 34 kDa qui interagit avec les filaments d'actine et la tropomyosine de manière Ca^{2+} -dépendante. Il a été montré qu'elle pouvait inhiber l'activité des filaments d'actine et de myosine (14). Le mécanisme de régulation lié à l'actine via la calponine n'est pas clair, même si son implication dans la phosphorylation est démontrée.

La caldesmone

Cette protéine peut être exprimée sous deux isoformes par les CML : la h-caldesmone (120-150 kDa) et la l-caldesmone (70-80 kDa). La h-caldesmone est exprimée de façon abondante par les CML matures contractiles et la l-caldesmone se localise dans les CML dédifférenciées, immatures, ou les tissus non musculaires.

Smootheline

Cette protéine existe sous la forme de 2 isoformes, smootheline A à 59kDa et smootheline B à 110kDa. La forme smootheline-B est un constituant du cytosquelette des CML qui se trouve exclusivement dans les cellules différenciées du muscle lisse.

La chaîne lourde de la myosine (MHC)

Cette protéine est exprimée essentiellement sous 2 isoformes dans les CML vasculaires : SM-1 (204 kDa) et SM-2 (200 kDa). La SM-2 est un marqueur de différenciation très avancé des CML. MHC a une activité ATP-asique qui permet la contraction musculaire. Certaines études ont défini MHC comme la protéine « moteur » de la contraction musculaire (15).

Les protéines contractiles majeures sont l'actine et la myosine, mais d'autres protéines jouent aussi un rôle dans la régulation de la contraction comme la caldesmone et la calponine. La tropomyosine et l'actinine, quant à elles, sont des protéines dont le rôle sera essentiel dans l'organisation des microfilaments. Il existe également des filaments intermédiaires dans les CML comme la desmine et la vimentine, intervenant dans le maintien de la morphologie cellulaire ou encore dans la résistance au stress.

Dans notre travail, l'expression de ces marqueurs par les cellules traitées sera évaluée. Aucun marqueur seul ne peut identifier les CML mais leur présence cumulée permettrait de valider l'obtention de ce phénotype.

La Matrice extracellulaire (MEC) des CML : distinction entre stade immature et différencié

Les différents états phénotypiques des CML ne sont pas caractérisés par l'expression définie de marqueurs distincts. Cependant les CML vasculaires expriment une variété de marqueurs indicatifs de leur état de maturation (différenciation), même si aucun n'est suffisamment spécifique pour les identifier. Les marqueurs apparaissent progressivement pour former un appareil contractile compétant (16,17).

La présence de certaines protéines (MH-MHC par exemple) permettent seules de caractériser un stade mature (ou différencié) des CML ; au contraire d'autres protéines seules ne serviront uniquement que de critère d'exclusion d'autres types cellulaires. Le tableau 1 permet d'identifier l'expression de ces protéines contractiles selon l'état différencié ou non des CML.

Tableau 1 : Expression des protéines contractiles selon le phénotype des CML (18).

<i>Protéines contractiles et du cytosquelette</i>	<i>CML immatures ou dédifférenciées (média au stade embryonnaire, CML retrouvée dans les pathologies vasculaires)</i>	<i>CML matures ou différenciées (CML de la media adulte des vaisseaux sains)</i>
<i>SM22-α</i>	-/+	+++
<i>α-SMA</i>	-/+	+++
<i>Calponine</i>	-/+	+++
<i>Caldesmone 70 kDa</i>	+++	-/+
<i>Caldesmone 150 kDa</i>	-/+	+++
<i>Tropomyosine</i>	-/+	+++
<i>Smoothelin</i>	-/+	+++
<i>MHC</i>	-/+	+++
<i>Vimentine</i>	+++	+++
<i>Desmine</i>	-/+	+++

I.4 Les pathologies vasculaires : besoin en substituts vasculaires

Les maladies cardiovasculaires font partie de l'une des premières causes de décès dans le monde. Elles représentent, selon les chiffres de 2012 de l'organisation mondiale de la santé, 30% de la mortalité mondiale totale. Les signes d'une défaillance vasculaire ne sont visibles que lorsque la pathologie s'est déjà développée de façon significative.

I.4.1 L'athérosclérose

L'athérosclérose est à l'origine de la plupart des maladies cardio-vasculaires. Cette pathologie artérielle résulte de l'association variable de remaniement de l'intima artérielle consistant en l'accumulation de lipides, glucides, de tissus fibreux, de sang et de produits sanguins, le tout accompagnant des modifications de la media vasculaire.

Les conséquences de la formation de plaques d'athérome se manifestent à différents niveaux. Elles sont responsables d'affections telles que :

- des cardiopathies ischémiques dues à l'athérosclérose des artères coronaires,
- d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) dus à l'athérosclérose des artères à visée encéphalique,
- d'artérites dues dans la plupart des cas à l'athérosclérose des artères des membres inférieurs

✚ d'ischémies aiguës des membres.

L'athérosclérose est une pathologie artérielle aujourd'hui décrite comme une maladie évoluant selon un processus inflammatoire chronique et évolutif (Fan and Watanabe, 2003). Elle correspond au développement d'une plaque d'athérome au niveau de la paroi vasculaire (18). L'évolution de cette plaque d'athérome est lente et mène à l'obstruction partielle (sténose) ou complète de la circulation sanguine. Le mécanisme inflammatoire d'athérogène est aujourd'hui bien décrit dans la littérature. La formation de cette plaque d'athérome et son évolution se fait en plusieurs étapes. L'initiation correspond au passage dans l'espace sous-endothélial de lipoprotéines qui sont retenues dans l'intima et subissent des modifications oxydatives. Les cellules endothéliales vont être activées par les lipoprotéines oxydées (principalement des LDL oxydées). Ces cellules sécrètent des facteurs chimiотactiques qui seront responsables du recrutement des monocytes et lymphocytes T circulants qui migrent dans le sous-endothélium. Des macrophages (provenant de la différenciation préalable des monocytes) exprimant des récepteurs adéquats pour l'internalisation des lipoprotéines oxydées engendrent ainsi la formation de cellules spumeuses. Des études récentes mettent en évidence l'importance du rôle de la composition de la plaque et de son instabilité pouvant pousser à sa rupture et à la thrombose (18).

I.4.2 Traitements associés à l'athérosclérose

Des traitements existent pour des lésions athéromateuses. Dans un premier temps, si la plaque est encore à un stade précoce, des techniques endovasculaires telles que l'angioplastie ou la pose de stents sont utilisées. Il s'agit d'insérer dans la lumière du vaisseau des endoprothèses métalliques afin de rétablir le diamètre de l'artère et maintenir la paroi vasculaire. Cependant ces techniques restent parfois insuffisantes et peuvent induire des thromboses tardives. Le pontage vasculaire à l'aide d'un substitut vasculaire reste nécessaire pour de nombreux patients. Pour cela les substituts préférés demeurent les vaisseaux autologues. Cependant, leur disponibilité est limitée dans le cas d'interventions répétées ou chez des patients ne présentant pas de vaisseaux de qualité suffisante. L'utilisation d'autres types de substituts devient nécessaire. Les allogreffes constituent alors une alternative pour le pontage vasculaire. Cependant cette technique présente des difficultés en termes de conservation des substituts et n'est donc pas préférée. En chirurgie vasculaire actuelle, les prothèses synthétiques pour le remplacement des vaisseaux de gros calibres sont largement utilisées avec succès. Ces prothèses telles que le polytétrafluoroéthylène (PTFE) et le polyéthylène téraphthalate (Dacron®) ou polyuréthane présentent certes des caractéristiques intéressantes en terme de

disponibilité et biocompatibilité mais les résultats pour le remplacement des vaisseaux de diamètre inférieurs à 6 mm ne sont pas favorables à leur utilisation. En effet, la diminution du flux vasculaire et la réponse d'hyperplasie intime contribuent à leur occlusion (19).

De nos jours, plusieurs évaluations cliniques ont montré des résultats prometteurs quant à l'utilisation de prothèses améliorées selon des procédés dits d'ingénierie tissulaire vasculaire (20).

II L'ingénierie tissulaire vasculaire

La mortalité et la morbidité croissante liées aux pathologies vasculaires rendent crucial le besoin en substituts vasculaires pour le traitement des vaisseaux de petits calibres (< 6mm de diamètre). L'ingénierie tissulaire vasculaire est décrite comme un domaine pluridisciplinaire reliant les fondements de l'ingénierie et de la biologie des vaisseaux dans le but de développer des substituts vasculaires adaptés pour restaurer et améliorer la fonction vasculaire. Ce concept est basé sur l'association :

- La matrice ou « scaffold » (naturelle ou synthétique)
- Les cellules
- Les signaux ou acteurs bioactifs

Pour la fabrication de substituts vasculaires, trois techniques d'approche, décrites sur la figure 6, subsistent :

- Assemblage *in vitro* de cellules et matrices dégradables synthétiques ou naturelles
- Auto-assemblage *in vitro* de feuillets cellulaires (scaffold pas nécessairement utilisé)
- Formation *in vivo* de vaisseaux : greffes acellulaires (vaisseaux décellularisés, substituts construits à partir de la MEC...) (21).

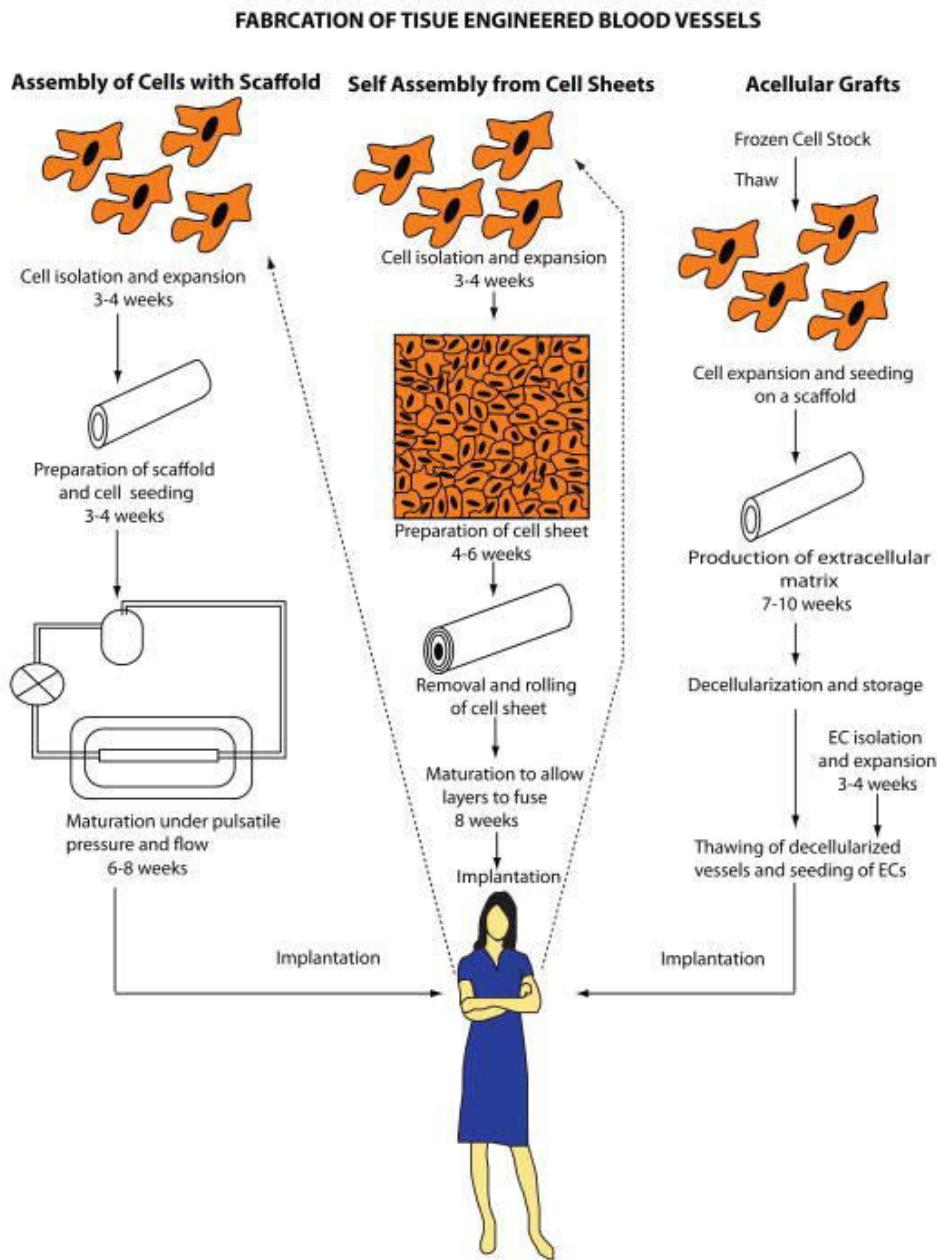


Figure 6 : Schéma des 3 différentes approches en ingénierie vasculaire pour la fabrication de substituts vasculaires (21)

II.1 Les matrices : « Biomatériaux Scaffolds »

II.1.1 Biomatériaux en ingénierie vasculaire : principales caractéristiques souhaitées

Pour la réussite d'une implantation pour le remplacement de vaisseaux de petits calibres tels, plusieurs facteurs sont nécessaires :

Facteurs mécaniques :

- Résistance à des pressions internes considérables, et qui permet aux sutures de résister aux tensions
- Perméabilité et compliance et élasticité de la paroi proche des vaisseaux natifs

■ Facteurs physiologiques

- Propriétés adaptées suite en réponse à la vasoconstriction/relaxation

■ Facteurs biologiques

- Biocompatibilité (non immunogène, non thrombogène)
- Stérilisable

■ Facteurs cliniques

- Temps de fabrication court
- Coût faible
- Disponibilité importante
- Caractéristiques adaptées (diamètre, longueur, structure...)

L'obtention de ce substitut idéal fait l'objet de l'ingénierie vasculaire. L'efficacité d'un biomatériau est fortement liée à ces propriétés physicochimiques. Plusieurs types de matrices ont été utilisés en tant que biomatériaux de nos jours. Dans nos travaux nous nous sommes intéressés à des polysaccharides en particulier : **les alginates**.

II.1.2 Les hydrogels d'alginate et leurs applications en ingénierie tissulaire

II.1.2.1 Composition de l'alginate et processus de gélification

L'alginate est un polysaccharide naturel extrait d'algues brunes. Il est constitué de par l'enchaînement de deux unités monomères : l'acide D-mannuronique (M) et l'acide L-guluronique (G), ces deux étant liés par des liaisons glycosiliques β -(1-4) et α -(1-4), qui s'imbrique selon trois sortes de blocs (figure 7).

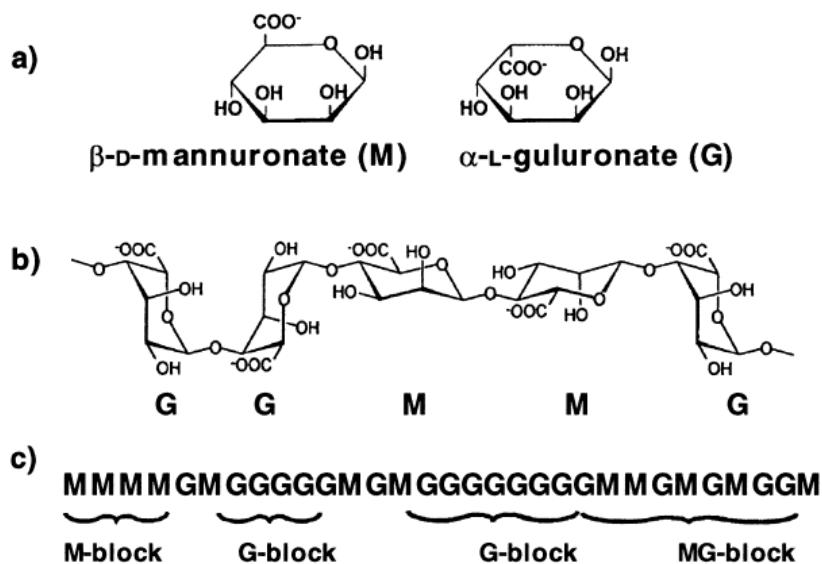


Figure 7 : Caractéristiques structurales des alginates

(a) Les monomères M et G, (b) conformation des chaînes, (c) distribution des blocs : MM ou GG ou MG (22).

Les propriétés physicochimiques des solutions et des gels d'alginate en milieux aqueux dépendent du type d'alginate, c'est à dire de la proportion de résidus mannuroniques par rapport

aux résidus guluroniques (rapport noté M/G), mais aussi du nombre et de la longueur des blocs (23).

L'alginate présente une propriété particulièrement intéressante. En effet, ce polysaccharide chargé négativement peut former un gel lorsqu'il est mis en présence d'ions divalents ou trivalents par des interactions avec les fonctions carboxylates des monomères le constituant. Cependant, tous les ions divalents n'ont pas la même affinité avec l'alginate (24) et le cation le plus utilisé reste le calcium qui déplace facilement les ions sodium contenues dans une solution d'alginate de sodium. Ce processus de gélification est décrit sur la figure 8. Le cation calcium va chélater le réseau d'alginate, pour former un réseau tridimensionnel de type « egg-box ». Ainsi un gel d'alginate de calcium est obtenu.

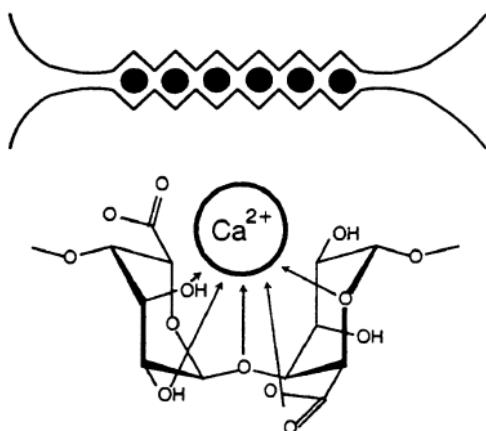


Figure 8 : Schéma représentant le réseau tridimensionnel de type « egg-box » qui se forme lors de la gélification de l'alginate en présence de calcium (22)

II.1.2.2 Propriétés des hydrogels d'alginate et application en ingénierie tissulaire

Les propriétés physico-chimiques des hydrogels d'alginate vont dépendre essentiellement de leurs compositions. En effet plusieurs paramètres tels que l'ion divalent, la masse moléculaire, la concentration ou encore le rapport M/G peuvent influencer ces propriétés (25,26). De plus, la nature des séquences de polymères d'alginate joue sur leur « flexibilité » et peuvent être classés dans l'ordre croissant : GG<MM<MG. Ainsi, plus le gel contient un taux important de G, plus il sera rigide et à l'opposé plus il sera élastique. De même la rigidité du gel augmente avec la concentration en polymère (27). Cependant ces propriétés mécaniques peuvent varier selon les procédés de gélifications élaborés. La diffusion des ions calcium se fait de façon plus lente à basse température, ainsi la gélification est ralentie et induit une structure ordonnée avec des propriétés mécaniques différentes (28). Concernant la stabilité/dégradation des gels d'alginate, ceux-ci sont insolubles dans l'eau. Cependant des agents chélateurs (EDTA, les phosphates, le citrate) ou une forte présence en ion sodium (ration $\text{Na}^+/\text{Ca}^+ < 25/1$), permettent de le dissoudre en solution aqueuse (Thèse H. Mjahed, 2009).

Une matrice scaffold pour être utilisée en ingénierie tissulaire, doit répondre aux critères cités dans le paragraphe précédent. Du fait de sa non cytotoxicité, et de ses propriétés intéressantes l'hydrogel d'alginate représente un bon candidat de support cellulaire en ingénierie tissulaire. L'alginate sous différentes formes (billes, films, ...) a déjà été utilisé pour la culture de types cellulaires variés tels que les chondrocytes, les ostéocytes et encore d'autres. Cependant, aucun récepteur cellulaire ne reconnaît l'alginate ce qui ne favorise pas l'adhésion cellulaire (29). Ainsi, des travaux ont modifié la surface des gels d'alginate par ajout de peptides de type arginine-acide aspartique RGD et ont favorisé l'adhésion cellulaire (30). Les modifications de surfaces permettent alors d'améliorer les propriétés mécaniques et/ou biologiques des gels d'alginates et jouent un rôle essentiel dans l'adhésion cellulaire.

II.1.3 Fonctionnalisation de surface

Durant ces dernières années, les études se sont intéressées à de nouvelles approches de modification de surface afin d'améliorer les propriétés bioactives (interactions cellules/ biomatériaux ou encore hôte/greffon) des biomatériaux utilisés.

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à la fonctionnalisation de surface par dépôt de films auto-assemblés de polyélectrolytes appelés aussi films multicouches de polyélectrolytes (FMP) qui ont pu, dans des études préalables de l'équipe, montrer leurs effets bénéfiques en termes d'adhésion, prolifération et différenciation cellulaire.

Les films multicouches de polyélectrolytes (FMP) ont été mis au point en 1992 par Decher et ses collaborateurs. Ce procédé permet la formation de films minces de polymères hydrophiles. Un dépôt de couches successives de chaînes de polyélectrolytes sur une surface chargée est réalisé. L'épaisseur du film est variable, allant du nanomètre à plusieurs dizaines de nanomètres. La réalisation consiste en fait en la succession alternée de couches de polycations et de polyanions, et forme un film très hydraté. Cette structure possède une forte cohésion du fait des forces électrostatiques qui interagissent entre les différents électrolytes de charges opposées, mais aussi par l'intermédiaire des interactions hydrophobes qui permettent la stabilité du complexe. Il est possible d'utiliser de nombreux polyélectrolytes pour la réalisation de ces FMP comme la poly-D-lysine, la polyéthylénimine, la poly-L-glutamine, ou encore d'autres. Dans notre étude, nous avons utilisés les polycationchlorhydrate poly(allylamine) (PAH) et les polyanionpoly(-4-styrène sulfonate de sodium) (PSS). Ceux-ci sont développés depuis plusieurs années au sein de l'équipe et ont montré des propriétés intéressantes. Ils ont permis une meilleure prolifération de cellules endothéliales et améliorent leur adhésion (31,32). Des

études du groupe ont montré que ces mêmes films, en modifiant la surface interne d'artère déendothélialisées, favorisent *in vivo* le recrutement cellulaire lorsque la charge de la dernière couche est positive (33) et induise une meilleure perméabilité du sang quand elle est négative (34).

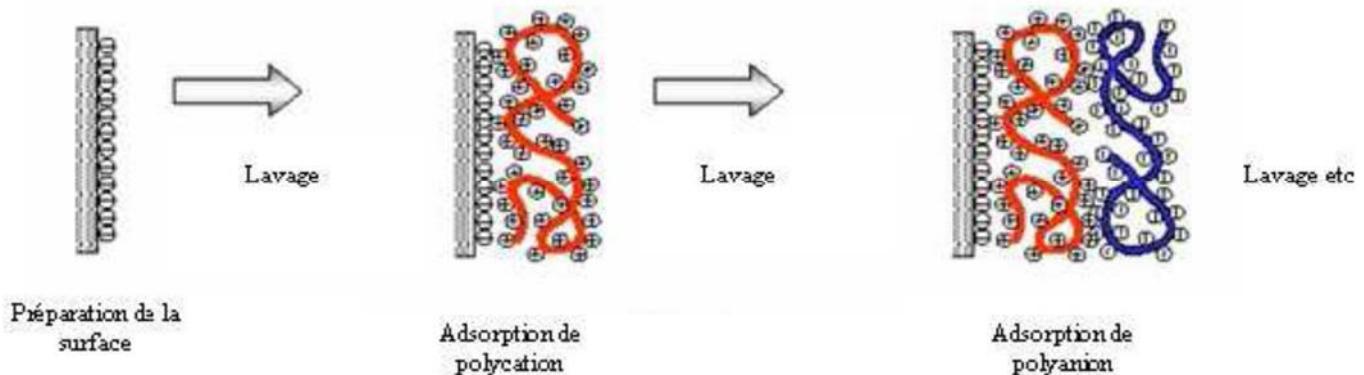


Figure 9 : Principe de construction des FMP
(D'après la Thèse de H. KERDJOUDJ, 2007)

II.2 La cellularisation des biomatériaux

La composante cellulaire des substituts vasculaires exerce un rôle important et offre au greffon les propriétés nécessaires à son implantation et sa longévité.

II.2.1 Les types cellulaires utilisés

Diverses études se sont intéressées à l'isolement et à l'expansion de CML *in vitro* pour développer des substituts vasculaires. Cependant, les résultats ont montré que les CML sont limitées en termes de prolifération et perdent leur phénotype contractile essentiel pour le maintien de la circulation sanguine et la pression artérielle (35). En outre, l'obtention CML des artères matures adultes de sujets sains est rare et un processus invasif est nécessaire, ce qui rend leur utilisation difficile (9).

Ainsi les études se sont intéressées à l'utilisation d'une source alternative de CML, les cellules souches.

II.2.1.1 Les cellules souches

Les cellules souches (CS) suscitent l'intérêt des chercheurs depuis plusieurs années maintenant. Ces cellules possèdent des propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation en divers tissus. Elles sont classifiées en différentes catégories (figure 10) :

- **Les cellules souches totipotentes** : le zygote jusqu'au stade huit est constitué de blastomères pouvant donner tous types cellulaires, et donc, par extension, un organisme entier.

- Les **cellules souches pluripotentes**, capables de donner tous les types cellulaires sauf les annexes embryonnaires et ne peuvent donc pas aboutir à elles seules à la formation d'un être humain.
- Les **cellules souches multipotentes**, susceptibles de donner différents types de cellules, mais spécifiques d'un seul organe. Elles sont présentes dans l'organisme adulte.
- Les **cellules souches unipotentes**, qui ne peuvent donner qu'une seule sorte de cellule, par exemple les hépatocytes du foie ou les kératinocytes de la peau.

Quatre types de cellules souches

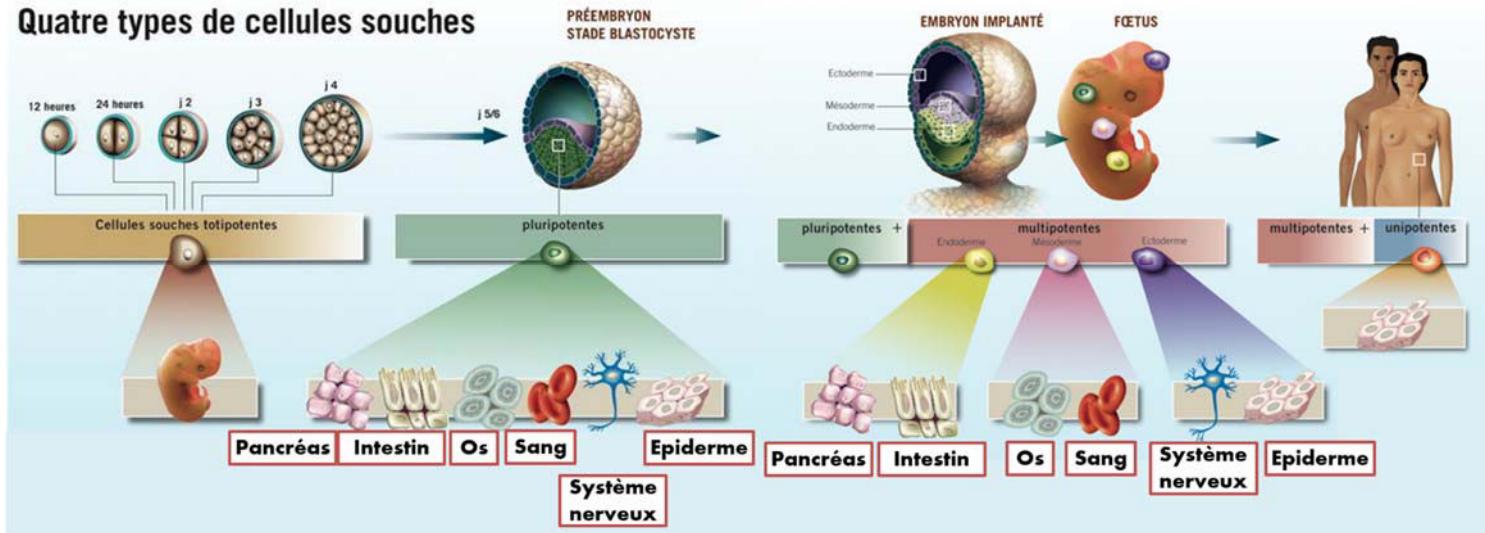


Figure 10: Les différents types de cellules souches

<http://www.sciencesetavenir.fr/infographies/20121008.OBS4954/infographie-les-quatre-types-de-cellules-souches.html>

La capacité de ces CS à se différencier en plusieurs types cellulaires fait d'elles d'excellents candidats en ingénierie tissulaire. Les cellules souches mésenchymateuses qui peuvent être d'origine fœtal ou adultes nous ont particulièrement intéressés dans nos travaux.

a Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) sont des cellules multipotentes à la morphologie fibroblastique et capables de former un tapis cellulaire (36). Friedenstein et son équipe ont identifié ces cellules pour la première fois en 1966 (37). À ce jour, aucun antigène spécifique des CSM humaines n'a encore été identifié (38). Cependant, un profil phénotypique est connu : elles sont identifiées comme positives pour l'expression des marqueurs CD90, CD105, CD73 et elles sont négatives en ce qui concerne l'expression des marqueurs hématopoïétiques (CD34, 45). Les CSM isolées directement de la moelle osseuse sont positifs pour CD34 (antigène spécifique des Cellules Souches Hématopoïétiques), mais perdent cet antigène lors de la culture *in vitro*.

Les CSMs les plus connues et encore les plus utilisées aujourd'hui sont les CSMs issues de la Moelle osseuse (MO). Ce sont les premières cellules décrites dans la littérature en tant que CSM. Cependant les CSMs peuvent être isolées d'autres tissus, tels que le tissu adipeux, le

follicule pileux, la pulpe dentaire... Elles peuvent être d'origine adulte ou fœtal et sont aussi retrouvées au niveau des tissus extra-embryonnaire comme le liquide amniotique, le placenta, ou le cordon ombilical.

b **Le cordon ombilical humain : source prometteuse de cellules souches mésenchymateuses (revue)**

Cette partie est présentée sous forme de revue de la littérature publiée en 2014 dans le journal Tissue Engineering Part B.

Cette revue présente cette source de CSM prometteuse que représente la gelée de Wharton (tissu conjonctif du cordon ombilical) et la compare aux autres sources de CSMs utilisées en ingénierie tissulaire.

Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: The New Gold Standard for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies?

Reine El Omar,^{1,*} Jacqueline Beroud,^{1,*} Jean-Francois Stoltz, PhD,^{1,2} Patrick Menu, PhD,¹
Emilie Velot, PhD¹ and Veronique Decot, PharmD, PhD^{1,2}

Due to their self-renewal capacity, multilineage differentiation potential, paracrine effects, and immunosuppressive properties, mesenchymal stromal cells (MSCs) are an attractive and promising tool for regenerative medicine. MSCs can be isolated from various tissues but despite their common immunophenotypic characteristics and functional properties, source-dependent differences in MSCs properties have recently emerged and lead to different clinical applications. Considered for a long time as a medical waste, umbilical cord appears these days as a promising source of MSCs. Several reports have shown that umbilical cord-derived MSCs are more primitive, proliferative, and immunosuppressive than their adult counterparts. In this review, we aim at synthesizing the differences between umbilical cord MSCs and MSCs from other sources (bone marrow, adipose tissue, periodontal ligament, dental pulp,...) with regard to their proliferation capacity, proteic and transcriptomic profiles, and their secretome involved in their regenerative, homing, and immunomodulatory capacities. Although umbilical cord MSCs are until now not particularly used as an MSC source in clinical practice, accumulating evidence shows that they may have a therapeutic advantage to treat several diseases, especially autoimmune and neurodegenerative diseases.

Introduction

MESENCHYMAL STROMAL CELLS (MSCs) are attractive cells due to their capacity of long-term *ex vivo* proliferation, multilineage differentiation potential, and immunomodulatory properties. These cells were first identified and isolated from the bone marrow (BM) and have emerged as powerful tools in tissue engineering and regeneration.¹ Although adult BM is the most common and best-characterized source of MSCs, Wharton's jelly (WJ) of the umbilical cord provides a novel source of MSCs with higher accessibility and fewer ethical constraints than BM holding great promise as an alternative. WJ is an extra-embryonic tissue that is easily obtained after birth, and it has initially been described by Thomas Wharton in 1656.² While the isolation of MSCs from BM requires an invasive procedure for the donor, MSCs can be noninvasively isolated from WJ.³ These WJ-MSCs are believed to be more primitive than MSCs derived from more mature tissue sources and to have intermediate properties between embryonic and adult stem cells.⁴ Moreover, WJ-MSCs are available in potentially large quantities, have a fast proliferation rate, a great expansion capability, do not induce teratomas, and harbor strong immunomodulatory capacities.^{5,6}

In this review, we will focus on the similarities and differences between WJ-MSCs and MSCs from other sources with regard to their proliferation, their surface markers, and their transcriptome profiles. The controversy between their paracrine effects and trans-differentiation potential will be discussed. In addition, we will particularly highlight their roles as (a) immunomodulators and the mechanisms involved in their immunosuppressive properties, as (b) anti-tumor agents, (c) migratory curative cells with (d) a special emphasis on their clinical and therapeutic applications in autoimmune and neurodegenerative diseases.

Main Features of WJ-MSCs

Isolation methods

Isolation of MSCs from WJ requires complex processing. Many isolation and expansion protocols have been demonstrated for a fast and efficient *ex vivo* generation of large quantities of cells. Currently, "enzymatic digestion" and "tissue explant" are the two types of methods used for the isolation of WJ-MSCs.⁷

Those based on enzymatic digestion have mainly used collagenase alone or in combination with other enzymes

¹CNRS UMR UL 7365, Bâtiment Biopôle, Faculté de médecine, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

²CHU de Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

*Both authors contributed equally to this work.

(e.g., trypsin, hyaluronidase) and were performed with or without the dissection of the umbilical cord into small pieces and with or without removing the blood vessels.⁸ Recently, Han *et al.* have suggested that using 0.2% collagenase II at 37°C for a digestion of 16–20 h is an effective and simple enzyme digestion method.⁷ Other groups have found that enzymatic digestion can alter cell population and function and, thus, have developed explant approaches without using any enzyme and taking advantage of the ability of MSCs to migrate from the tissue to adhere on the plastic.^{8–10} Hua *et al.* have, very recently, compared three explant and three enzymatic methods with regard to time of primary culture, cell number, cell morphology, immune phenotype, and differentiation potential of WJ-MSCs. They have shown that the 10 mm-size tissue explant method was the optimal protocol for the isolation of MSCs.¹¹

Morphology and proliferation capacity

WJ-MSCs cultured *in vitro* shared a similar fibro-blastoid shaped morphology to BM, amniotic fluid (AF), or teeth and periodontal ligament (PDL)-MSC.^{12,13}

The proliferation capacity of cells is important regarding their application potential in cell therapy and tissue engineering. WJ-MSCs proliferation capacity seems to be different from other sources MSCs. Indeed, for instance, Yu *et al.* have shown that over a period of 7 days after seeding, WJ-MSCs grew much faster than PDL-MSC and had a cell doubling time of 22.23 h against 27.51 h for PDL-MSC.¹⁴ Compared with BM-MSCs, WJ-MSCs grow much faster for

the early passages and have a cell doubling time (24 h) almost twice shorter than BM-MSCs (40 h) over the 1st passage. These observations were confirmed by Abu Kasim *et al.* showing that WJ-MSCs and dental pulp-mesenchymal stem cells (DP-MSCs) were highly proliferative as compared with BM and adipose tissue (AT)-MSCs.¹⁵ Furthermore, WJ-MSCs have a greater ability to form colony-forming unit-fibroblasts colonies *in vitro* than BM-MSCs, and their formation's frequency depends on seeding cell density.^{4,16}

Other studies focusing on DP-MSCs showed that cells from both sources (WJ and teeth) initially grew slowly but their proliferation rates were increased after the first subculture.¹⁷ However, WJ-MSCs growth is influenced by the number of culture passages *in vitro*, as amplifying these cells until passage 10 will result in a slower cell growth compared with the same cell culture at passage 5.¹⁸

A very recent study has evaluated the proliferation kinetics and phenotypic characteristics of MSCs derived from WJ and AT during prolonged *in vitro* expansion and found that WJ-MSCs were isolated with a high efficiency and bore a substantially increased proliferation capacity; whereas AT-MSCs exhibited a reduced proliferation potential showing typical signs of senescence at an early stage.¹⁹

Marker expression at protein level

A large number of studies have analyzed the surface markers of WJ-MSCs and compared their expression profiles with other sources of MSCs such as BM, teeth, or AF.

TABLE 1. PHENOTYPIC PROFILE OF WJ-MSCS COMPARED WITH MSCS FROM OTHER SOURCES

WJ-MSCs markers	Compared with []	References
Positive: CD29, CD105, HLA-ABC, Oct-4, Gata-4, Cx43, α -actin, cTnt Negative: CD34, HLA-DR	[AF-MSCs] Similar marker expression except Oct-4: ~25% for WJ-MSC vs. ~51% for AF MSC	18
Positive: CD44, CD13, CD56, CD61, CD73, CD105, CD90, CD166, CD29, HLA-ABC, CD59 Negative: HLA-DR	[dental pulp of milk and adult wisdom teeth-derived MSCs] Similar marker expression	17
Positive: CD73, CD105, CD90, Negative: CD34, HLA-DR, CD45, CD19, CD11b	[PDL-MSCs] Similar marker expression	14
Positive: CD68 Negative: CD34, CD45, CD163	[promyelocytic cell line (HL-60): known to express CD68] Similar level expression	20
Positive: CD13, CD29, CD44, CD105, CD106, CD73, CD166, HLA-ABC, CD90 Negative: CD14, CD34, CD38, CD45 CD31, HLA-DR	[Bone marrow MSCs] Similar marker expression except: <ul style="list-style-type: none">• CD106: WJ << BM• HLA-ABC: WJ < BM	13,16,21
Positive: CD105, CD146, CD73, CD90 Negative: CD14, CD34, CD31, CD45, CD3	[human MSCs from: tibial plateau (TP), trabecular bone, iliac crest (IC), BM, and WJ umbilical cord] Similar level expression for all markers except CD46 (twice more expressed for IC than for WJ and TP)	22
Positive: CD44, CD73, CD105, CD90, CD106, CD29, vimentin, laminin, Oct-4, Nanog, Negative: CD34, CD14, CD45, CD31, vWF	[Adult and fetal bone marrow (aBM-MSCs and fBM-MSCs) and adipose tissue-derived MSC (AT-MSCs)] Similar marker expression except Oct-4 and Nanog expressed only by BM-MSCs and WJ-MSCs	23

AF, amniotic fluid; AT, adipose tissue; BM, bone marrow; IC, iliac crest; MSCs, mesenchymal stromal cells; PDL, periodontal ligament; TP, tibial plateau; WJ, Wharton's jelly.

The following table summarizes the phenotypic profiles of these MSCs mentioned in the literature (Table 1).

WJ-MSCs, such as MSCs from other sources, positively express the classical mesenchymal surface markers. However, Table 1 highlights the differences in the expression levels of other markers:

- Unlike BM-MSCs, WJ-MSCs weakly expressed endoglin (SH2, CD105) and CD49e at passage 8.
- WJ-MSCs and AT-MSCs expressed CD106 at much lower levels than BM-MSCs.
- In comparison with BM-MSCs, HLA-ABC is very weakly expressed by WJ-MSCs, suggesting that these cells could be good candidates for allogeneic cell therapy.

Transcriptomic profile

Emerging data have compared the transcriptomic profile of WJ-MSCs with MSCs from other sources. The following table gives an overview of the main comparisons (Table 2).

Some studies showing a high expression of embryonic genes such as *LIFR*, *ESG1*, *SOX2*, *TERT*, *NANOG*, *POUFI*, *OCT4*, *LIN28*, *DNMT3B*, and *GABRB3* by WJ-MSCs suggest that WJ could be a more primitive source of MSCs.^{4,6,24–26} Furthermore, as shown in Table 2, WJ-MSCs express genes encoding for proteins that are associated with morphogenesis: *SHH*, *neuregulin-1* and 4, *SNA2*, and *WNT4*.²⁷

WJ-MSCs, compared with MSCs from other tissues, differentially express genes involved in bone development. Transcription factors involved in osteoblast differentiation such as *RUNX2* were found to be expressed at comparative levels in BM-MSCs, skin-MSCs, AT-MSCs, and WJ-MSCs. However, Table 2 shows that skin-MSCs are characterized by a significantly increased expression of genes (*BMP4*, *BMP2*) that are associated with bone and cartilage development in comparison to the other MSCs.

WJ-MSCs reveal an important expression of genes involved in liver and cardiovascular development. The transcriptomic profile of WJ-MSCs and AF-MSCs reveals the basal expression of several mature myocardial genes: *GATA-4*, *c-TnT*, and *Cx43*, which could be associated to the potential of differentiation into myocardial cells. Interestingly, a high expression of genes encoding for GATA-binding protein 6 (*GATA6*), heart and neural crest derivatives expressed 1 (*HAND1*), inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule 1 (*ICAM1*), and vascular cell adhesion molecule 1 (*VCAM1*) was detected in WJ-MSCs (Table 2). WJ-MSCs were also shown to express genes involved in cardiovascular system development, including angiogenesis, cardiogenesis, endothelial cell (EC) development, and vasculogenesis (Table 2). In addition, other genes involved in cardiovascular development, including endoglin (*ENG*), *GJA1*, *VCAM1*, and *GATA6*, were significantly increased in BM-MSCs.²⁸

The transcriptomic profile also reveals that WJ-MSCs have a significantly increased expression of genes (*AFP*, *DKK1*, *DPP4*, and *DSG2*) which are associated with liver devel-

opment compared with BM-MSCs, AT-MSCs, and skin-MSCs.

WJ-MSCs express genes involved in neural development. WJ-MSCs and DP-MSCs revealed a high expression of the neuro-ectoderm lineage markers.¹⁵ De Kock *et al.* have studied the whole gene expression profiles of four human mesoderm-derived stem cell populations: AT-MSCs, BM-MSCs, skin-MSCs, and WJ-MSCs. They have shown differences in gene expression between distinct stem cell types. Skin-MSCs predominantly expressed genes involved in neurogenesis (NES), skin, and bone (*RUNX2*, *BMP4*).²⁸

Such a transcriptomic profile reveals a closer proximity between WJ-MSCs and BM-MSCs than between other combinations. Considering the genomic profile of WJ-MSCs, WJ may be considered a reliable source of MSCs useful not only in cardiovascular regenerative medicine^{30,31} but also in neurodegenerative diseases. The latter will be discussed in the last part of the review.

Regenerative role of MSCs: differentiation potential versus secretome

A summary of the various comparisons between sources of MSCs that have been already described in the literature is shown in Figure 1.

WJ-MSCs differentiate into adipocytes slower than BM-MSCs.⁴ Bai *et al.* have shown that AF-MSCs and WJ-MSCs could differentiate into myocardial-like cells with an important expression of myocardial genes such as *GATA-4*, *c-TnT*, α -actin, and *Cx43* after myocardial induction.¹⁸

More recently, Chen *et al.* have worked on *in vitro* differentiation analysis of MSCs isolated from DP and WJ. They have shown that MSCs isolated from both sources exhibited the capacity to differentiate into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes. However, they have noted some differences in their differentiation potentials. DP-MSCs and WJ-MSCs had a similar potential for osteogenic differentiation, but the chondrogenic and adipogenic differentiation potentials of WJ-MSCs were more important than those of DP-MSCs.¹⁷ Meanwhile, according to Zhang *et al.*, fetal human BM-MSCs have the highest potential of *in vitro* monolayer osteogenic differentiation, come after human WJ-MSCs, human adult BM-MSCs, and then AT-MSCs.²³ Baksh *et al.* have found similar results as the previous study when comparing the *in vitro* differentiation potentials of WJ-MSCs and BM-MSCs.⁴⁴

Jo *et al.* have studied the *in vivo* osteogenic differentiation, in a rat model, of human MSCs isolated from different sources. No differences were detectable in osteogenesis between adult AT-MSCs, BM-MSCs, and WJ-MSCs.⁴⁵ Controversial results have been described by Zhang *et al.* In fact, after a subcutaneous implantation of MSCs scaffolds in mice, better results were obtained with scaffolds elaborated with human fetal and adult BM-MSCs than those constructed with WJ-MSCs and AT-MSCs.²³ Differences in the results between the mentioned studies are probably due to the different experimental conditions. This explains that MSCs of various tissue origins have specific characteristics of differentiation or require different conditions for osteoinduction.

TABLE 2. TRANSCRIPTOMIC PROFILE OF WJ-MSCS COMPARED WITH MSCS FROM OTHER SOURCES

Gene	Gene identification/function	WJ-MSC ₃	BM-MSC ₃	PDL-MSC ₃	AT-MSC ₃	Skin-derived MSC ₃	References
Genes related to bone development and neurogenesis							
<i>BMP4</i>	Induce endochondral osteogenesis	++	+	ND	ND	++	28
<i>TGFBR1</i>	Bone development	++	++	ND	ND	ND	27
<i>OPN</i>	Osteogenic marker	++	++	+++	ND	ND	14,27
<i>STAT1</i>	Bone development	+	+	ND	ND	ND	22
<i>BSP</i>	Osteogenic marker	-	ND	++	ND	ND	14
<i>OSX</i>	Osteogenic marker	-	ND	-	ND	ND	14
<i>CXCR4</i>	Mesoderm marker	-	+	ND	ND	ND	27
<i>BMP2</i>	Bone development	+	++	ND	ND	++	28
<i>RUNX2</i>	Osteogenic marker	++	++	ND	ND	++	22
<i>CDH2</i>	Neural gene	++	++	ND	ND	-	27
<i>NES</i>	Neural development	++	++	ND	ND	++	28
Gene related to liver and cardiovascular systems							
<i>GATA-4</i>	Mature myocardial gene	+	+	ND	ND	++	18,28,29
<i>c-TnT</i>	Mature myocardial gene	++	++	ND	ND	ND	18
<i>VEGF</i>	Cardiovascular development	++	++	ND	ND	ND	27
<i>Cx43</i>	Mature myocardial genes	++	++	++	ND	ND	18,20
<i>VCAMI</i>	Cardiovascular development	++	++	ND	ND	-	28
<i>GJA1</i>	Cardiovascular development	++	++	ND	ND	++	28
<i>AFP</i>	Liver development	++	++	-	ND	++	28
<i>DSG2</i>	Cardiovascular development	++	++	++	ND	-	28
<i>ENG</i>	Cardiovascular development	++	++	++	ND	-	28
<i>HAND1</i>	Cardiovascular development	++	++	-	ND	-	28
<i>GATA6</i>	Cardiovascular development	++	++	-	ND	-	28
<i>DPP4</i>	Liver development	++	++	-	ND	-	28
<i>DKK1</i>	Liver development	++	++	-	ND	-	28
Gene related to stemness							
<i>ACTG2</i>	Stemness-related genes	+	+	++	ND	ND	27
<i>TERT</i>	Stemness-related genes	++	++	+/-	ND	ND	4,27
<i>ESG1</i>	Stemness-related genes	++	++	++	ND	ND	27
<i>Oct3/4</i>	Stemness-related genes	++	++	++	ND	ND	27
<i>ABCG2</i>	Stemness-related genes	++	++	++	ND	ND	27
<i>LFR</i>	Stemness-related genes	++	++	++	ND	ND	27
<i>SOX2</i>	Stemness-related genes	++	++	++	ND	ND	14,27
<i>Nanog</i>	Stemness-related genes	++	++	++	ND	ND	14
<i>Oct-4</i>	Stemness-related genes	++	++	++	ND	ND	14
<i>THY1</i>	MSCs marker	++	++	++	ND	-	28
Adipogenic and chondrogenic genes							
<i>PPARγ</i>	Adipogenic marker	++	++	++	ND	ND	13,14
<i>FABP4</i>	Adipogenic marker	++	++	++	ND	ND	13
<i>LPL</i>	Adipogenic marker	-	-	-	ND	ND	13
<i>LEPR</i>	Adipogenic marker	-	-	-	ND	ND	ND

(continued)

TABLE 2. CONTINUED

Gene	Gene identification/function	WJ-MSCs	BM-MSCs	PDL-MSCs	AF-MSCs	AT-MSCs	Skin-derived MSCs	References
<i>CD36</i>	Adipogenic marker	-	ND	+	ND	ND	ND	14
<i>CEBPA</i>	Adipogenic differentiation	+	ND	++	ND	ND	ND	14
<i>COL2</i>	Chondrogenic marker	+	+	+	ND	+	+	14
<i>SOX9</i>	Chondrogenic marker	+	+	+	ND	ND	ND	14
Genes implicated in morphogenesis, adhesion, cell structure, and other mesodermal markers								
<i>ACTA</i>	Maintains the cytoskeleton	+	ND	+	ND	ND	ND	18
<i>ACTB</i>	Cell motility, structure, and integrity	+++	ND	+	ND	ND	ND	27
<i>CDH5</i>	Controls the cohesion and organization of the intercellular junctions in endothelial cells	++	ND	+	ND	+	+	28
<i>ITGB1</i>	Extracellular adhesion molecule	++	++	ND	ND	ND	ND	18
<i>STAG1</i>	Encodes for component cohesion	+	+	ND	ND	ND	++	28
<i>WT1</i>	Kidneys and gonads development	++	-/+	ND	ND	ND	-/+	28
<i>WNT4</i>	Associated with morphogenesis	+	+	ND	ND	ND	ND	18
<i>SNA2</i>	Associated with morphogenesis	++	++	ND	ND	ND	ND	18
<i>SHH</i>	Associated with morphogenesis	-/+	+	ND	ND	ND	ND	18
<i>Neuregulin 4</i>	Associated with morphogenesis	++	++	ND	ND	ND	ND	18
<i>COL1A1</i>	Mesodermal marker	++	++	ND	ND	-	ND	28
<i>CXCR4</i>	Mesoderm marker	+	+	ND	ND	ND	ND	18
<i>ICAMI</i>	Mesodermal lineage specification	+++	+	ND	ND	+	+	28
<i>CD44</i>	Mesoderm marker	++	++	ND	ND	ND	ND	18
<i>PECAMI</i>	Cell adhesion marker	++	+/-	ND	ND	+/-	+	28
<i>CD9</i>	Implication in differentiation, adhesion, and signal transduction	+	-	ND	ND	+	+	28
<i>Collagen X</i>	Mesoderm marker	-	++	ND	ND	ND	ND	18
<i>FKK-1</i>	Mesoderm marker	++	-	ND	ND	ND	ND	18
<i>CD68</i>	Highly expressed by human monocytes and tissue macrophages	+++	ND	ND	ND	ND	ND	20

The table given next presents the difference of gene expression, for various markers, between the different MSCs sources. The difference of expression between the sources is presented by +++, ++, +, -, and ND corresponds to a nondetermined comparison.

PPLA: cyclophilin A; Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A; ITGB1, integrin, b1: fibronectin receptor, b polyneptide; WNT4, wingless-type MMTV integration site family member 4; SHH, sonic hedgehog homolog (Drosophila); SNAI2, snail homolog 2 (Drosophila); TGFBR1, transforming growth factor, β receptor 1; TERT, telomerase reverse transcriptase; ESG1:ESTs, weakly similar to embryonal stem cell specific gene 1; Cx43, connexin-43; ACTA, alpha-actin; ACTB, beta actin; CDH2, cadherin 2; OPN, osteopontin; LIFR, leukemia inhibitory factor receptor; SOX2, sex-determining region Y (SRY)-box; ND, nondetermined.

Cell Types Sources	Chondrocyte	Osteocyte	Adipocyte	Endothelial cell	Neuron	Myocardial cell	Pancreatic islet-like cell
Bone Marrow	++ (32, 33)	++ (23, 32)	++ (32, 34)	+++ (17)	++ (27)	++ (35)	++ (12)
Adipose tissue	++ (32, 33)	++ (23, 36)	+++ (23, 34, 36)	ND	+++ (36)	++ (35)	++ (12)
Dental pulp	++ (17)	++ (12, 14, 17)	++ (17)	ND	++ (37, 38)	++ (35)	++ (39)
Umbilical cord	++ (14, 17)	++ (14, 17, 36)	++ (4, 14, 36)	+++ (17)	++ (27, 36)	++ (18)	++ (12)
Periodontal ligament	+++ (12, 14)	+++ (14)	++ (12, 14)	++ (40)	++ (37, 38)	ND	ND
Amniotic fluid	++ (33)	++ (41)	++ (4)	++ (42)	++ (43)	++ (18)	++ (39)

FIG. 1. Differentiation potential of WJ-MSCs compared with MSCs from other sources. This figure shows differences in the differentiation potential of MSCs from many sources toward a specific cell type, which is indicated by +++, ++, +, -, and ND corresponds to a nondetermined comparison. For example, PDL-MSCs have the greatest potential to differentiate into chondrocytes, while DP-MSCs have the lowest differentiation potential toward this type of cells. DP, dental pulp; WJ-MSC, Wharton's jelly-mesenchymal stromal cell. Color images available online at www.liebertpub.com/tcb

Very recently, Yu *et al.* have shown that WJ-MSCs are not good alternatives for periodontal tissue generation compared with PDL-MSCs which have a much better osteo/dentinogenic differentiation potential.^{12,14} Various studies have demonstrated the capacity of WJ-MSCs to differentiate into pancreatic islet-like cells.^{46–48} Kim *et al.* have compared this potential with other sources of MSCs and did not show significant differences between BM-MSCs and AT-MSCs.⁴⁶

Some authors have focused on the application of MSCs in vascular engineering and more particularly their capacity to differentiate into EC, or to acquire pericyte markers when co-culturing with EC. Chen *et al.* were pioneers in studying the endothelial differentiation potential of BM-MSCs and WJ-MSCs. Both sources of MSCs were able to differentiate into EC but WJ-MSCs appear to have a greater differentiation potential, as derived EC-like exhibited a higher expression of endothelial markers.⁵

For a long time, it has been considered that the regenerative potential of MSCs is due to their plasticity and differentiation capacity. However, the direct link between their differentiation potential and their beneficial effects has

never been proved. Indeed, recent studies suggest that the benefits of MSCs transplantation may be associated to a paracrine modulatory effect rather than the replacement of affected cells, at the site of injury, by differentiated stem cells.^{49,50} Emerging data suggest that stem cells could be then considered as a reservoir of trophic factors which are released when needed to modulate and repair surrounding damaged tissues, which leads to a paradigm shift in regenerative medicine. Understanding the cell secretome has attracted much attention, and it has been demonstrated that trophic factors could have many effects such as modulation of inflammatory reactions, immunomodulation, anti-apoptotic and pro-angiogenic capacities, and many others (reviewed in Doorn *et al.*⁵¹). Vallone *et al.* have highlighted in their review the exact mechanisms that would lead MSCs to damaged tissues after transplantation, where they will exert their remedial actions.⁵² Katsuda *et al.* have also described a possible therapeutic mechanism of AT-MSCs, in Alzheimer disease, through a paracrine pathway. Vesicles secreted by these cells could carry soluble factors that may treat this pathology. Results of this study will be discussed

in the final part of this review. Therapeutic effects of BM-MSCs in regenerative medicine (heart disease for example) through paracrine/autocrine mechanisms have been reviewed by Pourrajab *et al.*⁵³

The controversy between the implication of the differentiation potential and the paracrine mechanisms of MSCs in their beneficial therapeutic actions is shown in Figure 2.

During the next few sections of this review, we will highlight the effects of WJ-MSCs secretome involved in many processes such as immunomodulation, homing to damaged tissues and others.

WJ-MSCs as Immunoprivileged Cells

Immunological features of MSCs

In the last decade, MSCs have gained considerable attention as candidates for tissue engineering, as modulators of immune responses in graft-versus-host disease, and as autoimmune diseases,⁵⁴ as these cells, once administered therapeutically, may be able to evade the immune system of the host. They are currently being assessed as a novel anti-inflammatory therapeutic agent in numerous clinical trials.⁵⁵ Two outstanding features of MSCs are relevant to their immunomodulatory effects:

Immunosuppression. MSCs-mediated immunosuppression describes the fact that MSCs are able to suppress several functions (proliferation, production of soluble factors, and cellular cytotoxicity) exerted by diverse immune cells such as T-, B-, and natural killer (NK) cells. It has been shown that immunosuppression is mediated by both cell-cell contact and paracrine signals via soluble factors.

Immunoprivilege. MSCs themselves are somehow protected from immunological defense mechanisms.⁵⁶ Indeed, MSCs lack expression of major histocompatibility complex (MHC) class II, giving MSCs the potential to escape recognition by alloreactive CD4⁺ T cells but express MHC Class I molecules. This expression enables them to escape from NK cell lysis. In addition, MSCs do not express co-stimulatory molecules required for effector T-cell induction.⁵⁷

Even if BM-MSCs, considered the gold standard in MSC therapy, and UC-MSCs share many similarities, emerging data suggest that WJ-MSCs could be less immunogenic than

BM-MSCs, making them a good candidate for allogeneic transplantation.

MSCs-mediated immunosuppression

MSCs show an absence or a low expression of MCH class II and co-stimulatory molecules, so they can be considered immunoprivileged cells, but they also interfere with different pathways of the immune response.⁵⁸ Their ability to modulate the immune system was first recognized after the fact that they could evade immunosurveillance after cell transplantation.⁵⁹ Especially, human MSC populations such as BM-, AT-, or UC-derived MSCs selectively alter immune cell function by suppressing T-cell proliferation, B-cell proliferation, and terminal differentiation,⁶⁰ inhibiting NK cell proliferation and cytotoxicity, steering monocytes and dendritic cells (DCs) to an immature DC state.⁶¹

MSCs and immune cell population. Adaptive immunity:
MSCs and T cells: T cells recognize antigens and are critical for cell-mediated immune response. They mature within the thymus into one of different subtypes with diverse roles. These cells are involved in the maintenance of self-tolerance, activation of other lymphocytes, lysis of infected cells, and interaction with cells of the innate immune system.

Currently, interactions of MSCs with T cells have been extensively studied. Graft versus Host Disease models presented the first evidence that MSCs can regulate immunosuppression *in vivo*.⁶² MSCs could reduce allograft rejection, which is partly mediated by T cells.^{63,64} Shortly afterward, T-cell immunosuppression mediated by MSCs was demonstrated *in vitro*. MSCs probably inhibit, via their induced or constitutively expressed secreted factors, T-lymphocyte activation and proliferation induced by mitogens and alloantigens^{65–68} as well as T-cell activation with CD3 beads.^{66,69} MSCs have been shown to equally inhibit CD4⁺, CD8⁺, CD2⁺, and CD3⁺ subsets.⁷⁰ In addition, T-lymphocytes inhibited by BM-MSCs do not enter apoptosis, as they actively proliferate on re-stimulation with cellular and humoral activators.⁶⁵ Many other studies have shown the ability of BM-MSCs to induce the expansion of functional regulatory T cells (Tregs).^{70,71} Recently, it has been shown that adhesion molecules ICAM1 and VCAM1,

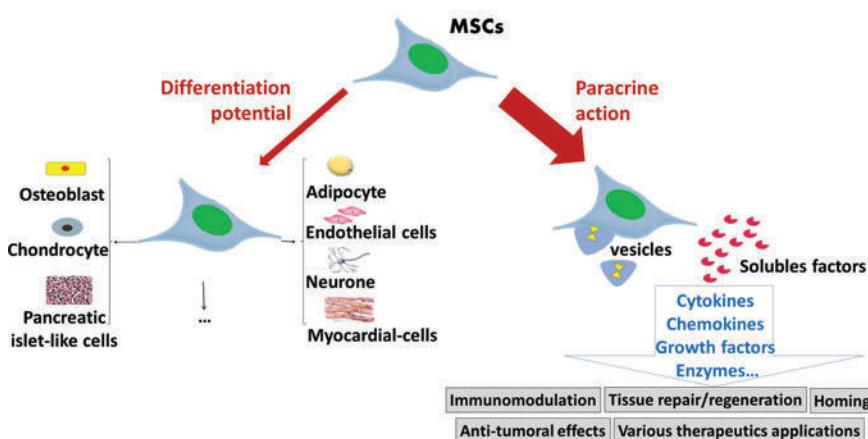


FIG. 2. Summary of the potential therapeutic roles of MSCs. Beneficial effects of MSCs have been attributed to their differentiation potentials. However, attention has been shifted to their paracrine effects (via vesicles and soluble factors) rather than their plasticity. The role that MSCs will play is determined by the microenvironment where they reside. MSCs, mesenchymal stromal cells. Color images available online at www.liebertpub.com/teb

which are required for a direct adhesion of MSCs to T cells, are critical for subsequent MSC-mediated immunosuppression, and are inducible by the parallel presence of interferon-gamma (IFN- γ) and inflammatory cytokines.⁷² Another possible mechanism underlying the BM-MSC-mediated suppression of T cells is to prevent their entry into the S phase of the cell cycle by mediating irreversible G0/G1 phase arrest through the inhibition of cyclin D2 expression.^{69,73} Similarly, it has been shown that the addition of DP-MSCs to phytohemagglutinin-stimulated T cells mediated an inhibition of their response.⁷⁴ Increased expression of immunomodulatory soluble factors (hepatocyte growth factor [HGF]- β 1, ICAM-1, IL-6, IL-10, transforming growth factor- β 1 [TGF- β 1], VCAM1, and vascular endothelial growth factor (VEGF)) secreted by human DP-MSCs was detected in a co-culture system with decreased expression levels of some pro-inflammatory cytokines and increased levels of some anti-inflammatory ones. Induction of Treg markers by human DP-MSCs was also demonstrated.⁷⁵ A very recent study has examined the *in vivo* and *in vitro* immunomodulatory effects of human supernumerary tooth-derived mesenchymal stem cells (SNT-MSCs). It has been shown that, in *in vitro* co-cultures, these cells suppressed the viability of T cells and also the differentiation of Th17 cells. *In vivo* transplantation of SNT-MSCs in systemic lupus erythematosus model MRL/Ipr mice suppressed increased levels of peripheral Th17 cells and IL-17 as well as *ex-vivo* differentiation of Th17 cells.⁷⁶

Fetal MSCs have been reported to have similar inhibitory effects on T-lymphocytes. It has been shown that mitogen-induced T-cell proliferation in an allogeneic model transplant, as well as in a xenograft model, was effectively suppressed by WJ-MSCs with levels comparable to BM-MSCs immunosuppression.⁷⁷ In addition, IFN- γ and/or tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) produced by activated T cells stimulate the production of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by MSCs, which, in turn, inhibited T-cell proliferation.⁷⁸ Tipnis *et al.* have reported that the expression of B7-H1, a negative regulator of T-cell activation constitutively expressed by WJ-MSCs, is increased after IFN- γ treatment. In addition, IFN- γ treatment induced IDO secretion by WJ-MSCs, which inhibited T-cell proliferation.⁷⁹ These results were confirmed very recently by Manochantr *et al.* showing that MSCs from amnion, placenta, and WJ can potentially substitute BM-MSCs in several therapeutic applications. Indeed, these cells inhibited alloreactive T-lymphocytes in the mixed lymphocyte reaction in a similar degree as BM-MSCs.⁸⁰

MSCs and B cells: The research on T-cell immunosuppression mediated by MSCs has attracted most of the attention in clinical applications and has been widely studied. However, B cells and humoral immune responses are more and more known as important mediators of chronic allograft rejection. Indeed, data about the influence of MSCs on B cells growth, differentiation, and production of immunoglobulins (Ig) are still scarce and controversial.⁸¹

B cells play an essential role in adaptive immunity. These cells develop in the BM strictly after a close interaction between B-cell progenitors and stromal cells that produce cytokines which are capable of supporting B-cell survival

and proliferation.⁸² They are directly responsible for the humoral immune response via the secretion of antibodies against pathogenic or foreign antigens. A subset of B lineage differentiates into memory B cells, which can mediate a rapid response on secondary exposure to that same antigen.

Corcione *et al.* demonstrated that BM-MSCs inhibited the proliferation of B cells and significantly decreased the production of IgM, IgG, and IgA⁸³; the same effect has been reported by Che *et al.* showing that UC-MSCs significantly suppressed the proliferation, differentiation, and immunoglobulin secretion of B cells *in vitro*.⁸⁴ To understand the results of Che *et al.*, it is essential to know that “B-lymphocyte-induced maturation protein-1” (Blimp-1), “X-box binding protein-1” (Xbp-1), “B-cell lymphoma-6” (Bcl-6) and “paired box gene-5” (PAX-5) are known as the main regulators of B-cell differentiation to immunoglobulin-secreting cells. PAX-5 and Bcl-6 are required to keep B-cell phenotypes. Blimp-1 inhibits the expression of both PAX-5 and Bcl-6 in order to let B cells differentiate. BCR signaling involves the MAPK signaling pathway and increases the transcriptional activity that is mediated by the transcription factor activator protein-1 (AP-1), which leads to Blimp-1 expression. Che *et al.* have shown a suppression of Blimp-1 expression and an induction of PAX-5 in the co-cultures of UC-MSCs and B-cells. They have also found that Akt and p38 MAPK were inhibited by WJ-MSCs.⁸⁴

However, these results have been contradicted by other groups. Rasmusson *et al.* have shown an increase of B-cell immunoglobulin secretion when co-cultured with BM-MSCs; this effect varied depending on the type of stimulus used to trigger B cells.⁸⁵ Likewise, Traggiai *et al.* have reported that BM-MSCs could promote B-cell expansion and differentiation after treatment with an agonist of Toll-like receptor 9.⁸⁶ A recent study has demonstrated that UC-MSCs promoted proliferation and differentiation of B cells both *in vitro* and *in vivo* partially through prostaglandin E2 (PGE2) axis.⁸²

Contradictions in the effects of MSCs on B cells could be associated to the differences in the B-cell source, the manner of their purification and stimulation, the culture conditions, and many other factors. However, the microenvironment plays a decisive role in determining the role that the MSCs will play.

Innate response:

MSCs and NK cells: NK cells are major effector cells of innate immunity, because they lack antigen-specific cell surface receptors.⁸⁷ They mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity as well as “spontaneous” killing of infected or transformed cells through the release of perforin and granzyme from cytotoxic granules.⁸⁸

MSCs and NK cells have been shown to interact *in vitro*. The outcome of this interaction may depend on the state of NK-cell activation and/or the cytokines present in the culture medium. IFN- γ -activated MSC-escaped NK cells mediated lysis through the induction of HLA-E and NK inhibitory ligands.^{89,90} Previous studies have indicated that cytokine-induced proliferation of NK cells leads to the up-regulation of HLA class I on MSCs.⁹⁰ In response to this up-regulation, HLA class I molecules, including human leukocyte antigen-G5 (HLA-G5), expressed by MSCs, bind

to the inhibitory receptor ILT2 expressed on NK cells.⁹¹ Furthermore, other studies have shown that the suppression of NK cell functions is mediated by a down-modulation of some activating NK cell receptors (NKp30, NKp44, and NKG2D) and by the inhibition of NK cell lytic granule formation.⁹² There is growing evidence that IDO, PGE2, and TGF- β 1 may control MSC-mediated inhibition of NK-cell function.⁹³

Boissel *et al.* evidenced that NK cells had a higher expansion when cultured with allogeneic and autologous WJ-MSCs as feeders in the presence of NK growth factors. WJ-MSCs feeders were rejected during the first week of co-culture. Expanded NK cells maintained an elevated cytotoxic profile and may be genetically manipulated.⁸⁸ In a recent study, Zhao *et al.* have been interested in elucidating the effect of UC-MSCs on NK cell-mediated cytotoxicity against DCs and the mechanism involved. They found that UC-MSCs can enhance this effect possibly by inhibiting DCs maturation and up-regulating the ligands for killer activator receptor on the surface of the DCs.⁹⁴ When comparing the immunosuppressive activity of MSCs derived from UC, AT, and BM on lymphocytes, Ribeiro *et al.* have shown that all the three types of MSCs exhibited a strong inhibitory effect on CD56^{dim}NK cell subset activation (cytotoxic NK cells). UC-MSCs were the only cells that were unable to inhibit the activation of CD56^{bright} NK cell subset (a subset that has the capacity to produce abundant cytokines after activation but has a low natural cytotoxicity). Among all these MSCs, AT-MSCs had a higher inhibitory capacity. A down-regulation of perforin and TNF- α ARNm by MSCs from the three sources was observed, while only AT- and BM-MSCs induced a minor reduction of granzyme B ARNm.⁹⁵

MSCs and DCs: DCs play a key role in the initiation of primary immune responses and tolerance, depending on the activation and maturation stage of DCs. Locally produced inflammatory cytokines or microbial components promote the maturation of DCs from a processing to a presenting stage, characterized by the up-regulation of MHC-class II and co-stimulatory molecules (CD80 and CD86), production of IL-12, and migration to lymphoid tissue. DCs maturation is a prerequisite to induce immunogenic T-cell responses, whereas tolerance is observed when antigens are presented by immature or semi-mature DCs. Therefore, DC maturation plays a key role in initiating T-cell responses.

BM-MSCs were shown to block the generation of functional antigen-presenting cells, including myeloid DCs from both monocytes and CD34⁺ cell precursors.^{96–98} Most results supported the notion that DCs at early stages of differentiation are sensitive to their inhibitory effects, while at later stages, they are resistant. However, WJ-MSCs inhibited DC maturation and activation even when the contact happened during the mature or immature stage. Both cell contact via surface ligands (B7H1) and soluble factors (IDO) enhanced the efficiency of suppression.⁷⁹ Very recently, Saeidi *et al.* showed that UC-MSCs and BM-MSCs strongly inhibited the differentiation and maturation of DCs with a more inhibitory effect on CD1a, CD83, CD86 expression, and DC endocytic activity. These cells also severely up-regulate CD14 expression. Results have indicated that UC-MSCs and BM-MSCs exerted their inhibitory effect on differentiation, maturation, and function of DCs through the secreted factors and free of any cell-to-cell contacts.⁹⁹

Immunomodulatory properties of WJ-MSCs in innate and adaptive responses are resumed in the figure given next (Fig. 3).

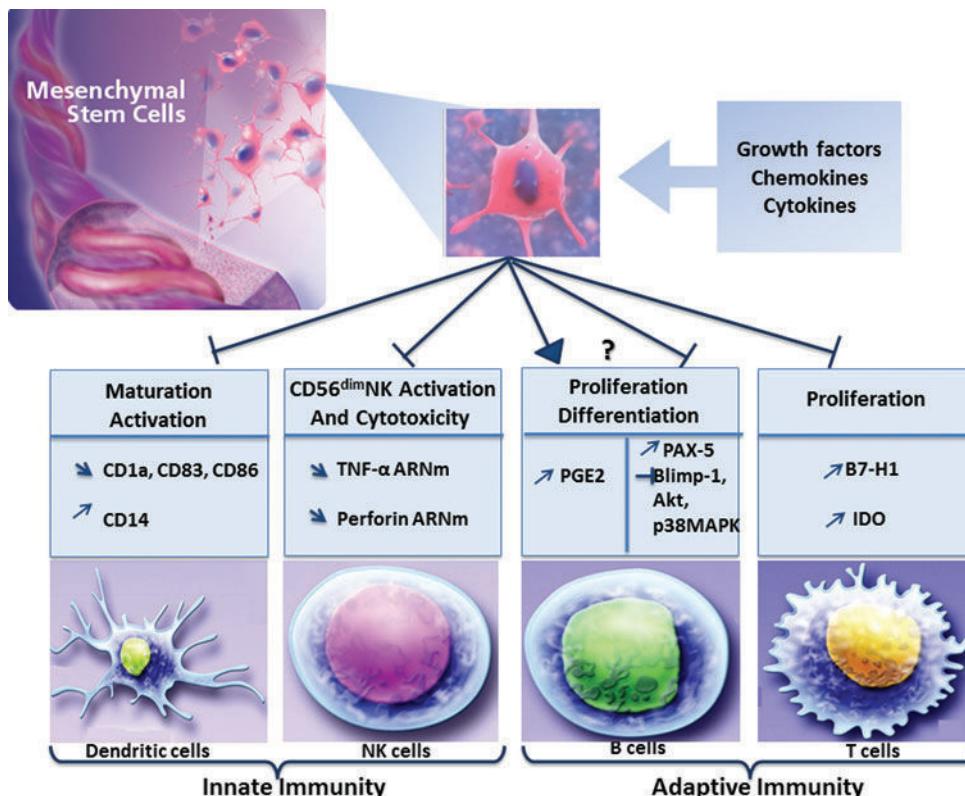


FIG. 3. Immunomodulatory effects of the WJ-MSCs on innate and adaptive immunity. The effects can be summarized as follows: inhibition of the maturation and activation of dendritic cells as well as the proliferation of T cells, activation of the expansion and cytotoxicity of NK cells. Effects of WJ-MSCs on B cells are still contradictory; they can stimulate or block the proliferation and differentiation of B cells and the secretion of immunoglobulin (Ig). NK, natural killer; WJ, Wharton's jelly. Color images available online at www.liebertpub.com/teb

MSCs and immunomodulatory paracrine factors. Multiple reports have evidenced, first *in vitro* and then *in vivo*, the ability of MSCs to express molecules that interact with both innate and adaptive immunity, both through soluble factors^{65,100} and in a cell contact-mediated fashion probably through the interaction of membrane receptors, adhesion molecules, or the cellular exchange of membrane vesicles.¹⁰¹ It is still a matter of debate whether the regulatory effects are cell-to-cell contact-dependent, or whether soluble factors are sufficient.¹⁰² The MSCs immune modulating effects will also depend on the ratio between MSCs and immune cells, and the state and stage of immune cell activation or maturation. Several factors that contribute to the MSCs-mediated effects have been identified, in particular growth factors, cytokines, chemokines, and hormones, all of which exert paracrine effects on immune cells and enable homing, migration, and their attachment to injured cells. Soluble factors implicated in MSCs-mediated immune modulation include nitric oxide (NO), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), heme oxygenase (Hmox1), secretion of anti-inflammatory cytokines such as IL-10, TGF- β , HGF, IL-6, and PGE2.^{68,70,103,104} A study comparing the immunomodulatory properties of MSCs derived from many sources showed that despite their similar cytokine profiles, WJ-MSCs only secrete IL-12, IL-15, and platelet-derived growth factor-AA (PDGF-AA). They did not secrete VEGF similar to other adult MSC sources.⁷⁸ The precise meaning of these differences, however, needs to be understood in WJ-MSCs/immune cell co-cultures.¹⁰⁵

Specialized immune tolerance implicated at the maternal-fetal interfaces depends on the expression of many molecules, including galectin-1, B7 proteins, HLA-G,¹⁰⁶ and the expression of immune suppressive cytokines such as leukemia inhibitory factor (LIF).^{107,108} Since WJ-MSCs are isolated from a peri-natal source, they could exhibit immune evasion mechanisms that are dominant at the fetal-maternal interface. In fact, Najar *et al.* showed that higher constitutive as well as IFN- γ inducible levels of LIF are expressed by WJ-MSCs than by BM-MSCs and the suppression of lymphoproliferation can be rescued by blocking LIF in co-cultures.¹⁰⁹ Furthermore, Prasanna *et al.* reported higher levels of both constitutive and IFN- γ inducible HGF in WJ-MSCs compared with BM-MSCs.¹¹⁰

Nonclassical type I HLA molecules are an interesting as yet only partly explored field in MSCs immune function. Several reports showed that BM-MSCs and WJ-MSCs express the HLA-G molecule, at both mRNA and protein level, and its soluble form HLA-G5.^{29,77,111} Weiss *et al.* also showed that WJ-MSCs constitutively express high levels of the immune suppressive HLA-G6 isoform, while BM-MSCs express the HLA-G5 isoform constitutively and its expression is not induced by IFN- γ .⁷⁷ HLA-G5 secretion has been directly implicated in the induction of regulatory cells (CD4 $^+$ CD25 $^+$ FoxP3 $^+$ Tregs) that are characterized as key suppressors of effector responses to alloantigens.¹¹² HLA-G5 secretion has also been linked with the suppression of NK cell production of IFN- γ in BM-MSCs co-cultures.¹¹³ Since the inhibition of maternal alloreactivity is due to the expression of high levels of HLA-G by the fetus, the exact role of immune-suppressive HLA-G isoforms, such as HLA-G6 expressed by WJ-MSCs, needs to be evaluated in detail.¹⁰⁵ Recently, the expression of HLA-E and HLA-F in

the WJ-MSCs has been reported; both are implicated in tolerogenic processes occurring at the fetal-maternal interface, along with HLA-G.¹¹⁴

Homing of MSCs

Maintaining the function and the integrity of the human body, which is often subjected to injuries, is essentially due to tissue repair. Shortly after an injury, different types of immune cells (neutrophils, monocytes, and lymphocytes) are conducted to the site of damage. These cells are responsible for the secretion of various growth factors and cytokines that will attract other residing or circulating cells such as MSCs. Endogenous MSCs present a pool of regenerative cells, participate in tissue repair, and communicate with other cells in response to signals of cellular damage.¹¹⁵ Their "homing" can be defined as the arrest of MSCs within the vasculature of a tissue than crossing the endothelium.¹¹⁶ Thus, the homing of endogenous MSCs is being considered a therapeutic benefit, and studies are evaluating new methods for recruiting a sufficient number of MSCs to exert their regenerative capacity. In cases where the reservoir of MSCs is depleted because of several diseases or the age, exogenous MSCs could be administrated to compensate the lack of endogenous MSCs (reviewed in Marquez-Curtis and Janowska-Wieczorek¹¹⁵ and Sohni and Verfaillie¹¹⁷). It has been reported that *in-vitro*-expanded MSCs preferentially home to sites of tissue damage, where they enhance wound healing, support tissue regeneration, and restore the BM microenvironment after damage by myeloablative chemotherapy or integrate into tumors.¹¹⁸

Since the precise molecular mechanisms by which MSCs migrate into sites of injury are not yet fully defined, the migration of leukocytes into sites of inflammation has been taken as a model.¹¹⁹ Indeed, on delivery into the blood stream, the MSCs keep close contact with EC whose role is being extensively studied in MSCs migration. They engraft into the endothelium, and eventually pass and leave the endothelium.¹²⁰ The migration of MSCs is mediated by a wide variety of molecules that are expressed by MSCs, including growth factors, chemokines, and receptors, and by chemotactic factors produced by immune cells.¹¹⁶ It has been demonstrated that human MSCs showed significant chemotaxis responses to several factors (including PDGF, VEGF, IGF-1, IL-8, bone morphogenetic protein BMP-4, and BMP-7)¹²¹ and express a variety of chemokine receptors (such as CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10) which might be involved in their migration into injured tissues along a chemokine gradient.¹²²

In addition, specific proteolytic enzymes are required so the cells can traverse the protein fibers of the extracellular matrix (ECM) and reach the target sites.^{118,123} In particular, the matrix metalloproteinases (MMPs), consisting of more than 24 zinc-dependent endopeptidases, are physiologically necessary for stem cell migration, degradation, and remodeling of ECM components, and are crucial for developmental events such as morphogenesis, cell proliferation, apoptosis, and differentiation.¹²⁴⁻¹²⁷

Ries *et al.* were the first to show that human BM-MSCs use constitutively expressed MMP-2 (gelatinase A), membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP), and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) to migrate

through human recombinant basement membranes. Inflammatory cytokines such as TGF- β 1, IL-1 β , and TNF- α are able to exert chemoattractive potential on hBM-MSCs and to up-regulate MMP-2, MT1-MMP, and/or MMP-9, enabling cellular trafficking of MSCs across human ECM barriers.¹¹⁸ MMP-2 has been also detected in WJ-MSCs in association with MMP-9 (gelatinase B), MMP-8, and MMP-13 (respectively collagenase-1 and -2), as well as in different regions of full-term human umbilical cord and in cultured HUVEC. The wide expression of these enzymes in the umbilical cord has been attributed to their role in the degradation and remodeling of ECM and in other physiological processes.¹²⁸

Recently, Balasubramanian *et al.* have compared chemokine and receptor gene expression between WJ- and BM-MSCs. Their results have shown that Chemokine (C-C motif) receptor 3 (CCR3) was more expressed in WJ-MSCs than in BM-MSCs; whereas the latter have presented a higher expression of CCR1, CCR7, CCRL2, Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 (CX3CR1), and CXCR5. MSCs from both sources had a similar expression of CCR5, CCR6, and CCRL1.

In addition, Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1), CXCL2, CXCL5, CXCL6, and CXCL8 (members of the CXC chemokine family) were up-regulated in WJ-MSCs in comparison with BM-MSCs. These chemokines are known as potent promoters of angiogenesis and mediate their activity by binding CXCR2 receptor on the endothelium (Fig. 4). On the contrary, CXCL12 and CXCL13, also two members of the CXC chemokine family and known to contribute to immune and nonimmune cell homing, were up-regulated in BM-MSCs. WJ-MSCs have shown a higher expression of IL-1A (enhance the expression of CXCL8) and TNF- α (angiogenic factor) than BM-MSCs; while IL16 (has an immunomodulatory role in asthmatic inflammation) and

CCRL12 (plays a role in the control of airway inflammatory response and in lung DC trafficking) were more expressed in BM-MSCs. Moreover, results have reported a stronger expression, in WJ-MSCs, of many growth factors linked with angiogenesis such as VEGF-D, PDGF-AA, TGF- β 2, β -FGF, and HGF.¹¹⁶ Their chemokine gene profile suggests that WJ-MSCs may be useful in the healing and treatment of ischemic lesions such as the ischemic myocardium, with cerebral ischemia for example. Moreover, they could be suggested as a treatment to reduce or prevent fibrosis and scarring in tissue lesions, as it has been shown that they secreted bFGF and HGF (known to have an anti-fibrotic effect).

Thus, *ex vivo*-expanded human MSCs with cytokines may be a useful method, in clinical applications, to increase their migration/homing potential after transplantation into patients, as well as the administration of cytokines to mobilize MSCs to sites of injury.

Anti-tumourigenic Effects of WJ-MSCs

MSCs have the capacity to migrate to tumor sites and modulate their microenvironment. Thus, they have an impact on tumour behavior.¹²⁹ A great deal of evidence suggests that solid tumors generate a microenvironment similar to that associated with wound healing, as they apply physical and chemical stress to neighboring tissues. Tumors can, therefore, be considered sites of tissue damage, which induces the migration of MSCs.¹³⁰

Human MSCs have been intensively studied for their potential use in cancer treatment. Their use has been limited, however, by a general concern related to their biosafety.¹³¹ Many studies have reported pro- or anti-tumorigenic effects of MSCs on the progression of primary and metastatic tumors. These contradictory results could be associated with differences in the MSC sources used, the type of tumour

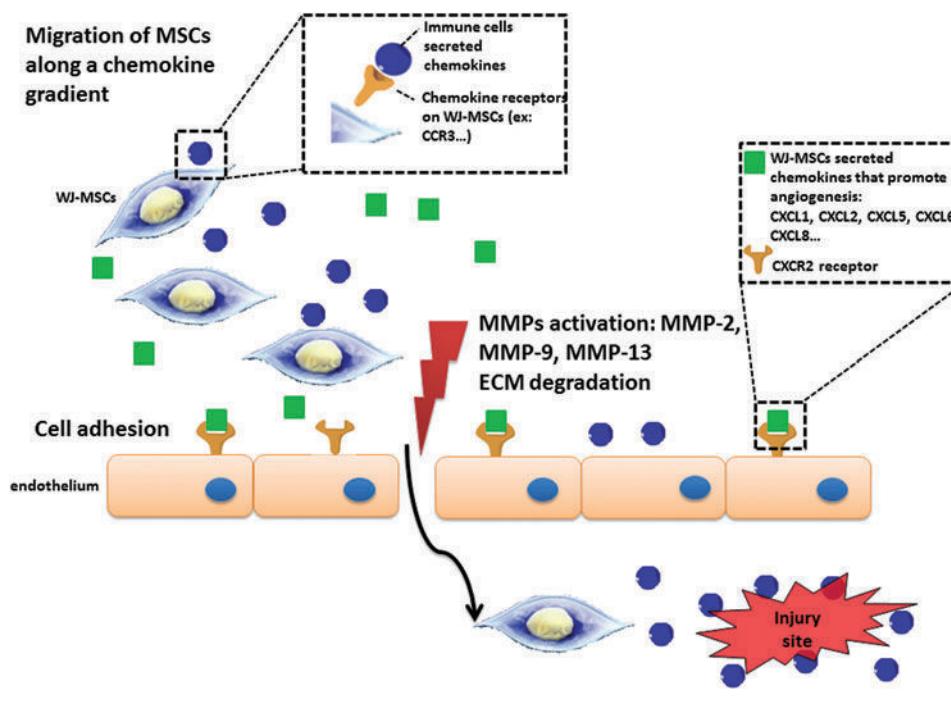


FIG. 4. Proposed mechanisms involved in the homing of WJ-MSCs to sites of tissue injury and their angiogenesis capacity. MSCs home to site of injury along gradients created by inflammatory chemokines and several factors. They express a variety of chemokine receptors that might be involved in their migration into injured sites. The expression of a set of MMPs by WJ-MSCs contributes to the extracellular matrix (ECM) degradation, which enables them to cross the ECM and reach the site of injury. They also express a variety of chemokines that are known as angiogenesis mediators and exert their function by binding to their receptor CXCR2 on the endothelium. MMPs, metalloproteinases. Color images available online at www.liebertpub.com/teb

model, the method of administration, or other unknown factors.^{130,132}

The tumor stroma consists of a complex ECM in which inflammatory and immune cells, fat cells, fibroblasts, and blood vessels reside. It plays a crucial role in tumor progression, angiogenesis, and metastasis through its effects on tumor-host interactions. Tumor-associated fibroblasts (TAFs) are activated fibroblasts in the tumor stroma.¹³¹ Several reports have hypothesized that BM-MSCs selectively proliferate to tumors and contribute to the formation of tumor-associated stroma by transforming into TAFs. They also promote tumor growth and metastasis by enhancing migration and angiogenesis and inhibiting apoptosis of tumor cells.^{133–137}

On the other hand, the immunosuppressive effects of MSCs can impair the function of a variety of immune cells (directly or through paracrine signals). This may be an important mechanism enabling MSCs to promote tumor growth or to increase the incidence of tumor formation. For instance, by increasing Tregs and reducing the activity of NK cells and cytotoxic T lymphocytes (CTL) (known to kill tumour cells), BM-MSCs can protect breast cancer cells.¹³⁸ They also have been linked to osteocarcinomas,¹³⁹ prostate tumors,^{140,141} breast tumors,^{138,140,142} colon cancer,¹³⁷ and others. A recent study has also demonstrated a fusion between MSCs and gastrointestinal epithelial cells, suggesting the formation of a more cancer-prone cell type.¹⁴³

Very recently, in order to examine the possible anticancer therapeutic applications of MSCs from different sources, Akimoto *et al.* have studied the inhibitory effects of MSCs from umbilical cord blood (UCB) and AT on “glioblastoma multiforme (GBM)” (the most aggressive type of primary brain tumor in humans). They found that, both *in vitro* and *in vivo*, GBM growth was inhibited by UCB-MSCs but promoted by AT-MSCs. UCB-MSCs induced apoptosis through the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), which is more strongly expressed by UCB-MSCs than by AT-MSCs.¹⁴⁴ Furthermore, it has been shown that naïve WJ-MSCs are able to produce factors suppressing cancer cell growth and inducing apoptosis, and so may be a novel tool for cancer therapy in contrast to MSCs from some other sources.¹⁴⁵ Other reports have likewise shown that WJ-MSCs can abrogate certain solid tumors.^{146–149} These cells decreased the growth of human breast cancer *in vitro* and stopped its growth when intravenously injected in an SCID mouse model.¹⁵⁰ Later, Fan *et al.* showed that WJ-MSCs do not induce teratomas in immunodeficient SCID mice, nor do they induce tumors when transplanted into diseased animal models.¹⁵¹ In a recent study, Subramanian *et al.* have examined whether WJ-MSCs, such as BM-MSCs, transform to the TAF phenotype in the presence of ovarian and breast cancer conditioned medium. Results have shown no expression of tumor-associated markers for hWJ-MSCs with a low expression of TAF-related genes, confirming that these cells are not associated with enhanced growth of solid tumors.³ In order to determine whether WJ-MSC-mediated inhibition of cancer cell growth was not specific to breast cancer cells, the same group compared the effects of WJ-MSC extracts and cell lysate on three other types of solid tumors: breast adenocarcinoma, ovarian carcinoma, and osteocarcinoma. They observed the same effects, which were probably mediated via agents in WJ-MSC

extracts.¹⁵² In addition, Ma *et al.* have shown that WJ-MSCs significantly inhibited the growth of breast cancer stem cells *in vitro* and *in vivo*, probably by inducing a cell cycle arrest and tumor cell apoptosis and inhibiting the activities of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and AKT (also known as protein kinase B).¹⁴⁹ A more recent study has reported that WJ-MSC conditioned medium as well as its cell lysate inhibits mammary carcinoma and osteosarcoma cell growth via apoptosis and autophagy *in vitro* and in xenograft mice.¹⁵³ In another study evaluating the tumorigenesis potential of WJ-MSCs in comparison with ESCs, animals injected with ESCs developed teratomas with increased levels of pro-inflammatory cytokines; whereas those injected with WJ-MSCs developed no tumors or inflammatory reactions at the injection sites and exhibited increased production of anti-inflammatory cytokines.¹⁵⁴ A very recent study on the effects of WJ-MSCs on intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC, a common form of primary liver cancer) has shown that these cells can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of human ICC cells. Apoptosis of tumour cells is related to the inhibition of PI3K/Akt and the Wnt/β-catenin signalling pathways.¹⁵⁵ The effects of WJ-MSCs have also been studied in hematopoietic tumours. Results obtained by Tian *et al.* have provided a new insight on how these cells may modulate leukemic tumour growth *in vitro*. According to this study, p38 MAPK, a suppressor of tumor development, was required for leukemic tumor suppression by WJ-MSCs.¹⁵⁶

These studies, taken together, indicate that WJ-MSCs are nontumorigenic, anti-tumorigenic, and hypoimmunogenic; do not transform to the TAF phenotype that is associated with enhanced growth of solid tumors; and suppress hematopoietic tumor development. WJ-MSCs appear to be a safe and promising tool for future cancer therapy and clinical applications, but more pieces of evidence are needed to further characterize their anti-tumorigenic mechanisms and to confirm this hypothesis.

Therapeutic Applications

Treatment of autoimmune diseases

The immune properties of WJ-MSCs suggest that they may be a therapeutic option to treat autoimmune diseases such as type 1 diabetes or Crohn's disease (CD).

Type 1 diabetes. Diabetes is a metabolic disease listed among the leading causes of death in some countries. It is characterized by absolute or relative insulin deficiency. Type 1 diabetes is characterized by an absolute insulin decrease due to T-cell-mediated destruction of insulin-producing pancreatic β cells.¹⁵⁷ This autoimmune destruction of pancreatic islet β-cells reduces the patient's ability to regulate blood glucose, leading to a high frequency of vascular complications that compromise the quality and expectancy of life.¹⁵⁸

Transplantation of pancreatic islet cells (PICs) as a potential cure for type I diabetes has been hampered by immune rejection and recurrent attacks against islets by the underlying autoimmunity. Studies have shown the capacity of WJ-MSCs to differentiate into mature islet-like cell clusters. These islet-like cell clusters have been shown to contain human C-peptide and to release insulin *in vitro* and

in vivo in response to physiological glucose levels. Real-time PCR analysis has shown the enhancement of insulin and other pancreatic β -cell-related genes, such as pancreatic and duodenal homeobox 1 (*pdx1*), homeobox HB9 ou MNX1 (*hlxb9*), NK2 homeobox 2 (*nkx2.2*), NK6 homeobox 1 (*nkx6.1*), and glucose transporter 2 (*glut-2*) in these cells.¹⁵⁹ Various publications have confirmed the pancreatic islet-like cell differentiation potential of WJ-MSCs.^{47,48,160} Kim *et al.*, comparing the capacities of MSCs from various sources (WJ, BM, AT, and periosteum) to differentiate into PICs, have confirmed that all cell lines were well differentiated with an increased insulin mRNA expression, but only PICs derived from periosteum progenitor cells showed insulin secretion to a high glucose concentration.¹⁶⁰

More recently, Hu *et al.* have studied the therapeutic potential of WJ-MSCs in patients with type 1 diabetes, evaluating the effects of these cells over a longer treatment time. They followed two groups of patients, the first of which received a basic treatment combined with WJ-MSC implantation; while the second received a basic treatment combined with normal saline therapy. Patients were followed for two years after the operations. During the follow-up period, patients treated with WJ-MSCs showed better Hba1 and C-peptide expression levels than patients in the second group. Although the precise mechanisms involved are unknown, WJ-MSC therapy appears to have a promising effect on type 1 diabetes patients and to be a good strategy for treatment of this disease.¹⁵⁸

Type 2 diabetes. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is the most common form of diabetes and is characterized by insulin resistance and pancreatic β -cell dysfunction. Hu *et al.* studied the effect of intravenous infusion of human WJ-MSCs as therapy, administering them alone and in combination with sitagliptin (a dipeptidyl-peptidase IV inhibitor known to increase insulin release and decrease glucagon levels by having an impact on α and β cells in the pancreatic islets) in a T2DM rat model. Compared with the control groups (a diabetic control group and a sitagliptin-only group), rats treated with WJ-MSCs only and those treated with a combination of WJ-MSCs and sitagliptin exhibited increased numbers of β cells. Glucagon level was decreased in the sitagliptin-only group and the WJ-MSCs+sitagliptin group compared with the WJ-MSCs-only group and the diabetic control group. These results suggest the therapeutic potential of WJ-MSCs in β -cell regeneration.¹⁶¹

Crohn's disease. CD is an inflammatory chronic disease caused by a dysregulation of immune tolerance and characterized by an idiopathic inflammation of the gastrointestinal tract. Frequent complications in CD are abscess and stricture formation, intestinal obstruction, and fistulas (abnormal connective passages from the epithelial lining of the intestines to another organ or to the skin caused by inflammation). Anti-TNF- α therapy is the first choice in the treatment of patients with perianal fistulas. Even with this treatment, however, perianal fistulas often lead to physical and emotional distress, and only 46% of cases heal completely.¹⁶²

Therapeutic effects of AT-MSCs and BM-MSCs on CD have already been proved.^{163,164} For instance, Garcia-Olma

et al. performed a clinical study on patients suffering from Crohn's enterocutaneous fistulas in which they compared the therapeutic effects of autologous expanded AT-MSCs and unexpanded cells corresponding to the stromal vascular fraction (SVF) when cells of each type were implanted in the fistulas. Three out of four cases treated with expanded AT-MSCs were healed, compared with only one out of four cases treated with SVF. The authors have suggested that the use of expanded AT-MSCs would be more advantageous, and that the immunosuppressive properties of these cells were responsible for their healing effects in the treatment of CD. Other studies in progress will enable us to better understand the link between the expansion of AT-MSCs and their beneficial effects.¹⁶³ In another study, Ciccioppo *et al.* examined the effect of *ex-vivo*-expanded BM-MSCs in CD. All 10 cases in which BM-MSCs were injected into the fistula exhibited signs of healing. In addition, a pro-apoptotic effect of BM-MSCs on mucosal T cells has been observed.¹⁶⁴

Recently, studies have focused on two granulomatous disorders: intestinal tuberculosis (ITB) and CD. Both diseases present similar clinical signs and are difficult to distinguish. The current challenge is the early identification of the correct disease in order to treat it efficiently and quickly to avoid complications or death. Working from the fact that recruited MSCs within granulomas in ITB can evade the host immune response, Banerjee *et al.* have been pursuing the possibility of analyzing MSC markers in the two types of granulomas (i.e., those derived from patients with CD and those derived from patients with ITB). Their results have shown that the mesenchymal marker CD73 is expressed only in MSCs within tuberculous granulomas, identifying CD73 as a possible marker of ITB. This would explain the essential pathogenic mechanisms in ITB as being based on the recruitment of MSCs with high CD73 expression. These observations suggest that MSCs with increased CD73 expression could be a future candidate for therapeutic intervention in CD. Given their phenotypic profile, WJ-MSCs could have real potential for therapeutic applications in CD.¹⁶⁵

Treatment of neurodegenerative diseases

Neurodegenerative diseases are chronic and progressive disorders of the central nervous system (CNS) which are characterized by a steady loss of neurons in the region of the brain and spinal cord that affects the mental and motor abilities of affected people. According to the World Health Organization, in 2040, the devastating diseases known as Alzheimer's and Parkinson's will represent the second leading cause of death worldwide. Multiple sclerosis (MS) is another neurodegenerative disease.

Parkinson's disease. Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder that is more common in the elderly. Its symptoms (tremor, rigidity, bradykinesia, and postural instability) are caused primarily by the degeneration of dopamine (DA) neurons in the substantia nigra.¹⁶⁶ Current therapies mostly relieve symptoms but do not restore the function of the lesioned side of the brain or the efficacy lost due to disease progression. Embryonic stem cells have been investigated as a renewable source of DA-producing cells.

However, technical and ethical obstacles have limited the application of this therapy.¹⁶⁷

Several groups have been interested in determining the effect of MSCs on the CNS. Ribeiro *et al.* have shown that AT-MSCs and WJ-MSCs are able to release trophic/neuroregulatory factors that could improve the metabolic viability of hippocampal neurons *in vitro*. These two types of MSCs do not have similar functionality, however, because their secretomes act differently on cell viability and on the densities of hippocampal neurons. Indeed, AT-MSCs require exogenous factors such as bFGF to be added in the primary cultures of hippocampal neurons in order to influence the metabolic viability and neuronal cell densities; whereas WJ-MSCs are able to promote neuronal survival without the addition of exogenous factors.¹⁶⁸

Weiss *et al.* have characterized WJ-MSCs and compared them with MSCs derived from other sources. In their study, they tested the therapeutic effects of WJ-MSCs in parkinsonian rats. Their initial results demonstrated that WJ-MSCs express growth factors and angiogenic factors, suggesting that they may be useful for the treatment of neurodegenerative diseases. Indeed, the characterization of WJ-MSCs reveals that they produce glial cell line-derived neurotrophic factor located in the cytoplasm. WJ-MSCs also express nestin, a marker of primitive neural stem cells.⁴ After neural induction of WJ-MSCs, the expression of nestin was lower in differentiated cells than in undifferentiated cells; whereas the expression of tyrosine hydroxylase (a mature neural marker of catecholaminergic neurons) was greater in differentiated cells. Moreover, it has been shown that WJ-MSCs express some genes encoding for proteins with a neurotrophic effect: CNTF (ciliary neurotrophic factor), VEGF, FGF20, and TRKC (neurotrophic tyrosine kinase). In addition, when they are transplanted into parkinsonian rats, WJ-MSCs can partially reverse the parkinsonian behavioral phenotype.²⁷ Yan *et al.* have managed to differentiate WJ-MSCs into neural-like cells *in vitro* and have subsequently tested the therapeutic potential of differentiated cells by implanting them into the striatum and substantia nigra of methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) lesioned hemi-parkinsonian rhesus monkeys. PD monkeys transplanted with the induced cells showed an improvement in behavioral measures. Furthermore, pathological and immunohistochemical data have indicated the presence of neuronal-like cells in the right brain hemisphere of PD monkeys, suggesting that they may be dopaminergic neurons.¹⁶⁷ Nearly identical results were obtained when WJ-MSCs were replaced by AT-MSCs.¹⁶⁹ The beneficial effect of BM-MSCs on a parkinsonian rat model was shown by Ye *et al.*¹⁷⁰

Multiple Sclerosis. Multiple sclerosis (MS) is a progressive neurodegenerative disorder of the CNS that is characterized by chronic inflammation, demyelination, and neuronal damage. Currently, there is no medical cure for MS, mainly owing to an incomplete understanding of its pathophysiology.¹⁷¹

Recently, Payne *et al.* have assessed the therapeutic efficiency of BM-MSCs, AT-MSCs, and WJ-MSCs against MS, using recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein (rMOG)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a model of MS in which both T- and B-cells contribute to the disease pathogenesis. They have

demonstrated that BM-MSCs exerted more potent immunomodulatory effects *in vitro* compared with AT-MSCs and WJ-MSCs. Unexpectedly, however, BM-MSCs did not impact the disease course, although the transplantation of AT-MSCs ameliorated clinical signs in two animal models of EAE. Furthermore, only AT-MSCs and WJ-MSCs expressed integrin- $\alpha 4$ (CD49d); BM-MSCs, which may not be able to adhere to VCAM1, a critical step in the extravasation of cells into the CNS during EAE, did not express integrin- $\alpha 4$.¹⁷² In their recent work, Liu *et al.* showed that WJ-MSCs could potentially play a therapeutic role in MS and could be an alternative to BM-MSCs, which have been extensively studied with regard to the treatment of MS.^{173–175} Thus, it is believed that these cells could restore behavioral functions and attenuate the histopathological deficits of EAE mice over the long term (50 days).¹⁷⁶ These results confirm those of Liang *et al.*, who transplanted WJ-MSCs to a patient with refractory progressive MS and subsequently observed stabilization of the disease.¹⁷⁷

Alzheimer's disease. Alzheimer's disease (AD) is a progressive and fatal neurodegenerative disorder that is characterized by a loss of memory and a deterioration of cognitive ability. Cumulative evidence supports the hypothesis that the accumulation of amyloid- β peptide (A β) in the brain and oxidative stress play critical roles in AD pathogenesis.

Very recently, Liang *et al.* have attempted to differentiate WJ-MSCs into cholinergic-like neurons. Cholinergic neurons are neurons of the autonomic nervous system and are one of the causes of cognitive disorders such as AD. To induce differentiation, Liang *et al.* used a neural stem cell conditioned medium supplemented with bone morphogenic protein 4 (BMP4) and fibroblast growth factors 8 (FGF8). First, they observed morphological changes of WJ-MSCs after culture in conditioned medium. These cells, which under normal conditions have a bipolar spindle-like morphology, changed into a bulbous shape with thin extensions touching each other to a certain extent after 16 days of differentiation. These observations already suggest a structural organization into axons. Moreover, they confirmed their hypothesis by showing an expression of cholinergic neuron markers, including choline acetyltransferase and NF by immunofluorescence and RT-PCR 20 days after the beginning of WJ-MSC induction. These *in-vitro* results demonstrate that WJ-MSCs can be induced into cholinergic-like neurons, which suggests that WJ-MSCs may be a very good candidate for the treatment of AD.¹⁷⁸ Patients suffering from AD show a decrease in the expression and activity levels of neprilysin (neural endopeptidase [NEP]), which is one of the several proteases involved in the proteolysis of A β . Thus, NEP has been intensively studied as a potential therapeutic target for AD. Since MSCs have the ability to synthesize vesicles (generated from the membrane), which also have a real therapeutic potential, Katsuda *et al.* have studied vesicles derived from AT-MSCs and identified their effects in co-cultures with cells over-producing A β . They observed a decrease in the amount of A β in the presence of AT-MSC vesicles. This phenomenon is explained by the initial expression on AT-MSC membranes of the NEP that is later present as an active form in the vesicles. Furthermore, they observed that AT-MSCs expressed NEP at a higher

level than BM-MSCs did, suggesting that AT-MSCs could be a better candidate than BM-MSCs for the treatment of AD.¹⁷⁹

In another recent *in-vivo* study, Yang *et al.* sought to determine the therapeutic impact and mechanisms of action of neuron-like cells differentiated from WJ-MSCs in AD. They induced the differentiation of human WJ-MSCs into neuron-like cells using tricyclodecan-9-yl-xanthogenate (D609), then transplanted them into a transgenic AD mouse model. The resulting beneficial effects were linked to an “alternatively activated” microglia (M2-like microglia). Treated mice showed increased M2-like microglial activation, associated with an increase in the expressions of IL-4 (an anti-inflammatory cytokine) and NEP and a decrease in the expressions of IL-1 β and TNF- α (pro-inflammatory cytokines). Hence, according to this study, transplantation of neuron-like cells differentiated from WJ-MSCs might be a promising cell therapy for AD.¹⁸⁰ Later, the same group studied the therapeutic impact of systemic administration of WJ-MSCs in a transgenic AD mouse model, and found that WJ-MSC infusion improved spatial learning and alleviated memory decline by reducing oxidative stress. All these results, taken together, suggest that WJ-MSCs in their differentiated (neuron-like cells) and undifferentiated forms may have beneficial effects in the prevention and treatment of AD.

Conclusion

The number of diseases that in their final stages require organ transplant or cellular therapy is increasing. Many of them are derived from or are accompanied by an unbalance in the organ inflammatory or immune state. In this regard, the use of a cellular therapy vehicle that can provide both organ recellularization and restoration of a physiological microenvironment without being rejected by the patient would benefit patients significantly.

To date, BM-MSCs have been considered the gold standard among therapeutic MSC-based therapies, yet BM-MSCs eventually degrade, exhibiting loss of proliferation and senescence. In the search for an alternative therapy lacking this flaw, different sources of MSCs have been explored. MSCs from AT, dental pulp, and AF have variable proliferation potentials and multilineage differentiation capacities, suggesting that the source of MSCs should be chosen carefully depending on the clinical applications targeted. Over the last few years, MSCs derived from WJ have gained much attention in regenerative medicine. The overview of the literature presented in this review has described their high differentiation potential as well as their important trophic, immunomodulatory, and anti-tumorigenic effects, which should be confirmed in different animal models. Taken together, all these works clearly show that the immunological features of various types of MSCs may affect their applications in regenerative medicine in ways which may be essential. Since these two properties rely, in turn, on paracrine effects, it is essential to further study the composition of MSCs secretome. This task will probably represent a major part of the relevant publications over the next 10 years.

The great question with regard to MSC therapy that still remains to be answered concerns its biosafety. Clinical trials

are still needed to evaluate this particular aspect, especially in new sources of MSCs such as WJ-MSCs, even if they seem to be promising tools for the treatment of incurable degenerative diseases.

Disclosure Statements

No competing financial interests exist.

References

- Catacchio, I., Berardi, S., Reale, A., De Lisi, A., Racanelli, V., Vacca, A., and Ria, R. Evidence for bone marrow adult stem cell plasticity: properties, molecular mechanisms, negative aspects, and clinical applications of hematopoietic and mesenchymal stem cells transdifferentiation. *Stem Cells Int* **2013**, 589139, 2013.
- Friedman, R., Betancur, M., Boissel, L., Tuncer, H., Cetrulo, C., and Klingemann, H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **13**, 1477, 2007.
- Subramanian, A., Shu-Uin, G., Kae-Siang, N., Gauthaman, K., Biswas, A., Choolani, M., Bongso, A., and Chui-Yee, F. Human umbilical cord Wharton’s jelly mesenchymal stem cells do not transform to tumor-associated fibroblasts in the presence of breast and ovarian cancer cells unlike bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* **113**, 1886, 2012.
- Troyer, D.L., and Weiss, M.L. Wharton’s jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* **26**, 591, 2008.
- Chen, M.Y., Lie, P.C., Li, Z.L., and Wei, X. Endothelial differentiation of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* **37**, 629, 2009.
- Fong, C.Y., Chak, L.L., Biswas, A., Tan, J.H., Gauthaman, K., Chan, W.K., and Bongso, A. Human Wharton’s jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* **7**, 1, 2011.
- Han, Y.F., Tao, R., Sun, T.J., Chai, J.K., Xu, G., and Liu, J. Optimization of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and culture methods. *Cytotechnology* **65**, 819, 2013.
- Dalous, J., Larghero, J., and Baud, O. Transplantation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a novel strategy to protect the central nervous system: technical aspects, preclinical studies, and clinical perspectives. *Pediatr Res* **71**, 482, 2012.
- Xu, Y., Meng, H., Li, C., Hao, M., Wang, Y., Yu, Z., Li, Q., Han, J., Zhai, Q., and Qiu, L. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells isolated by a novel explantation technique can differentiate into functional endothelial cells and promote revascularization. *Stem Cells Dev* **19**, 1511, 2010.
- Majore, I., Moretti, P., Stahl, F., Hass, R., and Kasper, C. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. *Stem Cell Rev* **7**, 17, 2011.
- Hua, J., Gong, J., Meng, H., Xu, B., Yao, L., Qian, M., He, Z., Zou, S., Zhou, B., and Song, Z. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix: proliferation and multilineage differentiation as compared to mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and bone marrow.

- Cell Biol Int 2013 [Epub ahead of print]; DOI: 10.1002/cbin.10188.
12. Kim, S.S., Kwon, D.W., Im, I., Kim, Y.D., Hwang, D.S., Holliday, L.S., Donatelli, R.E., Son, W.S., and Jun, E.S. Differentiation and characteristics of undifferentiated mesenchymal stem cells originating from adult premolar periodontal ligaments. *Korean J Orthod* **42**, 307, 2012.
 13. Hsieh, J.Y., Fu, Y.S., Chang, S.J., Tsuang, Y.H., and Wang, H.W. Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. *Stem Cells Dev* **19**, 1895, 2010.
 14. Yu, S., Long, J., Yu, J., Du, J., Ma, P., Ma, Y., Yang, D., and Fan, Z. Analysis of differentiation potentials and gene expression profiles of mesenchymal stem cells derived from periodontal ligament and Wharton's jelly of the umbilical cord. *Cells Tissues Organs* **197**, 209, 2013.
 15. Abu Kasim, N.H., Govindasamy, V., Gnanasegaran, N., Musa, S., Pradeep, P.J., Sriyaya, T.C., and Aziz, Z.A. Unique molecular signatures influencing the biological function and fate of post-natal stem cells isolated from different sources. *J Tissue Eng Regen Med* 2012 [Epub ahead of print]; DOI: 10.1002/term.
 16. Lu, L.L., Liu, Y.J., Yang, S.G., Zhao, Q.J., Wang, X., Gong, W., Han, Z.B., Xu, Z.S., Lu, Y.X., Liu, D., Chen, Z.Z., and Han, Z.C. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* **91**, 1017, 2006.
 17. Chen, H.C., Lee, Y.S., Sieber, M., Lu, H.T., Wei, P.C., Wang, C.N., Peng, H.H., Chao, A.S., Cheng, P.J., Chang, S.D., Chen, S.J., and Wang, T.H. MicroRNA and messenger RNA analyses of mesenchymal stem cells derived from teeth and the Wharton jelly of umbilical cord. *Stem Cells Dev* **21**, 911, 2012.
 18. Bai, J., Hu, Y., Wang, Y.R., Liu, L.F., Chen, J., Su, S.P., and Wang, Y. Comparison of human amniotic fluid-derived and umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stromal cells: characterization and myocardial differentiation capacity. *J Geriatr Cardiol* **9**, 166, 2012.
 19. Christodoulou, I., Kolisis, F.N., Papaevangelou, D., and Zoumpourlis, V. Comparative evaluation of human mesenchymal stem cells of fetal (Wharton's jelly) and adult (adipose tissue) origin during prolonged in vitro expansion: considerations for cyotherapy. *Stem Cells Int* **2013**, 246134, 2013.
 20. La Rocca, G., Anzalone, R., and Farina, F. The expression of CD68 in human umbilical cord mesenchymal stem cells: new evidences of presence in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol* **70**, 161, 2009.
 21. Malgieri, A., Kantzari, E., Patrizi, M.P., and Gambardella, S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int J Clin Exp Med* **3**, 248, 2010.
 22. Torreggiani, E., Lisignoli, G., Manferdini, C., Lambertini, E., Penolazzi, L., Vecchiatini, R., Gabusi, E., Chieco, P., Facchini, A., Gambari, R., and Piva, R. Role of slug transcription factor in human mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* **16**, 740, 2012.
 23. Zhang, Z.Y., Teoh, S.H., Chong, M.S., Schantz, J.T., Fisk, N.M., Choolani, M.A., and Chan, J. Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **27**, 126, 2009.
 24. Salehinejad, P., Alitheen, N.B., Ali, A.M., Omar, A.R., Mohit, M., Janzamin, E., Samani, F.S., Torshizi, Z., and Nematollahi-Mahani, S.N. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **48**, 75, 2012.
 25. Nekanti, U., Rao, V.B., Bahirvani, A.G., Jan, M., Totey, S., and Ta, M. Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **19**, 117, 2010.
 26. Fong, C.Y., Subramanian, A., Gauthaman, K., Venugopal, J., Biswas, A., Ramakrishna, S., and Bongso, A. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells undergo enhanced chondrogenic differentiation when grown on nanofibrous scaffolds and in a sequential two-stage culture medium environment. *Stem Cell Rev* **8**, 195, 2012.
 27. Weiss, M.L., Medicetty, S., Bledsoe, A.R., Rachakatla, R.S., Choi, M., Merchav, S., Luo, Y., Rao, M.S., Vela-galeti, G., and Troyer, D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* **24**, 781, 2006.
 28. De Kock, J., Najar, M., Bolleyn, J., Al Battah, F., Rodrigues, R.M., Buyl, K., Raicevic, G., Govaere, O., Branson, S., Meganathan, K., Gaspar, J.A., Roskams, T., Sachinidis, A., Lagneaux, L., Vanhaecke, T., and Rogiers, V. Mesoderm-derived stem cells: the link between the transcriptome and their differentiation potential. *Stem Cells Dev* **21**, 3309, 2012.
 29. La Rocca, G., Anzalone, R., Corrao, S., Magno, F., Loria, T., Lo Iacono, M., Di Stefano, A., Giannuzzi, P., Marasa, L., Cappello, F., Zummo, G., and Farina, F. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol* **131**, 267, 2009.
 30. Zhang, J., Chen, G.H., Wang, Y.W., Zhao, J., Duan, H.F., Liao, L.M., Zhang, X.Z., Chen, Y.D., and Chen, H. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* **125**, 3472, 2012.
 31. Corrao, S., La Rocca, G., Lo Iacono, M., Zummo, G., Gerbino, A., Farina, F., and Anzalone, R. New frontiers in regenerative medicine in cardiology: the potential of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* **8**, 39, 2013.
 32. Hoganson, D.M., Meppelink, A.M., Hinkel, C.J., Goldman, S.M., Liu, X.H., Nunley, R.M., Gaut, J.P., and Vancanti, J.P. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on decellularized extracellular matrix materials. *J Biomed Mater Res A* 2013 [Epub ahead of print]; DOI: 10.1002/jbm.a.34941.
 33. Park, J.S., Shim, M.S., Shim, S.H., Yang, H.N., Jeon, S.Y., Woo, D.G., Lee, D.R., Yoon, T.K., and Park, K.H. Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bone marrow encapsulated in fibrin gels containing TGF-beta3. *Biomaterials* **32**, 8139, 2011.
 34. Vishnubalaji, R., Al-Nbaheen, M., Kadalmali, B., Al-dahmash, A., and Ramesh, T. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. *Cell Tissue Res* **347**, 419, 2013.

35. Arminan, A., Gandia, C., Bartual, M., Garcia-Verdugo, J.M., Lledo, E., Mirabet, V., Llop, M., Barea, J., Montero, J.A., and Sepulveda, P. Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **18**, 907, 2009.
36. Hu, L., Hu, J., Zhao, J., Liu, J., Ouyang, W., Yang, C., Gong, N., Du, L., Khanal, A., and Chen, L. Side-by-side comparison of the biological characteristics of human umbilical cord and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int* **2013**, 438243, 2013.
37. Osathanon, T., Sawangmake, C., Nowwarote, N., and Pavasant, P. Neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells using different induction protocols. *Oral Dis* **2013** [Epub ahead of print]; DOI: 10.1111/odi.12119.
38. Kadar, K., Kiraly, M., Porcsalmý, B., Molnar, B., Racz, G.Z., Blazsek, J., Kallo, K., Szabo, E.L., Gera, I., Gerber, G., and Varga, G. Differentiation potential of stem cells from human dental origin—promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol* **60 Suppl 7**, 167, 2009.
39. Carnevale, G., Riccio, M., Pisciotta, A., Beretti, F., Maraldi, T., Zavatti, M., Cavallini, G.M., La Sala, G.B., Ferrari, A., and De Pol, A. *In vitro* differentiation into insulin-producing beta-cells of stem cells isolated from human amniotic fluid and dental pulp. *Dig Liver Dis* **45**, 669, 2013.
40. Martinez, C., Rath, S., Van Gulden, S., Pelaez, D., Alfonso, A., Fernandez, N., Kos, L., Cheung, H., and Ramaswamy, S. Periodontal ligament cells cultured under steady-flow environments demonstrate potential for use in heart valve tissue engineering. *Tissue Eng Part A* **19**, 458, 2013.
41. de Lara Janz, F., Favero, G.M., Bohatch, M.S., Jr., Aguiar Debes, A., and Bydlowski, S.P. Simvastatin induces osteogenic differentiation in human amniotic fluid mesenchymal stem cells (AFMSC). *Fundam Clin Pharmacol* **2012** [Epub ahead of print]; DOI: 10.1111/fcp.12006.
42. Benavides, O.M., Petsche, J.J., Moise, K.J., Jr., Johnson, A., and Jacot, J.G. Evaluation of endothelial cells differentiated from amniotic fluid-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* **18**, 1123, 2012.
43. Hartmann, K., Raabe, O., Wenisch, S., and Arnhold, S. Amniotic fluid derived stem cells give rise to neuron-like cells without a further differentiation potential into retina-like cells. *Am J Stem Cells* **2**, 108, 2013.
44. Baksh, D., Yao, R., and Tuan, R.S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* **25**, 1384, 2007.
45. Jo, C.H., Yoon, P.W., Kim, H., Kang, K.S., and Yoon, K.S. Comparative evaluation of *in vivo* osteogenic differentiation of fetal and adult mesenchymal stem cell in rat critical-sized femoral defect model. *Cell Tissue Res* **353**, 41, 2013.
46. Kim, S.H., Abbasi, F., Lamendola, C., Reaven, G.M., and McLaughlin, T. Glucose-stimulated insulin secretion in gastric bypass patients with hypoglycemic syndrome: no evidence for inappropriate pancreatic beta-cell function. *Obes Surg* **20**, 1110, 2012.
47. Tsai, P.J., Wang, H.S., Shyr, Y.M., Weng, Z.C., Tai, L.C., Shyu, J.F., and Chen, T.H. Transplantation of insulin-producing cells from umbilical cord mesenchymal stem cells for the treatment of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biomed Sci* **19**, 47, 2012.
48. Wang, H.S., Shyu, J.F., Shen, W.S., Hsu, H.C., Chi, T.C., Chen, C.P., Huang, S.W., Shyr, Y.M., Tang, K.T., and Chen, T.H. Transplantation of insulin-producing cells derived from umbilical cord stromal mesenchymal stem cells to treat NOD mice. *Cell Transplant* **20**, 455, 2011.
49. Bianco, P., Cao, X., Frenette, P.S., Mao, J.J., Robey, P.G., Simmons, P.J., and Wang, C.Y. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med* **19**, 35, 2013.
50. Bollini, S., Gentili, C., Tasso, R., Anderson, K.S., and Cancedda, R. The regenerative role of the fetal and adult stem cell secretome. *J Clin Med* **2**, 302, 2013.
51. Doorn, J., Moll, G., Le Blanc, K., van Blitterswijk, C., and de Boer, J. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Eng Part B Rev* **18**, 101, 2011.
52. Fernandez Vallone, V.B., Romanik, M.A., Choi, H., Labovsky, V., Otaegui, J., and Chasseing, N.A. Mesenchymal stem cells and their use in therapy: what has been achieved? *Differentiation* **85**, 1, 2013.
53. Pourrajab, F., Forouzannia, S.K., and Tabatabaei, S.A. Molecular characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells, source of regenerative medicine. *Int J Cardiol* **163**, 125, 2013.
54. Stubbendorff, M., Deuse, T., Hua, X., Phan, T.T., Bieback, K., Atkinson, K., Eiermann, T.H., Velden, J., Schroeder, C., Reichensperger, H., Robbins, R.C., Volk, H.D., and Schrepfer, S. Immunological properties of extraembryonic human mesenchymal stromal cells derived from gestational tissue. *Stem Cells Dev* **22**, 2619, 2013.
55. Patel, D.M., Shah, J., and Srivastava, A.S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int* **2013**, 496218, 2013.
56. Hass, R., Kasper, C., Bohm, S., and Jacobs, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* **9**, 12, 2011.
57. Ryan, J.M., Barry, F.P., Murphy, J.M., and Mahon, B.P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)* **2**, 8, 2005.
58. De Miguel, M.P., Fuentes-Julian, S., Blazquez-Martinez, A., Pascual, C.Y., Aller, M.A., Arias, J., and Arnalich-Montiel, F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med* **12**, 574, 2012.
59. Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Parekkadan, B., Kitagawa, Y., Tompkins, R.G., Kobayashi, N., and Yarmush, M.L. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant* **19**, 667, 2010.
60. English, K., French, A., and Wood, K.J. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell* **7**, 431, 2010.
61. Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **8**, 726, 2008.
62. Maitra, B., Szekely, E., Gjini, K., Laughlin, M.J., Dennis, J., Haynesworth, S.E., and Koc, O.N. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* **33**, 597, 2004.
63. Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., Dini, G., Egeler, R.M., Bacigalupo, A.,

- Fibbe, W., and Ringden, O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* **371**, 1579, 2008.
64. Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Gotherstrom, C., Hassan, M., Uzunel, M., and Ringden, O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* **363**, 1439, 2004.
 65. Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**, 3838, 2002.
 66. Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C., and Guinan, E.C. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* **75**, 389, 2003.
 67. Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S.E., and Ringden, O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* **57**, 11, 2003.
 68. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., and Shi, Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* **2**, 141, 2008.
 69. Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Taylor, R., Simpson, E., and Dazzi, F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* **101**, 3722, 2003.
 70. Aggarwal, S., and Pittenger, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815, 2005.
 71. Ghannam, S., Pene, J., Torcy-Moquet, G., Jorgensen, C., and Yssel, H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol* **185**, 302, 2010.
 72. Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A.I., Le, A.D., Shi, S., Shao, C., and Shi, Y. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* **184**, 2321, 2010.
 73. Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P.J., Lam, E.W., and Dazzi, F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* **105**, 2821, 2005.
 74. Pierdomenico, L., Bonsi, L., Calvitti, M., Rondelli, D., Arpinati, M., Chirumbolo, G., Becchetti, E., Marchionni, C., Alviano, F., Fossati, V., Staffolani, N., Franchina, M., Grossi, A., and Bagnara, G.P. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* **80**, 836, 2005.
 75. Demircan, P.C., Sariboyaci, A.E., Unal, Z.S., Gacar, G., Subasi, C., and Karaoz, E. Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. *Cytotherapy* **13**, 1205, 2011.
 76. Makino, Y., Yamaza, H., Akiyama, K., Ma, L., Hoshino, Y., Nonaka, K., Terada, Y., Kukita, T., Shi, S., and Yamaza, T. Immune therapeutic potential of stem cells from human supernumerary teeth. *J Dent Res* **92**, 609, 2013.
 77. Weiss, M.L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K.B., Weiss, R.J., VanderWerff, I., Troyer, D., and McIntosh, K.R. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* **26**, 2865, 2008.
 78. Yoo, K.H., Jang, I.K., Lee, M.W., Kim, H.E., Yang, M.S., Eom, Y., Lee, J.E., Kim, Y.J., Yang, S.K., Jung, H.L., Sung, K.W., Kim, C.W., and Koo, H.H. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol* **259**, 150, 2009.
 79. Tipnis, S., Viswanathan, C., and Majumdar, A.S. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. *Immunol Cell Biol* **88**, 795, 2010.
 80. Manochantr, S., U-pratya, Y., Kheolamai, P., Rojphisan, S., Chayosumrit, M., Tantrawatpan, C., Supokawej, A., and Issaragrisil, S. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells derived from amnion, placenta, Wharton's jelly and umbilical cord. *Intern Med J* **43**, 430, 2013.
 81. Franquesa, M., Hoogduijn, M.J., Bestard, O., and Grinyo, J.M. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Front Immunol* **3**, 212, 2012.
 82. Ji, Y.R., Yang, Z.X., Han, Z.B., Meng, L., Liang, L., Feng, X.M., Yang, S.G., Chi, Y., Chen, D.D., Wang, Y.W., and Han, Z.C. Mesenchymal stem cells support proliferation and terminal differentiation of B cells. *Cell Physiol Biochem* **30**, 1526, 2012.
 83. Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Rissi, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V., and Uccelli, A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* **107**, 367, 2006.
 84. Che, N., Li, X., Zhou, S., Liu, R., Shi, D., Lu, L., and Sun, L. Umbilical cord mesenchymal stem cells suppress B-cell proliferation and differentiation. *Cell Immunol* **274**, 46, 2012.
 85. Rasmusson, I., Le Blanc, K., Sundberg, B., and Ringden, O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol* **65**, 336, 2007.
 86. Traggiai, E., Volpi, S., Schena, F., Gattorno, M., Ferlito, F., Moretta, L., and Martini, A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells* **26**, 562, 2008.
 87. Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* **331**, 44, 2011.
 88. Boissel, L., Tuncer, H.H., Betancur, M., Wolfberg, A., and Klingemann, H. Umbilical cord mesenchymal stem cells increase expansion of cord blood natural killer cells. *Biol Blood Marrow Transplant* **14**, 1031, 2008.
 89. Rasmusson, I., Ringden, O., Sundberg, B., and Le Blanc, K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* **76**, 1208, 2003.
 90. Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M.C., and Moretta, L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit

- IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* **107**, 1484, 2006.
91. Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V.M., Allan, D.S., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B., Jones, E.Y., van der Merwe, P.A., Kumagai, I., and Maenaka, K. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8856, 2003.
 92. Favier, B., Lemaoult, J., Lesport, E., and Carosella, E.D. ILT2/HLA-G interaction impairs NK-cell functions through the inhibition of the late but not the early events of the NK-cell activating synapse. *FASEB J* **24**, 689, 2010.
 93. Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Beccetti, F., Mingari, M.C., and Moretta, L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* **111**, 1327, 2008.
 94. Zhao, Y., Cao, D., and Chen, W. [Regulation of mesenchymal stem cells derived from umbilical cord on natural killer cells-mediated cytotoxicity against dendritic cells]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **33**, 121, 2013.
 95. Ribeiro, A., Laranjeira, P., Mendes, S., Velada, I., Leite, C., Andrade, P., Santos, F., Henriques, A., Graoas, M., Cardoso, C.M., Martinho, A., Pais, M., da Silva, C., Cabral, J., Trindade, H., and Paiva, A. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Res Ther* **4**, 125, 2013.
 96. Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R., and Fibbe, W.E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+ -derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **177**, 2080, 2006.
 97. Spaggiari, G.M., Abdelrazik, H., Beccetti, F., and Moretta, L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* **113**, 6576, 2009.
 98. Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., and Rachmilewitz, J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* **105**, 2214, 2005.
 99. Saeidi, M., Masoud, A., Shakiba, Y., Hadjati, J., Mo hyeddin Bonab, M., Nicknam, M.H., Latifpour, M., and Nikbin, B. Immunomodulatory effects of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on differentiation, maturation and endocytosis of monocyte-derived dendritic cells. *Iran J Allergy Asthma Immunol* **12**, 37, 2013.
 100. Vija, L., Farge, D., Gautier, J.F., Vexiau, P., Dumitache, C., Bourgarit, A., Verrecchia, F., and Larghero, J. Mesenchymal stem cells: stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. *Diabetes Metab* **35**, 85, 2009.
 101. Hass, R., and Otte, A. Mesenchymal stem cells as all-round supporters in a normal and neoplastic microenvironment. *Cell Commun Signal* **10**, 13, 2012.
 102. Casiraghi, F., Noris, M., and Remuzzi, G. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* **15**, 731, 2010.
 103. Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C., and Noel, D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* **1**, 2, 2010.
 104. Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Gobel, U., Daubener, W., and Diloo, D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* **103**, 4619, 2004.
 105. Prasanna, S.J., and Jahnnavi, V.S. Wharton's jelly mesenchymal stem cells as off-the-shelf cellular therapeutics: a closer look into their regenerative and immunomodulatory properties. *Open Tissue Eng Regen Med J* **4**, 28, 2011.
 106. Than, N.G., Romero, R., Erez, O., Weckle, A., Tarca, A.L., Hotra, J., Abbas, A., Han, Y.M., Kim, S.S., Kusarovic, J.P., Gotsch, F., Hou, Z., Santolaya-Forgas, J., Benirschke, K., Papp, Z., Grossman, L.I., Goodman, M., and Wildman, D.E. Emergence of hormonal and redox regulation of galectin-1 in placental mammals: implication in maternal-fetal immune tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15819, 2008.
 107. Carosella, E.D., Moreau, P., Le Maoult, J., Le Discorde, M., Dausset, J., and Rouas-Freiss, N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol* **81**, 199, 2003.
 108. Vogiagis, D., and Salamonsen, L.A. Review: the role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. *J Endocrinol* **160**, 181, 1999.
 109. Najar, M., Raicevic, G., Boufker, H.I., Fayyad-Kazan, H., De Bruyn, C., Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M., and Lagneaux, L. Adipose-tissue-derived and Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells suppress lymphocyte responses by secreting leukemia inhibitory factor. *Tissue Eng Part A* **16**, 3537, 2010.
 110. Prasanna, S.J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S.R., and Vasandan, A.B. Pro-inflammatory cytokines, IFNgamma and TNFalpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One* **5**, e9016, 2010.
 111. Selmani, Z., Naji, A., Gaiffe, E., Obert, L., Tibergien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D., and Deschaseaux, F. HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. *Transplantation* **87**, S62, 2009.
 112. Lee, J.M., Jung, J., Lee, H.J., Jeong, S.J., Cho, K.J., Hwang, S.G., and Kim, G.J. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. *Int Immunopharmacol* **13**, 219, 2012.
 113. Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tibergien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D., and Deschaseaux, F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells* **26**, 212, 2008.
 114. La Rocca, G., Corrao, S., Lo Iacono, M., Corsello, T., Farina, F., and Anzalone, R. Novel immunomodulatory makers expressed by human WJ-MSC: an updated review in regenerative and reparative medicine. *Open Tissue Eng Regen Med J* **5**, 50, 2012.
 115. Marquez-Curtis, L.A., and Janowska-Wieczorek, A. Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal

- cells by targeting the SDF-1/CXCR4 Axis. *Biomed Res Int* **2013**, *15*, 2013.
116. Balasubramanian, S., Venugopal, P., Sundarrajan, S., Zakkaria, Z., Majumdar, A.S., and Ta, M. Comparison of chemokine and receptor gene expression between Wharton's jelly and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **14**, 26, 2012.
 117. Sohni, A., and Verfaillie, C.M. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int* **2013**, *130763*, 2013.
 118. Ries, C., Egea, V., Karow, M., Kolb, H., Jochum, M., and Neth, P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* **109**, 4055, 2007.
 119. Chute, J.P. Stem cell homing. *Curr Opin Hematol* **13**, 399, 2006.
 120. Nourshargh, S., and Marelli-Berg, F.M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol* **26**, 157, 2005.
 121. Mishima, Y., and Lotz, M. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **26**, 1407, 2008.
 122. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **25**, 2739, 2007.
 123. Kalluri, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **3**, 422, 2003.
 124. Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., and Engler, J.A. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* **4**, 197, 1993.
 125. Mandal, M., Mandal, A., Das, S., Chakraborti, T., and Sajal, C. Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biochem* **252**, 305, 2003.
 126. Lipari, L., Mauro, A., Tortorici, S., Burruano, F., Leone, A., Spatola, G.F., Gerbino, A., Buscemi, M., and Tete, S. Immunohistochemical and transcriptional expression of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in normal and pathological human oral mucosa. *J Biol Regul Homeost Agents* **23**, 259, 2009.
 127. Schneider, R.K., Puellen, A., Kramann, R., Raupach, K., Bornemann, J., Knuechel, R., Perez-Bouza, A., and Neuss, S. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials* **31**, 467, 2010.
 128. Mauro, A., Buscemi, M., and Gerbino, A. Immunohistochemical and transcriptional expression of matrix metalloproteinases in full-term human umbilical cord and human umbilical vein endothelial cells. *J Mol Histol* **41**, 367, 2010.
 129. Stagg, J. Mesenchymal stem cells in cancer. *Stem Cell Rev* **4**, 119, 2008.
 130. Ljubic, B., Milovanovic, M., Volarevic, V., Murray, B., Bugarski, D., Przyborski, S., Arsenijevic, N., Lukic, M.L., and Stojkovic, M. Human mesenchymal stem cells creating an immunosuppressive environment and promote breast cancer in mice. *Sci Rep* **3**, 2298, 2013.
 131. Torsvik, A., and Bjerkvig, R. Mesenchymal stem cell signaling in cancer progression. *Cancer Treat Rev* **39**, 180, 2013.
 132. Mandel, K., Yang, Y., Schambach, A., Glage, S., Otte, A., and Hass, R. Mesenchymal stem cells (MSC) directly interact with breast cancer cells and promote tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cells Dev* **22**, 3114, 2013.
 133. Studeny, M., Marini, F.C., Champlin, R.E., Zompetta, C., Fidler, I.J., and Andreeff, M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* **62**, 3603, 2002.
 134. Studeny, M., Marini, F.C., Dembinski, J.L., Zompetta, C., Cabreira-Hansen, M., Bekele, B.N., Champlin, R.E., and Andreeff, M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* **96**, 1593, 2004.
 135. Mishra, P.J., Humeniuk, R., Medina, D.J., Alexe, G., Mesirov, J.P., Ganeshan, S., Glod, J.W., and Banerjee, D. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* **68**, 4331, 2008.
 136. Spaeth, E.L., Dembinski, J.L., Sasser, A.K., Watson, K., Klopp, A., Hall, B., Andreeff, M., and Marini, F. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One* **4**, e4992, 2009.
 137. Shinagawa, K., Kitadai, Y., Tanaka, M., Sumida, T., Kodama, M., Higashi, Y., Tanaka, S., Yasui, W., and Chayama, K. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* **127**, 2323, 2010.
 138. Patel, S.A., Meyer, J.R., Greco, S.J., Corcoran, K.E., Bryan, M., and Rameshwar, P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J Immunol* **184**, 5885, 2010.
 139. Amariglio, N., Hirshberg, A., Scheithauer, B.W., Cohen, Y., Loewenthal, R., Trakhtenbrot, L., Paz, N., Koren-Michowitz, M., Waldman, D., Leider-Trejo, L., Toren, A., Constantini, S., and Rechavi, G. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* **6**, e1000029, 2009.
 140. Zhang, T., Lee, Y.W., Rui, Y.F., Cheng, T.Y., Jiang, X.H., and Li, G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. *Stem Cell Res Ther* **4**, 70, 2013.
 141. Luo, J., Ok Lee, S., Liang, L., Huang, C.K., Li, L., Wen, S., and Chang, C. Infiltrating bone marrow mesenchymal stem cells increase prostate cancer stem cell population and metastatic ability via secreting cytokines to suppress androgen receptor signaling. *Oncogene* 2013 [Epub ahead of print]; DOI: 10.1038/onc.2013.233.
 142. Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., and Weinberg, R.A. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449**, 557, 2007.
 143. Ferrand, J., Noel, D., Lehours, P., Prochazkova-Carlotti, M., Chambonnier, L., Menard, A., Megraud, F., and Varon, C. Human bone marrow-derived stem cells acquire epithelial characteristics through fusion with gastrointestinal epithelial cells. *PLoS One* **6**, e19569, 2011.
 144. Akimoto, K., Kimura, K., Nagano, M., Takano, S., To'a Salazar, G., Yamashita, T., and Ohneda, O. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit, but adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote,

- glioblastoma multiforme proliferation. *Stem Cells Dev* **22**, 1370, 2013.
145. Kim, D.W., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S.D., and Borlongan, C.V. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *Int J Mol Sci* **14**, 11692, 2013.
146. Rachakatla, R.S., Marini, F., Weiss, M.L., Tamura, M., and Troyer, D. Development of human umbilical cord matrix stem cell-based gene therapy for experimental lung tumors. *Cancer Gene Ther* **14**, 828, 2007.
147. Sun, B., Yu, K.R., Bhandari, D.R., Jung, J.W., Kang, S.K., and Kang, K.S. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix prohibits metastatic cancer cell MDA-MB-231 proliferation. *Cancer Lett* **296**, 178, 2010.
148. Chao, K.C., Yang, H.T., and Chen, M.W. Human umbilical cord mesenchymal stem cells suppress breast cancer tumourigenesis through direct cell-cell contact and internalization. *J Cell Mol Med* **16**, 1803, 2011.
149. Ma, Y., Hao, X., Zhang, S., and Zhang, J. The *in vitro* and *in vivo* effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the growth of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **133**, 473, 2012.
150. Ayuzawa, R., Doi, C., Rachakatla, R.S., Pyle, M.M., Maurya, D.K., Troyer, D., and Tamura, M. Naive human umbilical cord matrix derived stem cells significantly attenuate growth of human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett* **280**, 31, 2009.
151. Fan, C.G., Zhang, Q.J., and Zhou, J.R. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. *Stem Cell Rev* **7**, 195, 2011.
152. Gauthaman, K., Yee, F.C., Cheyyatraivendran, S., Biswas, A., Choolani, M., and Bongso, A. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cell (hWJSC) extracts inhibit cancer cell growth *in vitro*. *J Cell Biochem* **113**, 2027, 2012.
153. Gauthaman, K., Fong, C.Y., Arularasu, S., Subramanian, A., Biswas, A., Choolani, M., and Bongso, A. Human Wharton's Jelly stem cell conditioned medium and cell-free lysate inhibit human osteosarcoma and mammary carcinoma cell growth *in vitro* and in xenograft mice. *J Cell Biochem* **114**, 366, 2013.
154. Gauthaman, K., Fong, C.Y., Suganya, C.A., Subramanian, A., Biswas, A., Choolani, M., and Bongso, A. Extraembryonic human Wharton's jelly stem cells do not induce tumorigenesis, unlike human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* **24**, 235, 2012.
155. Liu, J., Han, G., Liu, H., and Qin, C. Correction: suppression of cholangiocarcinoma cell growth by human umbilical cord mesenchymal stem cells: a possible role of Wnt and Akt signaling. *PLoS One* **8**: e6244, doi 10.1371/journal.pone.0062844.
156. Tian, K., Yang, S., Ren, Q., Han, Z., Lu, S., Ma, F., and Zhang, L. p38 MAPK contributes to the growth inhibition of leukemic tumor cells mediated by human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem* **26**, 799, 2010.
157. Anzalone, R., Lo Iacono, M., Loria, T., Di Stefano, A., Giannuzzi, P., Farina, F., and La Rocca, G. Wharton's jelly mesenchymal stem cells as candidates for beta cells regeneration: extending the differentiative and immunomodulatory benefits of adult mesenchymal stem cells for the treatment of type 1 diabetes. *Stem Cell Rev* **7**, 342, 2011.
158. Hu, J., Yu, X., Wang, Z., Wang, F., Wang, L., Gao, H., Chen, Y., Zhao, W., Jia, Z., Yan, S., and Wang, Y. Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus. *Endocr J* **60**, 347, 2013.
159. Chao, K.C., Chao, K.F., Fu, Y.S., and Liu, S.H. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS One* **3**, e1451, 2008.
160. Kim, S.J., Choi, Y.S., Ko, E.S., Lim, S.M., Lee, C.W., and Kim, D.I. Glucose-stimulated insulin secretion of various mesenchymal stem cells after insulin-producing cell differentiation. *J Biosci Bioeng* **113**, 771, 2012.
161. Hu, J., Wang, F., Sun, R., Wang, Z., Yu, X., Wang, L., Gao, H., Zhao, W., Yan, S., and Wang, Y. Effect of combined therapy of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from umbilical cord with sitagliptin in type 2 diabetic rats. *Endocrine* **45**, 279, 2014.
162. Molendijk, I., Duijvestein, M., van der Meulen-de Jong, A.E., van Deen, W.K., Swets, M., Hommes, D.W., and Verspaget, H.W. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells in Crohn's disease. *J Allergy (Cairo)* **2012**, 187408, 2012.
163. Garcia-Olmo, D., Herreros, D., Pascual, M., Pascual, I., De-La-Quintana, P., Trebol, J., and Garcia-Arranz, M. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. *Int J Colorectal Dis* **24**, 27, 2009.
164. Ciccocioppo, R., Bernardo, M.E., Sgarella, A., Maccario, R., Avanzini, M.A., Ubezio, C., Minelli, A., Alvisi, C., Vanoli, A., Calliada, F., Dionigi, P., Perotti, C., Locatelli, F., and Corazza, G.R. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut* **60**, 788, 2011.
165. Banerjee, R., Balaji, M., Sasikala, M., Anuradha, S., Rao, G.V., and Reddy, D.N. Granulomas of intestinal tuberculosis and Crohn's disease can be differentiated by CD73 cell surface marker expression: a pilot study. *Dig Dis Sci* **58**, 2301, 2013.
166. Vernier, P., Moret, F., Callier, S., Snappy, M., Wersinger, C., and Sidhu, A. The degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease: insights from embryology and evolution of the mesostriatalcortical system. *Ann N Y Acad Sci* **1035**, 231, 2004.
167. Yan, M., Sun, M., Zhou, Y., Wang, W., He, Z., Tang, D., Lu, S., Wang, X., Li, S., and Li, H. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopamine neurons mediated by the Lmx1a and neurturin *in vitro*: potential therapeutic application for Parkinson's disease in a rhesus monkey model. *PLoS One* **8**, e64000, 2013.
168. Ribeiro, C.A., Fraga, J.S., Graos, M., Neves, N.M., Reis, R.L., Gimble, J.M., Sousa, N., and Salgado, A.J. The secretome of stem cells isolated from the adipose tissue and Wharton jelly acts differently on central nervous system derived cell populations. *Stem Cell Res Ther* **3**, 18, 2012.
169. Zhou, Y., Sun, M., Li, H., Yan, M., He, Z., Wang, W., and Lu, S. Recovery of behavioral symptoms in hemiparkinsonian rhesus monkeys through combined gene and stem cell therapy. *Cytotherapy* **15**, 467, 2013.
170. Ye, M., Wang, X.J., Zhang, Y.H., Lu, G.Q., Liang, L., Xu, J.Y., and Chen, S.D. Transplantation of bone marrow

- stromal cells containing the neuritin gene in rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* **1142**, 206, 2007.
171. Auletta, J.J., Bartholomew, A.M., Maziarz, R.T., Deans, R.J., Miller, R.H., Lazarus, H.M., and Cohen, J.A. The potential of mesenchymal stromal cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. *Immunotherapy* **4**, 529, 2012.
172. Payne, N.L., Sun, G., McDonald, C., Layton, D., Moussa, L., Emerson-Webber, A., Veron, N., Siatskas, C., Herszfeld, D., Price, J., and Bernard, C.C. Distinct immunomodulatory and migratory mechanisms underpin the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in autoimmune demyelination. *Cell Transplant* **22**, 1409, 2013.
173. Zhang, J., Li, Y., Chen, J., Cui, Y., Lu, M., Elias, S.B., Mitchell, J.B., Hammill, L., Vanguri, P., and Chopp, M. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Exp Neurol* **195**, 16, 2005.
174. Zhang, J., Brodie, C., Li, Y., Zheng, X., Roberts, C., Lu, M., Gao, Q., Borneman, J., Savant-Bhonsale, S., Elias, S.B., and Chopp, M. Bone marrow stromal cell therapy reduces proNGF and p75 expression in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci* **279**, 30, 2009.
175. Ryu, C.H., Park, K.Y., Hou, Y., Jeong, C.H., Kim, S.M., and Jeun, S.S. Gene therapy of multiple sclerosis using interferon beta -secreting human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int* **2013**, 696738, 2013.
176. Liu, R., Zhang, Z., Lu, Z., Borlongan, C., Pan, J., Chen, J., Qian, L., Liu, Z., Zhu, L., Zhang, J., and Xu, Y. Human umbilical cord stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating immunoinflammation and remyelination. *Stem Cells Dev* **22**, 1053, 2013.
177. Liang, J., Zhang, H., Hua, B., Wang, H., Wang, J., Han, Z., and Sun, L. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler* **15**, 644, 2009.
178. Liang, J., Wu, S., Zhao, H., Li, S.L., Liu, Z.X., Wu, J., and Zhou, L. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into cholinergic-like neurons *in vitro*. *Neurosci Lett* **532**, 59, 2013.
179. Katsuda, T., Tsuchiya, R., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takagaki, K., Oki, K., Takeshita, F., Sakai, Y., Kuroda, M., and Ochiya, T. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci Rep* **3**, 1197, 2013.
180. Yang, H., Xie, Z., Wei, L., Yang, S., Zhu, Z., Wang, P., Zhao, C., and Bi, J. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived neuron-like cells rescue memory deficits and reduce amyloid-beta deposition in an AbetaPP/PS1 transgenic mouse model. *Stem Cell Res Ther* **4**, 76, 2013.

Address correspondence to:
*Veronique Decot, PharmD, PhD
CNRS UMR UL 7365
Bâtiment Biopôle
Faculté de médecine
9 Ave. de la Forêt de Haye
54500 Vandœuvre-lès-Nancy
France*

E-mail: v.decot@chu-nancy.f

Received: October 24, 2013

Accepted: February 4, 2014

Online Publication Date: April 21, 2014

II.2.2 Les stratégies d'obtention de CML

Différentes approches sont utilisées dans les études pour l'obtention d'un phénotype contractile de CML. Nous nous sommes intéressés à deux d'entre elles, plutôt simples à mettre en œuvre, pour notre travail.

a La culture sans sérum

La culture sans sérum est connue pour induire un phénotype plus contractile de CML. Après privation de sérum, les CML isolées à partir d'artères ombilicales ont montré une augmentation de l'expression de leurs protéines contractiles (39). De plus, des études récentes ont mis en évidence l'effet de la privation en sérum sur la culture de cellules souches embryonnaires, ce qui a conduit en leur différenciation vers un phénotype contractile de CML (40).

b L'influence des facteurs de croissance

Dans la littérature, plusieurs travaux ont évalué l'influence de plusieurs paramètres sur l'expression par des CSM induites, des marqueurs contractiles de CML, mais les effets de facteurs solubles prédominent dans les études. Le tableau 2 met en évidence le facteur de croissance transforming growth factor bêta 1 (TGF- β 1) employé dans la plupart des travaux. Ce facteur de croissance a été montré comme jouant un rôle essentiel dans le développement vasculaire et la régulation des diverses fonctions des CML (9,41). Il a été démontré comme induisant la différenciation de CSM en CML (42–44). Les conditions de culture utilisées diffèrent selon les études, y compris le type de support, la concentration en facteur de croissance, la proportion de la concentration en sérum ou du glucose utilisés. Parfois, le milieu a été supplémenté avec d'autres facteurs solubles tels que l'acide ascorbique (45,46) un dérivé des plaquettes facteur de croissance BB (PDGF-BB) (47), ou une protéine morphogénétique osseuse 4 (BMP4) afin d'améliorer la différenciation des CSM (41).

Tableau 2 : Travaux de différenciation de CSMs en CML

Source CSMs	Milieu de différenciation	Marqueurs de CML mis en évidence	Test de fonctionnalité (contractilité) effectué	Référence
AT (Mouse)	DMEM 4,5g/L glucose + 25mM Hepes +10% SVF + 100µM β -Mercaptoethanol + 50ng/ml of mouse recombinant EGF	α -SMA, SM22- α , Calponin, Caldesmon, PDGFR- β , Desmin, SM-MHC, Smoothelin-B	Collagen gel lattice contraction assay	Lachaud et al., 2014 (48)
AT (human)	Media with different soluble factors: - sphingosylphosphorylcholine (SPC) at 0.5, 2.0 and 5.0 mM - TGF β 1 (0.2, 0.5, 1, 2 and 5 ng/ml) - TGF β 3 (0.2, 0.5, 1, 2 and 5 ng/ml)	α -SMA, SM22- α , Calponin, Myocardin, SRF	ND	Jeon et al., 2006 (49)
AT (human)	Media-199+13% SVF +heparin (7.5U/L) + one of following supplements: - SPC 2µM - Angiotensin II 1µM - TGF β 1 2ng/ml	Calponin, Caldesmon, SM-MHC	Collagen gel lattice contraction assay	Harris et al., 2012 (43)
AT (human)	DMEM+1% SVF + one of following supplements: - TGF β 1 5ng/ml - BMP4 2.5ng/ml - TGF β 1 5ng/ml + BMP4 2.5ng/ml	α -SMA, SM22- α , Calponin, SM-MHC	Collagen gel lattice contraction assay	Wang et al., 2010 (41)
AT (human)	Serum free α -MEM + 2ng/ml TGF β 1	α -SMA, Calponin, Caldesmon, SM-MHC, Smoothelin-B, myocardin	Collagen gel lattice contraction assay	Park et al., 2013 (49)
AT (human)	serum-starved for 24 h, and then treated: α -MEM + 2 ng/mL TGF β 1	α -SMA	ND	Kim et al., 2012 (50)
AT (rabbit)	DMEM + 1% FBS + 100U/ml heparin	α -SMA, SM-MHC,	ND	Zhao et., 2012 (51)
BM (rat)	serum-starved with 0.1% BSA-containing DMEM for 24 h and then treated: + 0.01 to 100µM serotonin	α -SMA, SM-MHC, Myocardin, SRF	ND	Hirota et al., 2014 (52)
BM (human)	Media with different soluble factors: -DMEM low glucose + 10% SVF + 1 ng/ml TGF β 1 - DMEM low glucose + 5% SVF + 0.01, 0.1, 1, or 10 ng/ml TGF β 1 - DMEM low glucose + 5% SVF + 10ng/ml PDGF-BB or PDGF-CC or bFGF or 50 μ g/ml ascorbic acid	α -SMA, Calponin,	ND	Gong et al. , 2008 (47)
BM (human)	Media with different soluble factors: -DMEM + 20% SVF + 0, 0.1, 1, and 10 ng/ml TGF β 1 -DMEM + 20% SVF + 30, or 300 μ M ascorbic acid -DMEM + 20% SVF + 30 μ M ascorbic acid + 1 ng/ml TGF β 1	α -SMA, SM22- α , Calponin, Caldesmon, Desmin, SM-MHC,	ND	Narita et al. , 2008 (45)
BM (human)	DMEM + 1% FBS + 10 ng/ml TGF β 1	α -SMA, Calponin	ND	Park et al. , 2011 (53)
BM (human)	Under different culture conditions: -MesenPro Reduced serum (2%) MSC medium (commercial media) -Lanza MSCBM: MSCGM SingleQuots (10% SVF, pen-strep-L-glutamine) -Enhanced DMEM (eDMEM): Low-glucose DMEM, 10% SVF 5 mmol/L HEPES, 3ng/mL copper sulfate, 50mg/mL proline, glycine, and ascorbic acid and 20mg/mL alanine -eDMEM TGF β 1 : eDMEM+1ng/ml	α -SMA, SM22- α , Calponin, SRF	ND	Gong et al. , 2009 (42)
BM and HF	DMEM + 10% SVF + 1 ng/ml bFGF	α -SMA, c, Calponin, Caldesmon, SRF, SM-MHC,	Fibrin hydrogel contraction assay	Alimperti et al., 2014 (44)
HF (human)	DMEM + 10% SVF + 2 mg/mL insulin, 300 mM ascorbic acid phosphate, and 2mg/mL ϵ -amino-n-caproic acid + 2ng/ml bFGF or TGF β 1	α -SMA, Calponin, SM-MHC, Smoothelin	Fibrin gel contraction	Liu et al., 2008 (46)

BM, Bone Marrow ; AT, Adipose tissue; HF Hair follicle; SMMHC, smooth muscle- myosin heavy chain; α -SMA, alpha-smooth muscle actin; PDGFR- β , platelet derived growth factor receptor; TGF β 1or 3, transforming growth factor beta 1 or 3; PDGF- BB or CC, platelet derived growth factor BB or CC; bFGF, fibroblast growth factor basic; BMP4, bone morphogenetic protein 4; IL- β , interleukin-beta; DMEM, Dulbecco's modified eagle's medium ; α -MEM, minimum essential medium- alpha.

OJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Comme évoqué dans la partie bibliographique précédente, la paroi vasculaire est composée de 3 tuniques : l'adventice, la couche la plus externe qui assure l'intégration du vaisseau dans les tissus conjonctifs voisins, l'intima, composée de l'endothélium et en contact direct avec le sang et la media, la couche moyenne, qui donne au vaisseau ses propriétés mécaniques assurant le tonus vasculaire. Les maladies vasculaires, telles que l'athérosclérose, nécessitent souvent un acte chirurgical soit pour effectuer un pontage et dévier la circulation sanguine, ou pour remplacer le vaisseau lésé. L'objectif de l'équipe « d'ingénierie vasculaire » de l'équipe 5 d'IMoPA, vise à élaborer un substitut vasculaire de petit calibre (diamètre inférieur à 6 mm) présentant les caractéristiques structurales et fonctionnelles du vaisseau natif. Le but de ce travail de thèse est de développer la couche médiane de la paroi vasculaire qui constituerait ce substitut. En utilisant des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton, et différenciées préalablement en CML, ce greffon cellularisé pourrait alimenter une banque de tissu pour fournir aux chirurgiens des substituts vasculaires fonctionnalisés non immunogènes.

Ce travail se divise en 3 étapes :

- Etude de l'effet des conditions environnementales (facteurs de croissance, influence du taux en O₂ et apport en sérum) sur la différenciation des CSM GW en CML.
- Evaluation de l'influence des films de polyélectrolytes sur le phénotype des CSM GW en réponse à un environnement favorable à la différenciation en CML.
- Approche du développement d'un biomatériau « scaffold » cylindrique à base d'hydrogel d'alginate stratifié, de sa cellularisation et l'évaluation biologique de ce tube cellularisé. Cependant la caractérisation physico-chimique et mécanique de ce tube n'a pas été finalisée. Ces travaux venant de commencer, les résultats préliminaires obtenus seront présentés, amorçant ainsi les études prochaines au sein de l'équipe.

Chapitre 1 : Différenciation des CSM GW en CML en réponse à différents facteurs environnementaux.

L'objectif de ce travail était de produire des CML humaines fonctionnelles et adaptées à la construction de substitut vasculaire. Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, l'utilisation de CML matures autologues serait l'idéal pour construire la paroi vasculaire mais se heurte à certaines limites en ingénierie tissulaire. Leur expansion *in vitro* montre une capacité de prolifération et la perte de leur phénotype contractile essentiel au maintien du tonus vasculaire. En outre, l'obtention de CML matures adultes nécessite un processus invasif, ce qui rend leur utilisation délicate. Ainsi nos travaux s'intéressent à une source alternative de CML. Notre approche est basée sur l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) isolées à partir de la gelée de Wharton (tissu conjonctif du cordon ombilical). Ces cellules, identifiées comme mésenchymateuses, présentent plusieurs avantages : d'origine humaine, disponibles, de récupération non invasive, et faiblement immunogène. Des études variées ont tenté d'obtenir un phénotype contractile de CML à partir de CSM d'origine diverse telle que le tissu adipeux, le follicule pileux, la pulpe dentaire, ou encore la moelle osseuse, source largement utilisée et caractérisée dans le domaine de l'ingénierie tissulaire (Harris et al., 2012 ; Lee et al., 2012 ; Park et al., 2013 ; Alimperti et al., 2014). Dans notre travail, nous avons utilisé les cellules issues de la gelée de Wharton qui sont jugées plus primitives que les CSM dérivées des autres sources tissulaires, et dotées de propriétés intermédiaires entre les cellules souches embryonnaires et adultes. Dans nos différentes études focalisées sur le potentiel d'obtention de CML fonctionnelles, les CSM adultes ont été soumises à diverses conditions environnementales, en considérant trois paramètres majeurs : la teneur en oxygène du milieu et la concentration en sérum et en TGF β 1. Nous avons, basé sur les résultats de la littérature et des précédents travaux au sein de l'équipe, décidé de cultiver nos CSM à une concentration en oxygène réduite (hypoxie). En effet, le taux d'oxygène au niveau de la paroi artérielle est faible, et notre protocole expérimental vise à se rapprocher des conditions physiologiques vasculaires. Ainsi nous avons évalué l'effet de l'hypoxie (2% d' O_2) sur l'expression des marqueurs contractiles caractéristiques des CML issues des CSM GW. Nous avons aussi joué sur l'apport en sérum de veau fœtal pendant la culture. En effet, un taux réduit de sérum a été appliqué pendant la phase de différenciation (2% vs 10% en phase proliférative). Des études préalables ont montré l'importance de la concentration en sérum dans la différenciation cellulaire et cette méthode a notamment été reportée comme influençant l'expression de marqueurs de CML (El-

Chapitre 1 : Différenciation des CSM GW en CML.

Mounayri et al., 2013). En plus de ces deux conditions de culture, les CSM GW ont été exposées à un milieu de culture supplémenté par du *transforming growth factor beta 1* (TGF β 1 : facteur de croissance jouant, en autre, un rôle majeur sur la prolifération et différenciation de plusieurs types cellulaires). Nous avons choisi d'appliquer deux concentrations de TGF β 1, fixées à 1 et 2 ng/ml, et évalué son impact sur la différenciation en CML.

Pour suivre l'état de différenciation des CSM ainsi stimulées, nous avons choisi d'évaluer l'expression d'un panel de marqueurs contractiles des CML servant comme marqueurs relatifs de l'état de maturation. En nous inspirant de la littérature, nous avons développé des méthodes de différenciation susceptibles de détecter leur expression, en particulier α -SMA, Sm22- α , calponine, h-caldesmone et SM-MHC, smootheline et vimentine. Dans un premier temps, nous avons vérifié la présence de ces marqueurs sur des CSM issues de 5 cordons ombilicaux (4 donneurs). Les CSM GW indifférenciées semblent exprimer, de façon basale, certaines protéines impliquées dans le processus de contraction des CML matures. Cependant leur niveau d'expression reste très faible comparé de celui mesuré au niveau des CML matures isolées d'artères ombilicales (utilisées comme contrôle positif dans notre étude). Aucune expression de SM-MHC (marqueurs tardif) n'a été observée et pas ou très peu (selon les souches de cordons) d'expression du marqueur Sm22- α .

La différenciation des CSM GW vers un phénotype de CML a été examinée à la fois par analyse transcriptomique et au niveau des protéines, par l'expression des différents marqueurs. Ce travail a donné lieu à une publication (actuellement soumise) présentée ci-après. Les résultats ont montré une augmentation des marqueurs de CML. L'expression de la protéine de Sm22 – α , selon l'origine des CSM GW, a été soit initiée ou sur-régulée, tendant ainsi vers le phénotype des CML matures observées *in vivo*. Cependant, aucune expression de SM-MHC (marqueur mature de la lignée CML) n'a été observée dans ces conditions, ce qui suggèrerait, après 12 jours de culture, un engagement encore à un stade immature de la différenciation des CSM en CML.

Cette étude a aussi permis de démontrer que les MSC GW cultivées avec un taux de sérum réduit dans des conditions hypoxiques et sans facteur de croissance spécifique (TGF β 1) ont initié ou augmenté l'expression de marqueurs contractiles de la CML. Ainsi, ces conditions de culture simples et peu coûteuses, pourraient suffire à provoquer une différenciation en CML contractiles. *In fine*, notre étude suggère que les MSC GW i) expriment déjà au niveau basal, sans traitement, certains des marqueurs CML, ii) présentent un phénotype contractile après différenciation dans des conditions spécifiques. Leur maturation vers des CML différenciées et matures pourrait être favorisée en les soumettant à des contraintes cycliques pour générer une monocouche de CML contractiles fonctionnalisant la paroi vasculaire. En outre, dans notre

Chapitre 1 : Différenciation des CSM GW en CML.

équipe, les CSM GW ont déjà mis en évidence leur potentiel de différenciation en cellules endothéliales (Thèse H. Rammal, 2014). Ainsi, les différentes couches (médias et intima) pourraient être associées pour construire un greffon vasculaire à partir de ces seules cellules.

J Beroud, M Gentils, P Menu, E Velot. « Wharton's Jelly mesenchymal stem cells express inherently smooth muscle contractile proteins which can be up-regulated under hypoxic conditions » *Stem cells and development.* (soumis).

Wharton's Jelly mesenchymal stem cells express inherently smooth muscle contractile proteins which can be up-regulated under hypoxic conditions.

**Jacqueline Beroud¹, Anne-Sophie Willemin¹, Monique Gentils¹, Patrick Menu¹ and
Émilie Velot¹**

¹ UMR 7365 CNRS- Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Biopôle de l'Université de Lorraine - Department of Cell and Tissue Engineering, Vectorization, Imaging -, Avenue de la Forêt de Haye, C.S. 50184, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex F-54505

Abstract

Human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from umbilical cord Wharton's jelly (WJ) were collected individually from four different sources. Cells were cultured i) in the presence of 1 or 2 ng/ml of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) which is known to induce smooth muscle cells (SMCs) contractile phenotype, ii) under low serum conditions and iii) under hypoxia. Hypoxia combined with low serum conditions favored the differentiation of WJ-MSCs towards a smooth muscle phenotype. Results showed at protein level an initiation of expression of SM22 α and calponin and an up-regulation of others (SMA, caldesmon,) SMC markers. WJ-MSCs could be an excellent candidate for use in vascular tissue engineering.

Key words: Wharton's jelly mesenchymal stem cells, hypoxia, smooth muscle cells, transforming growth factor-beta 1, low serum conditions, differentiation

INTRODUCTION

Smooth muscle cells (SMCs) are part of the muscle of several tissues including urinary bladder, uterus, gastrointestinal tract, respiratory tract and blood vessels. Their contractile properties in vascular wall make them the main actors for the maintenance and the regulation of blood pressure (55). SMCs in mature blood vessels exhibit low proliferative activity, low synthetic capacity and express a repertoire of contractile proteins (9). Moreover, these cells can modulate their phenotype to adapt themselves. For instance, in response to vascular injury, they will exhibit a high rate of proliferation, migration and production of extracellular matrix components such as collagen, elastin, and proteoglycans. Thus, they adopt a phenotype known as “synthetic phenotype” and they can play a critical role in vascular repair. However, this phenotype switching (contractile to synthetic) of the vascular SMCs is dramatically involved in development and/or progression of vascular disease as it was clearly described in atherosclerosis (6,8). The state of differentiation/maturation of vascular SMCs can be identified by the expression of an adequate numbers of contractile protein markers. This includes early markers such as smooth muscle α -actin (SMA, also known as ACTA2), SM22 α (also known as TAGLN), and intermediate to late markers calponin, caldesmon, smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC, also known as MYH11) and smoothelin (SMTN). Various studies were interested in mature SMCs isolation and expansion *in vitro* to allow the development of vascular tissue engineering. However, the results showed that SMCs have a limited proliferation and lose their contractile phenotype which is essential for the maintenance of blood flow and blood pressure (35).

In addition, obtaining mature SMCs from healthy subjects adult arteries would be an invasive process (9).

Mesenchymal stem cells (MSCs) seem to represent an alternative cell source to contribute to blood vessel engineering. These cells have a fibroblast-like morphology, and the ability to grow and form a monolayer on tissue culture plastic (36). They are found in different tissues, such as bone marrow, adipose tissue, skin, dental tissues, hair follicle, periodontal ligament and umbilical cord. Until now, no specific antigen for human MSCs has been identified (38,56). However, in standard culture condition MSCs are defined by the International Society for Cellular Therapy (ISCT) with following phenotypic profile: they must be positive for CD44, CD73, CD90, CD105, and negative for CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a, HLA-DR

(57). MSCs have immunomodulatory properties (58) and their multipotency allows them to be differentiated into a variety of cell types such as osteocytes, adipocytes, chondrocytes, or vascular cells, more particularly SMCs (59). Thus, MSCs represent an attractive source for vascular engineering approaches.

In the literature, the influence of numerous parameters has been evaluated through the expression of SMC markers by induced-MSCs. The effects of soluble factors predominated in these studies. Among them, transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) has been mostly employed (43,50,49). This growth factor has been shown to play an essential role in vascular development and regulate diverse functions on vascular SMCs (9,41). *In vitro*, TGF- β 1 inhibits the proliferation of SMCs (60). Moreover, it also has the capacity to induce the expression of SMC markers from MSCs. Nevertheless, culture conditions differed according to the studies, including the type of medium, the concentration of growth factor and the proportion of serum or glucose. Sometimes, media were supplemented with other soluble factors such as ascorbic acid (45,46), platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) (47) or bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) (41) in order to improve MSCs differentiation (61). The effect of oxygen has also been investigated on stem cells culture, with highly variable results. Hypoxia is able to influence MSCs growth, morphology and gene expression (62–64) and also to impact the cell differentiation (61,63,65). Furthermore, results obtained with circulating endothelial progenitors shown that hypoxia could facilitate the differentiation into a smooth muscle cells lineage (61). Oxygen concentration could also play a critical role in SMCs differentiation from MSCs.

In the present work, we have investigated the cellular differentiation of MSCs isolated from umbilical cord towards a SMCs lineage under various conditions: i) a low concentration of serum, this method has been reported to influence the expression of SMCs genes (66), ii) a TGF- β 1 stimulation, which is suggested to induce the differentiation of MSCs into various cells phenotype such as SMCs (43,45,47,67) and iii) hypoxia that could also promote the differentiation into a SMCs lineage (61).

In contrast to other papers, this investigation was carried out with Wharton's Jelly (WJ, umbilical cord connective tissue) as source for MSCs. Besides being abundant source, it contains cells with a higher proliferative capacity than MSCs from bone marrow (58,63). Several groups including ours have already reported WJ as a promising source of MSCs for therapeutic applications or regenerative medicine (58). Moreover, no work has ever presented *in vitro* or *in vivo* differentiation capability of the WJ-MSCs into SMCs lineage. In our work,

expression of various SMCs markers by induced WJ-MSCs was measured at transcriptomic and protein level to evaluate the state of differentiation/maturation.

MATERIALS AND METHODS

MSCs isolation from umbilical cords

MSCs are isolated from umbilical cords of newborns. Cords were obtained from healthy donors after their consent. The jelly called "Wharton's jelly" surrounding the vessels in the cord is detached then incubated at 37 degrees in a 1% (m/v: in DMEM with antibiotics and antifungal media) collagenase I solution (GIBCO®, France) for a period of 18 hours. Then, the viscous suspension recovered was centrifuged at 250 g for 10 min. The cells in the pellet were then resuspended in the non-differentiating culture medium (alpha-MEM (LONZA®, France) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) decomplemented at 56 ° C for 30 min, glutamine, antibiotics and antifungal) and amplified in Flask culture. At the third passage cells were phenotypically characterized by flow cytometry to verify their mesenchymal character (CD90 +, CD105 +, CD73 +, CD34-, CD45-, HLA-DR-). Human SMCs from umbilical arteries were used as positive control.

Induction of WJ-MSCs into SMCs

Cells in the fourth passage were seeded on glass substrates at a cell density of 1000 cells/cm² and grown to 60-70% of confluence in normoxic conditions (21% oxygen). WJ-MSC, to induce differentiation into SMCs were subjected to environmental factors: addition of soluble factors in the culture medium and variation of oxygen. Differentiating media consisted of DMEM (GIBCO®, France) low glucose (1g/ml), 2% FBS, penicillin (100 UI/ml, SIGMA, France), streptomycin (100 µg/ml, SIGMA, France), glutamine (2mM), fungizon (2.5mg/ml), and supplemented by addition of transforming growth factors beta 1 (TGF-β1, R&D System). Two concentrations of TGF-β1 were tested: 1 and 2ng/ml in the DMEM media. We referred to the literature for the TGF-β1 concentration (43,50,49,51). WJ-MSCs were cultivated in differentiating media for up to two weeks both under normoxic and hypoxic (2% oxygen) conditions. Media were changed every 2 days. The control culture was grown in parallel in basal medium (alpha-MEM) supplemented with 2% FBS.

Evaluation of differentiation

Expression of SMCs markers was identified on treated WJ-MSCs at transcriptomic and protein level after 6, 9 and 12 days of culture. Contractility assays were performed to assess the state of cells differentiation. Human arterial SMCs from umbilical cords were used as positive control and undifferentiated WJ-MSCs were used as negative control.

Evaluation at protein level: protein extraction and Western Blot

After 6, 9 and 12 days of culture, stimulated MSCs and controls (non-stimulated and SMC using as positive control) were lysed with radioimmunoprecipitation assay with RIPA buffer supplemented by EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, Germany). Then, protein lysates were quantified with DC TM protein assay (Biorad, France) according to manufacturer's protocol and stored at -20°C for Western Blot. After the proteins assayed in each sample, these are heated at 95 ° C for 5 minutes in a mixture of blue and Laemmli β-mercaptoethanol to denature proteins and heavier. Proteins were deposited at a rate of 20µg per well on a pre-cast gel (Criterion® TGX: Biorad, France) consisting in an acrylamide gradient 4-20% gel and electrophoresed at 120 V. When migration was complete, proteins were transferred to a membrane of polyvinylidene fluoride (PVDF) using Trans-Blot® Turbo™ system (Biorad, France). The membranes were blocked by incubating for 1 h in Tris-buffered saline/Tween (TBST, pH: 7.4) with 5% milk. The next step was to incubate the primary antibody solutions diluted at different concentrations (Anti SMA (Dako, 1/32000), Anti-SM22α, sigma, 1/10000, Anti calponin, Dako, 1/2500, Anti caldesmon, sigma, 1/5000, Anti SMMHC, Dako, 1/2500, and Anti GAPDH, Santa Cruz, 1/8000), in TBST with 5% milk, for 2 h at room temperature or overnight at 4 ° C with stirring. Membranes were then washed with TBST 6 times 5 min and incubated for 1h at room temperature with goat anti-mouse horseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibodies. Membranes were washed, and HRP was detected by enhanced chemiluminescence (ECL: Amersham). The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as loading control.

Evaluation at transcriptomic level: RNA extraction, RT-PCR and quantitative PCR

The extraction and purification of RNA contained in cell lysates were performed with the RNeasy Mini Kit (QIAGEN). After thawing on ice, in the lysed cell sample QIAzol ®, the tube is left at room temperature 5 min before addition of chloroform to an immiscible phase separation. An intensive agitation above a 10 minutes incubation at room temperature, followed by centrifugation at 4 ° C (15 minutes, 12000 g). The translucent upper phase, containing RNA,

is recovered and mixed by inversion with 70 ° ethanol (v / v). The content is then treated according to the supplier's recommendations. Total RNA was eluted in 30 µl of water RNase / DNase-free. The concentration of RNA in ng/µl is determined by spectrophotometric analysis (Nanodrop). Reverse transcription is the formation of complementary Deoxyribonucleic Acid (cDNA) from RNA extracted earlier. It is made from 100 ng of RNA. The supermix and iScript reverse transcriptase buffer are added (5x iScript Reaction Mix, Biorad). The mixture is then placed in a thermocycler to performe the reverse transcription as recommended by the supplier program. The cDNA were stored at -20 ° C.

Then qPCR were performed in 96-well plates where each well were composed by 4 µl of reverse transcription mixture (cDNA), 10 µl of iTaq Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, France), and 0.3 µmol/l of both primers (Forward and reverse) whose sequences correspond to known SMC markers (SMMHC, SMNT, and vimentin) and to a reference gene (ribosomal protein RP29). The PCR was started at first by an activation of the enzyme at high temperature stage (95 ° C 10 min) followed by 40 cycles of amplification. The PCR is divided into three steps: 15 sec denaturation at 95 ° C, 1 min at the primers annealing temperature (Ta), which allows the specific recognition and attachment sequences, and 1 min at : elongation by allowing the polymerase to synthesizing all of the targeted sequence. A step of slow denaturation was performed allowing obtaining melting curves, from which the presence of nonspecific products can be controlled. The results were obtained from the analysis of the amplification curves by comparative threshold cycle (CT) method. The delta CT method was applied using the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Data are relative to control values. Gene expression was normalized to the level of RP29 housekeeping gene.

Statistical analyses

Statistical tests and graph representations were elaborated with GraphPad Prism 6 software. All results are expressed as mean +/- standard deviation (SD). Each experiment was performed with three, four or five donors, each time with at least triplicate samples. Statistical analysis was performed on quantified data (qPCR and densitometry for western blotting). Statistical analysis was carried out using ANOVA, followed by Bonferroni *post hoc* test. A *p*-value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTATS

Umbilical cords stem cells in Wharton's jelly exhibit characteristics of MSCs by morphology and phenotypic profile.

Undifferentiated WJ-MSCs were cultured until passage 4. In Figure 1, we analyzed surface markers expression of MSC isolated from 5 umbilical cords by flow cytometry (Figure 2). The cells were positive for expression of CD105 (92.02% +/- 7.45%), CD73 (95.92% +/- 4.33%), and CD90 (90.98% +/- 6.08%). They were negative for expression of HLA-Dr (1.4% +/- 0.71%), CD86 (1.28% +/- 0.98%) and also for markers of the hematopoietic lineage, including the CD34 (0.44% +/- 0.21%) and CD45 (0.44% +/- 4.32%). So, WJ-MSC phenotypic profile answer to the second criteria for defining MSC.

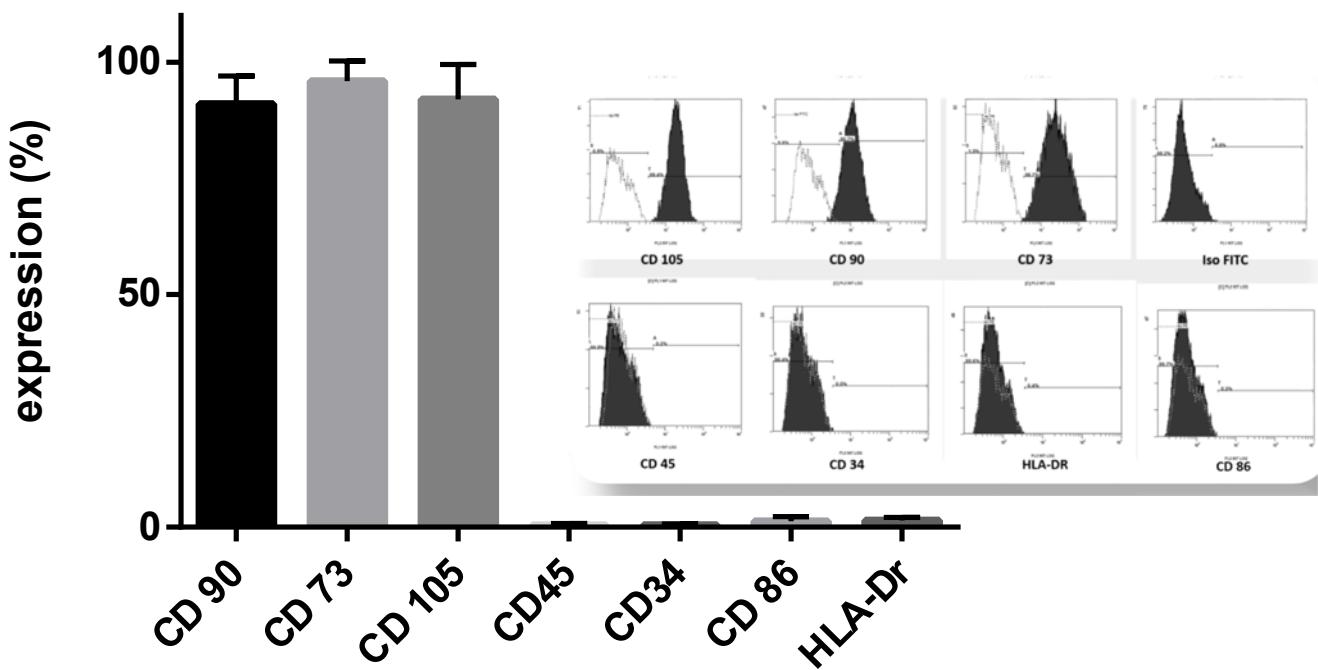


Figure 1 : Phenotypic profile of WJ-MSCs flow cytometry analysis of the expression of different markers in WJ-MSCs cultured during 8 days at passage 4 before stimulated for differentiating assay. WJ-MSCs were positive for mesenchymal markers such as CD73, CD90 and CD105 and negative for hematopoietic markers (CD45, CD34) and HLA-DR (Human Leukocyte Antigen-DR). Areas in dotted line represent antibody isotype control patterns, whereas Gray areas show signals obtained from antibodies against the identified markers. Results are expressed as mean +/- SD, N=5.

WJ-MSCs express some of SMC specific markers

Prior to culture with the different environmental conditions, the expression of differentiated SMCs specific markers with a role in contractile function (SMA, Sm22 α , calponin, caldesmon, MHC and SMTN) was investigate at transcriptomic and protein level. As exhibited in Figure 3 and 4, there was a baseline expression at transcriptomic and protein level of some early and intermediate known markers of SMCs (SMA, calponin, caldesmon) in WJ-MSCs. However, these expressions were significantly lower than those in mature umbilical cord SMCs (UC-SMCs), except for vimentin, characteristic of mesenchymal tissue, whose expression is lower in UC-SMCs. The transcriptomic profiles revealed no significant differences between WJ-MSCs and UC-SMCs for calponin and caldesmone genes expression level. On the contrary, WJ-MSCs expressed only low level of Sm22- α and SMTN, highly expressed in contractile SMCs phenotype. However, MHC (known as late marker) expression was completely absent in all of cells.

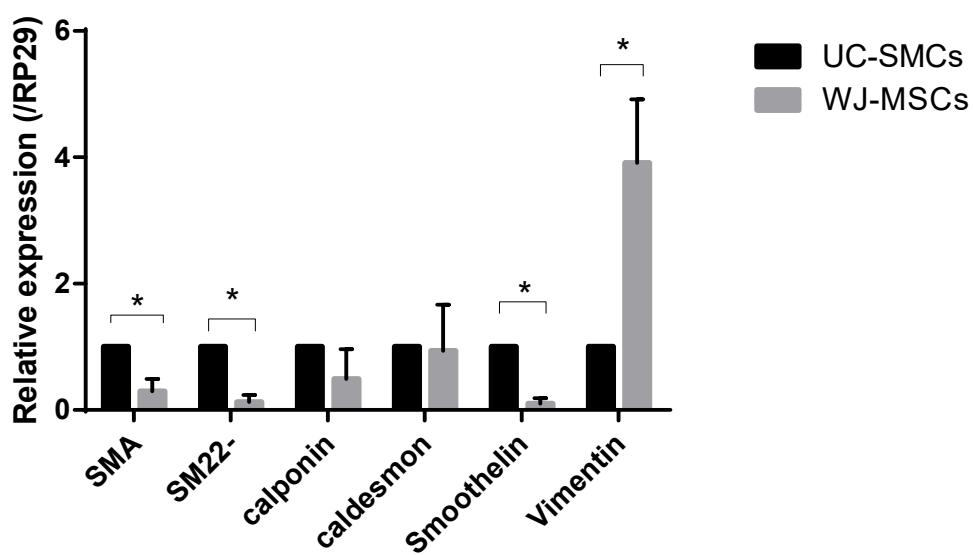


Figure 2 : Expression of SMCs genes (SMA, SM22 α , calponin, caldesmon, Smoothelin) and vimentin in human WJ-MSCs at baseline compared to human UC-SMCs. Cells were cultivated at passage 4 under normal conditions for 7 days. The expression was determined by RT-qPCR analysis. The expression of genes (SMA, SM22 α , calponin, caldesmon, SMTN, vimentin) were quantified and normalized to the expression level of RP29). * $p < 0.01$, Results are expressed as mean +/- SD for 4 cells donors ($N=4$, umbilical cords).

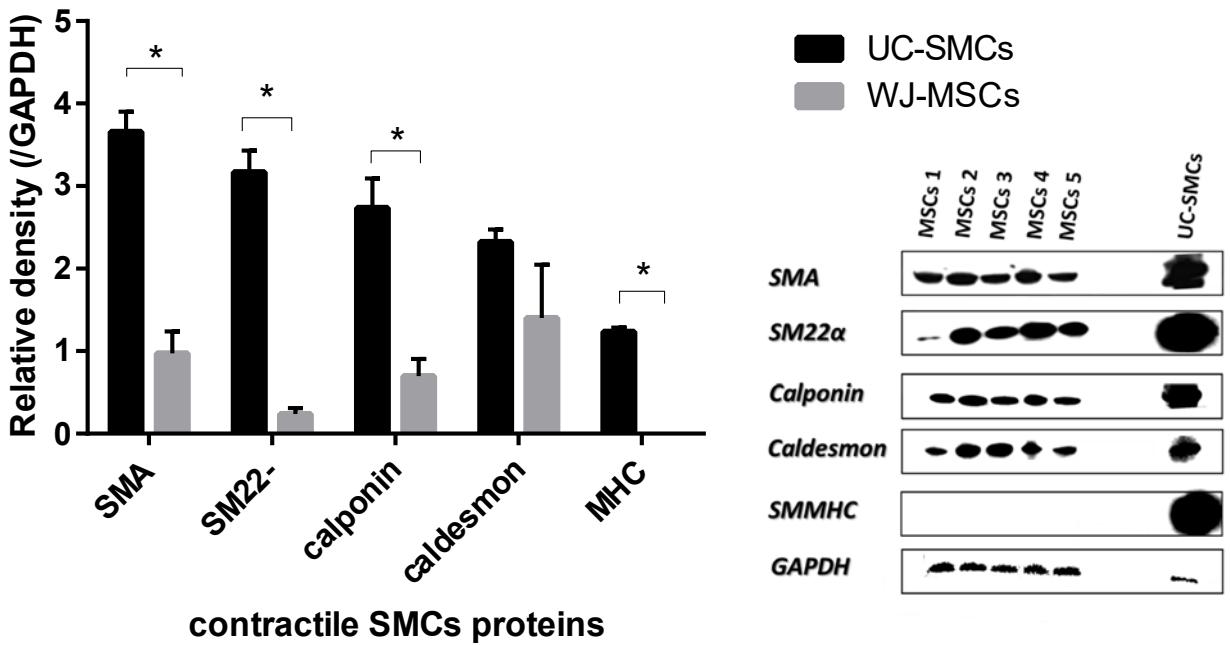


Figure 3 : Expression of SMCs contractile proteins (SMA, SM22, calponin, caldesmon, MHC) in human WJ-MSCs at baseline. Cells were cultivated at passage 4 under normal conditions for 7 days. The expression was determined by western blot analysis. The densities of proteins were quantified and normalized to the expression level of GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). * $p < 0.01$, Results are expressed as mean +/- SD for 5 cells donors ($N=5$, umbilical cords).

Effect of TGF β 1, low serum and oxygenation on WJ-MSCs morphology and proliferation

At the fourth passage, human WJ-MSCs exhibit a fibroblast-like spindle morphology during culture (figure 5). After one week in culture, the different environmental conditions seemed impact on WJ-MSCs growth. When the cells were treated in low serum (2% FBS), they grew to less than in basic conditions at 10% FBS. As exhibit in Figure 5A, hypoxia enhanced cells growth, but didn't seem offsetting the low serum effect during the culture (Figure 5B).

Whereas, TGF β 1 addition improved WJ-MSCs proliferation, and in combination with hypoxia, the effect was even more pronounced (figure 5 C, D). Regarding the appearance of the cells, no evident change in morphology were observed, whatever the culture conditions.

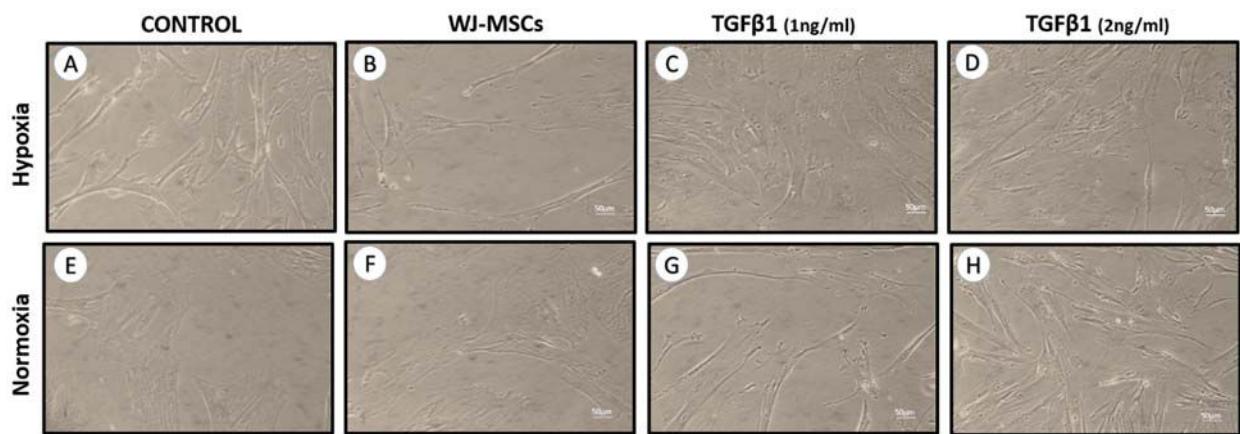


Figure 4: Morphology of WJ-MSCs cultured at fourth passage during 7 days.

Phase contrast images of WJ-MSCs, cultivated on basic conditions at 10% FBS in basal medium α -MEM as control (A, D), treated in low serum medium (2% FBS) in basal medium α -MEM (B, F), treated in low serum medium (2% FBS) in differentiating medium DMEM supplemented by 1ng/ml of TGF β 1 (C, G), treated in low serum medium (2% FBS) in differentiating medium DMEM supplemented by 2ng/ml of TGF β 1. Cells were cultured on glass (D, H), untreated. (Leica light microscopy, $\times 10$ magnification, scale bar = 50 μ m).

Effect of TGF β 1, low serum and oxygenation on the expression of SMC markers

Prior to culture with the three environmental conditions (low serum, hypoxia and in presence of TGF β 1), WJ-MSCs expressed calponin, caldesmon and a very low level of SMA, SM22 and smoothelin. We studied, in four umbilical cords cells lines, if the expression level of all these markers could be promote under differentiating conditions.

Expression of SMCs protein is promoted under differentiating conditions

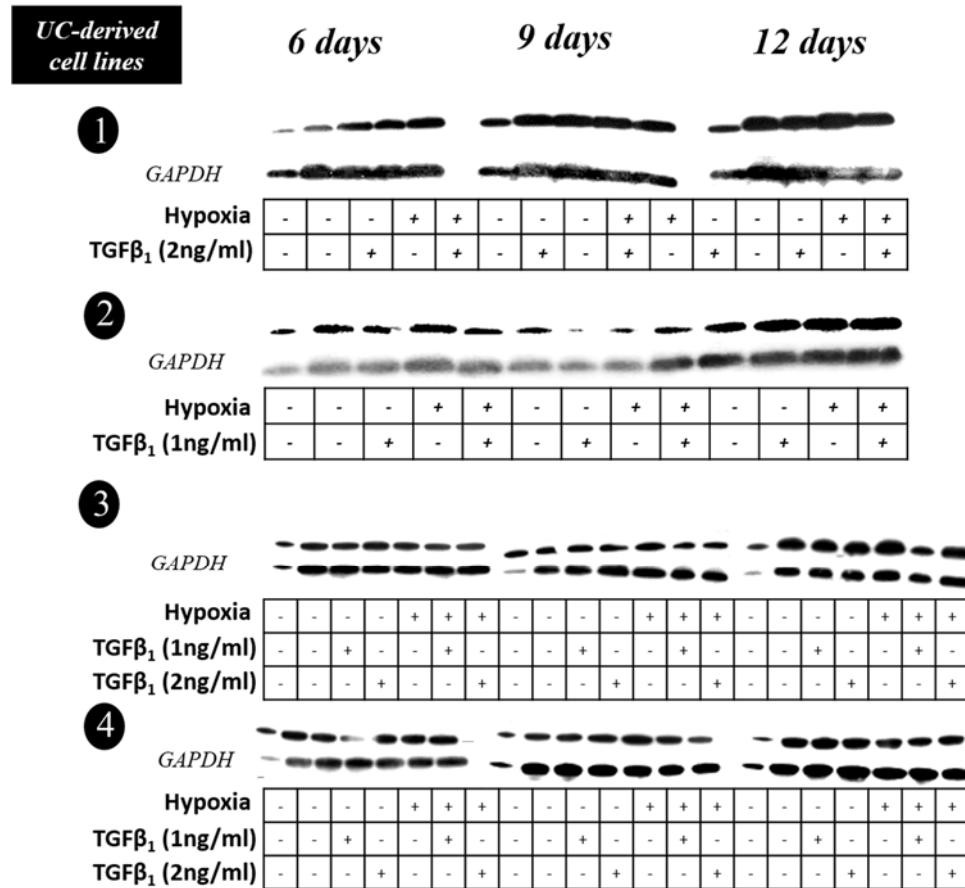
Expression of SMA, SM22 α , calponin and caldesmon in the protein level was analyzed by western blotting detection (Figure 6). According to donors umbilical cords, the expression profile of these proteins is not quite the same at basal level. Indeed, α -SMA and caldesmon were detected whatever donors. However, the calponin expression seemed very low and totally absent for donors 1 and 4. Regarding the SM22- α protein, no detection of the protein was observe except for the donor 2. Despite these variable expression levels, the effects of various environmental factors were visible. After one week in culture in differentiating media, all cell lines showed an up-regulation of SMA and caldesmon but no differences were observable between the different treatments. Their expression seemed to be more important after 12 days of treatment. For caldesmon, a faster effect appeared under hypoxia since we observe at days

6, more important signals compared to the others conditions. At days 12, signals became equivalent.

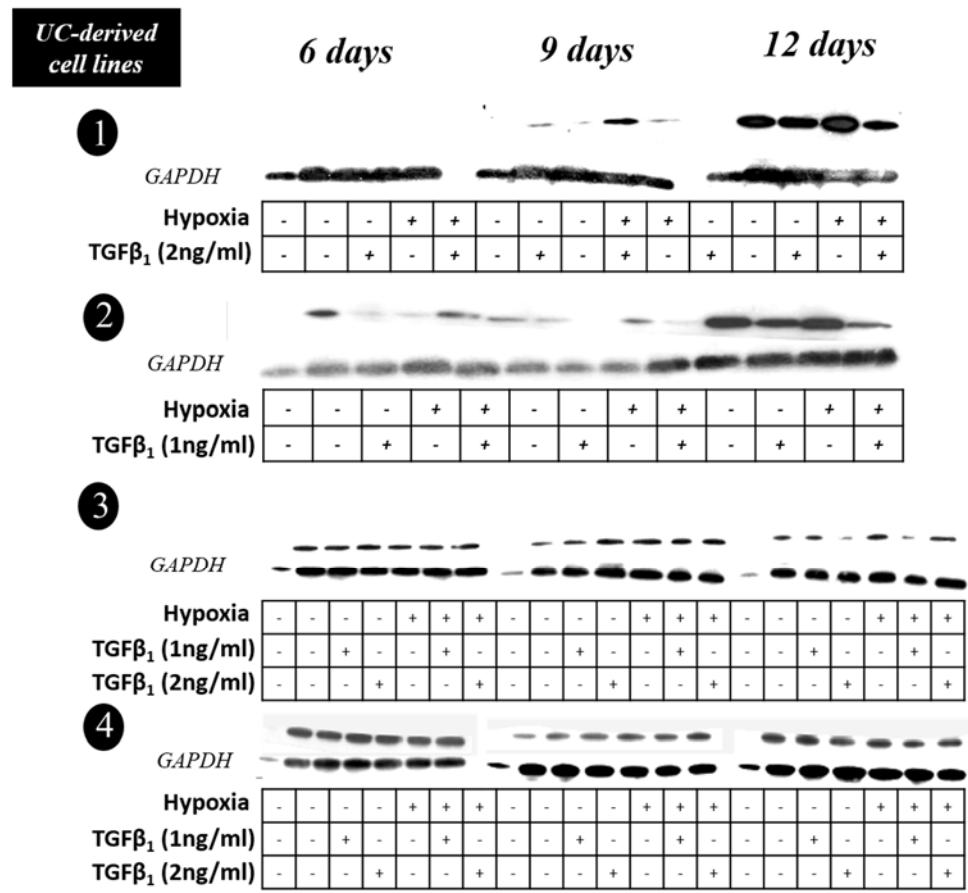
Western blot analysis revealed an up-regulation of calponin with all three agents in two of four cell lines and an initiation of this protein expression for the two others cell lines (1 and 4). From 6 days of treatment, cells stimulated under hypoxia with or without TGF β 1 and regardless of cell lines, showed a much greater expression of the calponin protein. The difference seemed more marked after 12 days of stimulation.

After 12 days in culture, all three conditions proved to be able to initiate (for cell lines 1, 3 and 4) or enhance the expression of Sm22- α protein. However, curiously, cells treated with TGF β 1 in comparison with those cultured without the growth factor appeared with this expression decreased. Regardless of cell lines or treatment no initiation of SMMHC were detected at protein level (data not shown).

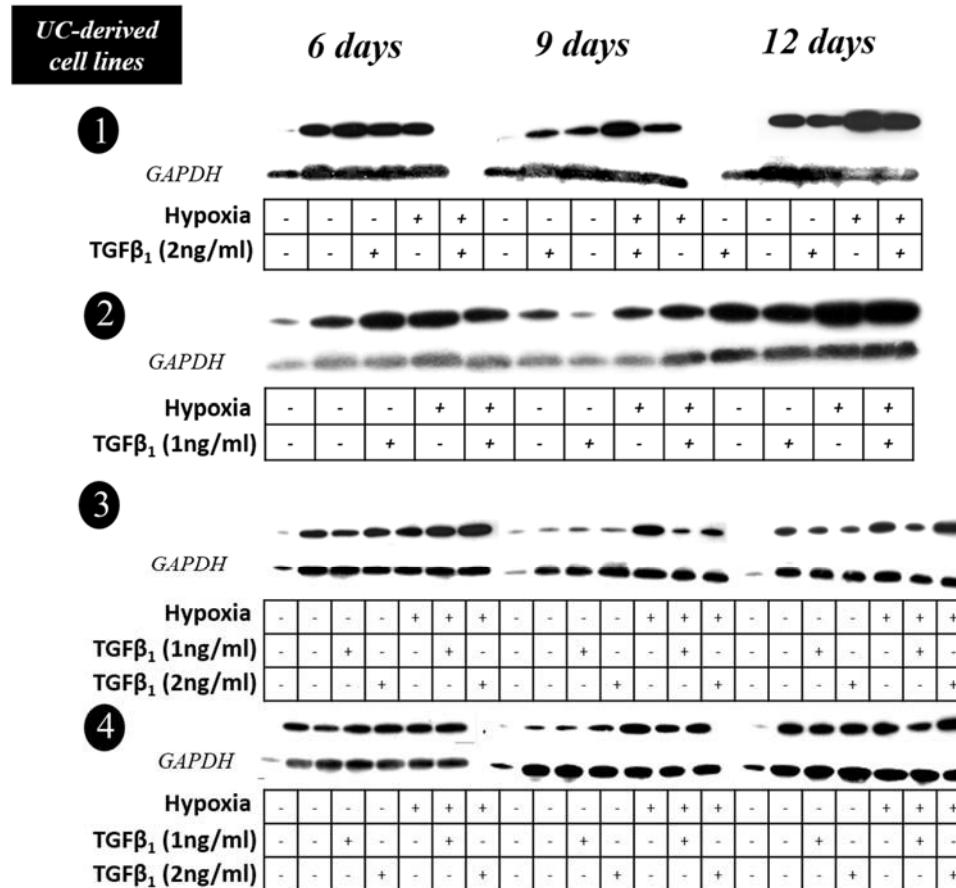
SMA



SM22 α



Calponin



Caldesmon

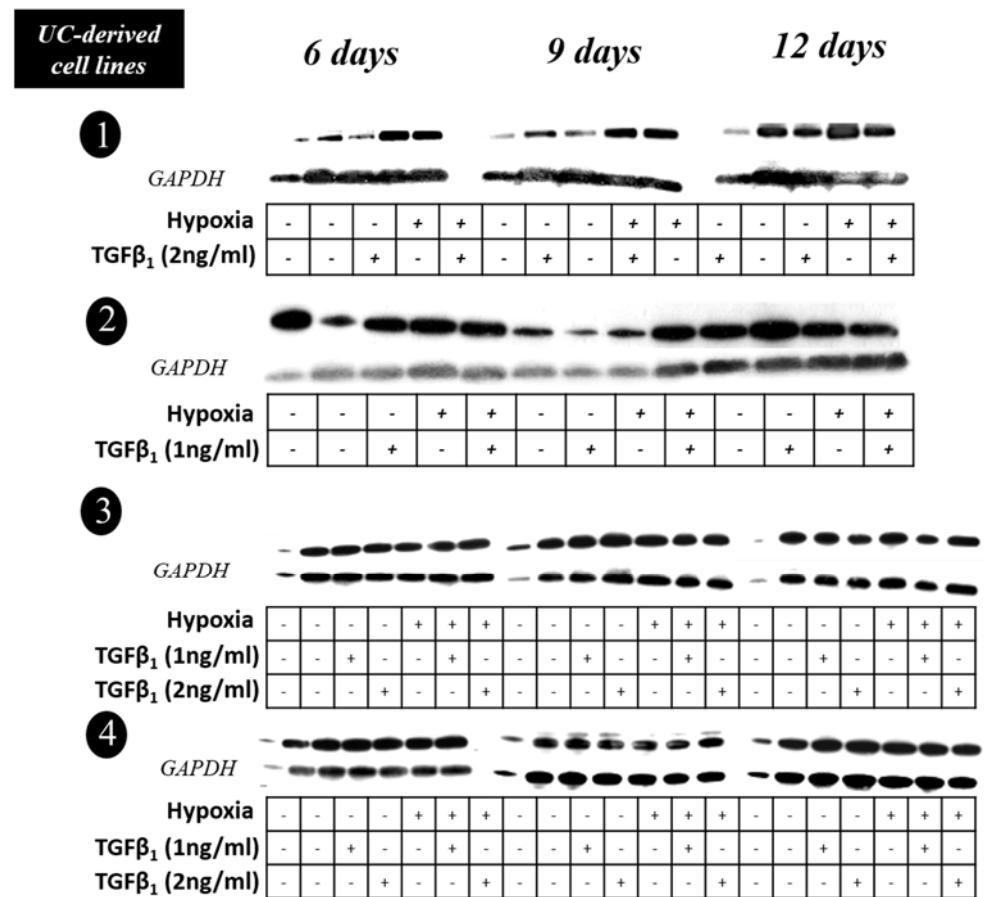


Figure 5 : Expression of SMCs contractile proteins under differentiating conditions. Western Blot for SMA, Sm22a, calponin, caldesmon and MHC was performed for 4 umbilical cords after differentiation for 12 days. No expression by MSCs stimulated was observed for SMMHC protein.

Up-regulation of the transcripts expression of SMCs markers under differentiating conditions

To investigate the gene expression of induced MSCs, real-time quantitative RT-PCR was performed. We focused on the analysis of gene expression of late markers such as SMTN and SMMHC which was not revealed in western blot at protein level.

Compared to basal level, an up regulation, of transcripts expression for smoothelin was seen in all cell lines under all differentiating conditions (Figures 6, 7 and 8). However, results remained variable across the different cell lines when cells were stimulated with the different treatments.

SMTN known as a SMC gene with high specificity, was up-regulated from 9 days in culture. Differences between cultures conditions was observed especially under hypoxia which seemed improve more this gene expression at day 9 in all cell lines. Then, for two cell lines (lines 2 and 3), TGF β 1 exhibited a positive effect in normoxia after 12 days. For all cells, the only decrease in the serum level for WJ-MSCs induction into SMCs was enough to promote the expression of SMTN and this was reinforced, for certain cell line, either by hypoxia or by TGF β 1. Moreover, our study all cells showed an important expression level of vimentin gene (characteristic of mesenchymal tissue) from the beginning of culture. If, for the first cell line, few differences were observed between the different conditions of stimulation, in contrast, for 3 others, changes were identifiable. Indeed, a decrease is observed at 9 days of treatment for the fourth line. In contrast, the third, the term remained similar, or almost, except for cells at day 12 and cultured under normoxia (classical culture condition with a reduced serum level) where the expression was tripled by reporting to other treatment conditions. Very low levels of MHC expression were observed and are therefore not presented (data not shown).

Chapitre 2 : influence de la charge de surface sur le comportement « spatial » des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton en culture.

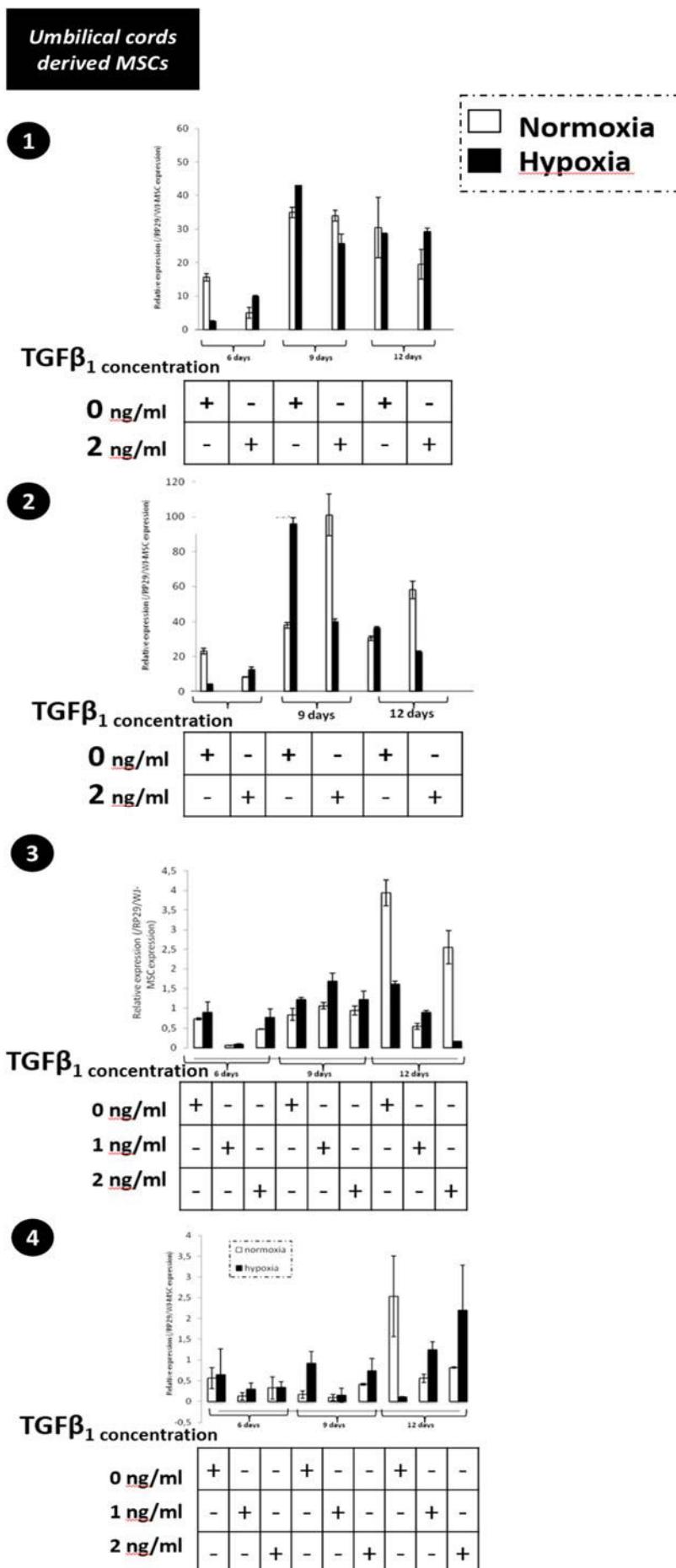


Figure 6 : Quantification of SMCs intermediate and late markers expression after 12 days of differentiation. Quantitative PCR for Smoothelin after 12 days of WJ-MSCS culture in response to 1 or 2 ng/ml of TGF β 1 in DMEM media supplemented with 2% of FBS under normoxia or hypoxia. (n=4).

Chapitre 2 : influence de la charge de surface sur le comportement « spatial » des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton en culture.

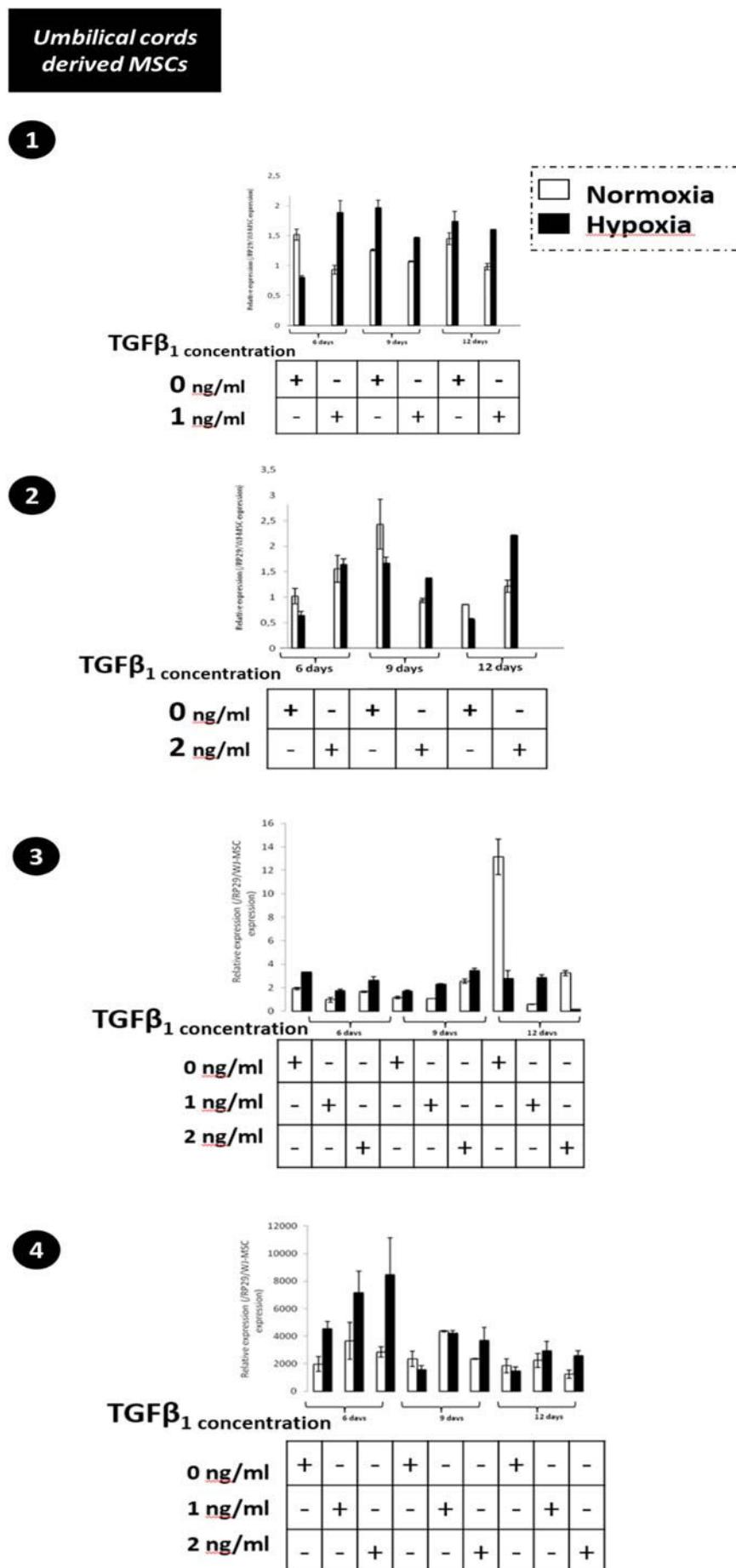


Figure 7 : Quantification of Vimentin (marker of SMCs synthetic phenotype) expression after 12 days of differentiation. Quantitative PCR after 12 days of WJ-MSCs culture in response to 1 or 2 ng/ml of TGF β 1 in DMEM media supplemented with 2% of FBS under normoxia or hypoxia. (n=4)

DISCUSSION

In vascular system, SMCs is an essential component providing maintenance of blood flow. For the development of vascular grafts by tissue engineering approach, generating a SMCs layer is a prerequisite for successful construction. The rarity of adult artery, and difficulties associated with mature SMCs *in vitro* culture, make them not excellent candidate. Thus, finding an alternative source of SMCs is an essential step. In the present study, we evaluated if SMCs could be generate from human MSCs obtained from umbilical cord conjunctive tissue. In a first time, we explored WJ-MSCs profile and we evaluate their SMCs markers expression at basal level. We detected baseline expression of SMCs markers protein level. SMA, sm22 α , calponin, early and intermediate markers of the state of SMCs differentiation, has indeed been detected for the isolated MSCs from 5 umbilical cords but their expression levels remained very low compared to that found for mature and contractile SMCs. Caldesmon expression revealed variable between MSCs according to donors (umbilical cords). So it didn't appear as a good marker for monitoring the state of differentiation of these MSCs. Many studies have ever detected SMCs markers in MSCs from others sources such as adipose tissue or bone marrow. Rodriguez *et al*, in 2006 have shown a baseline expression of early markers SMA, Sm22 α by AT-MSCs, whereas Harris *et al* works on AT-MSCs revealed an expression of intermediate markers calponin and caldesmon (43). BM-MSCs also shown α -SMA and calponin expression at undifferentiated state (45,47) and Narita's team demonstrate the presence of Sm22 α . These observations confirms that SMA expression is not specific to SMCs lineage and it may indeed, be detected in a wide variety of non SMCs types such as myofibroblasts, cardiomyocytes in some cardiomyopathies or also in endothelial cells in certain conditions (6). Although some of papers validated obtaining of SMCs-like by its expression (47,51), SMA is certainly not a sufficient evidence for identification of SMCs lineage. However, these firsts' results revealing basal expression of some SMCs markers what highlight the idea that WJ could represent an easily accessible and abundant promising cell source of MSCs for vascular graft development.

In this goal, we demonstrated that WJ-MSCs acquired SMCs phenotype as evidenced by their expression of markers such as SMA, SM22 α , calponin, caldesmon, and smoothelin upon induction for 12 days under Hypoxia associated with a decreased of serum in culture and coupled or no with TGF β 1 stimulation. Apart from smoothelin which have ever been defined to be selectively expressed in vascular differentiated SMCs, all of the others are not specific. However, their combined expression could validate induction of MSCs towards a SMCs

Chapitre 2 : influence de la charge de surface sur le comportement « spatial » des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton en culture.

phenotype (6). We found the initiation of calponin and sm22 α expression and an up-regulation of caldesmon and SMA at protein level in the presence of TGF β 1. To date, TGF β 1 has been reported to induce differentiation of MSCs into SMCs (41,43,45–47,50,49). Narita et al., have expanded bone marrow MSCs (BM-MSCs) *in vitro* in medium supplemented with TGF β 1 combined or no with ascorbic acid and thus up-regulated gene expression of SMA, SM22 α , and calponin (45). Their work were confirmed by Gong et al., since they also examined TGF β 1 impact on BM-MSCs differentiation in comparison to others medium supplements and they discovered that TGF β 1 was the strongest SMCs inducers from human BM-MSCs(47). Park et al., treated human adipose-derived MSCs with TGF β 1 and showed an increase of contraction capacity and the expression levels of SMCs genes. Our results showed that TGF β 1 stimulate indeed the differentiation of WJ-MSCs into SMCs phenotype but its effect has not distinguished from those obtained with other environmental conditions applied. Hypoxia revealed a more effective and earlier effect on expression of some markers. Surprisingly, when the three environmental conditions (low serum, low O₂ were applied TGF β 1), TGF β 1 presence in culture seemed inhibited the positive effect of hypoxia by attenuating the expression of Sm22 α . Oxygen concentration is one of the most important conditions of culture properties. Many studies have ever evaluated the impact of low oxygen on MSCs culture. Recently it was confirmed that hypoxia had beneficial effects on proliferation potential and stemness markers expression (63,68). Their studies also demonstrate the boost effect of low oxygen on chondrogenic differentiation potential from MSCs but variable effects were observed on adipogenic differentiation and Drela et al., also showed inhibiting effect of hypoxia on neural differentiating capacities from WJ-MSCs expression.

To date, no laboratories have published data on the differentiation of WJ-MSCs into SMCs.

Our study is the first report which describe additive effect, on WJ-MSCs, of TGF β 1 in media under low oxygen current and low serum. This study highlighted the beneficial effect of hypoxia on SMCs obtention from MSCs. However, this condition was combined with low serum in culture what demonstrated also its important effect. That confirmed studies that have ever shown the impact of serum levels on various cells differentiation. Besides, SMCs have been obtained from embryonic cells cultivating in serum-free conditions (40,69). Moreover, our data revealed the heterogeneity of WJ-MSCs which exhibited various profile when initially cultivated. Indeed, western blotting analyzes highlighted their differential expression of some markers which were even totally absent in some cells donors (umbilical cords). It looks like a study focused on the differentiation of MSCs from the bone marrow SMCs. Their

Chapitre 2 : influence de la charge de surface sur le comportement « spatial » des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton en culture.

differentiation potential were associated with their CD146 expression. It could be interesting to investigate the link between WJ-MSCs protein profile and their origins. Maybe, their profile and differentiation potential could be connected to some factors (donor age, childbirth...).

CONCLUSION

To conclude we demonstrated that WJ-MSCs cultivated at low serum in hypoxic conditions and without specific growth factor (TGF β 1) enhancing SMCs differentiation displayed phenotypic properties of SMCs as showed by the expression of SMCs contractile markers. Thus these simple and inexpensive conditions of MSCs culture, could be enough to cause a differentiation into contractile SMCs. Indeed, our study suggested that WJ-MSCS i) express already at basal level, without treatment, some of SMCs markers, ii) exhibit a contractile phenotype after differentiation under specific conditions. Their maturation towards differentiated SMCs would be achieved through step of cyclic stress stimulation to generate a SMCs monolayer mimicking vascular wall. Moreover, in our team, WJ-MSCs have ever been differentiate into endothelial-cells like. Thus, the different layers (media and intima) could be associated to build for example a vascular graft.

SUPPLEMENTARY DATA:

Table 1: Primers pairs used to value the differentiation stage of stimulated WJ-MSC

SMC MARKERS GENE		FORWARD PRIMERS	REVERSE PRIMERS	T _a
<i>α-SMA (ACTA)</i>		GAACATGGCATCATCACCAA	GGACATTGAAAGTCTCAAAC	54 °C
<i>SM22- α (TAGLN)</i>		CAGGTGGCTCAGTTCCCTGAA	AGTGCCCATCATTCTTGGTC	60 °C
<i>Calponin (CNN1)</i>		AGGAGGAGCTGAGAGAGTGG	CTGGCTGCAGCTTATTGATG	60 °C
<i>Caldesmon (CALD-H)</i>		ACCAGTGCAATTGAGGGAAC	CCTTCAGCAGCAACAGGAAG	60 °C
<i>Myosin heavy chain (SMMHC)</i>		CCCAAGTTCTCCAAGGTGGA	TTGACCACCACGCAGAAAGAG	54 °C
<i>Smoothelin (SMTN)</i>		CTGCAGCATCAAGATGGAAG	TCTGGTGCTTGTTCACTCG	60 °C
<i>Vimentin (VIM)</i>		TCAGAGAGAGGAAGCCGAAA	ATTCCACTTGCGTTCAAGG	60 °C
<i>RP29</i>		AAGATGGTCACCAGCAGCTGTACTG	AGACACGACAAGAGCGAGAA	60 °C

REFERENCES

1. Xu ZC, Zhang WJ, Li H, Cui L, Cen L, Zhou GD, et al. Engineering of an elastic large muscular vessel wall with pulsatile stimulation in bioreactor. *Biomaterials*. avr 2008;29(10):1464-72.
2. Salmon N, Paternotte E, Decot V, Stoltz J-F, Menu P, Labrude P. Polyelectrolyte multilayer films promote human cord blood stem cells differentiation into mature endothelial cells exhibiting a stable phenotype. *Biomed Mater Eng*. 2009;19(4-5):349-54.
3. Berthelemy N, Kerdjoudj H, Gaucher C, Schaaf P, Stoltz J-F, Lacolley P, et al. Polyelectrolyte Films Boost Progenitor Cell Differentiation into Endothelium-like Monolayers. *Adv Mater Deerfield Beach Fla*. 17 juill 2008;20(14):2674-8.
4. Bolton TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev*. juill 1979;59(3):606-718.
5. Yano K, Araki Y, Hales SJ, Tanaka M, Ikebe M. Boundary of the autoinhibitory region of smooth muscle myosin light-chain kinase. *Biochemistry (Mosc)*. 16 nov 1993;32(45):12054-61.
6. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*. juill 2004;84(3):767-801.
7. Kawai-Kowase K, Owens GK. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. janv 2007;292(1):C59-69.
8. Wang D-Z, Olson EN. Control of smooth muscle development by the myocardin family of transcriptional coactivators. *Curr Opin Genet Dev*. oct 2004;14(5):558-66.
9. Beamish JA, He P, Kottke-Marchant K, Marchant RE. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. oct 2010;16(5):467-91.
10. Owens GK, Wise G. Regulation of differentiation/maturation in vascular smooth muscle cells by hormones and growth factors. *Agents Actions Suppl*. 1997;48:3-24.
11. Vandekerckhove J, Weber K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol*. 25 déc 1978;126(4):783-802.
12. Clowes AW, Clowes MM, Kocher O, Ropraz P, Chaponnier C, Gabbiani G. Arterial smooth muscle cells in vivo: relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin. *J Cell Biol*. nov 1988;107(5):1939-45.
13. Chiavegato A, Roelofs M, Franch R, Castellucci E, Sarinella F, Sartore S. Differential expression of SM22 isoforms in myofibroblasts and smooth muscle cells from rabbit bladder. *J Muscle Res Cell Motil*. févr 1999;20(2):133-46.

Chapitre 2 : influence de la charge de surface sur le comportement « spatial » des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton en culture.

14. Winder SJ, Sutherland C, Walsh MP. A comparison of the effects of calponin on smooth and skeletal muscle actomyosin systems in the presence and absence of caldesmon. *Biochem J.* 15 déc 1992;288 (Pt 3):733-9.
15. Babij P, Kawamoto S, White S, Adelstein RS, Periasamy M. Differential expression of SM1 and SM2 myosin isoforms in cultured vascular smooth muscle. *Am J Physiol.* mars 1992;262(3 Pt 1):C607-13.
16. Hungerford JE, Owens GK, Argraves WS, Little CD. Development of the aortic vessel wall as defined by vascular smooth muscle and extracellular matrix markers. *Dev Biol.* 15 sept 1996;178(2):375-92.
17. Hungerford JE, Hoeffler JP, Bowers CW, Dahm LM, Falchetto R, Shabanowitz J, et al. Identification of a novel marker for primordial smooth muscle and its differential expression pattern in contractile vs noncontractile cells. *J Cell Biol.* 19 mai 1997;137(4):925-37.
18. Miano JM. Vascular smooth muscle cell differentiation-2010. *J Biomed Res.* mai 2010;24(3):169-80.
19. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 19 mai 2011;473(7347):317-25.
20. Sarkar S, Salacinski HJ, Hamilton G, Seifalian AM. The mechanical properties of infrainguinal vascular bypass grafts: their role in influencing patency. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg.* juin 2006;31(6):627-36.
21. Seifu DG, Purnama A, Mequanint K, Mantovani D. Small-diameter vascular tissue engineering. *Nat Rev Cardiol.* juill 2013;10(7):410-21.
22. Fernandez CE, Achneck HE, Reichert WM, Truskey GA. Biological and engineering design considerations for vascular tissue engineered blood vessels (TEBs). *Curr Opin Chem Eng.* 1 févr 2014;3:83-90.
23. Draget KI, Skjåk-Braek G, Smidsrød O. Alginate based new materials. *Int J Biol Macromol.* août 1997;21(1-2):47-55.
24. Seely GR, Hart RL. The binding of alkaline earth metal ions to alginate. *Macromolecules.* oct 1974;7(5):706-10.
25. Stabler C, Wilks K, Sambanis A, Constantinidis I. The effects of alginate composition on encapsulated betaTC3 cells. *Biomaterials.* juin 2001;22(11):1301-10.
26. Rastello De Boisseson M, Leonard M, Hubert P, Marchal P, Stequert A, Castel C, et al. Physical alginate hydrogels based on hydrophobic or dual hydrophobic/ionic interactions: bead formation, structure, and stability. *J Colloid Interface Sci.* 1 mai 2004;273(1):131-9.
27. LeRoux MA, Guilak F, Setton LA. Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration. *J Biomed Mater Res.* oct 1999;47(1):46-53.

Chapitre 2 : influence de la charge de surface sur le comportement « spatial » des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton en culture.

28. Drury JL, Dennis RG, Mooney DJ. The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials*. juill 2004;25(16):3187-99.
29. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci*. 7 août 2006;6(8):623-33.
30. Genes NG, Rowley JA, Mooney DJ, Bonassar LJ. Effect of substrate mechanics on chondrocyte adhesion to modified alginate surfaces. *Arch Biochem Biophys*. 15 févr 2004;422(2):161-7.
31. Boura C, Menu P, Payan E, Picart C, Voegel JC, Muller S, et al. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials*. sept 2003;24(20):3521-30.
32. Boura C, Muller S, Voegel JC, Schaaf P, Stoltz JF, Menu P. Behaviour of endothelial cells seeded on thin polyelectrolyte multilayered films: a new biological scaffold. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2005;33(3):269-75.
33. Paternotte E, Kerdjoudj H, Kokten T, Stoltz J-F, Kearney-Schwartz A, Voegel J-C, et al. Endothelialized and preconditioned natural umbilical arteries with long term patency open the route for future human uses. *Clin Hemorheol Microcirc*. 1 janv 2013;54(3):223-34.
34. Kerdjoudj H, Berthelemy N, Rinckenbach S, Kearney-Schwartz A, Montagne K, Schaaf P, et al. Small vessel replacement by human umbilical arteries with polyelectrolyte film-treated arteries: in vivo behavior. *J Am Coll Cardiol*. 4 nov 2008;52(19):1589-97.
35. Reusch P, Wagdy H, Reusch R, Wilson E, Ives HE. Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. nov 1996;79(5):1046-53.
36. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2004;22(3):377-84.
37. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. déc 1966;16(3):381-90.
38. Lennon DP, Caplan AI. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. nov 2006;34(11):1604-5.
39. Han M, Wen J-K, Zheng B, Cheng Y, Zhang C. Serum deprivation results in redifferentiation of human umbilical vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. juill 2006;291(1):C50-8.
40. El-Mounayri O, Mihic A, Shikatani EA, Gagliardi M, Steinbach SK, Dubois N, et al. Serum-free differentiation of functional human coronary-like vascular smooth muscle cells from embryonic stem cells. *Cardiovasc Res*. 1 avr 2013;98(1):125-35.
41. Wang C, Cen L, Yin S, Liu Q, Liu W, Cao Y, et al. A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. févr 2010;31(4):621-30.

Chapitre 2 : influence de la charge de surface sur le comportement « spatial » des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton en culture.

42. Gong Z, Calkins G, Cheng E, Krause D, Niklason LE. Influence of culture medium on smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. févr 2009;15(2):319-30.
43. Harris LJ, Abdollahi H, Zhang P, McIlhenny S, Tulenko TN, DiMuzio PJ. Differentiation of adult stem cells into smooth muscle for vascular tissue engineering. *J Surg Res*. 15 juin 2011;168(2):306-14.
44. Alimperti S, You H, George T, Agarwal SK, Andreadis ST. Cadherin-11 regulates both mesenchymal stem cell differentiation into smooth muscle cells and the development of contractile function in vivo. *J Cell Sci*. 15 juin 2014;127(Pt 12):2627-38.
45. Narita Y, Yamawaki A, Kagami H, Ueda M, Ueda Y. Effects of transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage. *Cell Tissue Res*. sept 2008;333(3):449-59.
46. Liu JY, Peng HF, Gopinath S, Tian J, Andreadis ST. Derivation of functional smooth muscle cells from multipotent human hair follicle mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. août 2010;16(8):2553-64.
47. Gong Z, Niklason LE. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. juin 2008;22(6):1635-48.
48. Lachaud CC, López-Beas J, Soria B, Hmadcha A. EGF-induced adipose tissue mesothelial cells undergo functional vascular smooth muscle differentiation. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1304.
49. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Bae YC, et al. Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth-muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. *J Cell Sci*. 1 déc 2006;119(Pt 23):4994-5005.
50. Park WS, Heo SC, Jeon ES, Hong DH, Son YK, Ko J-H, et al. Functional expression of smooth muscle-specific ion channels in TGF- β (1)-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 15 août 2013;305(4):C377-91.
51. Kim YM, Kim J, Heo SC, Shin SH, Do EK, Suh D-S, et al. Proteomic identification of ADAM12 as a regulator for TGF- β 1-induced differentiation of human mesenchymal stem cells to smooth muscle cells. *PloS One*. 2012;7(7):e40820.
52. Zhao Z, Yu H, Xiao F, Wang X, Yang S, Li S. Differentiation of adipose-derived stem cells promotes regeneration of smooth muscle for ureteral tissue engineering. *J Surg Res*. nov 2012;178(1):55-62.
53. Hirota N, McCuaig S, O'Sullivan MJ, Martin JG. Serotonin augments smooth muscle differentiation of bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res*. mai 2014;12(3):599-609.
54. Park JS, Chu JS, Tsou AD, Diop R, Tang Z, Wang A, et al. The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β . *Biomaterials*. juin 2011;32(16):3921-30.

Chapitre 2 : influence de la charge de surface sur le comportement « spatial » des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton en culture.

55. Yoshida T, Owens GK. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circ Res*. 18 févr 2005;96(3):280-91.
56. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 5 août 2015]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1316137>
57. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
58. Omar R El, Beroud J, Stoltz J-F, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev*. oct 2014;20(5):523-44.
59. Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater*. févr 2011;7(2):463-77.
60. Björkerud S. Effects of transforming growth factor-beta 1 on human arterial smooth muscle cells in vitro. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol Am Heart Assoc*. août 1991;11(4):892-902.
61. Berthelemy N, Kerdjoudj H, Schaaf P, Prin-Mathieu C, Lacolley P, Stoltz J-F, et al. O₂ level controls hematopoietic circulating progenitor cells differentiation into endothelial or smooth muscle cells. *PloS One*. 2009;4(5):e5514.
62. Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, Totey S, Ta M. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia. *Int J Biol Sci*. 2010;6(5):499-512.
63. Drela K, Sarnowska A, Siedlecka P, Szablowska-Gadomska I, Wielgos M, Jurga M, et al. Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. *Cytotherapy*. juill 2014;16(7):881-92.
64. Das R, Jahr H, van Osch GJVM, Farrell E. The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue Eng Part B Rev*. avr 2010;16(2):159-68.
65. Boyette LB, Creasey OA, Guzik L, Lozito T, Tuan RS. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells display enhanced clonogenicity but impaired differentiation with hypoxic preconditioning. *Stem Cells Transl Med*. févr 2014;3(2):241-54.
66. Tamama K, Sen CK, Wells A. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into the smooth muscle lineage by blocking ERK/MAPK signaling pathway. *Stem Cells Dev*. oct 2008;17(5):897-908.
67. Lee MJ, Kim MY, Heo SC, Kwon YW, Kim YM, Do EK, et al. Macrophages regulate smooth muscle differentiation of mesenchymal stem cells via a prostaglandin F₂α-mediated paracrine mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. nov 2012;32(11):2733-40.

Chapitre 2 : influence de la charge de surface sur le comportement « spatial » des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton en culture.

68. Choi JR, Pingguan-Murphy B, Wan Abas WAB, Noor Azmi MA, Omar SZ, Chua KH, et al. Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 30 mai 2014;448(2):218-24.
69. Corotchi MC, Popa MA, Remes A, Sima LE, Gussi I, Lupu Plesu M. Isolation method and xeno-free culture conditions influence multipotent differentiation capacity of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther. 2013;4(4):81.
70. Moby V, Boura C, Kerdjoudj H, Voegel J-C, Marchal L, Dumas D, et al. Poly(styrenesulfonate)/poly(allylamine) multilayers: a route to favor endothelial cell growth on expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular grafts. Biomacromolecules. juill 2007;8(7):2156-60.
71. Izquierdo A, Ono SS, Voegel J-C, Schaaf P, Decher G. Dipping versus spraying: exploring the deposition conditions for speeding up layer-by-layer assembly. Langmuir ACS J Surf Colloids. 2 août 2005;21(16):7558-67.
72. Kuriyama H, Kitamura K, Itoh T, Inoue R. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. Physiol Rev. juill 1998;78(3):811-920.

Chapitre 2 : influence de la charge de surface sur le comportement « spatial » des cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton en culture.

En 1997, Decher et ses collaborateurs ont développé une nouvelle technique permettant de fonctionnaliser des surfaces de différents matériaux. Comme exposé dans la partie bibliographique de ce manuscrit, cette méthode permet de construire des films de polyélectrolytes, appelés « films multicoques de polyélectrolytes (FMP). La technique consiste à déposer par alternance des couches de polycations et de polyanions. Ces films obtenus présentent des avantages variés : simplicité de mise en œuvre, utilisation en solution aqueuse, construction possible quelle que soit la surface du substrat à fonctionnaliser.

Des travaux précédents, au sein du laboratoire, ont utilisé ces FMP constitués de polycations de poly-allylamine (PAH) et de polystyrène sulfonate (PSS) en tant que polyanion. La structure choisie et utilisée était composée de 3 bicouches et demi : (PAH-PSS)₃-PAH. Ainsi les résultats des différentes études effectuées au sein de l'équipe, ont montré l'effet positif de ces films en termes de biocompatibilité, d'adhésion et prolifération de cellules matures (31,32). Par ailleurs, ces FMP ont été évalués *in vivo*, et ont favorisé le recrutement cellulaire, lorsqu'ils étaient déposés sur la surface lumineuse de substituts vasculaires naturels ou synthétiques (34). De plus, ces films ont aussi amélioré la différenciation de progéniteurs endothéliaux circulants de lapin en cellules vasculaires (54).

Cependant, ces études se sont essentiellement focalisées sur leur différenciation vers des CE. Dans ce travail, nous utilisons les CSM GW comme source alternative de CML potentiellement utilisable et capable de se différencier en CML (observé dans le chapitre 1), combinées à l'utilisation des FMP susceptibles d'améliorer cette différenciation dans le but final d'obtenir une couche de CML fonctionnelles.

Ainsi, les 3,5 bicouches de FMP ont été construites sur des substrats en verre à l'instar des précédents travaux, puis les CSM GW ont été cultivées dans les conditions classiques (Normoxie 21% O₂ à 10% SVF).

Contrairement à toutes nos attentes, un comportement inattendu des CSM GW a pu être observé sur ces films. En effet, après 10 jours de culture, les cellules formaient des îlots ou nodules qui s'avèrent un facteur limitant en ingénierie vasculaire. En effet, notre but est d'obtenir une

Elaboration d'un biomatériau « scaffold » à base d'hydrogel d'alginate.

couche détachable et enroulable pour recréer la media vasculaire. Ces résultats vont à l'encontre de nos objectifs. Ainsi, 2 questions majeures ont été soulevées :

- Ce comportement notable est-il propre aux CSM GW puisque ces résultats n'ont pas été constatés lors des précédents travaux qui utilisaient d'autres origines cellulaires ?
- Ce comportement est-il dû aux propriétés spécifiques des FMP, comme sa dureté, sa charge de surface, son épaisseur, ... ?

Pour répondre à ces questions, nous avons choisi, d'une part, de cultiver à la fois des cellules souches d'une autre source, à savoir CSM de la moelle osseuse mais aussi des HUVEC, cellules différencierées de phénotype endothérial isolées à partir de la veine ombilicale. D'autre part, nous avons imaginé que la charge de surface des FMP était inappropriée pour les CSM GW. Nous avons donc fait varier cette charge de surface en jouant sur la construction des FMP. C'est le polyélectrolyte déposé en surface (donc la dernière couche) qui donne la charge à l'ensemble du film. En effet, des surfaces chargées positivement sont recouvertes de films de type (PAH-PSS)₃-PAH, alors que par des films (PAH-PSS)₄ présentent une charge de surface négative. Les CSM-GW, après caractérisation au passage 3, ont été ensemencées sur ces deux constructions et des lames de verre recouvertes par du collagène de type 1 ont été utilisées comme contrôle positif.

Nous avons observé des résultats similaires aux études précédentes pour les CSM MO et les HUVEC lorsque les cellules sont ensemencées sur les FMP formés de 3,5 bicouches, alors que les CSM GW forment, comme nous l'avions observé précédemment, des nodules sur ces mêmes surfaces. En revanche, les FMP de surface négative, à savoir (PAH-PSS)₄, favorise la croissance des CSM GW. Ainsi, la dernière couche (la plus superficielle et celle en contact avec les cellules) des films influence le comportement des CSM GW et joue donc un rôle essentiel sur leur croissance.

Ces résultats nous amènent à la réflexion suivante : en jouant sur la charge de surface des FMP, cela permettrait d'orienter le comportement des CSM GW. Le choix d'une surface positive serait judicieux pour l'obtention de culture en 3 dimensions adaptée davantage au domaine de l'ingénierie du cartilage ou de l'os par exemple. En revanche, pour l'ingénierie vasculaire, une surface négative semblerait plus appropriée puisqu'elle favoriserait la culture en monocouche.

Ces observations ont fait l'objet de l'article suivant :

H Rammal*, **J Beroud***, M Gentils, P Labrude, P Menu, H Kerdjoudj, et E Velot. « Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films ». *Bio-medical materials and engineering* 23, n° 4 (1 janvier 2013):299-309.

*Both Authors contributed equally to this work.

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

H. Rammal^{a,*}, J. Beroud^{a,*}, M. Gentils^a, P. Labrude^a, P. Menu^{a,**}, H. Kerdjoudj^{b,*} and E. Velot^{a,*}

^a Faculté de Médecine, UMR 7365, CNRS-Université de Lorraine, Biopôle, Vandœuvre-lès-Nancy, France

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

Abstract.

BACKGROUND: Polyelectrolyte multilayer (PEMs) films made of poly(allylamine hydrochloride) (PAH) as polycation and poly(styrene sulfonate) (PSS) as polyanion, with a PAH ending layer, can be used as a coating in order to improve the anti-thrombogenicity and patency of vascular grafts in vascular engineering field. They induce strong adhesion of mature endothelial cells on glass, expanded polytetrafluoroethylene and cryopreserved arteries. Despite their outstanding effect on mature and progenitor endothelial cells, PEMs ending with PAH showed a poor outcome on Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) culture.

OBJECTIVE: The aim of this work was to examine the influence of the ending charge of PEMs on WJ-MSCs behavior.

METHODS: WJ-MSCs amplified until the 3rd passage were seeded and cultured on (PAH-PSS)₃-PAH and on (PAH-PSS)₄ coated glass for 10 days. Stem cell phenotype was checked by flow cytometry and cell morphology was followed by bright field microscopy.

RESULTS: Flow cytometry analysis showed that WJ-MSCs were positive for MSC's markers CD73, CD90 and CD105 and negative for hematopoietic markers CD34 and CD45. Light microscopy showed development of nodule-like structures after 10 days of culture on (PAH-PSS)₃-PAH, which resulted in a disturbance of cell monolayer. Whereas WJ-MSCs cultured on (PAH-PSS)₄ ending with PSS showed a normal cell growth like on collagen and reached confluence after 10 days.

CONCLUSION: The culture surface seems to have a determining role in WJ-MSC's "spatial" behavior, which could be considered in the field of tissue engineering.

Keywords: Mesenchymal stem cells, polyelectrolyte multilayer films, culture surface, stem cells behavior

1. Introduction

Vascular diseases are a major challenge for medical science because the use of grafts largely fails due to high immunogenicity and thrombogenicity. Improving graft patency using mature endothelial cells (ECs) enhances the survival of the graft after transplantation [1]. However, these cells present low availability restricting their use [2]. As an alternative, stem cell-based therapies have rapidly risen as a potential strategy for tissue repair in regenerative medicine field. Since their discovery [3], bone marrow

*These authors contributed equally to this work.

** Address for correspondence: P. Menu, Faculté de Médecine, UMR 7365, CNRS-Université de Lorraine, Biopôle, Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 (0)3 83 68 54 57; Fax: 33 (0)3 83 68 54 09; E-mail: patrick.menu@univ-lorraine.fr.

1 mesenchymal stem cells (BM-MSCs) have been extensively investigated and their use in clinical trials
2 showed some encouraging results [4]. Nevertheless these cells present several limits. Besides the invasive
3 and painful cell collecting procedure, BM-MSCs are present at very low frequency (approximately
4 0.001–0.01% [5]) and their quality decreases with the age of the donor [6].

5 Alternative sources for MSCs isolation have been pursued. Thus, these cells can be obtained from
6 several birth-associated tissues including umbilical cord Wharton's jelly [7]. These cells are multipotent,
7 with an inexpensive harvesting, easily and not invasively isolated, immunocompatible, politically
8 permissible and present a high differentiation potential [8,9]. Despite their ability to differentiate into
9 several lineages, the majority of transplanted MSCs or mature cells die within the first days following the
10 injection [10,11]; this death might be due to a weak initial adhesion and a cellular detachment caused by
11 blood flow. Since 2000, our group demonstrated the possibility to use polyelectrolyte multilayer (PEMs)
12 films made of poly(allylamine hydrochloride) (PAH) as polycation and poly(styrene sulfonate) (PSS) as
13 polyanion, with a PAH ending layer, as a coating in order to develop an anti-thrombogenic surface in
14 vascular engineering field [12].

15 This surface modification is based on the alternate adsorption of oppositely charged polyelectrolytes [13]. Beside their great simplicity of preparation, this method offers also large possibilities
16 in PEMs properties tuning such as PEMs thickness, surface roughness and wettability [14]. We demonstrated
17 that (PSS/PAH)₃-PAH film deposited on glass improved ECs adhesion and viability [15], increased significantly their adherence under shear stress [16] and also promoted their attachment and
18 proliferation inside small-diameter vascular grafts [17]. Recently, we demonstrated that these PEMs
19 were able to promote *in vitro* the endothelial differentiation of endothelial progenitor cells (EPCs) [18,
20 19] and of BM-MSCs [20].

21 Initial cell adhesion is mostly mediated through electrostatic interaction [21] and, more indirectly,
22 *via* serum proteins adsorbed on to the films. The most frequently studied synthetic PEMs are, by far,
23 linearly growing and dense PSS/PAH films. It has been previously reported that different types of cells
24 such as endothelial cells [15], fibroblasts [22,23], osteoblastic cells [24], hepatocytes [25], rabbit and
25 human EPCs [18,19] and BM-MSCs [20] had a good adhesion and behavior on PSS/PAH films; and that
26 film terminated with PAH preserved cell shape, attachment, cytoskeleton arrangement and exhibited an
27 excellent cellular biocompatibility [16].

28 Recently, we found that WJ-MSCs exhibit an unexpected behavior on (PAH-PSS)₃-PAH film. The
29 outer layer of PEMs film, and more specifically its terminal charge, is thought to be responsible for this
30 MSC's special behavior after 10 days of growing. In order to prove the influence of the surface charge on
31 MSC's culture, the behavior of two sources of MSCs (WJ- and BM-MSCs) was evaluated on positively
32 charged outer layer of (PAH-PSS)₃-PAH classical architecture and on negatively charged outer layer of
33 (PAH-PSS)₄ film.

34 2. Material and methods

35 2.1. Polyelectrolyte multilayers films

36 All reagents were purchased from Sigma Aldrich (France) unless specified otherwise. Anionic PSS
37 (MW = 70 kDa) and cationic PAH (MW = 70 kDa) were used to build polyelectrolyte multilayers (PEMs)
38 films from polyelectrolyte solution at 1 mg/ml (PSS and PAH) and dissolved in Tris
39 (10 mM)/NaCl (150 mM) solution. Each experiment was preceded by a cleaning step of the cover

glasses (diameter: 34.7 mm) with 100 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) during 15 min at 100°C. After an intensive ultrapure water (Millipore) rinse, cover glasses were brought in contact with 10 mM hydrochloric acid during 15 min at 100°C and finally rinsed with ultrapure water. Cover glasses were then placed in 6-well plates and PAH solution was incubated for 5 min at room temperature. After an intensive Tris/NaCl solution rinse, polyanion (PSS) was adsorbed for 5 min. Thus, 7 or 8 alternate depositions of polycationic PAH and polyanionic PSS layers were deposited and (PAH-PSS)₃-PAH or (PAH-PSS)₄ films were then built up. Type I rat tail collagen (BD Bioscience) was used as positive control for cell adhesion. Glass slides were coated by 100 µg/ml of collagen I in phosphate buffer saline (PBS, Gibco) for 10 min at 37°C and rinsed with PBS solution before cell seeding.

2.2. Cell isolation

2.2.1. HUVECs

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated from fresh umbilical cords according to the method of Jaffe et al. [26]. They were cultured at 37°C at 5% CO₂ and 21% O₂ in 25 cm² tissue-culture-treated flasks in complete medium. The medium consisted of an equal mixture of media M199 (Fisher) and RPMI 1640, supplemented with 20% decomplemented human serum, 2 mM L-glutamin (Fisher), 20 mM HEPES, 100 IU/ml penicillin (Fisher) and 2.5 mg/ml fungizone® (Fisher). Medium was changed every 2 days.

2.2.2. MSCs from Wharton's jelly umbilical cord

Fresh human umbilical cords were obtained after full-term births with informed consent using the guidelines approved by the university hospital center (CHU) of Nancy. Briefly, after rinsing in Hank's balanced salt solution (HBSS), cords were aseptically stored at 4°C in sterile saline until processing. Umbilical cord vessels were then removed from cord segments, and exposed mesenchymal tissue was cut into very small pieces or explants (1–2 mm³). For the digestion step, explants were incubated with collagenase type 2 (1 mg/ml, Fisher), in DMEM (Gibco) medium for 18 h in 5% CO₂ at 37°C. After incubation, enzyme was inactivated with decomplemented fetal bovine serum (FBS). WJ-MSCs were suspended and cultured in alpha Minimal Eagle Medium (α -MEM, Lonza) complete proliferation medium supplemented with 10% FBS, penicillin/streptomycin 100 IU/ml, glutamine 2 mM and 2.5 mg/ml fungizone®, and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 21% O₂ at 37°C with a medium change every 2 days.

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

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

2.2.4. Cells behavior

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

1 2.2.5. Cytoskeleton staining

2 Fluorescent dyes were used to stain actin cytoskeleton; phalloidin coupled with an Alexa 488 green
3 fluorophore (Invitrogen, 1/100) was used in the presence of 0.1% Triton X-100 and 0.5% bovine serum
4 albumin (BSA, Euromedex), after permeabilization of cell membranes with 0.5% Triton X-100. A blue
5 DNA labeling was performed using the dye 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1/250,000). Ob-
6 servations were made after one week and two weeks of culture. Phalloidin and DAPI labeled cells
7 were mounted on microscope glass slides (VWR) to be observed by fluorescence microscopy (Le-
8 ica, $\times 10$ magnification) after using the appropriate excitation and emission filters for Alexa Fluor 488
9 (Ex485/Em538).

10 11 2.3. WJ-MSC's phenotypic characterization

12 WJ-MSCs were characterized at 3rd passage by flow cytometry (FACSCalibur; BD Bioscience)
13 through the expression of MSC's markers cluster of differentiation CD73 (Ecto-5'-nucleotidase),
14 CD90 (Thymocyte differentiation antigen-1) and CD105 (Endoglin), hematopoietic markers CD34
15 and CD45 (Leukocyte common antigen-5); using mouse anti-human CD45-(HI30) fluorescein isoth-
16 iocyanate FITC-conjugated antibody (BD Bioscience), phycoerythrin PE-conjugated mouse anti-human
17 CD34-(581), CD73-(AD2), CD90-(5E10) (BD Bioscience) and CD105-(5N6) antibodies (Serotec) and
18 appropriate isotype controls. Briefly, adherents WJ-MSCs were detached using trypsin/ethylenediamine-
19 tetraacetic acid (EDTA) and incubated for 1 hour at room temperature with appropriate conjugated anti-
20 bodies. Stained cells were immediately analyzed and at least 10,000 events were measured and analysis
21 was performed with the CELLQuestTM software (BD Bioscience).

23 24 3. Results**25 26 3.1. Phenotypic characterization of WJ-MSCs**

27 The mesenchymal phenotype of the cells from Wharton's jelly umbilical cord was assessed by flow
28 cytometry. Cells exhibited a strong positive surface expression for the MSC's evaluated markers: nearly
29 100% for CD90, 90% for CD73 and 60% for CD105. In addition, there was no detection of the
30 hematopoietic lineage markers CD34 and CD45 (Fig. 1).

33 34 3.2. Behavior of WJ-MSCs on (PAH-PSS)₃-PAH and (PAH-PSS)₄ after 10 days

35 Macroscopic visualization of WJ-MSCs cultured in a 10% FBS proliferation medium at passage 4
36 on (PAH-PSS)₃-PAH showed the formation of nodule-like shapes after 10 days. These clearly and eas-
37 ily observable white shapes covered all the culture area (Fig. 2(a)). However, in the same conditions,
38 WJ-MSCs on (PAH-PSS)₄ film did not develop any nodule-like shapes and exhibited a normal growth
39 (Fig. 2(b)), similar to controls (data not shown).

**41 42 3.3. Influence of the film charge on the morphology and behavior of HUVECs and BM-MSCs on
(PAH-PSS)₃-PAH and on (PAH-PSS)₄ after 5 and 10 days**

43 Microscopic observation of HUVECs cultured on (PAH-PSS)₃-PAH and on (PAH-PSS)₄ showed a
44 normal and basic cobblestone morphology after 5 days: they were homogenous, closely opposed, large
45 46

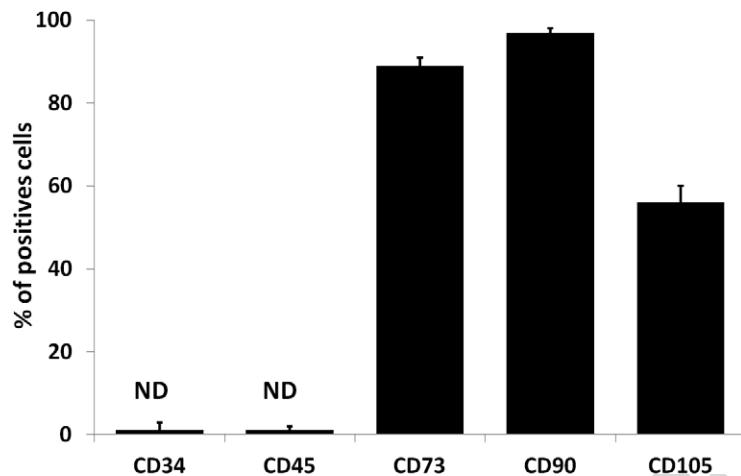


Fig. 1. Phenotypic characterization of Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) at passage 3 performed by flow cytometry. The analysis of phenotypic markers showed the percentages of positive cells for hematopoietic stem cells (CD34 and CD45) and MSCs (CD73, CD90 and CD105). Results are expressed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

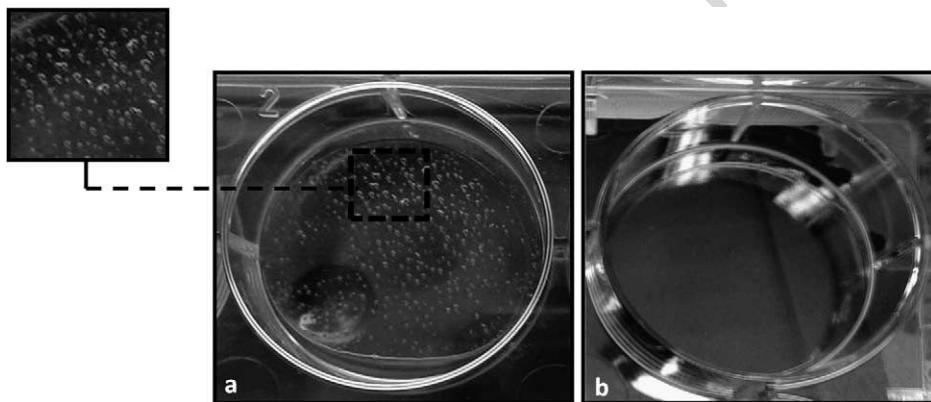


Fig. 2. Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) behavior after 10 days of culture on: (a) $(\text{PAH-PSS})_3\text{-PAH}$ and (b) $(\text{PAH-PSS})_4$ polyelectrolyte multilayers films. Representative picture, taken after medium change, showing the formation of nodule-like shapes in WJ-MSCs cultured for 10 days on $(\text{PAH-PSS})_3\text{-PAH}$ structure. Square surrounded by a dashed black line representing a magnification of the nodule-like structures.

and polygonal with indistinct cell borders (Fig. 3(a) and (e)); these cells formed a confluent monolayer after 10 days (Fig. 3(b) and (f)). On both culture surfaces, BM-MSCs began, after 5 days of culture, to display a broadened flat morphology and grew close to one another in parallel arrays forming multiple overlapping layers (Fig. 3(c) and (g)). These cells conserved their fibroblastic phenotype and reached confluence after 10 days (Fig. 3(d) and (h)). Hence, the charge of the outer layer did not alter the growth of the tested cells, in respect to their specificity.

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

Microscopic evaluation of WJ-MSCs cultured at passage 4 with a normal 10% FBS culture medium ($\alpha\text{-MEM}$, Lonza[®]) on uncoated, collagen, $(\text{PAH-PSS})_4$ and $(\text{PAH-PSS})_3\text{-PAH}$ coated culture surfaces

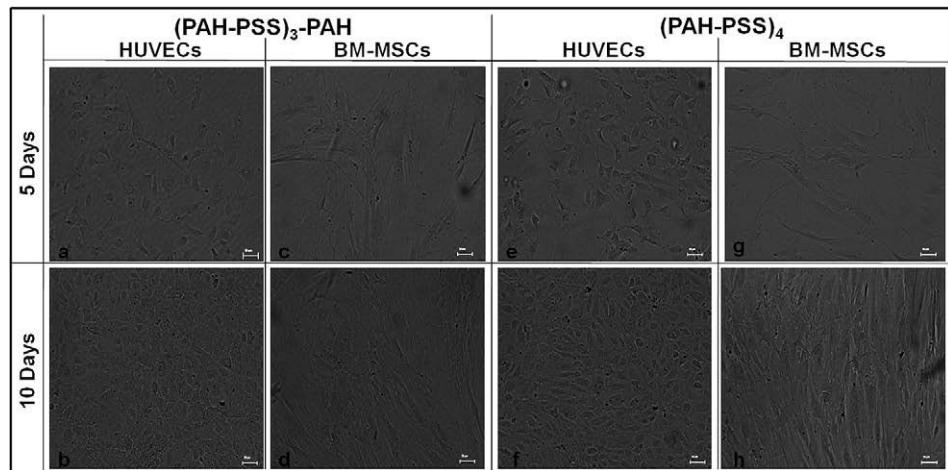


Fig. 3. Morphology and behavior of Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs). Representative pictures showing the morphology of proliferating HUVECs on (PAH-PSS)₃-PAH (a)–(b), on (PAH-PSS)₄ (e)–(f) and of proliferating BM-MSCs on (PAH-PSS)₃-PAH (c)–(d)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

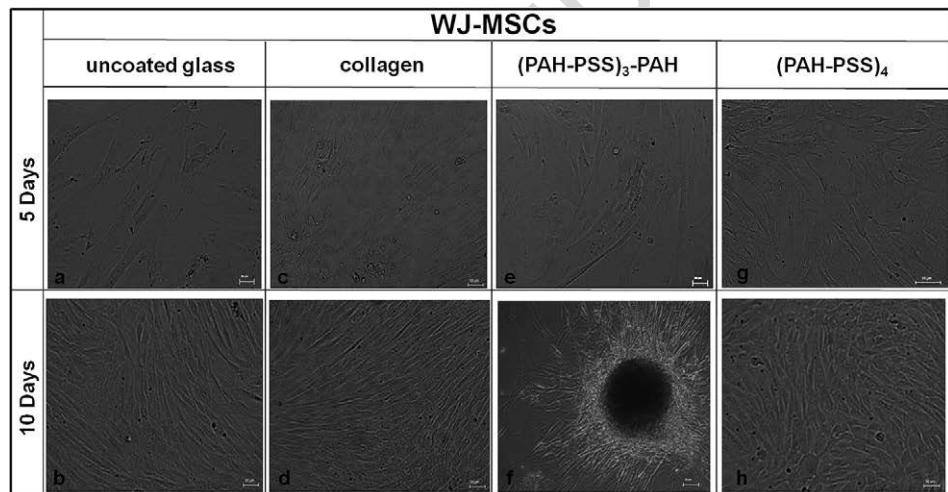


Fig. 4. Morphology and behavior of Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs). Representative pictures showing the morphology of proliferating WJ-MSCs after 5 (a, c, e) and (g) and 10 (b, d, f) and (h) days of culture on: (a)–(b) uncoated glass, (c)–(d) collagen coated glass, (e)–(f) (PAH-PSS)₃-PAH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

showed, in the first 5 days following the plating, a similar and typical fibroblast-like morphology (Fig. 4(a), (c), (e), (g)). After 10 days, WJ-MSCs cultured on uncoated glass (Fig. 4(b)), collagen (Fig. 4(d)) and on (PAH-PSS)₄ (Fig. 4(h)) displayed a broadened flat morphology and reached confluence, whereas on (PAH-PSS)₃-PAH surface (Fig. 4(f)), cells developed some nodule-like shapes covering all the culture surface.

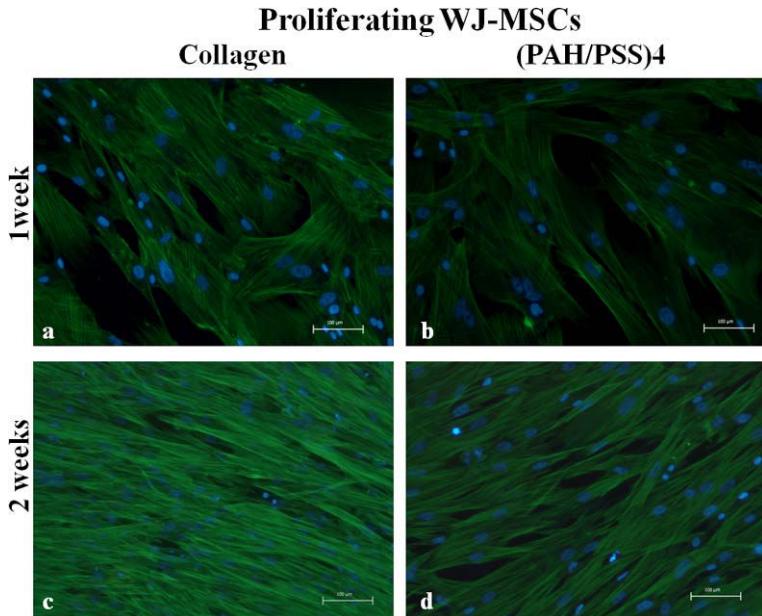


Fig. 5. Behavior analysis of Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) cultivated in proliferation medium (complete alpha MEM) by fluorescent probe staining. Representative pictures showing WJ-MSCs (a–d) actin filaments (green by phalloidin) and nucleus (blue by DAPI) staining after one and two weeks of culture on collagen and (PAH/PSS)₄ surface (Leica fluorescent microscopy, $\times 10$ magnification, scale bar = 100 μm). (Colors are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/BME-130754>.)

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

These experiments were made only on the two main conditions favoring the WJ-MSCs development: collagen and (PAH/PSS)₄. WJ-MSCs actin filaments observation on collagen (positive control) and (PAH/PSS)₄ did not show any remarkable difference between these two culture surfaces concerning cell adhesion and behavior. Cells proliferated normally on both culture surface (Fig. 5(a) and (b)) and expended on all the culture surface area forming a stable confluent cell monolayer after 2 weeks (Fig. 5(c) and (d)).

4. Discussion

Vascular disease is the leading cause of mortality in today's world, requiring surgical interventions including small diameter (inner diameter <6 mm) bypass grafting with autologous veins or arteries [27]. However, adequate autologous vessels for bypass conduits are not possible in many patients [28]. Therefore, the need for patient-compatible tissue-engineered vascular grafts is urgent. However, the patency rate of small diameter vascular grafts is weak due to the formation of thrombus [29,30], leaving significant space for improvement in this field [31]. A promising method to prevent thrombus formation and improve the performance of small-diameter vascular grafts would be the endothelialization of the luminal surface of scaffold materials in order to form a functional and antithrombogenic surface [32]. However, endothelialization has always been limited because of the low availability of autologous cells and because of the weak adhesion of ECs, leading to their detachment from the surface upon exposure to blood circulation [33].

To address cell immunogenicity and availability, stem cell-based therapies have rapidly emerged as a potential strategy for tissue repair and regeneration. It was reported that vascular smooth muscle cells and ECs could be obtained from MSCs [34–36]. These cells have multipotent differentiation potential and represent an attractive cell source for regenerative medicine [2]. Today, BM-MSCs are still considered as the standard key for clinical use. Nevertheless, these cells present several disadvantages. Besides the invasive and painful cell collecting procedure, BM-MSCs are weakly present (0.001–0.01%) and their quality decreases with the age of the donor [5,6]. For these reasons and depending on their differentiation potential, alternative cell sources like WJ-MSCs have gained more and more attention in vascular tissue engineering field during this last decade [37]. A blessing advantage of these birth-associated cells is their easy availability, their simple and non-invasive isolation procedure and finally the absence of ethical consideration. These cells are described as more primitive than the other tissue sources [38,39] (except embryonic one) and as one of the leading cell sources used in tissue engineering because they exhibit all the primary criteria used for this aim: multipotency, inexpensive, immunocompatible, ethically acceptable and easily expandable *in vitro* for several passages [9].

To address cell adhesion, our group demonstrated the possibility to use polyelectrolyte multilayer films (PEMs) made of poly(allylamine hydrochloride) (PAH) as polycation and poly(styrene sulfonate) (PSS) as polyanion, with a PAH ending layer, as antithrombogenic coating in vascular engineering field [12]. Most groups use collagen in surface modification, but this coated surface may present some disadvantages, including poor optical characteristics for microscopy, heterogeneity within the extracted collagen, immunogenicity, fragility due to a rapid enzymatic destruction, poor mechanical strength, and ineffectiveness in the management of infected sites [40,41]. In our study and based on ours previous published results [12,16], WJ-MSCs were cultivated in a first time on (PAH-PSS)₃-PAH film. It has been shown that this film is widely used for the modification of surfaces such as glass, plastic, decellularized arteries and PTFE, in order to make them bioactive and adhesive for various cell types such as endothelial cells, EPCs and BM-MSCs. Our group previously demonstrated that this film improves initial endothelial-cell adhesion and viability [15] and is able to promote *in vitro* the endothelial differentiation from progenitor cells (EPCs) [18,19] and more recently from BM-MSCs [20].

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

Nodule-like or three dimensioned shapes formation *in vitro* is not a new phenomena, it has always been the goal of many studies in bone or cartilage tissue engineering. Growing cells as three dimensioned architectures has been described in many research fields, many teams aimed to achieve this type of nodules from different cells. Human dermal fibroblasts were at the origin of these nodules, as described in the work of Shin et al. [42]. Others like Yoon et al., Cheng et al. and other colleagues stimulated human adipose-derived stem cells to form these spheres [43–45]. Nowadays, natural cell spheres formation has never been examined without any stimulation factors, the present study is the first to examine natural WJ-MSC's nodule-like shapes formation with a simple modification of culture surface.

Nodule-like shapes formation is adapted for bone and cartilage field but is a limiting factor in vascular tissue engineering. Reversing the charge of the outer layer from a positively charged layer ending with

1 PAH to a negatively charged surface ending with PSS improved WJ-MSC's behavior as they appeared to
 2 have normal growth similar to BM-MSCs and HUVECs at the same time and under the same conditions.
 3 No nodule-like shapes were visible. PEMs seemed to influence the cellular behavior of WJ-MSCs. It has
 4 been shown that the outer polyelectrolyte layer constitutes the determinant factor for the properties of
 5 the film and seems to define the properties of the whole architecture [24]. Thus, WJ-MSC's specific
 6 behavior seems to be caused by the global surface charge that films may present.

5. Conclusion

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

References

- [1] S. Levenberg, J. Rouwkema, M. Macdonald, E.S. Garfein, D.S. Kohane and D.C. Darland, Engineering vascularized skeletal muscle tissue, *Nat. Biotechnol.* **23**(7) (2005), 879–884.
- [2] A. Rodriguez-Morata, I. Garzon, M. Alaminos, N. Garcia-Hondurilla, M.C. Sanchez-Quevedo and J. Bujan, Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells, *Ann. Vasc. Surg.* **22**(3) (2008), 440–448.
- [3] A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhyan and K.S. Lalykina, The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells, *Cell Tissue Kinet.* **3**(4) (1970), 393–403.
- [4] S. Bajada, I. Mazakova, J.B. Richardson and N. Ashammakhi, Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2**(4) (2008), 169–183.
- [5] H. Castro-Malaspina, R.E. Gay, G. Resnick, N. Kapoor, P. Meyers and D. Chiarieri, Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny, *Blood* **56**(2) (1980), 289–301.
- [6] K. Stenderup, J. Justesen, C. Clausen and M. Kassem, Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells, *Bone* **33**(6) (2003), 919–926.
- [7] K.D. McElreavey, A.I. Irvine, K.T. Ennis and W.H. McLean, Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord, *Biochem. Soc. Trans.* **19**(1) (1991), 29S.
- [8] M.L. Weiss, S. Medicetty, A.R. Bledsoe, R.S. Rachakatla, M. Choi and S. Merchav, Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease, *Stem. Cells* **24**(3) (2006), 781–792.
- [9] S. Karahuseyinoglu, O. Cinar, E. Kilic, F. Kara, G.G. Akay and D.O. Demiralp, Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: *in situ* and *in vitro* surveys, *Stem. Cells* **25**(2) (2007), 319–331.
- [10] W. Wagner and A.D. Ho, Mesenchymal stem cell preparations – comparing apples and oranges, *Stem. Cell Rev.* **3**(4) (2007), 239–248.
- [11] G.P. Meyer, K.C. Wollert, J. Lotz, J. Pirr, U. Rager, P. Lippolt, A. Hahn, S. Fichtner, A. Schaefer, L. Arseniev, A. Ganser and H. Drexler, Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial, *Eur. Heart J.* **30**(24) (2009), 2978–2984.

- [12] H. Kerdjoudj, N. Berthelemy, F. Boulmedais, J.F. Stoltz, P. Menu and J.C. Voegel, Multilayered polyelectrolyte films: a tool for arteries and vessel repair, *Soft Matter* **16**(6) (2010), 3722–3734.
- [13] G. Decher, Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites, *Science* **277**(5330) (1997), 1232–1237.
- [14] G. Ladam, C. Gergely, B. Senger, G. Decher, J.C. Voegel and P. Schaaf, Protein interactions with polyelectrolyte multilayers: interactions between human serum albumin and polystyrene sulfonate/polyallylamine multilayers, *Biomacromolecules* **1**(4) (2000), 674–687.
- [15] C. Boura, P. Menu, E. Payan, C. Picart, J.C. Voegel and S. Muller, Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification, *Biomaterials* **24**(20) (2003), 3521–3530.
- [16] C. Boura, S. Muller, D. Vautier, D. Dumas, P. Schaaf, J.C. Voegel, J.F. Stoltz and P. Menu, Endothelial cell – interactions with polyelectrolyte multilayer films, *Biomaterials* **26**(22) (2005), 4568–4575.
- [17] V. Moby, C. Boura, H. Kerdjoudj, J.C. Voegel, L. Marchal, D. Dumas, P. Schaaf, J.F. Stoltz and P. Menu, Poly(styrenesulfonate)/poly(allylamine) multilayers: a route to favor endothelial cell growth on expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular grafts, *Biomacromolecules* **8**(7) (2007), 2156–2160.
- [18] N. Salmon, E. Paternotte, V. Decot, J.F. Stoltz, P. Menu and P. Labrude, Polyelectrolyte multilayer films promote human cord blood stem cells differentiation into mature endothelial cells exhibiting a stable phenotype, *Biomed. Mater. Eng.* **19**(4,5) (2009), 349–354.
- [19] N. Berthelemy, H. Kerdjoudj, P. Schaaf, C. Prin-Mathieu, P. Lacolley, J.F. Stoltz, J.C. Voegel and P. Menu, O₂ level controls hematopoietic circulating progenitor cells differentiation into endothelial or smooth muscle cells, *PLoS One* **4**(5) (2009), e5514.
- [20] V. Moby, P. Labrude, A. Kadi, L. Bordenave, J.F. Stoltz and P. Menu, Polyelectrolyte multilayer film and human mesenchymal stem cells: an attractive alternative in vascular engineering applications, *J. Biomed. Mater. Res. A* **96**(2) (2011), 313–319.
- [21] G. Ladam, P. Schaaf, G. Decher, J. Voegel and F.J. Cuisinier, Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films, *Biomol. Eng.* **19**(2–6) (2002), 273–280.
- [22] C. Brunot, B. Grosogeoat, 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.
- [23] L. Mhamadi, C. Picart, C. Lagneau, A. Othmane, B. Grosogeoat, N. Jaffrezic-Renault and L. Ponsonnet, Study of the polyelectrolyte multilayer thin film's properties and correlation with the behavior of the human gingival fibroblasts, *Mat. Sci. Eng. C* **26**(2,3) (2006), 273–281.
- [24] P. Tryoen-Toth, D. Vautier, Y. Haikel, J.C. Voegel, P. Schaaf and J. Chluba, Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films, *J. Biomed. Mater. Res.* **60**(4) (2002), 657–667.
- [25] C.R. Wittmer, J.A. Phelps, C.M. Lepus, W.M. Saltzman, M.J. Harding and P.R. Van Tassel, Multilayer nanofilms as substrates for hepatocellular applications, *Biomaterials* **29**(30) (2008), 4082–4090.
- [26] E.A. Jaffe, R.L. Nachman, C.G. Becker and C.R. Minick, Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria, *J. Clin. Invest.* **52**(11) (1973), 2745–2756.
- [27] G. Soldani, P. Losi, M. Bernabei, S. Burchielli, D. Chiappino and S. Kull, Long term performance of small-diameter vascular grafts made of a poly(ether)urethane-polydimethylsiloxane semi-interpenetrating polymeric network, *Biomaterials* **31**(9) (2010), 2592–2605.
- [28] R.M. Nerem and D. Seliktar, Vascular tissue engineering, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **3** (2001), 225–243.
- [29] F.B. Pomposelli Jr., S. Arora, G.W. Gibbons, R. Frykberg, P. Smakowski and D.R. Campbell, Lower extremity arterial reconstruction in the very elderly: successful outcome preserves not only the limb but also residential status and ambulatory function, *J. Vasc. Surg.* **28**(2) (1998), 215–225.
- [30] W.C. Tarry, D.B. Walsh, N.J. Birkmeyer, M.F. Fillinger, R.M. Zwolak and J.L. Cronenwett, Fate of the contralateral leg after infringuinal bypass, *J. Vasc. Surg.* **27**(6) (1998), 1039–1047; discussion 47–48.
- [31] J.M. Heyligers, H.J. Verhagen, J.I. Rotmans, C. Weeterings, P.G. de Groot and F.L. Moll, Heparin immobilization reduces thrombogenicity of small-caliber expanded polytetrafluoroethylene grafts, *J. Vasc. Surg.* **43**(3) (2006), 587–591.
- [32] H. Shin, S. Jo and A.G. Mikos, Biomimetic materials for tissue engineering, *Biomaterials* **24**(24) (2003), 4353–4364.
- [33] J.E. Rosenman, R.F. Kempczinski, W.H. Pearce and E.B. Silberstein, Kinetics of endothelial cell seeding, *J. Vasc. Surg.* **2**(6) (1985), 778–784.
- [34] Z. Gong and L.E. Niklason, Use of human mesenchymal stem cells as alternative source of smooth muscle cells in vessel engineering, *Methods Mol. Biol.* **698** (2011), 279–294.
- [35] S.M. Goerke, J. Plaha, S. Hager, S. Strassburg, N. Torio-Padron and G.B. Stark, Human endothelial progenitor cells induce extracellular signal-regulated kinase-dependent differentiation of mesenchymal stem cells into smooth muscle cells upon cocultivation, *Tissue Eng. Part A* **18**(23,24) (2012), 2395–2405.
- [36] O. Vittorio, E. Jacchetti, S. Pacini and M. Cecchini, Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells: when traditional biology meets mechanotransduction, *Integr. Biol. (Camb.)* (2012).
- [37] M.Y. Chen, P.C. Lie, Z.L. Li and X. Wei, Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Exp. Hematol.* **37**(5) (2009), 629–640.

- 1 [38] D.L. Troyer and M.L. Weiss, Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population, *Stem. Cells* **26**(3) 1
2 (2008), 591–599. 2
- 3 [39] C.Y. Fong, L.L. Chak, A. Biswas, J.H. Tan, K. Gauthaman and W.K. Chan, Human Wharton's jelly stem cells have unique 3
4 transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells, *Stem. Cell Rev.* **7**(1) 4
5 (2011), 1–16. 5
- 6 [40] J.T. Elliott, J.T. Woodward, K.J. Langenbach, A. Tona, P.L. Jones and A.L. Plant, Vascular smooth muscle cell response 6
7 on thin films of collagen, *Matrix Biol.* **24**(7) (2005), 489–502. 6
- 8 [41] W. Friess, Collagen – biomaterial for drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45**(2) (1998), 113–136. 7
- 9 [42] J.Y. Shin, J. Park, H.K. Jang, T.J. Lee, W.G. La and S.H. Bhang, Efficient formation of cell spheroids using polymer 8
10 nanofibers, *Biotechnol. Lett.* **34**(5) (2012), 795–803. 9
- 11 [43] H.H. Yoon, S.H. Bhang, J.Y. Shin, J. Shin and B.S. Kim, Enhanced cartilage formation via three-dimensional cell 10
engineering of human adipose-derived stem cells, *Tissue Eng. Part A* **18**(19,20) (2012), 1949–1956. 11
- 12 [44] N.C. Cheng, S. Wang and T.H. Young, The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on 12
chitosan films on stemness and differentiation capabilities, *Biomaterials* **33**(6) (2012), 1748–1758. 12
- 13 [45] Z. An, K. Kavanoor, M.L. Choy and L.J. Kaufman, Polyelectrolyte microcapsule interactions with cells in two- and 13
three-dimensional culture, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **70**(1) (2009), 114–123. 13
- 14 14
- 15 15
- 16 16
- 17 17
- 18 18
- 19 19
- 20 20
- 21 21
- 22 22
- 23 23
- 24 24
- 25 25
- 26 26
- 27 27
- 28 28
- 29 29
- 30 30
- 31 31
- 32 32
- 33 33
- 34 34
- 35 35
- 36 36
- 37 37
- 38 38
- 39 39
- 40 40
- 41 41
- 42 42
- 43 43
- 44 44
- 45 45
- 46 46

Chapitre 3 : Elaboration d'un biomatériau « scaffold » à base d'hydrogel d'alginate pour l'ingénierie vasculaire.

Objectifs des travaux

Ces travaux, basés sur le principe de la triade en ingénierie tissulaire, visent à utiliser, comme nous l'avons vu précédemment, les CSM GW, en tant que composante cellulaire. Ainsi, il serait possible de construire, à partir de cette seule source de cellules, et selon les conditions environnementales appliquées, à la fois l'intima en engendrant un phénotype endothérial (Thèse Hassan Rammal, 2014), mais aussi, comme exposé dans les chapitres précédents dans ce manuscrit, la media par différenciation en CML. Pour reconstruire ces deux couches constitutives de la paroi vasculaire, l'un des autres éléments de la triade devient indispensable, à savoir le biomatériau support sur lequel les cellules pourraient proliférer, se différencier, produire leur matrice, etc... La construction d'un tel support fait l'objet de ce dernier chapitre. Nous avons cherché à développer une matrice qui permettrait d'obtenir un feuillett cellulaire détachable et enroulable sur lui-même et en plusieurs couches, pour former un tube cylindrique cellularisé dans son épaisseur.

Les hydrogels de polysaccharides, en plus de mimer la matrice extracellulaire, ont plusieurs avantages. Ils sont biocompatibles, biodégradables, et bactériostatiques (Ravi et al., 2010). C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi d'utiliser un hydrogel d'alginate qui servira de matrice pour construire un feuillett cellulaire de CML reconstituant ainsi la média d'un vaisseau sanguin. Cependant, l'hydrogel sera fonctionnalisé en surface par un film multicouche de polyélectrolytes de type Poly(styrenesulfonate)/poly(allylamine) (PSS/PAH) qui favorisera l'adhésion et la prolifération des cellules par la suite (31). Le biomatériau fonctionnalisé sera ensuite cellularisé à partir de CSM GW préalablement différenciées *in vitro* vers un phénotype CML-like (selon la méthode définie dans le premier chapitre), formant ainsi des feuillets mono-cellulaires de CML détachables.

Ce chapitre du manuscrit est divisé en deux parties.

- La première partie traite de la mise au point de technique d'élaboration de la matrice d'hydrogel d'alginate pour la culture des CSM GW.
- La seconde partie présentée sous forme d'article (accepté dans la revue de l'Association Française d'Histologie) de l'obtention du scaffold tridimensionnel cellularisé, pouvant servir de base à la construction d'un substitut vasculaire.

I Partie 1 : Mise au point de l'architecture 2D du biomatériau à base d'hydrogel d'alginate et caractérisation biologique

Notre travail avait été initié par le Dr Halima Kerdjoudj qui avait utilisé des matrices d'alginate cellularisées avec des cellules progénitrices de lapin. Cependant, la pulvérisation du gel, technique employée initialement, a présenté des difficultés de reproductibilité et d'homogénéité pour l'élaboration des hydrogels. C'est donc sur ce concept que nous avons orienté nos études visant à améliorer la technique mise en œuvre pour la synthèse des hydrogels.

I.1 MATERIELS ET METHODES

Elaboration des hydrogels d'alginate fonctionnalisé par les films multicouches de polyélectrolytes (FMP)

Réactifs / matériel nécessaires à l'élaboration des hydrogels d'alginate :

Alginate Low (sigma[®]) : solution finale à 1g/100ml d'eau ultra pure.

Alginate Medium (sigma[®]) : solution finale à 1g/100ml d'eau ultrapure.

Solution CaCl₂ (sigma[®]) : solution finale à 0.09M dans eau ultrapure.

Solution de PAH (sigma[®]) : solution finale à 1mg/ml dans tampon CaCl₂.

Solution de périodate (Acrosorganics[®]) : solution préparée à 10 mg/ml dans eau ultrapure.

Solution de PSS (sigma[®]) : solution finale à 1mg/ml dans tampon CaCl₂.

Solution de Sodium Dodecyl sulfate (sigma[®]) : 0,01 M.

Toutes les solutions sont ensuite filtrées sur 0,22 µm.

Matériels nécessaires à la construction de l'architecture du biomatériau selon les techniques utilisées :

Trois techniques ont été confrontées dans le but d'obtenir un support le plus régulier possible et compatible à l'adhésion cellulaire.

Elaboration par pulvérisation :

6 Bouteilles de 250 ml en verre autoclavées contenant les différentes solutions

Lames de verre : ronde de 9 cm² ou rectangulaire de 30 cm², selon la surface désirée.

Un compresseur : pour pulvériser les solutions sur les supports.

1 pistolet : pour pulvériser les solutions

5 petites bouteilles de pulvérisation : elles sont munies d'un bouchon serti et adapté au pistolet pour pulvériser les solutions.

Elaboration d'un biomatériau « scaffold » à base d'hydrogel d'alginate.

Un système de fixation (punaises) pour fixer les lames de verre sur le support qui sera placé verticalement.

Support de pulvérisation : potence avec une bassine (récupération des déchets pulvérisés). Une plaquette en bois rectangulaire recouverte d'aluminium sur laquelle les lames ont été fixées verticalement.

Elaboration par DIP-Coating :

5 Bouteilles verre autoclavées : pour les solutions

5 bêchers verre autoclavés : pour effectuer les différents trempages dans les solutions

Lames de verre : ronde de 9 cm² ou rectangulaire de 30 cm², selon la surface désirée.

Support lame pour le trempage : une potence avec manche mobile avec un élévateur.

Elaboration par SPIN-Coating :

(réalisé à l'*Institut Jean Lamour - UMR CNRS n°7198, PR D. ROUXEL*)

5 Bouteilles verre autoclavées : pour les solutions

Lames de verre : carrées de 10 cm².

5 seringues : pour déposer les solutions avant le recouvrement de la surface des lames par spin coating.

Méthodologie :

Prétraitement des poudres d'alginate :

Les quantités nécessaires d'alginate Low et Médium sont placées respectivement dans 2 bouteilles en verre de 250ml, avec un barreau aimanté adapté dans chacune d'entre elles puis autoclavées. Ainsi, les poudres seront stérilisées par traitement thermique à 121°C.

Prétraitement des lames de verre support de la culture :

Afin d'optimiser l'adsorption de l'alginate sur la lame de verre, un prétraitement permettant de « dégraisser » la surface des substrats est élaboré. Deux solutions, préparées extemporanément, sont indispensables au prétraitement des lames de verre : une solution aqueuse de Dodécylsulfate de Sodium (SDS) à 4 mg/L, et une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (HCl) à 37% v/v. Les lames de verre, placées au fond d'un bêcher de 250 mL, sont trempées pendant 15 minutes, dans la solution de SDS portée à 100°C. Puis, tout en remuant les lames de verre, un triple rinçage à l'eau ultrapure est pratiqué. Par la suite et durant 15 minutes, les lames de verres sont portées à 100°C dans un bain de solution HCl. Enfin, après 3 lavages à l'eau ultrapure les lames sont conservées à 4°C, plongées dans de l'eau ultrapure.

Préparation des solutions d'alginate :

La quantité nécessaire d'eau ultrapure filtrée sur 0,22µm est ajoutée dans chacune des bouteilles autoclavées. La préparation est réalisée stérilement sous hotte. Les poudres sont placées sous agitation magnétique jusqu'à dissolution totale.

Architecture du biomatériau élaboré :

Une architecture composée de gel d'alginate recouvert d'un film multicouche de polyélectrolytes est élaborée, sur laquelle on envisage d'ensemencer des cellules afin d'obtenir un « tapis de cellules » capables de synthétiser leur matrice extracellulaire synthétisée qui remplacera progressivement le biomatériau dégradé. Cette architecture sera ainsi construite (figure 18) :

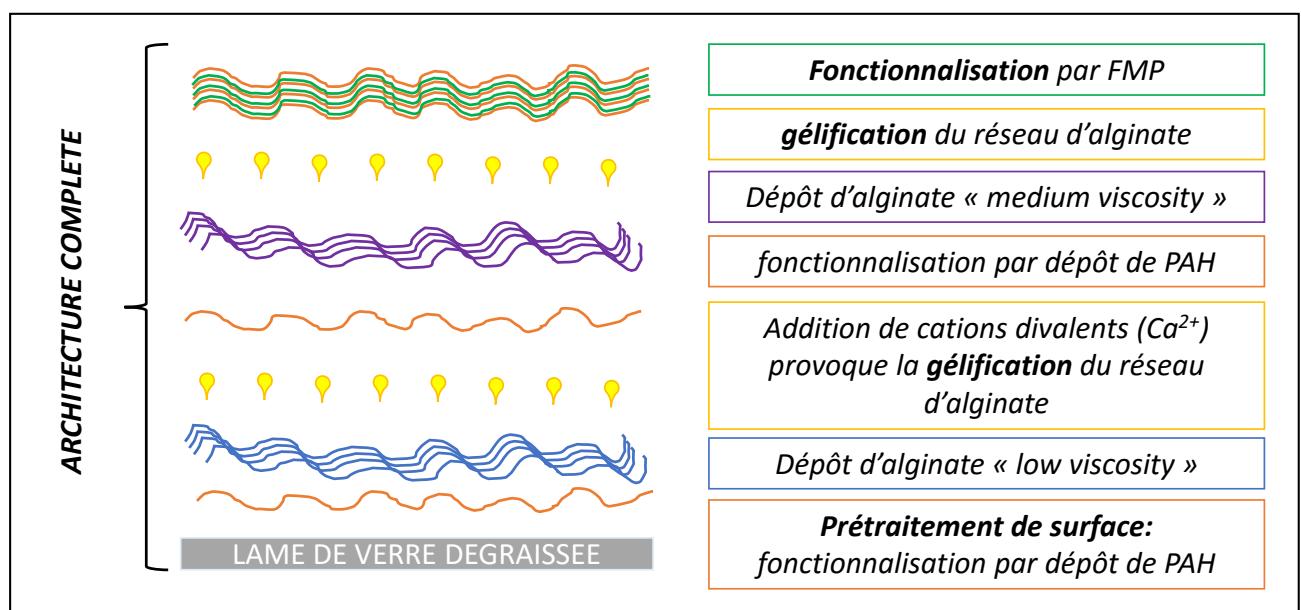


Figure 11 : Composition et architecture complète du biomatériau

Une lame de verre est utilisée en tant que substrat sur lequel un hydrogel d'alginate stratifié est élaboré par dépôt successifs de solution sur le substrat

Mise en Œuvre des hydrogels d'alginate par pulvérisation

Paramétrage du compresseur :

La pression de pulvérisation est fixée à 1,5 bar.

- Dépôt des différentes couches pour l'élaboration de l'hydrogel d'alginate :

Les lames de verre sont fixées au support posé verticalement, à l'aide de punaises. Les différentes solutions sont pulvérisées les unes à la suite des autres dans un ordre défini et de façon précise comme indiqué dans le tableau 2.

Elaboration d'un biomatériau « scaffold » à base d'hydrogel d'alginate.

Les lames de verres sont ensuite retirées du support, en découpant à l'aide d'un scalpel, le superflu des gels autour des lames, puis sont placées dans des boîtes de pétri.

Tableau 3 : Méthodologie permettant la construction de l'hydrogel d'alginate par pulvérisation

Solution déposée	Ordre de dépôt sur la lame	Procédé de pulvérisation (positionnement par rapport à la lame)	Temps de pulvérisation
PAH	1 et 4	Pulvérisation par le dessus des lames en se déplaçant selon la largeur des lames	15 secondes
Alginate Low	2	En se déplaçant selon la largeur des lames ↓↑	30 secondes
CaCl₂	3 et 6	Pulvérisation par le dessus des lames en se déplaçant selon la largeur des lames	15 secondes
Alginate médium	5	En se déplaçant selon la largeur des lames ↓↑	30 secondes

ii. Fonctionnalisation par les FMP :

Les multicouches sont construites par incubations successives des lames de verre recouvertes d'alginate dans les solutions de polycations (PAH) et de polyanions (PSS) pendant 10 min. Chaque incubation est séparée par trois étapes de rinçage avec la solution tampon de CaCl₂, afin d'éliminer l'excès des polyélectrolytes non adsorbés. Le cycle est répété 6 fois jusqu'à obtention de l'architecture (PAH-PSS)₆. Les surfaces sont ensuite décontaminées par exposition aux UVs pendant 1h, avant l'ensemencement des cellules.

Mise en œuvre des hydrogels d'alginate par Dip-coating (DC)

Dans le cas du dip-coating, les solutions, le prétraitement des solutions d'alginate et des lames de verres sont identiques à ceux décrits précédemment.

i. Dépôt des différentes couches :

Le dispositif utilisé, élaboré par nos soins après plusieurs essais, est schématisé sur la figure 19. Les lames de verre sont maintenues par une pince, positionnées de façon verticale. Les lames sont ensuite plongées de façon successives dans un ordre précis comme décrit dans le tableau 3, en tournant la molette du support élévateur.

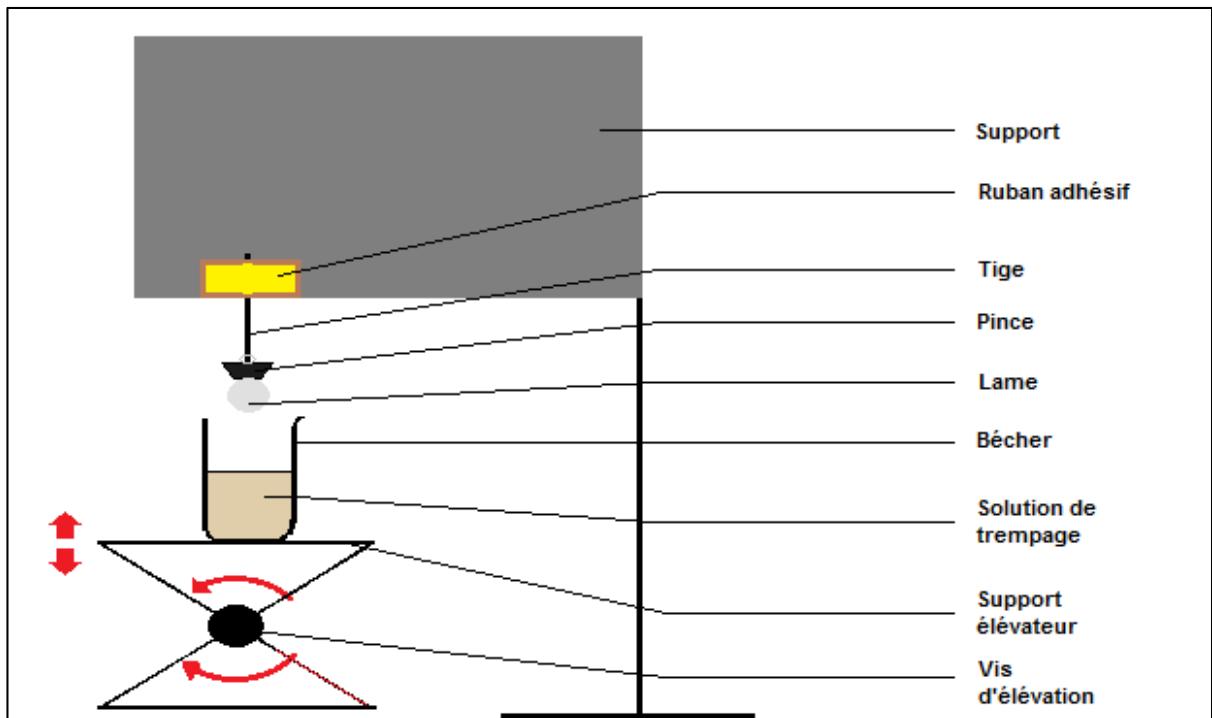


Figure 12 : Dispositif utilisé pour l'élaboration des hydrogels d'alginate par Dip-coating

Le substrat (lame de verre ronde) est maintenu à l'aide d'une pince elle-même fixée sur un support élévateur amovible à l'aide d'une molette (vis d'élévation). Les couches successives nécessaires à la construction de l'hydrogel sont élaborées par trempage dans la solution

Les lames de verres sont ensuite retirées et placées dans des boîtes de pétri et conservées dans un bain de Chlorure de calcium pour maintenir la structure.

Tableau 4 : Méthodologie permettant la construction de l'hydrogel d'alginate par Dip-coating

Solution déposée	Ordre de dépôt sur la lame	Temps de trempage de la lame placée verticalement
PAH	1 et 4	30 secondes
Alginate Low	2	1 minute
CaCl ₂	3 et 6	30 secondes
Alginate médium	5	1 minute

ii. Dépôt des FMP :

De la même façon que pour la pulvérisation, et dans les mêmes conditions, des FMP seront construits à la surface des différents hydrogels d'alginate. La mise en œuvre de cette technique a été délicate car, réalisée dans des locaux de l'Institut Jean Lamour (IJL) avec un appareil dédié à d'autres usages, nous avons été vigilants pour respecter les meilleures conditions de stérilité.

Mise en œuvre des hydrogels d'alginate par Spin coating (SP)

L'appareillage (figure 20) situé à l'institut Jean Lamour (IJL) nécessite les mêmes solutions qui celles utilisées pour la pulvérisation et pour le DC.

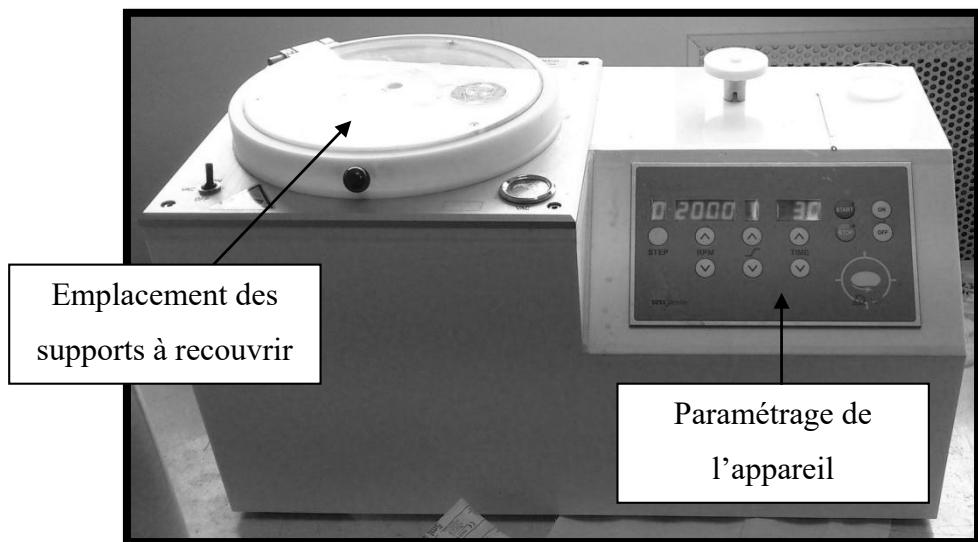


Figure 13 : Dispositif utilisé pour l'élaboration des hydrogels d'alginate par Spin coating
(Süss Microtec Delta 6 RC spin coater, situé à l'Institut Jean Lamour IJL, Nancy)

i. Paramétrage de l'appareil :

Nous avons imaginé et développé un protocole susceptible d'obtenir un étalement régulier de nos couches. A la suite de nos mises au point, la vitesse de rotation est fixée à 500 rotations par minutes, l'accélération à 1 seconde, et la durée de rotation à 30 secondes. Les lames de verre sont fixées sur le support de rotation par dépression grâce à une pompe à vide

ii. Dépôt des différentes couches :

L'appareil est mis en rotation et à l'aide d'une seringue, 1 mL de chaque solution est déposé sur la lame de verre, les unes après les autres, afin d'obtenir l'architecture souhaitée décrite précédemment. A la fin de la manipulation, nos lames de verres recouvertes des hydrogels sont récupérées.

iii. Dépôt des FMP :

De la même façon que pour les techniques précédentes, des FMPs sont construits sur les hydrogels obtenus.

Tests de biocompatibilité et analyse du comportement cellulaire sur les différentes structures élaborées :

La démarche adoptée consiste à récupérer les CSM humaines issues du cordon ombilical. Ces cellules sont ensuite cultivées pendant 7 jours sur les hydrogels élaborés selon les 3 techniques (pulvérisation, DC et SC) afin d'étudier l'influence de la construction des hydrogels sur le comportement des CSM GW.

Obtention des CSM à partir de cordons ombilicaux

Réactifs / matériel :

Tampons

Des tampons isotoniques (*Phosphate Buffer Solution (PBS)* et *Hank's balanced salt solution HBSS*, Sigma®, France) à pH 7,4 sans calcium ni magnésium, ont été utilisés dans la plupart des étapes de culture cellulaire (lavages, dilutions...).

Milieux de culture et de congélation

Le milieu de culture de base (pour les cellules souches issues du cordon ombilical humain) est un milieu α -MEM supplémenté avec 10% du sérum de veaux foetal (SVF) décomplémenté à 56°C pendant 30 min, de la glutamine, des antibiotiques et des antifongiques (*tableau 4*).

Le milieu de congélation : 70% (v/v) de milieu de base 20% (v/v) SVF et 10% (v/v) DMSO.

Solutions de digestion enzymatique

Deux solutions de digestion enzymatique ont été utilisées :

Solution 1 : collagénase pour la récupération des CSM, constituée de 1% de collagénase Type II (p/v dans DMEM sans rouge de phénol), supplémenté d'antibiotiques et d'anti-fongiques (Gibco®, France).

Solution 2 : trypsine utilisée pour l'entretien des cultures, constituée de 0.25% de trypsine EDTA (Sigma®, France) diluée au ½ dans l'HBSS.

Méthodologie :

Les CSM ainsi que les cellules, sont isolés à partir de cordons ombilicaux de nouveau-nés (convention entre l'UTCT (CHU de Brabois) et la Maternité Régionale de Nancy). Les cordons proviennent de donneurs sains, après consentement maternel. Ils sont recueillis dès l'expulsion placentaire et coupés en morceaux d'une dimension allant de 20 à 25 cm pour être immédiatement placés dans un flacon de culture contenant une solution tampon stérile. Ils sont alors rapidement placés à 4°C avant utilisation.

Isolement des CSM

Sous une hotte à flux laminaire, l'extérieur du cordon est décontaminé avec de l'éthanol 70%. De petits morceaux de 3 cm environ sont découpés à l'aide d'un scalpel et de pinces. La coupe histologique d'un cordon ombilical montre la présence de deux artères et d'une veine englobée dans une matrice appelée « gelée de Wharton ». Les vaisseaux sanguins ainsi que l'enveloppe externe sont soigneusement retirés et la gelée est isolée. Elle est alors coupée en petits morceaux puis lavée dans du milieu DMEM sans sérum. Par la suite, les morceaux sont suspendus dans la solution de collagénase et incubés à 37 °C pendant 18 h. L'action enzymatique est stoppée après ajout de sérum (SVF) dans la suspension cellulaire. Celle-ci est centrifugée à 250 g pendant 10 min. Les cellules présentes dans le culot sont alors remises en suspension dans du milieu de culture complet puis ensemencées dans des plaques 6 puits (10 cm^2) à la densité de 3000 cellules/cm². Le milieu de culture est changé après trois jours, permettant l'élimination des cellules non adhérentes, puis tous les deux jours jusqu'à confluence.

Entretien des cellules

Après 8-10 jours, les cellules arrivent à environ 80% de confluence. Histologiquement ; les CSM GW sont fusiformes et bien allongés, leur taille peut atteindre 100 µm. Afin de les amplifier, il est nécessaire de pratiquer un 2^{ème} puis un 3^{ème} passage. Pour ce faire, les cellules sont lavées 2 fois avec 5 mL de tampon HBSS. Ce lavage permet d'une part d'éliminer le sérum qui inhiberait l'activité enzymatique de la trypsine, et d'autre part de libérer des ions Ca²⁺ qui ensuite, faciliteront l'adhésion des cellules. Les cellules sont détachées à l'aide de 5 mL de trypsine-EDTA. L'action de la trypsine est stoppée, après 4 min d'incubation à 37°C, en ajoutant 10 mL de milieu complet. La suspension cellulaire est recueillie dans un tube stérile de 50 mL, puis centrifugée à 250 g. Le culot cellulaire est remis en suspension soit dans du milieu complet pour être ensemencé, soit dans du milieu de congélation.

Ensemencement des CSM GW

Les cellules au 4^{ème} passage sont ensemencées à une densité cellulaire de 3000 cellules/cm² et cultivées à 37°C pendant 7 jours sur les différents hydrogels étudiés fonctionnalisés ou non par les FMP. Des cellules seront ensemencées aussi sur des surfaces témoins telles que le plastique, le collagène, le verre.

Evaluation de l'activité métabolique des cellules sur les biomatériaux (test MTT)

Pour caractériser la biocompatibilité de notre matériau nous avons, dans un premier temps, évalué l'activité métabolique des cellules ensemencées sur les hydrogels élaborés selon les 3 techniques précédemment décrites. Pour cela, un test d'activité métabolique (Test MTT) a été mis en œuvre.

1- Test MTT :

Principe :

Il s'agit d'un test révélateur de l'activité métabolique des cellules. Son principe est basé sur l'activité d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Dans les cellules vivantes présentant une activité métabolique, la succinate déshydrogénase réduit le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) en Formazan. Cette réduction permet la formation de précipités de couleur violette au sein des mitochondries. Une mesure par spectrométrie à 550 nm (Varioskan Flash, Thermo Scientific) permet de révéler l'intensité de la coloration du précipité, qui sera alors directement proportionnelle au nombre de cellules « actives ». Ainsi, la réduction du sel de tétrazolium est rapportée à la quantité d'ADN par puits pour comparer les activités mitochondrielles de chaque condition entre elles.

Réactifs / matériel :

La solution est préparée à partir de 250 mg de MTT dissous dans 50ml de tampon PBS et filtrée sur 0,2µm. La solution est maintenue à l'abri de la lumière.

Milieu de culture de base α -MEM (pour les cellules souches issues du cordon ombilical humain) est supplémenté avec 10% du sérum de veaux fœtal (SVF) décomplémenté à 56°C pendant 30 min, de la glutamine, des antibiotiques et des antifongiques (*tableau 4*).

Solution de DMSO permet de lyser les cellules et solubilise les cristaux de formazan.

Plaque 96 puits transparente.

Un spectrofluorimètre avec lecteur de microplaques. (Varioskan, Thermoscientific)

Méthodologie :

Pour l'exécution de ce test, le milieu de culture présent dans chaque puits est remplacé par 600 µL de milieu frais. Ensuite, 120 µL de solution mère de MTT sont ajoutés dans chacun des puits, et la plaque de culture est incubée durant 4 heures à 37°C. A l'issue de cette incubation, le milieu de chaque puits est remplacé par 1,2 mL de DMSO et la plaque est immédiatement placée 5 minutes à l'incubateur. Un transfert de 100 µL de surnageant de chaque puits est réalisé dans une plaque 96 puits transparente et un duplicat pour chaque mesure est réalisé. La lecture est faite à 550 nm.

2- Dosage ADN :

Principe :

Cette méthode fluorimétrique met en évidence l'ADN cellulaire. La solution de Hoechst est l'agent colorant. Il s'agit d'un intercalant de l'ADN qui permet d'évaluer la quantité d'ADN et de normaliser la prolifération cellulaire par rapport aux résultats du test MTT. Une courbe

Elaboration d'un biomatériau « scaffold » à base d'hydrogel d'alginate.

d'étalonnage est établie avec une gamme d'ADN de thymus de veau. La lecture est réalisée par spectrométrie aux longueurs d'ondes excitatrices à 356nm, et d'émission à 458 nm.

Réactifs / matériel :

Solution de Hoechst : Hoechst 33258 (réf : H3569, Invitrogen, France) à 0,1 µg / ml dans un tampon de Hoechst (10mM Tris, 1mM EDTA et 0.1 mM NaCl, à pH 7,4)

ADN de thymus de veau (réf : D3664, Sigma, France), nécessaire pour effectuer la gamme étalon.

Centrifugeuse à Eppendorf

Tubes Eppendorf DNase / RNase free (réf : 3213, Costar)

Plaque 96 puits noire (réf : 353241, BD Falcon)

Un spectrofluorimètre avec lecteur de microplaques (Varioskan Flash, Thermoscientific)

Méthodologie :

Pour la récupération des culots cellulaires et pour les contrôles correspondant aux cellules cultivées sur plastique, les cellules sont simplement décollées à l'aide d'un scraper (stérile et DNase, RNase free) puis placées dans des tubes Eppendorff DNase / RNase free pour être centrifugées à 300g pendant 5 min. Le culot cellulaire ainsi récupéré peut-être éventuellement conservé à -20°C jusqu'au dosage si celui-ci n'est pas effectué dans l'immédiat.

Chaque hydrogel, dissous avec 500µl de solution de citrate-EDTA pendant 20 min, est placé dans un tube Eppendorf DNase / RNase Free. Les tubes sont centrifugés à 300g pendant 5min et les culots cellulaires sont alors récupérés à sec et peuvent être congelées à -80°C jusqu'au dosage.

Une gamme étalon est élaborée à partir d'ADN de thymus de veau (Tableau 4).

Les échantillons, pour l'élaboration de la gamme et les échantillons à doser, seront traités de façon similaire. Les culots cellulaires sont repris dans 100µl de tampon Hoechst et les cellules sont lysées par trois cycles de congélation / décongélation dans de l'azote liquide (-196°C) / bain marie (37°C). Aux cellules lysées sont ajoutés 900 µl de solution de Hoechst et l'ensemble est homogénéisé. L'intensité de fluorescence (IF) est mesurée au spectrofluorimètre à une excitation $\lambda_{\text{excitation}} = 356\text{nm}$ et une $\lambda_{\text{émission}} = 458\text{nm}$. Ainsi les résultats obtenus permettront de déduire la quantité d'ADN contenue dans nos échantillons, à l'aide de la courbe étalon donnant directement la concentration en ADN. Les résultats sont alors exprimés en µg / ml.

Enfin, la biocompatibilité de notre matériau pourra être évaluée en tenant compte du pourcentage de réduction du MTT rapporté à la quantité d'ADN, témoin de l'activité métabolique des cellules. Les résultats ainsi normalisés peuvent être comparés entre eux.

Tableau 5 : Gamme étalon élaborée à partir de thymus de veau

Concentration en ADN ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Volume de solution d'ADN de thymus de veau (μl)	0	5	10	20	40	60	80	100
Volume de Tampon Hoechst (μl)	100	95	90	80	60	40	20	0

I.2 RESULTATS OBTENUS POUR CETTE PREMIERE PARTIE

L'influence du procédé d'élaboration des hydrogels d'alginate sur la culture des CSM GW issues de la gelée de Wharton a été vérifiée d'une part en termes d'adhésion, étalement et prolifération et d'autre part en comparant les activités métaboliques cellulaires observées sur chaque hydrogel.

Adhésion, étalement, morphologie et prolifération cellulaire :

Cette partie du travail a consisté à observer le comportement des CSM GW sur les hydrogels d'alginate et plus particulièrement à vérifier si la technique de construction des hydrogels pouvait avoir une influence sur comportement cellulaire. Pour cela une observation au microscope optique a été effectuée.

La figure 21 permet de visualiser la morphologie des CSM GW, en P4, cultivées pendant 7 jours sur des surfaces témoins. Ces surfaces (verre, collagène et FMP) sont déjà largement connues et employées en culture cellulaire et particulièrement au laboratoire. Les CSM GW présentent une morphologie fusiforme et allongée caractéristique de ces cellules et ce quelque-soit la surface témoin étudiée (Figure 21).

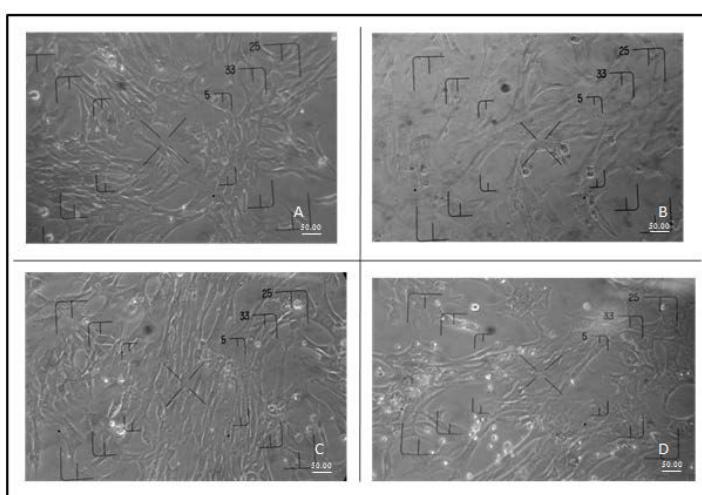


Figure 14 : Aspect morphologie de CSM GW en P4 cultivées 7 jours

sur (A) une lame de verre (B) une lame de verre fonctionnalisée avec du collagène (C) une lame de verre fonctionnalisée par les FMP dans du milieu de culture α -MEM à 10 % en SVF. Observation au microscope optique à contraste de phase : Grossissement x20

Elaboration d'un biomatériau « scaffold » à base d'hydrogel d'alginate.

Le comportement morphologique des CSM GW en P4 sur les différentes constructions d'hydrogels d'alginate fonctionnalisés par les FMP, est représenté sur la figure 22.

La figure 22B représente l'hydrogel élaboré par pulvérisation : très peu de cellules sont visibles sur la surface. Cette observation suggère qu'un nombre très faible de ces cellules adhèrent sur la surface construite par DC.

La figure 22D correspond à un l'hydrogel élaboré DC et met en évidence une bonne adhésion et prolifération des cellules après 7 jours de culture sur cette surface. Les cellules sont bien étalées, et présentent une morphologie fusiforme similaire à celle observée sur les surfaces témoins de la figure 21.

La figure 22F correspond à un l'hydrogel élaboré SC et montrent un comportement cellulaire similaires à celles cultivées sur les hydrogels élaborés par DC. Par conséquence il semblerait que les méthodes de DC et de SC soient les plus appropriées pour cultiver les CSM GW.

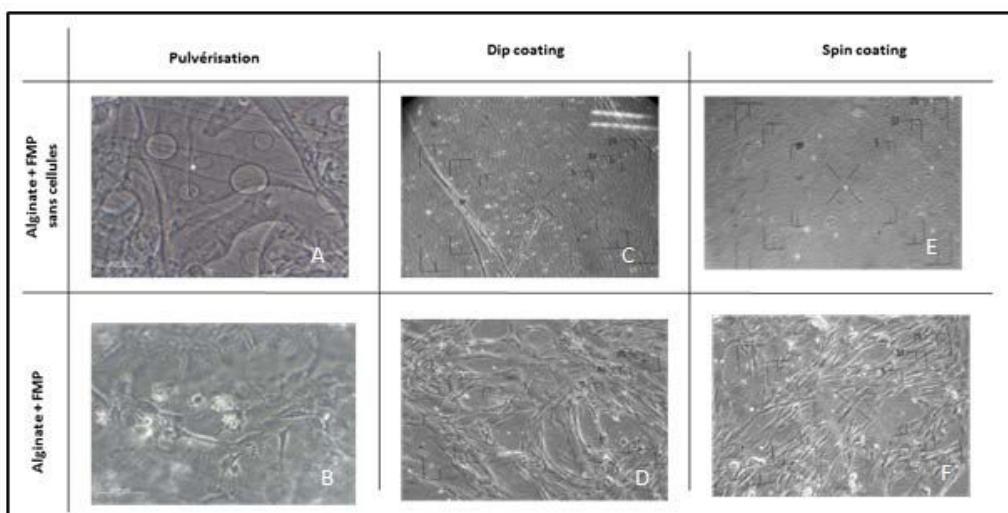


Figure 15 : Aspect morphologie de CSM GW en P4 cultivées 7 jours sur les hydrogels d'alginate fonctionnalisé par les FMP préparés respectivement par pulvérisation (B) DC (D) SC (F). Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture α -MEM à 10 % en SVF. Les photos (A) (C) (E) représentent les hydrogels d'alginate sans cellules, préparés respectivement par pulvérisation, DC et SC. Observation au microscope optique à contraste de phase : Grossissement x20

Evaluation de l'activité métabolique :

La figure 23, représente l'activité métabolique des CSM GW ensemencées à 3000 cell/cm^2 sur des hydrogels d'alginate élaborés selon les 3 techniques citées précédemment. L'activité a été mesurée à 7 jours de culture, et calculée grâce à la réduction de MTT rapporté à la quantité d'ADN dans chaque échantillon.

Quelle que soit la technique d'élaboration de la surface d'alginate, les activités métaboliques des cellules sont fortement diminuées (Figure 23). En effet, comparées au contrôle (plastique) ces valeurs, dans le cas des hydrogels d'alginate obtenus par pulvérisation, représentent

Elaboration d'un biomatériau « scaffold » à base d'hydrogel d'alginate.

seulement 11%, pour ceux mis en œuvre par DC, elles atteignent 34% et enfin pour ceux élaborés pas SC, elles sont similaires (29%). La pulvérisation d'hydrogel paraît la moins idéale pour la culture des CSM GW, alors que les deux autres techniques, le DC et le SC, mettent en évidence des activités métaboliques plus importantes, suggérant une meilleure prolifération cellulaire dans nos conditions expérimentales. Ces observations intéressantes répondent à nos attentes, l'obtention d'un feuillet cellularisé.

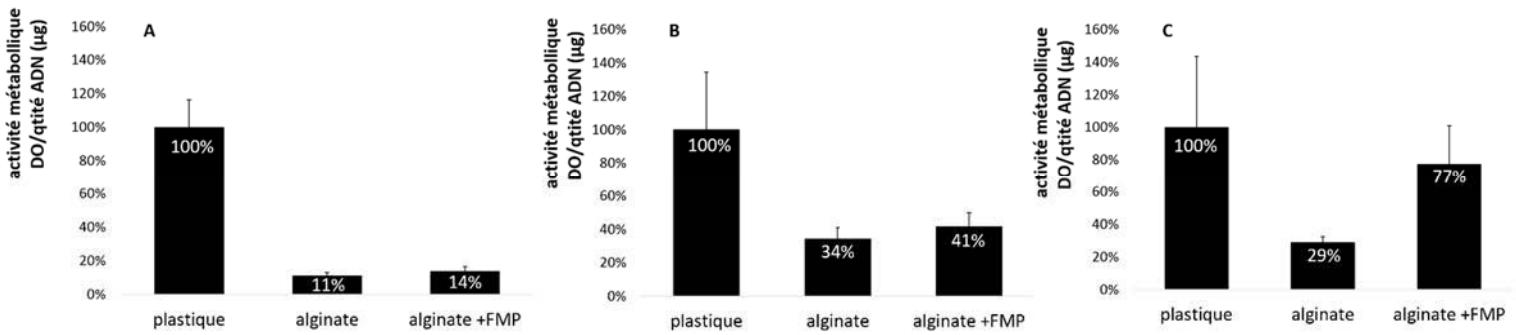


Figure 16 : Activité métabolique des CSM GW cultivées pendant 7 jours sur des hydrogels d'alginate

L'activité des CSM GW ensemencées en P4 à 3000 cellules/cm² a été calculée par le pourcentage de réduction du MTT rapporté à la quantité d'ADN. Les hydrogels d'alginate ont été élaborés (A) par pulvérisation, (B) par DC, ou (C) par SC. Pour chacune des conditions, une surface témoin, le plastique, idéale pour la culture des CSM GW, a été utilisée, puis l'activité a été mesurée sur les hydrogels d'alginate ou d'alginate fonctionnalisés (alginate + FMP) par les FMP (PAH-PSS)6. Les résultats sont présentés en moyenne ± SD, N=3.

Par ailleurs, on note l'effet positif de la fonctionnalisation de surface des hydrogels d'alginate par les FMP qui permet, quel que soit la mise en œuvre de ces derniers, d'augmenter l'activité mitochondriale des cellules. Pour les hydrogels élaborés par SC, cette valeur atteint 77 % du contrôle et révèle donc une surface propice à la culture des CSM GW. La présence d'une fonctionnalisation de la surface des constructions paraît donc indispensable. Ceci est lié à la surface qui est améliorée par les FMP PAH/PSS en termes de rigidité et favorise ainsi la culture de cellules adhérentes telles que les CSMs GW (55).

Cette partie nous a permis de valider la technique d'élaboration des matrices d'hydrogels d'alginate. Sans compter que la pulvérisation et le DC ne sont pas automatisés ce qui entraîne des problèmes de reproductibilité, le SC et l'appareillage utilisé ont permis de fixer des paramètres (vitesse de rotation, temps...), et la culture des CSM GW sur les hydrogels élaborés par SC a été favorisée. Le SC semble aussi plus avantageux quant à la consommation de réactifs puisque seulement quelques millilitres (environ 5ml) sont nécessaires pour l'élaboration du gel contre une vingtaine de millilitres pour la pulvérisation et environ 250 ml pour le DC.

Elaboration d'un biomatériau « scaffold » à base d'hydrogel d'alginate.

Ces résultats montrent que le mode de construction des hydrogels influe considérablement sur la réponse cellulaire. Ceci est de toute évidence lié aux propriétés physico-chimiques qui varie selon la technique d'élaboration utilisée (56).

I.3 CONCLUSION et PERSPECTIVES (PARTIE 1)

En résumé, la technique de SC utilisée est plus reproductible, diminue la consommation de réactifs, et permet d'obtenir des hydrogels visuellement plus homogènes en surface et en épaisseur et plus favorable à la culture des CSM GW. Une caractérisation fine physico-chimique (topographie, porosité) et mécanique (module d'Young) des biomatériaux obtenus serait nécessaire pour comprendre les résultats biologiques obtenus et identifier ces interactions matrice-cellules. Quelque soit la technique utilisée, le matériau cellularisé a pu être facilement détaché du substrat à l'aide d'un scraper. A l'issue de ces expériences, nous avons obtenu un feuillet cellulaire détachable, qui était l'un des objectifs de notre travail. L'étape suivante a été de reconstruire une structure tridimensionnelle mimant la paroi cellulaire.

II Partie 2 : Mise au point de l'architecture 3D du biomatériau à base d'hydrogel d'alginate et formation d'un cylindre cellularisé recréant la media vasculaire

Cette partie du travail a fait l'objet d'un article en français présenté ci-dessous :

Jacqueline Beroud, Monique Gentils, Sébastien Hupont, Patrick Menu, Emilie Velot. « Valorisation de biomatériaux hybrides par mosaïquage d'images en macroscopie à fluorescence : Application à l'étude de la colonisation cellulaire de biomatériaux au potentiel de greffons vasculaires ». Revue IAFH (*in Press*).

VALORISATION DE BIOMATERIAUX HYBRIDES PAR MOSAÏQUAGE D'IMAGES EN MACROSCOPIE A FLUORESCENCE : ÉTUDE DE LA COLONISATION CELLULAIRE DE BIOMATERIAUX AYANT LE POTENTIEL DE GREFFONS VASCULAIRES

Jacqueline Beroud¹, Sébastien Hupont^{1,2}, Monique Gentils¹, Patrick Menu¹, Émilie Velot^{1*}

* emilie.velot@univ-lorraine.fr

¹ Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus Biologie-Santé, Faculté de Médecine,
UMR 7365 CNRS-UL Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA),
Avenue de la Forêt de Haye - C.S. 50184 - 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex - France

² CNRS FR3209 BMCT – PTIBC IBISA Nancy - PlaTeforme d'Imagerie et de Biophysique
Cellulaire, Biopôle, Campus Biologie-Santé,
9 Avenue de la Forêt de Haye - 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy - France

RÉSUMÉ

La construction de tubes cellularisés est un prérequis dans le cadre de l'ingénierie vasculaire. Afin de construire un tube cellularisé susceptible d'être perfusé par un flux pulsatile mimant les conditions physiologiques sanguines, nous avons déposé un film multicouche de polyélectrolytes (FMP) à la surface de membranes d'alginate, puis nous avons colonisé le biomatériau obtenu par des cellules souches ayant la capacité de se différencier en cellules vasculaires. Le feuillet formé par l'alginate, le FMP et les cellules a ensuite

été enroulé autour d'un mandrin en téflon pour former un tube.

Afin de valider la colonisation cellulaire du biomatériau (alginate-FMP), nous avons cherché à imager notre structure à l'échelle du tissu en utilisant la macroscopie de fluorescence, qui autorise une visualisation à l'échelle à la fois cellulaire et tissulaire. Les cellules ancrées au sein de la structure ont été visualisées par un double marquage des noyaux et des filaments d'actine. Les premières images de nos tubes n'ont pas permis de valider la

présence de cellules, cependant une observation transversale a permis d'examiner l'organisation de la paroi du tube après enroulement et de mesurer ses dimensions. Nous avons tenté de lever les verrous techniques et adapté les protocoles de marquage pour le biomatériau en trois dimensions (3D) après enroulement.

Des images ont été acquises à la fois en microscopie et en macroscopie, en lumière transmise et en fluorescence, d'abord en deux dimensions (2D) avant enroulement du feutre puis en 3D après enroulement. Les résultats 2D obtenus en mode mosaïquage ont permis de cartographier la répartition cellulaire à la surface de l'échantillon et les images en lumière transmise ont illustré la structure macro/microscopique de l'échantillon. Les observations 3D ont montré que la colonisation cellulaire était localisée principalement le long des parois du tube. L'acquisition en x,y,z en mode mosaïquage s'est révélée complexe à cause du temps d'acquisition au cours duquel le biomatériau se dessèche et se rétracte. Cependant, l'utilisation d'un algorithme adapté nécessaire à la reconstruction 3D pourrait être envisagée en assemblant les plans nets obtenus.

ABSTRACT

The Build-up of cellularized tubes is a prerequisite for vascular engineering. To build a cellularized tube able to be perfused by pulsatile flow mimicking blood physiological conditions, we filed poly-electrolyte multilayer film (PMF) on the surface of alginate membranes, then we colonized the obtained biomaterial by stem

cells having the ability to differentiate into vascular cells. The sheet made of alginate, PMF and cells was then wrapped around a Teflon's mandrel to form a tube.

To validate the cell colonization of the biomaterial (alginate-PMF), we sought to image our structure at tissue scale using fluorescence microscopy, allowing visualization through both cell and tissue levels. Cells fixed on the structure were visualized by double labeling of nuclei and actin filaments. The first images of our tubes have not validated the presence of cells, however a cross observation was used to examine the organization of the wall of the tube after coiling and measure its dimensions. We tried to remove technical obstacles and adapted the labeling protocols for three-dimensional (3D) biomaterial after coiling.

Images were acquired in both microscopy and macroscopy in transmitted light and fluorescence, first in 2D before coiling the sheet and 3D after coiling. 2D results obtained in «mosaic» mode were used to map the cellular distribution at the sample surface and transmitted light images have illustrated the macro/microstructure of the sample. 3D observations have shown that cell colonization was located mainly along the tube walls. The acquisition in x, y, z «mosaic» mode was proved complex because of the acquisition time during which the biomaterial dries out and retracts. However, the use of a suitable algorithm necessary for 3D reconstruction may be considered to stitch the clear planes.

INTRODUCTION

Ingénierie vasculaire et biomatériaux

Les maladies vasculaires sont le centre d'intérêt de nombreux pôles de recherche en ingénierie tissulaire, car le remplacement de vaisseau est souvent nécessaire malgré l'existence de techniques curatives (angioplastie, endoprothèse...). Les substituts vasculaires idéaux restent les greffons autologues, mais leur faible disponibilité et/ou leur mauvaise qualité contraignent à l'utilisation de prothèses synthétiques (Dacron®...). Si ces substituts synthétiques permettent de remplacer avec succès des vaisseaux de gros calibre, ils ne conviennent pas pour les vaisseaux de petit diamètre (< 6 mm). C'est dans ce contexte que les procédés de bio-ingénierie vasculaire se développent. Deux approches *in vitro* ont été mises en évidence dans la littérature : le « tout biologique » et « l'hybride ». Ce dernier est un matériau composé de cellules et d'un échafaudage ou « scaffold » supportant l'ensemble.

Au milieu des années 1980, Weinberg et Bell ont été les premiers à développer des « vaisseaux hybrides ». Ils ont construit un cylindre à base de collagène dans lequel ils ont ensemencé des fibroblastes, cellules constitutives de la couche la plus externe de la paroi des vaisseaux natifs. La réalisation de ce cylindre terminée, ils ont ajouté les autres types cellulaires (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) constituant la paroi vasculaire pour obtenir ainsi assemblé un vaisseau de petit calibre. Malheureusement, ce substitut n'a pas résisté aux pressions semblables au flux sanguin [1]. En conséquence, Niklason a

choisi de construire un substitut en condition dynamique à l'aide d'un bioréacteur et a ainsi amélioré la tenue mécanique du greffon : un tube de polymère dégradable ensemencé de cellules endothéliales bovines [2]. Parallèlement à ces travaux, L'Heureux et ses collaborateurs ont développé le procédé de feuillet cellulaire, où différents feuillets cellulaires constitutifs de la paroi des vaisseaux sont produits de façon séparée en utilisant des gels de collagène et des cellules matures, puis assemblés. Ils ont conçu un vaisseau *in vitro* [3].

Nos travaux sont basés sur le concept de « biomatériaux hybrides », visant à construire un biomatériau tubulaire parfaitement cellularisé destiné à mimer un vaisseau natif. Notre méthode repose sur 2 étapes fondamentales : la première consiste à déposer des films multicouches de polyélectrolytes (FMP) à la surface de membranes d'hydrogel d'alginate. Les FMP ont déjà prouvé leurs effets bénéfiques en termes d'adhésion, de prolifération et de différenciation cellulaire [4]. Dans un second temps, le biomatériau obtenu est ensemencé par des cellules souches méenchymateuses (CSM) qui ont la capacité de se différencier en cellules vasculaires. Cette structure permet d'obtenir un feuillet formé par l'alginate, le FMP et les CSM, qui est ensuite enroulé autour d'un mandrin en Téflon, puis détaché pour former un tube cellularisé susceptible d'être perfusé par un flux pulsatile mimant le flux sanguin.

Nous proposons dans cet article d'utiliser un macroscope fonctionnant en

lumière transmise et en épifluorescence (MacroFluo) selon un mode d'acquisition par mosaïque permettant de réaliser une mosaïque d'images pour cartographier un échantillon dans son ensemble, en 2D (x,y) ou en 3D (x,y,z). Cet outil permet une validation rapide de la colonisation cellulaire d'un biomatériau dans sa globalité et est complémentaire à d'autres techniques de validation telles que l'histologie qui demeure incontournable.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Elaboration du biomatériau d'alginate et recouvrement par les FMP

Pour construire les hydrogels d'algates, la technique du trempage-retrait ou « *dip coating* » a été utilisée. Ce procédé consiste à immerger un substrat dans une solution puis à le retirer pour en recouvrir la surface. Les substrats utilisés sont des lames de verre rectangulaires. Les lames sont préalablement dégraissées pour assurer une mouillabilité et une épaisseur de dépôt relativement uniforme à la surface. Les lames de verre sont fixées sur un support posé verticalement, puis trempées dans trois solutions successives : la première est une solution de polycations de poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH) permettant de charger la surface du substrat positivement, suivi d'une solution d'alginate de sodium (polysaccharide anionique), et enfin d'une solution de chlorure de calcium. Les ions calcium divalents vont chélater les fonctions hydroxyles des résidus poly-guluroniques de l'alginate et permettre la conception d'une structure plus solide (hydrogel) par les nouvelles interactions créées. Les FMP sont construits

ensuite par incubations successives des lames de verre recouvertes d'alginate dans des solutions de polycations (PAH) et de polyanions poly(sodium 4-styrènesulfonate) (PSS). Chaque incubation est séparée par trois étapes de lavage avec une solution tampon de chlorure de calcium (CaCl_2), afin d'éliminer l'excès des polyélectrolytes non adsorbés. Le cycle est répété six fois jusqu'à obtention de l'architecture (PAH-PSS)₆, ainsi la dernière couche du FMP est chargée négativement.

Cellularisation du biomatériau

Les CSM utilisées sont isolées à partir de cordons ombilicaux de nouveau-nés (convention avec le CHU de Nancy). Le tissu conjonctif, appelé « gelée de Wharton », qui entoure les vaisseaux dans le cordon est détaché puis incubé à 37°C dans une solution de collagénase pendant 18 heures. L'action enzymatique de la collagénase permet de récupérer les CSM qui seront par la suite amplifiées en culture cellulaire dans du milieu α -MEM supplémenté avec 10% du sérum de veau fetal (SVF). Au troisième passage, les cellules sont caractérisées phénotypiquement par cytométrie en flux afin de vérifier leur caractère mésenchymateux [5]. Les CSM sont ensuite ensemencées sur les biomatériaux à une densité de 1000 cellules par cm^2 . Après 7 jours de culture, le biomatériau dit hybride du fait de sa cellularisation est préparé pour l'acquisition d'images.

Préparation des échantillons pour l'analyse par macroscopie à fluorescence

Afin de valider la colonisation cellulaire de notre biomatériau (Alginate-

FMP), nous avons cherché à imager notre structure à l'échelle du tissu en utilisant la macroscopie de fluorescence. Le marquage des cellules est effectué au niveau des noyaux par le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) et des filaments d'actine par la phalloïdine-Alexa-488 après avoir préalablement fixé et perméabilisé les échantillons. Pour cela trois procédures ont été réalisées. Le tableau I résume avec précision les échantillons produits et les méthodes de préparation de ces derniers.

Etape	Echantillons A : structure 2D (Alginate-FMP-CSM) et marquage post-enroulement	Echantillons B : structure 2D (Alginate-FMP-CSM)	Echantillons Cx : structure 3D (Alginate-FMP-CSM) et marquage pré-enroulement	Echantillons Ch : structure 3D (Alginate-FMP-CSM) et marquage pré-enroulement
Rinçages (2 fois)				
Tensions salines phosphate (PBS)				
Fixation				
	Solution de fixation à pH 7.4 pendant 4 heures : paraformaldéhyde 4%, 100 mM de sodium cacodylate trisolvate, 10 mM de chlorure de calcium			
Lavage				
	Solution de lavage : 100 mM de sodium cacodylate trisolvate, 50 mM de chlorure de baryum Rinçage puis lavage pendant 2 heures sous agitation lente suivis d'un changement de bain pour conservation			
Perméabilisation				
	Solution de permeabilisation pendant 30 minutes : 0.5% de Triton™ X-100 dilué dans de l'eau distillée			
Rinçages (2 fois)				
	Solution de lavage			
Marquage des filaments d'actine				
	Solution de marquage des filaments d'actine pendant 30 minutes : une solution de 4.6 µM de phalloïdine-Alexa-488 reconstruite dans du méthanol et diluée au 1/100 ^{ème} dans du PBS			
Rinçages (2 fois)				
	Solution de lavage			
Marquage nucléaire				
	d'4'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) dilué au 1/250 ^{ème} dans une solution de PBS pendant 15 minutes	DAPI 1/250 ^{ème} sur la nuit à 4°C	DAPI 1/100 ^{ème} sur la nuit à 4°C	
Rinçages (2 fois)				
	Solution de lavage			
RÉSULTATS				
	Figures 2 et 3	Figure 4	Non exploitables	Figure 5

Tableau I: Protocole de marquage noyaux/filaments d'actine des biomatériaux cellularisés. Après culture des CSM ombilicales pendant 7 jours sur le biomatériau d'alginate-FMP, les échantillons sont récupérés et plongés dans différents bains afin de mettre en évidence le noyau des cellules et leur cytosquelette par un marquage DAPI/phalloïdine-Alexa Fluor488.

Les échantillons appelés «structure 3D» ont été préparés après enroulement du feuillet obtenu (CSM sur alginate + FMP après 7 jours de culture) autour d'un tuteur cylindrique (mandrin en Téflon). Ces structures 3D permettent d'obtenir un biomatériau tubulaire cellularisé. La Figure 1 résume les procédures expérimentales suivies à partir de la mise en œuvre du biomatériau jusqu'à l'analyse de la colonisation cellulaire. Les expériences ont été réalisées un minimum de trois fois par condition et

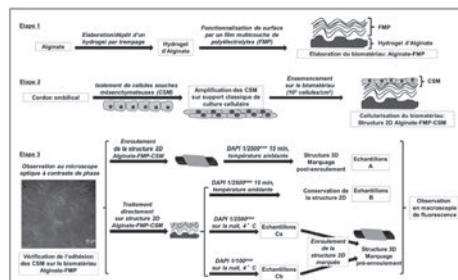


Figure 1: Procédure expérimentale effectuée de 1) l'élaboration du biomatériau (Alginate-FMP), à 2) la cellulation par les CSM, puis à 3) la préparation des échantillons du biomatériau hybride pour analyser la colonisation cellulaire (marquage DAPI/phalloïdine).

les images présentées sont les plus représentatives pour ces conditions (les échantillons «Ca» n'ont pas permis d'obtenir des images exploitableables).

Macroscopie à fluorescence

Les images ont été acquises sur macroscope de fluorescence Z16APOA Leica (zoom optique autorisant un agrandissement variable x0,57 à x9,2) muni d'un objectif x5 d'ouverture numérique 0,5NA et d'une caméra CCD couleur DFC300fx Leica Microsystems de 1392x1040 pixels mesurant 6,45 µm de côté.

RÉSULTATS/DISCUSSION

Les premières images obtenues sur les échantillons «A» de nos tubes cellularisés n'ont pas permis de valider la présence de cellules. En effet, la diffusion due à l'auto fluorescence de la membrane d'alginate ne permettait pas de distinguer les filaments d'actine. De plus le marquage DAPI n'ayant visiblement pas fonctionné, il n'était pas non plus possible de mettre en évidence les noyaux. Le protocole de

marquage, pourtant effectué en routine au laboratoire sur des échantillons 2D ne semblait pas adapté à nos structures 3D. Cependant, ces premières images macroscopiques ont dans un premier temps permis de vérifier l'organisation de la paroi de notre tube par une observation transversale (Figure 2) : le feuillet formé par l'alginate,

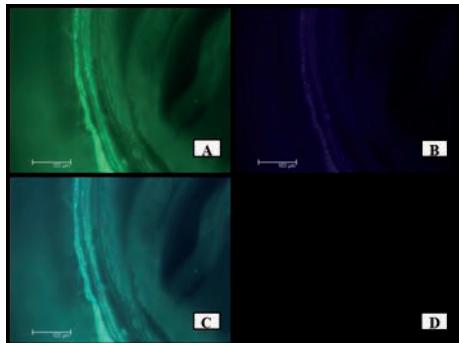


Figure 2: Coupe transversale du biomatériau Alginate-FMP cellularisé par des CSM après marquage DAPI/Phalloïdine-Alexa Fluor 488 (échantillons «A»). Aucune détection de cellules n'est évidente: l'autofluorescence importante du biomatériau gène la détection. Après enroulement de la structure hybride, 3 couches sont visibles et l'épaisseur de la paroi totale du tube est estimée à environ 100µm. A) acquisition en fluorescence pour mettre en évidence phalloïdine en vert, B) acquisition en fluorescence pour mettre en évidence DAPI en bleu, C) superposition vert + bleu, D) témoin sans marquage.

le FMP et les CSM a pu être enroulé trois fois autour du mandrin, révélant une épaisseur totale de la paroi de 100µm. D'autre part, l'acquisition longitudinale a permis d'estimer le diamètre du tube à 4 mm, ce qui confirme et correspond parfaitement à nos objectifs initiaux (Figure 3).

L'autofluorescence observée sur les échantillons «A» semble gêner la détec-

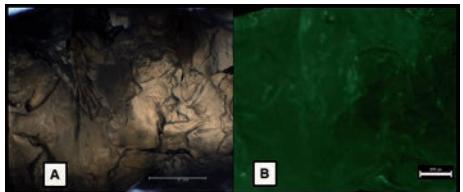


Figure 3: Coupe longitudinale du biomatériau Alginate-FMP cellularisé par des CSM après marquage DAPI/Phalloïdine-Alexa Fluor 488 (échantillons «A»). Aucune détection de cellules n'est évidente: l'autofluorescence importante du biomatériau gène la détection. Le tube formé après enroulement de l'architecture révèle un diamètre de 4mm. A) acquisition en lumière transmise et B) images obtenues en fluorescence.

tion du signal des cellules marquées par la phalloïdine et il se retrouve «noyé» dans le signal d'autofluorescence du biomatériau. Le film d'alginate replié sur lui-même plusieurs fois (3 couches) suite à l'enroulement, a pour effet d'augmenter le signal qu'il diffuse et diminue le rapport signal sur bruit de l'image, ce qui rend le marquage fluorescent cellulaire peu détectable.

Suite à ces observations, l'efficacité du marquage sur film 2D avant enroulement a été vérifiée et le protocole du marquage DAPI a été adapté selon nos structures. Nous avons effectué des images micro/macroscopiques sur film 2D avant enroulement (échantillons «B») et en tube 3D (échantillons «Cb»), à la fois en lumière transmise (LT) et en épifluorescence.

La technique de reconstruction grand champ par mosaïque d'images en macroscopie de fluorescence consiste à acquérir une série d'images en x et en y selon la taille du champ souhaité et dont

la taille de chaque image initiale sera fixée par un grandissement souhaité. Une fois la pile d'images acquise, un algorithme recrée la mosaïque d'images par le calcul du taux de recouvrement de chaque bord d'images pouvant atteindre plusieurs cm^2 . Les résultats 2D obtenus Figure 4 en uti-

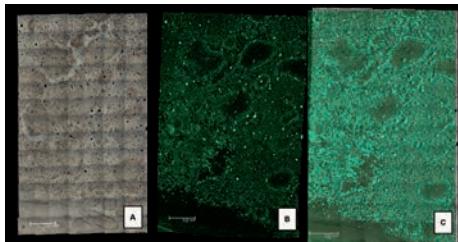


Figure 4: Mosaïque d'images avec reconstruction 2D partielle (échantillons «B», 4cm^2). Acquisition A) en lumière transmise (LT), B) en fluorescence et C) superposition LT+Fluorescence «post-acquisition».

lisant le mode mosaïquage ont permis de cartographier les échantillons «B» : les images en LT reflètent la structure macro/microscopique et la fluorescence montre la colonisation cellulaire de notre biomatériau grâce à la réponse en fluorescence de la phalloïdine couplée à l'Alexa 488 pour visualiser les filaments d'actine. Des images couplant les deux montrent une organisation des cellules selon la topographie du biomatériau.

Les observations en 3D ne se sont pas révélées exploitables pour les échantillons «Ca», en revanche, celles des échantillons «Cb» ont montré la colonisation cellulaire localisée le long des parois de l'échantillon (Figure 5) et aucune fluorescence n'a été observée au centre. L'acquisition 3D avec mosaïquage s'est révélée plus compliquée : le temps d'acquisition étant plus long, ceci

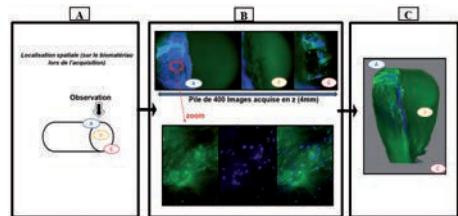


Figure 5: Répartition cellulaire des CSM de cordon au sein de la structure 3D (échantillons «Cb»). A) schématisation du point d'observation lors de l'acquisition en z. B) images obtenues : en haut avec un grandissement total de 95,4 (0,35) et un objectif X 5, en bas après zoom sur une zone d'intérêt permettant de vérifier que le signal visible correspond à des cellules. C) reconstruction 3D du biomatériau tubulaire cellularisé.

a entraîné un phénomène de rétractation et de dessèchement du biomatériau. Cela a pour effet une perte du focus, d'où une disparition du signal. Cependant un assemblage manuel pourrait être envisagé avec les plans nets obtenus sur la pile d'images en z et un algorithme adapté nécessaire à la reconstruction 3D. Cependant, ce type d'approche n'est pas encore accessible à ce stade de notre travail.

CONCLUSION

La facette mosaïquage de la macroscopie de fluorescence permet de visualiser la répartition cellulaire sur l'ensemble du biomatériau et valide de façon irréfutable la colonisation cellulaire de ce dernier. Ainsi, nous avons pu vérifier qu'il était possible d'obtenir un feuillet formé par l'alginate, le FMP et les CSM pour former un biomatériau hybride (alginate-FMP-CSM) parfaitement enroulable pour finalement reconstruire un cylindre susceptible de recréer la paroi vasculaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. WEINBERG CB, BELL E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*, 1986 Jan 24;231(4736):397-400.
2. NIKLASON LE. Techview: medical technology. Replacement arteries made to order. *Science*, 1999 Nov 19;286(5444):1493-4.
3. PECK M, GEBHART D, DUSSERRE N, MCALLISTER TN, L'HEUREUX N. The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. *Cells Tissues Organs*, 2012;195(1-2):144-58.
4. BOURA C, MENU P, PAYAN E, PICART C, VOESEL JC, MULLER S, STOLTZ JF. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials*, 2003 Sep;24(20):3521-30.
5. RAMMAL H, BEROUD J, GENTILS M, LABRUDE P, MENU P, KERDJOU-DJ H, VELOT E. Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films. *Biomed Mater Eng.*, 2013;23(4):299-309.

DISCUSSION - CONCLUSION GENERALE

Les maladies cardiovasculaires n'ont cessé d'augmenter au cours de ces dernières années. Elles demeurent la principale cause de mortalité mondiale et devraient encore augmenter au cours des prochaines décennies. Parmi les causes, l'arthérosclérose, anévrysme, ... nécessitent une intervention chirurgicale qui demande, dans certains cas, la substitution du vaisseau. Cette situation entraîne une demande considérable en greffons vasculaires, en particulier pour des vaisseaux de petits calibres (diamètre < 6mm). L'utilisation de vaisseaux autologues ou hétérologues ne répond pas suffisamment à la demande. Les substituts synthétiques ne sont pas toujours applicables dans ces situations. Aussi les cliniciens ont fait appel à la bio-ingénierie tissulaire. De nombreux concepts ont été mis en œuvre visant à construire ce type greffon vasculaire idéal. L'objectif final de cette thèse s'inscrit dans cette dynamique de recherche par les concepts de l'ingénierie vasculaire. L'obtention d'une « media vasculaire » ou couche de cellules musculaires lisses est un prérequis pour l'élaboration d'un substitut capable de résister aux pressions sanguines tout en entretenant le tonus vasculaire. Les difficultés de récupérer les CML d'artères adultes, et de la perte de leur fonctionnalité lors de la culture, les rendent difficilement utilisables pour l'élaboration de tels substituts. Ainsi, trouver une source alternative de CML est une étape essentielle en ingénierie vasculaire.

Pour atteindre cet objectif, notre travail s'est articulé en plusieurs étapes :

- Identification des conditions propices à la culture des CSM GW dans le but d'orienter leur phénotype vers celui caractéristique des CML contractiles.
- Adaptation de la surface de recouvrement des surfaces. Cette étape a été initiée par l'observations du comportement inattendu des CSM GW sur les films multicouches de poly-électrolytes en comparaison avec des surfaces de culture largement employées en culture cellulaire telles que les protéines de la MEC (fibronectine, collagène) et le plastic. Elle nous a conduit à adapter les conditions de cultures et modifier l'architecture des multicouches.
- Etude de l'influence des FMP sur l'expression des CSM GW induite selon les conditions de différenciation fixées au chapitre 1.
- Mise au point de biomatériau scaffolds à base d'hydrogels d'alginate : adaptation à la culture monocouche des CSM GW dans le but d'obtenir un feuillet cellulaire détachable.

Dans notre première étude, nous avons donc évalué si les CML, générées à partir de cellules souches mésenchymateuses humaines issues du cordon ombilical (GW) avaient un phénotype contractile.

Les principaux travaux de la littérature jusqu'à présent différencient des CSM, d'autres tissus tels que la moelle osseuse ou le tissu adipeux, en utilisant des facteurs de croissances tels que le TGF β 1 (42,43,45,46,49). Notre travail a montré que ces conditions de culture pouvaient être appliquées aux CSM issues de la gelée de Wharton. Cette source cellulaire multipotentes, facilement accessible nous a donc semblé très intéressante pour leur capacité à se différencier en CML fonctionnelles. Pour cela, différentes conditions expérimentales ont été testées afin d'obtenir un phénotype de CML contractile. Ainsi, des CSM GW cultivées avec un plus faible taux de sérum (2% contre 10% en culture classique) et traitées pendant 12 jours en hypoxie ont permis d'obtenir des résultats similaires, voire améliorés (pour certains marqueurs de CML détectés) comparé à une stimulation par le TGF β 1. L'expression de la calponine et de SM22- α a été initiée et une sur-régulation de la caldesmone et α -SMA tant au niveau des gènes que des protéines a été observée. Étonnamment, lorsque les trois conditions environnementales (sérum faible, hypoxie, TGF β 1) sont appliquées simultanément, le TGF β 1 semblait même contrecarrer l'effet positif de l'hypoxie en atténuant l'expression de SM22- α . Tous ces résultats ont fait l'objet d'une discussion dans la publication située dans le chapitre 1 du manuscrit.

Nous avons poursuivi notre travail dans le but de favoriser la culture de ces cellules sur différentes surfaces, dont les tissus ou une construction bio-compatible, et d'améliorer la différenciation cellulaire en utilisant une approche développée et bien connue au sein de l'équipe. Le recouvrement des surfaces de culture par les FMP, qui modifient la surface en contact avec les cellules, a montré dans des études précédentes, que ces structures favorisaient non seulement l'adhésion et la prolifération de cellules matures (31) mais qu'ils pouvaient aussi accélérer la différenciation de progéniteurs endothéliaux (EPC) en cellule endothéliale like (Berthélémy et al., 2009). Dans notre travail, les films (PH-PSS)₃-PAH classiquement utilisés au sein de l'équipe ont montré des résultats inattendus quant à la culture des CSM GW. Ensemencées sur cette architecture, les CSM GW ont adopté un comportement particulier puisqu'une croissance tridimensionnelle, inadaptée à nos objectifs, a été observée. Ce comportement leur semble propre puisque aucun autre type cellulaire testé (CSM de moelle osseuse, cellules endothéliales) cultivé dans les mêmes conditions, n'a conduit à la formation de ces nodules-like. En revanche, les films (PAH-PSS)₄ terminant en surface par une couche négative, ont favorisé la culture de ces CSM GW en monocouche, permettant d'obtenir un tapis cellulaire bidimensionnel, plus adapté à nos objectifs finaux. Cette partie du travail a fait l'objet

d'une publication présentée dans le chapitre 2 du manuscrit dans laquelle différentes approches ont été discutées. Aujourd'hui, le processus de la formation de ces sphères cellulaires obtenues de façon spontanée dans nos cultures n'a été examiné. Cependant, la formation de ces nodules est un facteur limitant dans l'ingénierie tissulaire vasculaire. La stratégie idéale pour la poursuite de ces travaux a été de cultiver les CSM GW sur des FMP se terminant par une charge négative (PSS).

Une fois cette architecture définie, des premiers tests (non présentés dans ce manuscrit) : les CSM GW ont été ensemencées au quatrième passage et stimulées selon les conditions de différenciation idéales obtenues au chapitre 1 de ce manuscrit, et sur les FMP adéquates à leur croissance en monocouche. Les premiers résultats obtenus dans ces conditions, ont montré l'effet « booster » des FMP en réponse à la culture en faible taux de sérum et dans les conditions hypoxiques fixées dans nos précédents travaux. Ainsi, avec ce protocole de différenciation, les CSM GW stimulées semblent s'orienter vers un phénotype de CML contractile. Ces résultats sont davantage discutés dans la publication du chapitre 4 de ce manuscrit. Des premiers tests de fonctionnalité sur ces CML-like obtenues par différenciation des CSM GW ont été réalisés. Ces tests, développés à partir de données de la littérature, reposent sur la capacité de contractilité des CML, connue comme étant essentiellement régulée par la dépolarisation membranaire (57). Les cellules différencierées sont incorporées à des matrices de gel de collagène puis exposées à des concentrations de KCL pour induire une dépolarisation membranaire. La contraction du gel à différents points dans le temps est calculée, au moyen d'une caméra numérique, en mesurant les dimensions des réseaux de gel. Des analyses, en utilisant un logiciel de traitement tel que NIH Image J, permettront ensuite de quantifier la contractilité de nos CML-like obtenues en comparaison avec des CML matures. Des améliorations des protocoles doivent être effectuées pour pouvoir obtenir des résultats comparables et reproductibles.

Les différents travaux effectués au sein de l'équipe montrent les nombreux avantages des FMP en termes d'adhésion, prolifération et différenciation cellulaire, mais aussi l'avantage d'un recouvrement total et stable des surfaces biologiques. Cependant, ce dernier point est à l'origine de la difficulté de les détacher de nos surfaces de culture. Or l'objectif de ce travail de thèse était certes d'obtenir ces CML-like mais sous forme de feuillet cellulaire détachable et enroulable pouvant recréer ainsi une « media vasculaire ».

Ainsi, inspirés par les travaux de Kerdjoudj, qui a utilisé (58) une stratégie basée sur l'utilisation d'hydrogels d'alginate pour l'obtention de feuillets de CML d'aorte de Lapin, facilement détachables, nous avons utilisé des supports similaires pour atteindre nos objectifs. A l'instar de leurs travaux, nos premiers essais utilisaient la technique de pulvérisation pour la

construction des architectures d'hydrogels souhaitées (décrise dans la partie 1 du chapitre 4). Cependant, ces conditions ne semblaient pas idéales à la culture de nos CSM GW humaines. De plus, les problématiques liées à la reproductibilité des résultats nous ont poussé à utiliser d'autres techniques faciles à mettre en œuvre au laboratoire, plus précisément le Dip-coating et le Spin-coating. Ces approches de recouvrement d'un substrat par l'hydrogel consistent soit à le plonger puis à le retirer dans l'hydrogel, soit à déposer l'hydrogel au centre du substrat et recouvrir sa surface par rotation centrifuge. Les structures obtenues par ces deux procédés donnent des films détachables sur lesquels la culture des CSM GW a été améliorée en termes de prolifération cellulaire mais aussi d'activité métabolique.

Finalement, une matrice d'hydrogel d'alginate fonctionnalisée en surface par les FMP a été construite. La colonisation de ce scaffold a été vérifiée à l'aide de la technique de macroscopie de fluorescence, en particulier son mode « mosaïque » qui met en évidence la cellularisation du biomatériau dans son ensemble. Cet aspect de notre travail a fait l'objet d'une publication qui est donnée dans la deuxième partie du chapitre 4 du manuscrit.

Un feuillet cellulaire détachable et enroulable a ainsi été obtenu. Des premiers tests de fonctionnalié ont consisté à faire circuler un liquide dans le tube cellulaire formé. Les résultats préliminaires sont prometteurs puisqu'à plusieurs reprises, nous avons maintenu des cylindres d'alginate cellularisés en conditions dynamiques sous flux pendant plus de 5 jours. Cependant de nombreuses étapes restent encore à mettre en œuvre. Il sera ensuite nécessaire d'ensemencer des cellules endothéliales-like provenant de la différenciation préalable des CSM GW (thèse Hassan Rammal) sur la surface lumineuse du cylindre préalablement cellularisé par des CML-like obtenus selon les techniques décrites dans ce travail. L'ensemble pourra ensuite être mûr dans un bioréacteur créant les conditions physiologiques et les contraintes mécaniques retrouvées au sein des vaisseaux de petits calibres. Il sera indispensable de vérifier les caractéristiques mécaniques de ce substitut construit par des mesures de compliance et d'élasticité, soumis à des valeurs supérieures à celles rencontrées dans les conditions physiologiques avant d'envisager des tests *in vivo*.

Les avantages de la construction d'un tel substitut sont nombreux :

- ✚ La fabrication de substituts vasculaires de petit diamètre « à façon », disponibles et cellularisés par des cellules réputées non immunogènes puisque issues de la gelée de Wharton. Ceci permettrait d'alimenter une banque de substituts vasculaires.

- La valorisation de la gelée de Wharton, source d'une très grande quantité de cellules humaines susceptibles de se différencier en CE (thèse Hassan Rammal) et en CML (ce projet de thèse). Son origine évite toute discrimination d'ordre éthique.
- L'accélération de la différenciation cellulaire sur les films multicouches de polyélectrolytes réduit le temps d'obtention du bio-vaisseaux.

Certaines limites sont cependant à considérer :

- L'utilisation des FMP de type PAH/PSS n'est pas validée par l'ANSM. Cependant, des premiers travaux effectués avec des films à base de chitosan (CHI) et d'acide hyaluronique (HA) (thèse Chaza Harmoush) ont révélé des résultats prometteurs quant au remplacement des FMP PAH/PSS par des FMP de type CHI/HA déjà acceptés, dans certaines conditions, par les autorités de santé.

A l'issue de ces travaux, d'autres aspects pourraient aussi donner naissance à plusieurs études, notamment en ce qui concerne l'effet des FMP, sur le comportement des CSM. Comment expliquer que ces films, selon la charge de la dernière couche, permettent une culture 2D ou 3D ? De plus, l'étude des interactions FMP-cellules, responsables d'une meilleure adhésion prolifération et différenciation cellulaire observée, peut aussi être effectuée afin de comprendre les mécanismes impliqués.

De plus, des interrogations restent encore à soulever :

- Finalement le scaffold obtenus pourra t'il être facilement suturé et placé sous un flux pulsatile ?
- Cette maturation sous flux pourra t-elle « booster » la synthèse matricielle ?
- Qu'en est-il de la dégradation de l'hydrogel en présence des cellules ?
- Les couches PAH/PSS sont-elles suffisamment perméables pour la culture à long termes des cellules ?

Ce travail, qui est un des axes majeurs de la thématique de l'équipe, semble très prometteur quant à l'obtention d'une couche de CML susceptibles de mimer la media vasculaire des vaisseaux natifs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Xu ZC, Zhang WJ, Li H, Cui L, Cen L, Zhou GD, et al. Engineering of an elastic large muscular vessel wall with pulsatile stimulation in bioreactor. *Biomaterials.* avr 2008;29(10):1464-72.
2. Salmon N, Paternotte E, Decot V, Stoltz J-F, Menu P, Labrude P. Polyelectrolyte multilayer films promote human cord blood stem cells differentiation into mature endothelial cells exhibiting a stable phenotype. *Biomed Mater Eng.* 2009;19(4-5):349-54.
3. Berthelemy N, Kerdjoudj H, Gaucher C, Schaaaf P, Stoltz J-F, Lacolley P, et al. Polyelectrolyte Films Boost Progenitor Cell Differentiation into Endothelium-like Monolayers. *Adv Mater Deerfield Beach Fla.* 17 juill 2008;20(14):2674-8.
4. Bolton TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev.* juill 1979;59(3):606-718.
5. Yano K, Araki Y, Hales SJ, Tanaka M, Ikebe M. Boundary of the autoinhibitory region of smooth muscle myosin light-chain kinase. *Biochemistry (Mosc).* 16 nov 1993;32(45):12054-61.
6. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* juill 2004;84(3):767-801.
7. Kawai-Kowase K, Owens GK. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* janv 2007;292(1):C59-69.
8. Wang D-Z, Olson EN. Control of smooth muscle development by the myocardin family of transcriptional coactivators. *Curr Opin Genet Dev.* oct 2004;14(5):558-66.
9. Beamish JA, He P, Kottke-Marchant K, Marchant RE. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* oct 2010;16(5):467-91.
10. Owens GK, Wise G. Regulation of differentiation/maturation in vascular smooth muscle cells by hormones and growth factors. *Agents Actions Suppl.* 1997;48:3-24.
11. Vandekerckhove J, Weber K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol.* 25 déc 1978;126(4):783-802.
12. Clowes AW, Clowes MM, Kocher O, Ropraz P, Chaponnier C, Gabbiani G. Arterial smooth muscle cells in vivo: relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin. *J Cell Biol.* nov 1988;107(5):1939-45.
13. Chiavegato A, Roelofs M, Franch R, Castellucci E, Sarinella F, Sartore S. Differential expression of SM22 isoforms in myofibroblasts and smooth muscle cells from rabbit bladder. *J Muscle Res Cell Motil.* févr 1999;20(2):133-46.
14. Winder SJ, Sutherland C, Walsh MP. A comparison of the effects of calponin on smooth and skeletal muscle actomyosin systems in the presence and absence of caldesmon. *Biochem J.* 15 déc 1992;288 (Pt 3):733-9.
15. Babij P, Kawamoto S, White S, Adelstein RS, Periasamy M. Differential expression of SM1 and SM2 myosin isoforms in cultured vascular smooth muscle. *Am J Physiol.* mars 1992;262(3 Pt 1):C607-13.
16. Hungerford JE, Owens GK, Argraves WS, Little CD. Development of the aortic vessel wall as defined by vascular smooth muscle and extracellular matrix markers. *Dev Biol.* 15 sept 1996;178(2):375-92.

17. Hungerford JE, Hoeffler JP, Bowers CW, Dahm LM, Falchetto R, Shabanowitz J, et al. Identification of a novel marker for primordial smooth muscle and its differential expression pattern in contractile vs noncontractile cells. *J Cell Biol.* 19 mai 1997;137(4):925-37.
18. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 19 mai 2011;473(7347):317-25.
19. Sarkar S, Salacinski HJ, Hamilton G, Seifalian AM. The mechanical properties of infrainguinal vascular bypass grafts: their role in influencing patency. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg.* juin 2006;31(6):627-36.
20. Seifu DG, Purnama A, Mequanint K, Mantovani D. Small-diameter vascular tissue engineering. *Nat Rev Cardiol.* juill 2013;10(7):410-21.
21. Fernandez CE, Achneck HE, Reichert WM, Truskey GA. Biological and engineering design considerations for vascular tissue engineered blood vessels (TEBVs). *Curr Opin Chem Eng.* 1 févr 2014;3:83-90.
22. Draget KI, Skjåk-Braek G, Smidsrød O. Alginate based new materials. *Int J Biol Macromol.* août 1997;21(1-2):47-55.
23. Mjahed H. caractérisation physico-chimique des films multicouches de polyélectrolytes à base de polysaccharides et de polypeptides en vue d'applications dans le domaine des biomatériaux. In 2009.
24. Seely GR, Hart RL. The binding of alkaline earth metal ions to alginate. *Macromolecules.* oct 1974;7(5):706-10.
25. Stabler C, Wilks K, Sambanis A, Constantinidis I. The effects of alginate composition on encapsulated betaTC3 cells. *Biomaterials.* juin 2001;22(11):1301-10.
26. Rastello De Boisseson M, Leonard M, Hubert P, Marchal P, Stequert A, Castel C, et al. Physical alginate hydrogels based on hydrophobic or dual hydrophobic/ionic interactions: bead formation, structure, and stability. *J Colloid Interface Sci.* 1 mai 2004;273(1):131-9.
27. LeRoux MA, Guilak F, Setton LA. Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration. *J Biomed Mater Res.* oct 1999;47(1):46-53.
28. Drury JL, Dennis RG, Mooney DJ. The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials.* juill 2004;25(16):3187-99.
29. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci.* 7 août 2006;6(8):623-33.
30. Genes NG, Rowley JA, Mooney DJ, Bonassar LJ. Effect of substrate mechanics on chondrocyte adhesion to modified alginate surfaces. *Arch Biochem Biophys.* 15 févr 2004;422(2):161-7.
31. Boura C, Menu P, Payan E, Picart C, Voegel JC, Muller S, et al. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials.* sept 2003;24(20):3521-30.
32. Boura C, Muller S, Voegel JC, Schaaf P, Stoltz JF, Menu P. Behaviour of endothelial cells seeded on thin polyelectrolyte multilayered films: a new biological scaffold. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005;33(3):269-75.
33. Paternotte E, Kerdjoudj H, Kokten T, Stoltz J-F, Kearney-Schwartz A, Voegel J-C, et al. Endothelialized and preconditioned natural umbilical arteries with long term patency open the route for future human uses. *Clin Hemorheol Microcirc.* 1 janv 2013;54(3):223-34.
34. Kerdjoudj H, Berthelemy N, Rinckenbach S, Kearney-Schwartz A, Montagne K, Schaaf P, et al. Small vessel replacement by human umbilical arteries with polyelectrolyte film-treated arteries: in vivo behavior. *J Am Coll Cardiol.* 4 nov 2008;52(19):1589-97.
35. Reusch P, Wagdy H, Reusch R, Wilson E, Ives HE. Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* nov 1996;79(5):1046-53.

36. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2004;22(3):377-84.
37. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* déc 1966;16(3):381-90.
38. Lennon DP, Caplan AI. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* nov 2006;34(11):1604-5.
39. Han M, Wen J-K, Zheng B, Cheng Y, Zhang C. Serum deprivation results in redifferentiation of human umbilical vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* juill 2006;291(1):C50-8.
40. El-Mounayri O, Mihic A, Shikatani EA, Gagliardi M, Steinbach SK, Dubois N, et al. Serum-free differentiation of functional human coronary-like vascular smooth muscle cells from embryonic stem cells. *Cardiovasc Res.* 1 avr 2013;98(1):125-35.
41. Wang C, Cen L, Yin S, Liu Q, Liu W, Cao Y, et al. A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells. *Biomaterials.* févr 2010;31(4):621-30.
42. Gong Z, Calkins G, Cheng E, Krause D, Niklason LE. Influence of culture medium on smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* févr 2009;15(2):319-30.
43. Harris LJ, Abdollahi H, Zhang P, McIlhenny S, Tulenko TN, DiMuzio PJ. Differentiation of adult stem cells into smooth muscle for vascular tissue engineering. *J Surg Res.* 15 juin 2011;168(2):306-14.
44. Alimperti S, You H, George T, Agarwal SK, Andreadis ST. Cadherin-11 regulates both mesenchymal stem cell differentiation into smooth muscle cells and the development of contractile function in vivo. *J Cell Sci.* 15 juin 2014;127(Pt 12):2627-38.
45. Narita Y, Yamawaki A, Kagami H, Ueda M, Ueda Y. Effects of transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage. *Cell Tissue Res.* sept 2008;333(3):449-59.
46. Liu JY, Peng HF, Gopinath S, Tian J, Andreadis ST. Derivation of functional smooth muscle cells from multipotent human hair follicle mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* août 2010;16(8):2553-64.
47. Gong Z, Niklason LE. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* juin 2008;22(6):1635-48.
48. Lachaud CC, López-Beas J, Soria B, Hmadcha A. EGF-induced adipose tissue mesothelial cells undergo functional vascular smooth muscle differentiation. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1304.
49. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Bae YC, et al. Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth-muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. *J Cell Sci.* 1 déc 2006;119(Pt 23):4994-5005.
50. Kim YM, Kim J, Heo SC, Shin SH, Do EK, Suh D-S, et al. Proteomic identification of ADAM12 as a regulator for TGF-β1-induced differentiation of human mesenchymal stem cells to smooth muscle cells. *PloS One.* 2012;7(7):e40820.
51. Zhao Z, Yu H, Xiao F, Wang X, Yang S, Li S. Differentiation of adipose-derived stem cells promotes regeneration of smooth muscle for ureteral tissue engineering. *J Surg Res.* nov 2012;178(1):55-62.
52. Hirota N, McCuaig S, O'Sullivan MJ, Martin JG. Serotonin augments smooth muscle differentiation of bone marrow stromal cells. *Stem Cell Res.* mai 2014;12(3):599-609.

Références bibliographiques

53. Park JS, Chu JS, Tsou AD, Diop R, Tang Z, Wang A, et al. The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β . *Biomaterials*. juin 2011;32(16):3921-30.
54. Berthelemy N, Kerdjoudj H, Schaaf P, Prin-Mathieu C, Lacolley P, Stoltz J-F, et al. O₂ level controls hematopoietic circulating progenitor cells differentiation into endothelial or smooth muscle cells. *PloS One*. 2009;4(5):e5514.
55. Moby V, Boura C, Kerdjoudj H, Voegel J-C, Marchal L, Dumas D, et al. Poly(styrenesulfonate)/poly(allylamine) multilayers: a route to favor endothelial cell growth on expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular grafts. *Biomacromolecules*. juill 2007;8(7):2156-60.
56. Izquierdo A, Ono SS, Voegel J-C, Schaaf P, Decher G. Dipping versus spraying: exploring the deposition conditions for speeding up layer-by-layer assembly. *Langmuir ACS J Surf Colloids*. 2 août 2005;21(16):7558-67.
57. Kuriyama H, Kitamura K, Itoh T, Inoue R. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. *Physiol Rev*. juill 1998;78(3):811-920.
58. Kerdjoudj H. Modification de la surface lumineuse artérielle par films de polyélectrolytes en vue d'obtenir un substitut vasculaire non thrombogénique. 2007. 144 p.

ANNEXES

J Beroud, B Vincent, E Paternotte, V-S Nguyen, H Kerdjoudj, E Velot, D Rouxel, and P Menu.
« Brillouin spectroscopy: A new tool to decipher viscoelastic properties of biological scaffold functionalized with nanoscale films ». *Bio-medical materials and engineering* 23, n° 4 (1 janvier 2013): 251-261.

Brillouin spectroscopy: A new tool to decipher viscoelastic properties of biological scaffold functionalized with nanoscale films

J. Beroud^a, B. Vincent^b, E. Paternotte^a, V.-S. Nguyen^b, H. Kerdjoudj^c, E. Velot^a, D. Rouxel^b and P. Menu^{a,*}

^a UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, IMoPA, Biopôle de l'Université de Lorraine,
Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^b Institut Jean Lamour, UMR-CNRS 7198, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^c UFR Odontologie, EA BIOS 4691, SFR CapSanté, Université de Reims Champagne-Ardenne

Abstract.

BACKGROUND: In tissue engineering, the endothelialization of vascular scaffold can be a crucial step to improve graft patency. A functional cellularization requires coating surfaces. Since 2003, our group used polyelectrolyte multilayer films (PEMFs) made of poly(allylamine hydrochloride) and polystyrene sulfonate to coat luminal surface of blood vessel. Previous results showed that PEMFs have remarkable physicochemical properties on cellular behavior: adhesion, proliferation, differentiation. However, no technic seems adapted for *in vitro* measurement of the viscoelastic shift after PEMFs buildup.

OBJECTIVE: In this present work, we proposed to use a new investigation method based on Brillouin spectroscopy (BS) investigating the influence PEMFs coating on vessel intrinsic viscoelasticity.

METHODS: On human umbilical arteries and rabbit vessels, PEMFs were buildup and the luminal surfaces viscoelasticity were measuring by BS.

RESULTS: BS showed that these films do not seem alter dynamic functionality and could be an interesting method for understanding the role of the tissue architecture, the interrelation between the different structures constituting the wall and the influence of this architecture on the tissue behavior, especially when the characterization of the different vascular wall components will be determined.

CONCLUSION: The ability of BS to characterize biological samples opens applications in tissue engineering field, especially as a tool for a better understanding of vascular diseases.

Keywords: Polyelectrolyte multilayer films, Brillouin spectroscopy, viscoelasticity, vascular substitutes

1. Introduction

Vascular diseases inducing high morbidity and mortality are today one of the most challenging research domain in medical science [1]. In this respect, autologous vessels remain the materials of choice for arterial reconstruction and bypass procedures because of the natural compliancy of the vessels and the antithrombogenic potential induced by endothelial cells. However, autografts can be unsuitable or unavailable [2,3], thus replacement proves to be problematic. The development of a functional small-diameter vascular graft has long been a “holy grail”. According to the tissue engineering paradigm, cells

* Address for correspondence: P. Menu, 1 Avenue du Maréchal Juin, 51100 Reims, France. Tel.: +33 (0)3 83 68 54 57; Fax: +33 (0)3 83 68 54 09; E-mail: patrick.menu@univ-lorraine.fr.

1 are seeded on a scaffold composed of synthetic polymer or natural material [2,3]. Then, the tissue is
2 matured *in vitro* and the construct is implanted in the appropriate anatomic location as prosthesis [2].
3 Unfortunately, the high thrombogenic surface and the poor mechanical properties of synthetic grafts
4 (Dacron® or GoreTex®) limit their use as small caliber grafts [1,2]. The cryopreserved arteries, from hu-
5 man vessel banks, provide a promising way for vessel replacement. Nevertheless, cryopreservation pro-
6 cedure induces structural changes that strongly modifies arterial wall mechanical properties and alters
7 the integrity of the endothelial lining [4–6]. Since 2003, our group has used polyelectrolyte multilayer
8 films (PEMFs) as coating for vascular tissue engineering. Previously, results showed that PEMFs made
9 of polycation: poly(allylamine hydrochloride) (PAH) and polyanion: poly(styrene sulfonate) (PSS), in-
10 duce strong adhesion and retention of mature endothelial cells as well as glass [7], expanded polyte-
11 trafluoroethylene [8] or cryopreserved arteries [2,9] surfaces. This adhesion resists even under strong
12 shears [10].

13 Despite numerous efforts that have been realized to improve the vascular allograft cryopreservation,
14 a poor patency is observed due especially to a change of the mechanical properties of the tissue [4,11].
15 In order to prevent abnormal smooth muscle cells (SMCs) proliferation at the anastomotic junction,
16 similar mechanical properties (compliance) between implanted graft and recipient vessels are important.
17 The cryopreservation procedure leads to an alteration of collagen/elastin network which modifies the
18 mechanical properties of the arteries. Recently, we demonstrated that PAH/PSS architecture improves
19 the compliance of cryopreserved arteries. Moreover, no SMCs proliferation at the anastomotic junction
20 after rabbit carotid bypass was observed.

21 Nowadays, several experimental techniques are available for the mechano-elastic characterization of
22 materials, which provide information at different experimental conditions. For instance, torsion pen-
23 dum informs about the shear modulus G , Dynamic Mechanical Analysis (DMA) gives the Young's
24 modulus E , micro-harness, or micro-indentation, gives information about the Knoop hardness H_k and
25 the Vickers hardness H_v from which E is deduced, acoustic microscopy (ultrasounds) and Brillouin
26 spectroscopy allow reaching the set of elastic constants c_{ij} [12]. The frequency of the measurement has
27 also to be taken into account, from static measurement for micro-hardness to some GHz for Brillouin
28 spectroscopy (frequency of the acoustic phonons in the material), by the Hz range for torsion pendulum
29 and DMA, and MHz–GHz for ultrasounds). Brillouin spectroscopy is the only technique to avoid con-
30 tact for measurement, which may be a crucial point for many experiments, especially when the sample
31 has to be measured in a liquid medium. Also, only Brillouin spectroscopy provides, besides c_{ij} , the
32 optical index n of the material. And this is the only technique, with micro-indentation, to be able, with
33 what is called Brillouin microscopy, to give local information, in the range of μm^3 instead of mm^3 for
34 all the other techniques. Some of these techniques are rather well adapted to measure the mechanical
35 properties of biological tissues, like acoustic microscopy [13] which may be applied for example to
36 the qualitative assessment of biomechanical micro structural properties of the bone-implant interface,
37 or micro-hardness also useful for bones structures [14]. So, for both of soft and hard tissues (micro-)
38 Brillouin spectroscopy is one of the most promising techniques.

39 Brillouin spectroscopy allows reaching the elastic constants thanks to the sound velocity in the ma-
40 terial. It is a powerful technique, not widely used because requiring optical tweaks sometimes delicate,
41 but very useful to characterize mechanical properties of crystalline single crystals or thin films [15], and
42 especially adapted to liquid [16] and soft materials such as oligomers [17,18] and polymer nanocompos-
43 ites [19].

44 On biological materials, Mathieu et al. showed recently that micro-Brillouin scattering allows to mea-
45 sure the elastic properties of newly formed bone tissue with a $10 \mu\text{m}$ resolution providing the means

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

1 to differentiate mature and newly formed bone microscopic elastic properties following an approach
2 coupled with histological analysis [20]. The results demonstrate the feasibility of micro-Brillouin scat-
3 tering measurements to investigate the elastic properties of bone tissue [21]. The aim of our study was
4 (i) to characterize the composition of the vessel wall, and (ii) to assess the potential effect of PEMFs on
5 vessels behavior. The viscoelasticity of blood vessels functionalized or not with PEMFs, was evaluated,
6 with this non-destructive and contactless Brillouin spectroscopy method. This study was performed on
7 various types of vessels which exhibited specific behavior (more or less elastic) as function of their
8 intrinsic properties and components.
9

10
11 **2. Material and methods**
12

13 *2.1. Isolation of blood vessels*
14

15 *2.1.1. Obtaining umbilical arteries*
16

17 In accordance with the law of bioethics and clinical research, because the agreement “to sell fragments
18 of umbilical cord non-therapeutic” established between the Laboratory and the Regional Maternity in
19 Nancy, and after informed consent of the mother, umbilical cords were removed. They were stored in
20 HBSS buffer, at 4°C before being brought to the laboratory. The umbilical arteries are extracted from
21 the cord using sterile clamps and placed in sterile cryotubes (Nunc®, France) containing 1 ml of medium
22 cryopreservation to be frozen by step. The cryopreservation medium is composed of 70% of culture
23 medium supplemented with 20% FBS serum and of 10% dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma, France)
24 Cryotubes stored overnight at -80°C, are stored in liquid nitrogen (-180°C). Arteries should be thawed
25 at 37°C before use and then rinsed in a decontamination solution consisting of HBSS (Sigma, France)
26 supplemented with 100 IU/ml penicillin (Gibco, France), 100 µg/ml streptomycin (Gibco, France) and
27 2.5 µg/ml Fungizone® (Gibco, France) to remove all traces of DMSO.
28

29 *2.1.2. Recovery of vena cava, femoral and carotid arteries*
30

31 All vessel removals were performed in accordance with the ethical rules (Decree No. 2001-131, re-
32 lated to the European Directive 86-609-EEC). New Zealand white rabbits male 3 ± 0.5 kg from CEGAV
33 (France) are housed in approved conditions. After complete anesthesia (sodium pentobarbital, pursuant
34 to Decree No. 2001-131) and systemic heparinization (300 IU/kg, Sanofi Synthelabo, Paris, France) of
35 the animal, vessels were removed and the animals euthanized by injection of a lethal dose of sodium
36 pentobarbital. Vessels were stocked at 4°C in HBSS containing 100 UI/ml penicillin, 100 µg/ml strepto-
37 mycin, and 2.5 µg/ml Fungizone®.
38

39 *2.2. Preparation of vessels*
40

41 *2.2.1. De-endothelialization of intima*
42

43 The arteries were de-endothelialized before the films buildup. The ends of the artery were cannulated
44 and a small nozzle is fixed at each end allowing liquid injection.
45

46 The arteries were washed three times with HBSS and then filled with trypsin/ethylenediaminetetra
47 acetic acid (EDTA) 0.25% (Sigma, France) and incubated at 37°C. After 20 min of incubation, the
48 trypsin solution was flushed from the artery by perfusion with endothelial-cell culture medium. This
49 procedure was followed by an extensive HBSS wash.
50

1 2.2.2. *Construction of PEMFs into vessels*

2 The intima of blood isolated vessels was covered with a film MPE (PAH-PSS)₃-PAH. The film is
 3 injected into the artery. All injected solutions were sterilized by filtration (0.22 µm, Millipore, France).
 4 The arteries were washed twice with Tris/NaCl, and the solution of polycations (PAH) constituting the
 5 first layer was put down. After 10 min of incubation at room temperature, three washes of three minutes
 6 Tris/NaCl were made to remove excess polyelectrolyte. The second layer of the polyanion (PSS) was
 7 put down and incubated for 10 min follow by three washes performed. The operation was repeated
 8 until the desired number of layers. Inner arteries coated by the film were kept overnight at 4°C in a
 9 decontamination solution of HBSS (Sigma, France) supplemented with 100 IU/ml penicillin (Gibco,
 10 France), 100 µg/ml streptomycin (Gibco, France) and 2.5 µg/ml Fungizone® (Gibco, France) to remove
 11 all traces of DMSO.

13 2.3. *Characterization of PEM film deposition in the arterial lumen*

16 2.3.1. *Characterization by confocal microscopy*

17 To view the film (PAH-PSS)₃-PAH deposition into the arterial lumen, the polycation (PAH) constitute
 18 the last layer was coupled to fluorochrome fluorescence green: FITC (fluorescein iso cyanate Thio) and
 19 observed by confocal laser scanning microscopy (method described by Kerdjoudj and colleagues [2]).

20 2.3.2. *Histological characterization*

21 Arteries whose light treated by film deposition PEMs were colored according to the method of Harris
 22 hematoxylin, eosin and saffron (H&S), allowing to show the nuclei blue-violet, red-pink cytoplasm,
 23 collagen fibers and connective fibers in saffron. Due to an interaction of eosin with polyanion (PSS), the
 24 film appeared in red. Staining of arterial samples was performed according to the method described by
 25 Kerdjoudj and colleagues [2].

28 2.4. *Brillouin spectroscopy*

30 2.4.1. *Principle*

31 Brillouin spectroscopy is based on the analysis of the light scattered by a material. The incoming
 32 photons interact with acoustic phonons propagating in the material, and in the spectrum of the scattered
 33 light appears the characteristic frequencies of these phonons, allowing calculating the velocity of the
 34 acoustic waves in different directions of the material. Knowing the density of the medium, we can
 35 calculate the various elastic constants of the material including the longitudinal c_{11} and transverse c_{44}
 36 constants, linked with its Young's modulus and shear modulus.

37 The interaction between the photons of the incident beam (carried by the wave vector k_i with energy:
 38 $\hbar\omega_i$) and acoustic phonons in the material (carried by the wave vector k_s with energy: $\hbar\omega_s$) leads to
 39 frequency shifts (f) of the scattered laser light. Of course, for photons and phonons involved in the
 40 scattering process, energy and momentum conservation holding as usual in inelastic scattering processes.
 41 During this inelastic diffusion, there is conservation of the energy (1) and of the amount of movement (2):

43
$$\hbar\omega_s = \hbar\omega_i \pm \hbar\Omega, \quad (1)$$

45
$$\hbar k_s = \hbar k_i \pm \hbar q. \quad (2)$$

1 The frequency is directly related to the propagation velocity (v) of the acoustic phonons by the relation:

$$2 \quad 3 \quad 4 \quad 5 \quad v = \frac{f \times \lambda_0}{\sqrt{2}}, \quad (3)$$

6 where λ_0 is the incident wavelength.

7 As the energy transfer between photons and phonons is extremely small in BS (the ratio between their
8 frequencies is about 10^{-5}) the vectors \vec{k}_i and \vec{k}_s have the same length. From geometric arguments and
9 using (1) and (2), the relation between the sound velocity v , the acoustic phonon frequency f and its
10 wave vector q may be easily calculated:

$$12 \quad 13 \quad v = \frac{2\pi f}{q} = \frac{\lambda_0 f}{2n \sin(\theta_i/2)}, \quad (4)$$

14 where λ_o is the laser wavelength and θ_i is the angle between the incident and scattered wave vectors \vec{k}_i
15 and \vec{k}_s .

16 The elastic modulus related to the wave vector \vec{q} can then be calculated, knowing the mass density ρ
17 of the material:

$$20 \quad 21 \quad c(\vec{q}) = \rho \cdot v^2(\vec{q}). \quad (5)$$

22 2.4.2. Brillouin measurement

23 The Brillouin spectrometer measurements were performed using a laser (power of 200 mW and wave-
24 length 532 nm) with a spectral narrow bandwidth and a very fine stable power. The received power level
25 of the sample is approximately 100 mW. The laser beam through the optical path allows a measurement
26 of average diameter of 50 μm . The measurements were made at room temperature and the sample is
27 studied at the air was not heated by the beam. The intensity of the spectral distribution is analyzed by
28 a Fabry–Perot (2×3 tandem pass) brand JRS Scientific Instruments (Switzerland), it is the Tandem
29 Fabry–Perot Interferometer AMT-1. The opto-electronic conversion is carried out by a photomultiplier
30 and the spectrum is accumulated on a multichannel analyzer (MCA). The whole system is controlled by
31 computer to increase the stability of the optical path. The mirrors of the interferometer were settled with
32 a gap of 3 mm between them and the configuration of the optical path was that of “back scattering”.

33 The particular scattering geometry (Fig. 1), with the incident laser beam at an angle of 45° with respect
34 to the faces of our sample and the scattered light also collected perpendicular to the incident beam: this
35 particular geometry is named 90A [22] (Fig. 1) – permits determining the acoustic velocity without
36 requiring knowledge of the refractive index [23].

39 3. Results and discussion

40 41 3.1. Checking the film deposition in the arterial lumen

42 The presence of the film (PAH-PSS)₃-PAH into the vessels surface was visualized through both of
43 methods: histology and confocal laser scanning microscopy observation (CLSM). The results are pre-
44 sented in Fig. 2. Cross sections of umbilical artery de-endothelialized were visualized by H&S staining.
45

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46

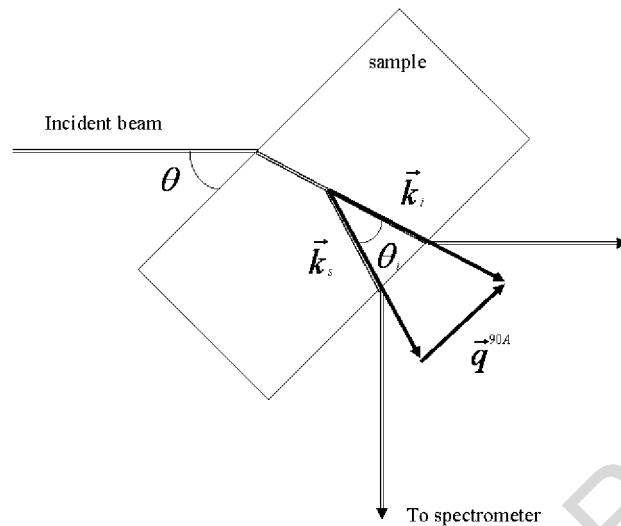


Fig. 1. 90A scattering geometry where \vec{k}_i is the wave-vector of the incident photon, \vec{k}_s is the wave-vector of the detected scattered photon and \vec{q}^{90A} the wave-vector of the involved phonon.

Figure 2(A) showed staining of nuclei in blue-violet, the presence of all the cells of the arterial wall. The same labeling was also performed on cross-sections of artery de-endothelialized and coated by the PEMF (Fig. 2(B)). By interaction between eosin and the polyanion (PSS), the PEMF appears in red. Thus we could observe a continuous red line across the luminal surface of the artery. This means that the film has been deposited over the all de-endothelialized luminal surface in a homogeneous and continuous way without any gaps visible. No cell nuclei are visible in the intima (Fig. 2(A)). Film deposition is also confirmed by CLSM (Fig. 2(C)). Cross-sections of artery were observed by CLSM. Fluorescence (FITC) at the lumen of the artery confirms the film deposition continuous and regular. In addition, by these two of techniques, no change in the structure of the wall was observed. This suggests the safety of the film components on the structure of the vascular wall.

Our observations are correlated with the work of Kerdjoudj et al., showing with these techniques the correct de-endothelialization of arteries and their recovery by PEMFs with the only difference being the type of fluorochrome used which proves to be rhodamine coupled with the polyanion [2].

3.2. Elastic study by Brillouin spectroscopy

3.2.1. Characterization of vascular tissues

The spectrum in Fig. 3 shows typical results obtained with Brillouin spectroscopy measurements of vena or arteries without endothelial cell. At low frequencies (<15 GHz), a very strong signal appears and a double peak is recorded at 23 and 24 GHz which derives from biological tissue. The first intense signal at low frequency is probably induced by the support (made with polystyrene sulfonate) on which the vessel is fixed, for other part, by longitudinal phonon in the liquid in which bathes the vein. The double peak may correspond to the elastin and collagen which are the two main organic components of the vessels. However, Cusack et al., which consisted in studying the viscoelastic properties of collagen by Brillouin spectroscopy, provide access to various values, including collagen density ($\rho = 1.12 \text{ g/cm}^3$), elastic constant ($c_{11} = 11.7 \text{ GN}\cdot\text{m}^2$) of collagen and the velocity ($v = 3202.19 \text{ m/s}$) [24].

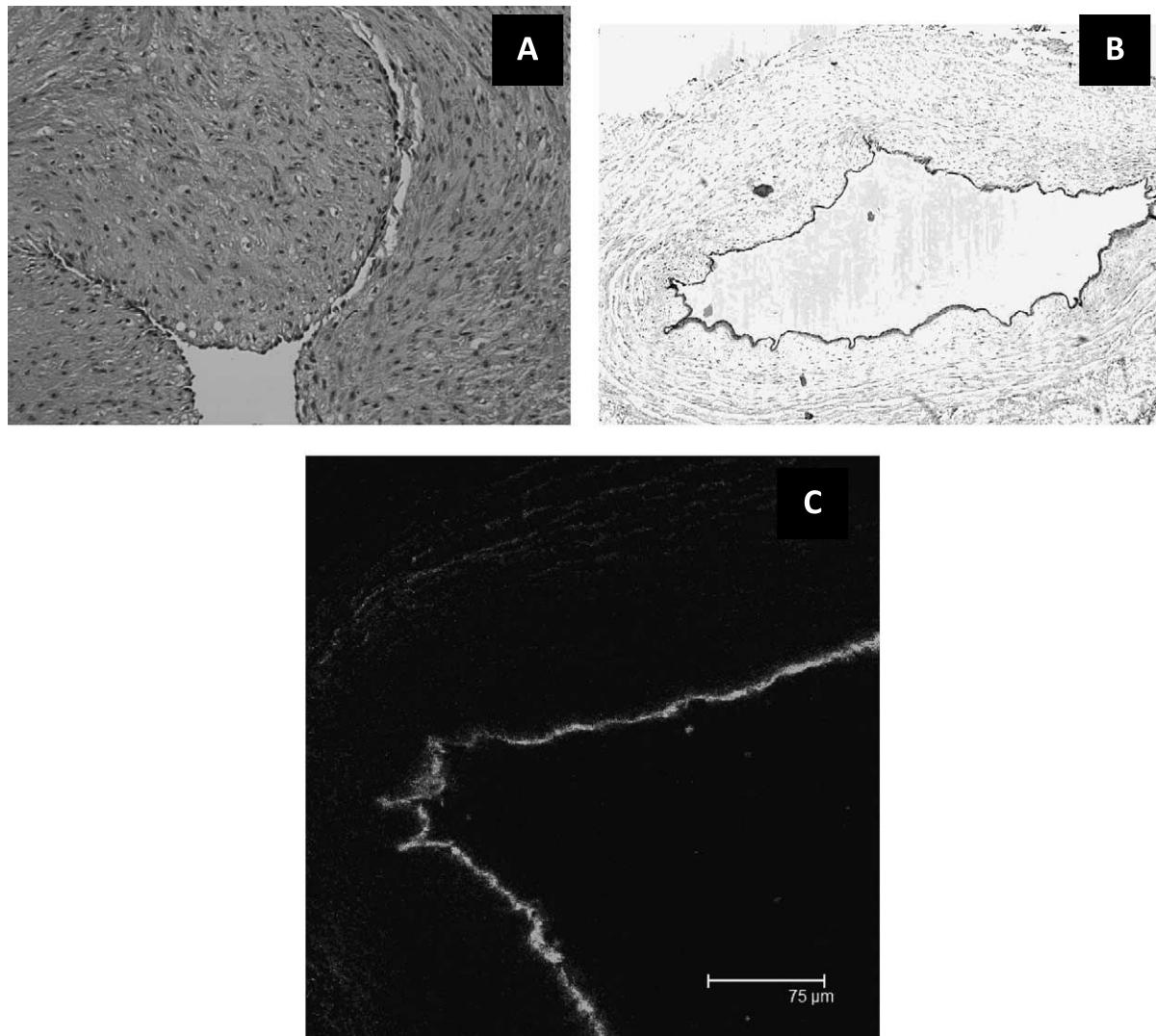


Fig. 2. Checking the film deposition in the lumen of the umbilical arteries de-endothelialized. Histological cross section of cryopreserved umbilical arteries (A) and polyelectrolyte multilayer film coated arteries (B). The arteries were stained by hematoxylin/eosin/Safran (objective $\times 20$). Fluorescent image of film built from FITC labeled polycation CLSM visualization (C) (sp2, AOBS, Leica, Germany), Numerical Opening 0.8; objective $\times 40$.

The frequency is directly related to the propagation velocity (v) of the acoustic phonons by the relation of the Eq. (3) (as described before). Frequency deduced according to their works would be close to 14 GHz. This value is quite far from our double peak at 23 and 24 GHz. We must therefore look beyond the origin of this double signal is found on each spectrum irrespective of the type of blood vessel.

The elastic wave velocity corresponding to our results, however, can not be calculated directly because with the configuration (backscatter) for which we obtained this signal, the refractive index must be known in order to extract the frequency of the phonon wave velocity acoustic.

The first part of the work was to detect the acoustic phonons (i.e. elastic waves) which propagate in biological tissues. The results are conclusive since they have shown that the response of acoustic

1 phonons from the tissue is identifiable on the spectrum, even if the signal from the strong liquid and
 2 polymer constituting the cell is several orders of magnitude more intense.

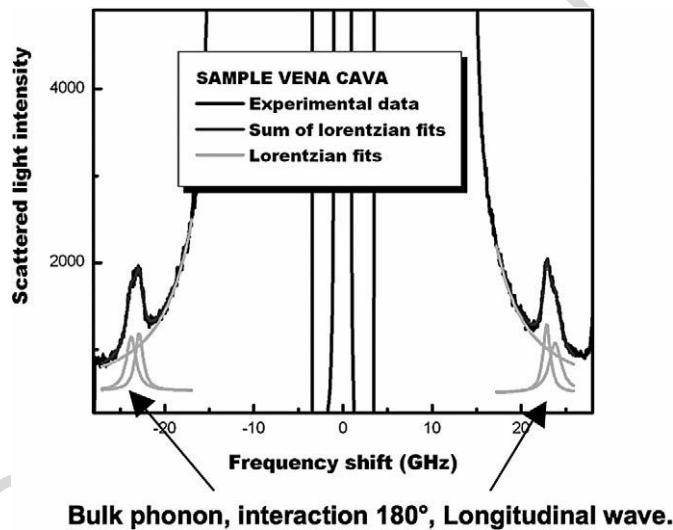
3 3.2.2. Identification of different types of vessels

4 All vessels analyzed by Brillouin spectroscopy have a spectrum of the same shape similar of the
 5 spectrum in Fig. 3. The vessels exhibit two acoustic phonons with frequencies at 23 and 24 GHz. Table 1
 6 gives the absolute areas of the two peaks for different types of vessels (vena cava, femoral and carotid
 7 arteries) studied and the relationship between these two areas. These results show important variations
 8 between different samples.

9 If no changes of the frequencies are observed among the vessels, the variation of the intensity of these
 10 peaks is characteristic of the type of vessel. This result obtained by Brillouin spectroscopy could be very
 11 interesting for specialists working on tissues, as it gives complementary information about the nature of
 12 direct vessels and even, could be a tool for a better understanding of vascular disease.

13 3.2.3. Influence of PEMFs

14 This part of the study was to determine the influence of polyelectrolyte multilayer films on the overall
 15 elastic properties of the vessels. These multilayer films have the property of being able to cover the
 16



34 Fig. 3. This spectrum shows typical results obtained with BS measurements of vena or arteries within a cell. Two phonons on
 35 both sides of the Rayleigh (centre of the spectrum) line attributed to vena cava. In the centre of the spectrum the large peak
 36 comes not only from Rayleigh scattering but also from liquid and cuvette wall acoustic phonons.

38 **Table 1**
 39 Brillouin Peak intensities characteristics of the different types of vessels

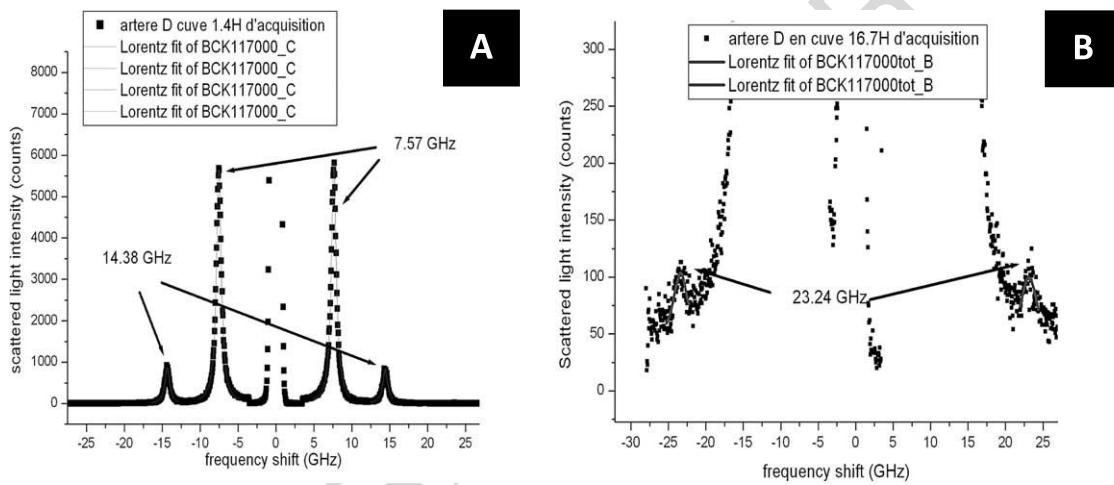
Samples	Vena cava	Aorta	Carotid	Femoral
23 GH peak area	400	800	1105	2000
24 GHz peak area	180	150	1270	800
A(23 GHz)/A(24 GHz)	2.2	5.3	1	2.5

45 *Notes:* No clear change in phonons frequencies could be pointed out. However a clear change
 46 in relative intensity of the peaks at 23 and 24 GHz were observed.

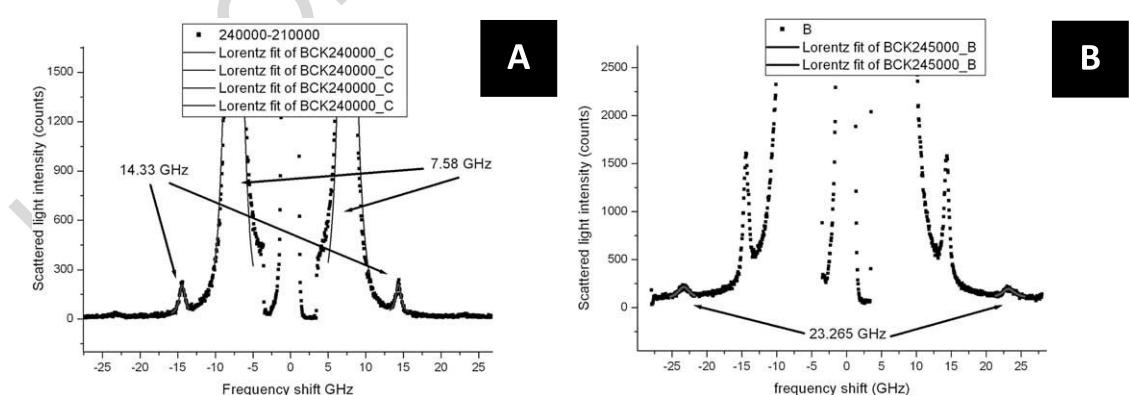
1 surfaces thoroughly (glass, substitutes) [25] and improve adhesion, or repulsion depending on charge of
2 the last layer [9].

3 Our study was performed on de-endothelialized umbilical arteries observed *in situ* in biological fluid.
4 Therefore, treatment of the spectrum had to overcome great majority of signals from the liquid responding
5 to 7.6 GHz and the polymer of the tank which respond to 14.4 GHz on the spectra of the umbilical
6 artery in Fig. 3.

7 With the treatment of the films arteries (Fig. 4), the spectrum is obtained under the same conditions as
8 for untreated arteries: again, the peak of saline, the peak of the plastic and fabric signals were visible. No
9 influence of PEMFs is thus demonstrated. However, these multilayer films actually represent on glass a
10 thickness of 10 to 15 nm; if the coating is the same on luminal surface of the arteries as glass, it should
11 represent around 1% of the analyzed thickness by Brillouin spectrometry. The reproducibility of the
12 measurement frequency, however, illustrates the accuracy of the technique.



30 Fig. 4. Brillouin Spectra of an artery umbilical: absence of PEMFs.
31
32



45 Fig. 5. Brillouin Spectra of an artery umbilical: presence of PEMFs.
46

1 4. Conclusion

2 BS is an interesting analytic method that could be used to improve the understanding of biological
 3 tissue behavior, especially when modified with coating surface. This work suggested that these films do
 4 not seem to alter dynamic functionality to assure blood circulation. The only observed differences in
 5 signals appear to be due to the composition of tissue layers that are closely next to the tunica intima. The
 6 ability of BS to characterize biological samples opens the possibility of a wide range of applications,
 7 more specifically in tissue engineering field, and perhaps to be a tool for a better understanding of
 8 vascular diseases.

12 References

- [1] J. Chlupáć, E. Filová and L. Bacáková, Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery, *Physiol. Res.* **58**(Suppl. 2) (2009), S119–S139.
- [2] H. Kerdjoudj, N. Berthelemy, S. Rinckenbach, A. Kearney-Schwartz, K. Montagne, P. Schaaf et al., Small vessel replacement by human umbilical arteries with polyelectrolyte film-treated arteries: *in vivo* behavior, *J. Am. Coll. Cardiol.* **52**(19) (2008), 1589–1597.
- [3] A. Rodriguez-Morata, I. Garzon, M. Alaminos, N. Garcia-Hondurilla, M.C. Sanchez-Quevedo, J. Bujan et al., Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells, *Ann. Vasc. Surg.* **22**(3) (2008), 440–448.
- [4] B. Lehalle, C. Geschier, G. Fiévé and J.F. Stoltz, Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts, *J. Vasc. Surg.* **25**(4) (1997), 751–752.
- [5] J.C. Park, H.J. Sung, D.H. Lee, Y.H. Park, B.K. Cho and H. Suh, Viability of cells in cryopreserved canine cardiovascular organs for transplantation, *Yonsei Med. J.* **41**(5) (2000), 556–562.
- [6] G. Pascual, N. García-Hondurilla, M. Rodríguez, F. Turégano, J. Bujan, J.M. Bellón, Effect of the thawing process on cryopreserved arteries, *Ann. Vasc. Surg.* **15**(6) (2001), 619–627.
- [7] 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.
- [8] V. Moby, C. Boura, H. Kerdjoudj, J.-C. Voegel, L. Marchal, D. Dumas et al., Poly(styrenesulfonate)/poly(allylamine) multilayers: a route to favor endothelial cell growth on expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular grafts, *Biomacromolecules* **8**(7) (2007), 2156–2160.
- [9] H. Kerdjoudj, C. Boura, L. Marchal, D. Dumas, P. Schaff, J.-C. Voegel et al., Decellularized umbilical artery treated with thin polyelectrolyte multilayer films: potential use in vascular engineering, *Biomed. Mater. Eng.* **16**(Suppl. 4) (2006), S123–S129.
- [10] H. Kerdjoudj, N. Berthelemy, F. Boulmedais, J.-F. Stoltz, P. Menu and J.-C. Voegel, Multilayered polyelectrolyte films: a tool for arteries and vessel repair, *Soft Matter* **6** (2010), 3722–3734.
- [11] W.C. Blondel, J. Didelon, G. Maurice, J.P. Carteaux, X. Wang and J.F. Stoltz, Investigation of 3-D mechanical properties of blood vessels using a new *in vitro* tests system: results on sheep common carotid arteries, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **48**(4) (2001), 442–451.
- [12] R. Hadji, V.S. Nguyen, B. Vincent, D. Rouxel and F. Bauer, Preparation and characterization of P(VDF-TrFE)/Al₂O₃ nanocomposite, *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **59**(1) (2012), 163–167.
- [13] J. Cano, J. Campo, J.J. Vaquero, J.M. Martínez and A. Bascones, High resolution image in bone biology I. Review of the literature, *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.* **12**(6) (2007), E454–E458.
- [14] M. Binkowski, Z. Wróbel and A. Dyszkiewicz, The changes caused by modification of biomechanical properties of a bone, *Stud. Health Technol. Inform.* **103** (2004), 12–18.
- [15] M.G. Beghi, F. Di Fonzo, S. Pietralunga, C. Ubaldi and C.E. Bottani, Precision and accuracy in film stiffness measurement by Brillouin spectroscopy, *Rev. Sci. Instrum.* **82**(5) (2011), 053107.
- [16] A.A. Maznev, K.J. Manke, C. Klieber, K.A. Nelson, S.H. Baek and C.B. Eom, Coherent Brillouin spectroscopy in a strongly scattering liquid by picosecond ultrasonics, *Opt. Lett.* **36**(15) (2011), 2925–2927.
- [17] J. Krüger, U. Müller, R. Bactavatchalou, J. Mainka, C. Gilow, W. Possart et al., The generalized Cauchy relation as an universal property of the amorphous state, *Journal De Physique* (2005), 45–49.
- [18] R. Bactavatchalou, P. Alnot, J. Bailer, M. Kolle, U. Müller, M. Philipp et al., The generalized Cauchy relation: A probe for local structure in materials with isotropic symmetry, *Journal of Physics: Conf.* **1** (2006), 111–117.
- [19] A. Sato, W. Knoll, Y. Pennec, B. Djafari-Rouhani, G. Fytas and M. Steinhart, Anisotropic propagation and confinement of high frequency phonons in nanocomposites, *J. Chem. Phys.* **130**(11) (2009), 111102.

- 1 [20] V. Mathieu, K. Fukui, M. Matsukawa, M. Kawabe, R. Vayron, E. Soffer et al., Micro-Brillouin scattering measurements
2 in mature and newly formed bone tissue surrounding an implant, *J. Biomech. Eng.* **133**(2) (2011), 021006.
3 [21] G. Haïat, F. Padilla, F. Peyrin and P. Laugier, Variation of ultrasonic parameters with microstructure and material properties
4 of trabecular bone: a 3D model simulation, *J. Bone Miner. Res.* **22**(5) (2007), 665–674.
5 [22] M. El Hakiki, J. Eschbach, D. Rouxel, B. Vincent, S. Vialle, J. Krüger et al., Elastic and piezoelectric constants of
6 potassium niobate studied by Brillouin spectroscopy, *Ferroelectrics* **351** (2007), 96–104.
7 [23] J. Krüger, U. Müller, R. Bactavatchalou, D. Liebschner, M. Sander, W. Possart et al., Mechanical interphases in epoxies
8 as seen by nondestructive high-performance Brillouin microscopy, in: *Adhesion: Current Research and Applications*,
9 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006, p. 125.
10 [24] S. Cusack and A. Miller, Determination of the elastic constants of collagen by Brillouin light scattering, *J. Mol. Biol.*
11 **135**(1) (1979), 39–51.
12 [25] H. Kerdjoudj, V. Moby, N. Berthelemy, M. Gentils, C. Boura, L. Bordenave et al., The ideal small arterial substitute: Role
13 of cell seeding and tissue engineering, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **37**(1,2) (2007), 89–98.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

Résumé :

Les pathologies vasculaires représentent aujourd’hui l’une des principales causes de mortalité mondiale et leur nombre ne cesse d’augmenter. Les greffons autologues (disponibilité faible) et les prothèses synthétiques inadaptées pour des vaisseaux de diamètre inférieur à 6 mm ne répondent pas à la demande et il existe aujourd’hui, un réel besoin en substitut vasculaire pour les petits vaisseaux. Ainsi, le concept de l’ingénierie vasculaire semble très prometteur. Cette approche est fondée sur l’utilisation de matrices « scaffold » associées à une composante cellulaire pour construire, dans des conditions environnementales adaptées, un vaisseau qui réponde et réagisse aux contraintes physiologiques. Dans cet objectif, la fonctionnalisation d’une media vasculaire constituée de cellules musculaires lisses (CML) est prérequis. Aux CML matures qui ne sont pas de bons candidats (perte de leur phénotype contractile lors de la culture), nous avons identifié les cellules souches mésenchymateuses (CSM) de la gelée de Wharton (tissu conjonctif du cordon ombilical) comme source cellulaire majeure. Leur facilité de récupération, leur présence en grand nombre, leur faible immunogénérité et leur capacité de prolifération et différenciation en font d’excellents candidats en ingénierie tissulaire. Dans ce travail nous avons déterminé les conditions favorables à l’obtention d’un phénotype CML fonctionnelles et montré l’impact de différents paramètres environnementaux (apport en oxygène, facteurs de croissance, teneur en sérum...) sur le comportement des CSM de la gelée de Wharton. Nous avons pu montrer que 1) ces cellules étaient capables de se différencier en cellules au phénotype contractile comparable à celui des CML matures. 2) L’utilisation des films multicouches de polyélectrolytes (FMP) en tant que support d’adhérence cellulaire a montré que les CSM de la gelée de Wharton avaient un comportement spécifique selon la charge de surface conduisant vers une culture tridimensionnelle inadaptée sur (PAH-PSS)₃ PAH et en monocouche sur films (PAH-PSS)₄, 3) Ces cellules pouvaient être cultivées sur des hydrogels d’alginat fonctionnalisés par les FMP pour fournir un feuillet cellulaire susceptible de recréer une media vasculaire.

Mots clés : Cellules souches mésenchymateuses, gelée de Wharton, film multicouches de polyélectrolytes, média vasculaire, cellules musculaires lisse, substituts vasculaires, ingénierie tissulaire

Abstract :

Vascular diseases represent today one of the leading causes of global mortality and the number is increasing. Autologous transplants (limited availability) and synthetic prostheses unsuitable for vessels with a diameter less than 6 mm are not sufficient and there is now a real need of vascular substitute for small vessels. Thus, the concept of vascular engineering seems very promising. This approach is based on the use of "scaffold" associated with a cellular component to build in suitable environmental conditions, a vessel that reacts with the physiological constraints. To this aim, the functionalization of an incorporated media vascular smooth muscle cells (SMC) is a prerequisite. Instead of using Mature CML which are not good candidates (loss of contractile phenotype in culture), we identified mesenchymal stem cells (MSCs) from Wharton's jelly (connective tissue of the umbilical cord) as a major cellular source. Their easiness of recovery, their presence in large numbers, their low immunogenicity, their proliferation and differentiation capacity make them excellent candidates for tissue engineering. In this work we determined the conditions for obtaining a functional CML phenotype and showed the impact of different environmental parameters (oxygen level, growth factors, serum content ...) on the behavior of CSM jelly Wharton. We have shown that: 1) these cells were able to differentiate into cells in contractile phenotype comparable to that of mature SMC. 2) The use of multilayer films of polyelectrolytes as cell adhesion support has shown that MSCs from the Wharton jelly had a specific behavior according to surface charge leading to an inappropriate three-dimensional cultures (PAH-PSS)₃-PAH and monolayer films on (PAH-PSS)₄, 3) These cells could be grown on functionalized alginate hydrogels to provide a cellular sheet which may recreate a vascular media.

Keywords: mesenchymal stem cells, Wharton's jelly, polyelectrolyte multilayer film, vascular media, smooth muscle cells, vascular substitutes, tissue engineering