



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>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ-NANCY 1
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ-ENVIRONNEMENT

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ-NANCY 1
Spécialité : Ingénierie Cellulaire et Tissulaire

Présentée

Par

Vanessa MOBY

Le 29 Février 2008

**Multicouche de polyélectrolytes et CSM : deux acteurs
complémentaires nécessaires à l'endothélialisation autologue de
prothèses vasculaires synthétiques en PTFEe**

Directeur de thèse : Dr. P. MENU

JURY

Rapporteurs :

**L. BORDENAVE
D. VAUTIER**

**Professeur
Ingénieur de recherche**

**Univ. V. Ségalen Bordeaux 2
INSERM Strasbourg**

Examineurs :

**J.F. STOLTZ
D. LAURENT-MAQUIN
P. BRAVETTI
P. MENU**

**Professeur
Professeur
Maître de conférences
Maître de conférences**

**UHP-Nancy 1
Univ. Reims
UHP-Nancy 1
UHP-Nancy 1**

Avant-propos et remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique entre le laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA-UMR CNRS 7563 (Faculté de Médecine de Nancy) et l'unité INSERM 595 (Faculté de Médecine, Strasbourg).

A Sarah et Pascal

*A ma mère et à toute ma famille,
ainsi qu'à tous mes amis, pour leur soutien et leurs encouragements.
En mémoire de mes grands-parents*

A Marine, qui a su être une amie à tous les instants, a supporté mes sauts d'humeur et m'a apporté son soutien

En Mémoire de Monsieur Luc MARCHAL qui m'a beaucoup aidé dans cette thèse aussi bien sur le plan scientifique que moral. Je ne saurais exprimer le vide qu'il a laissé au Laboratoire. Puisse t'il toujours rester dans nos cœurs...

REMERCIEMENTS

Mes travaux ont été réalisés au laboratoire de mécanique et ingénierie cellulaire et tissulaire de l'UMR-CNRS 7563 de l'Université Henri Poincaré de Nancy. Je tiens à exprimer à Monsieur le Professeur **Jean-François STOLTZ**, Directeur du laboratoire et membre de l'Académie Française de Médecine, ma profonde gratitude pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. La confiance qu'il m'a accordée et ses encouragements m'ont beaucoup aidée à mener à terme le travail. Qu'il soit assuré de mon attachement.

Monsieur **Patrick MENU**, Maître de Conférences Universitaire à la Faculté de Pharmacie de Nancy, m'a proposé le thème de recherche et a assuré la direction scientifique de cette thèse. Sa grande disponibilité a permis un suivi permanent du déroulement des travaux. Les discussions et les conseils qu'il m'a prodigués m'ont été d'une grande utilité. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Madame **Laurence BORDENAVE**, Professeur des Universités (Bordeaux 2) et Monsieur **Dominique VAUTIER**, Ingénieur de Recherche à l'INSERM (Strasbourg) ont accepté être les rapporteurs de cette thèse. Leurs commentaires et leurs remarques constitueront sans doute un précieux concours. Je les remercie vivement.

Je suis également très sensible à l'honneur que me fait Madame **Dominique LAURENT-MAQUIN**, Professeur des Universités (Reims) et Monsieur **Pierre BRAVETTI**, Maître de Conférences Universitaire à la Faculté d'Odontologie de Nancy, en acceptant de juger ma thèse.

Je remercie très sincèrement Monsieur **Pierre LABRUDE**, Professeur de l'Université Henri Poincaré de Nancy pour les conseils et l'aide qu'il m'a apportés dans la correction de ce manuscrit, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à Madame le Docteur **Sylvaine MULLER**, Chargée de Recherche à l'INSERM, qui m'a permis de faire mes premiers pas dans ce Laboratoire et a su toujours être à mon écoute.

Je remercie vivement Monsieur **Dominique DUMAS**, Ingénieur de Recherche au Laboratoire, pour sa bonne humeur et son aide précieuse en microscopie.

Je voudrais aussi remercier l'UTCT, en particulier Mesdames les Docteurs **Danièle Bensoussan** et **Véronique DECOT**, pour leur disponibilité, leur gentillesse et pour m'avoir fourni les CSM.

Je remercie aussi tout particulièrement Madame **Monique GENTILS** pour son aide, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je tiens à remercier la **Fondation de France** pour m'avoir appuyé financièrement durant la fin de ma thèse.

A Julien, Nadia, Emilie et Annabelle pour nos fous rires et nos week-ends détente.

A Cindy, qui a su m'éviter la panique de dernière minute.

A tout le personnel du laboratoire ainsi qu'à mes collègues et notamment collègues de bureau et en particulier Assia pour m'avoir encouragée et supportée durant ces années.

Table des matières

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	9
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	16
LISTE DES ABREVIATIONS	20
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	23
INTRODUCTION GENERALE	27
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	31
I - Les vaisseaux sanguins.....	32
<i>I.1 - Développement embryonnaire des vaisseaux sanguins</i>	<i>32</i>
I.1.1 - Vasculogenèse et angiogenèse	32
I.1.2 - La famille des VEGF et ses récepteurs	35
I.1.2.1 - Introduction.....	35
I.1.2.2 - VEGF-A.....	35
I.1.2.3 - VEGF-B	36
I.1.2.4 - Les récepteurs à VEGF	36
<i>I.2 - Structure et fonction des artères matures</i>	<i>38</i>
I.2.1 - La couche interne ou intima	38
I.2.2 - La média	40
I.2.3 - L'adventice	41
II - Les pathologies vasculaires et la chirurgie de pontage vasculaire.....	42
III - Ingénierie tissulaire.....	46
<i>III.1 - La matrice</i>	<i>47</i>
III.1.1 - Les prothèses artérielles en PTFE expansé (PTFEe)	48
III.1.2 - Modifications de surface des prothèses artérielles en PTFEe	51
III.1.2.1 - Ajout de molécules de la matrice extracellulaire et traitement des surfaces par butylamine ou rayons ultraviolets	51
III.1.2.2 - Techniques de transplantation électrostatique de CE.....	69
III.1.2.3 - Les films multicouches de polyelectrolytes	69

III.2 -	<i>Les cellules</i>	76
III.2.1 -	Limites des cellules endothéliales matures	76
III.2.2 -	Les cellules souches et progéniteurs	77
III.2.2.1 -	Les cellules souches embryonnaires	77
III.2.2.2 -	Cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	78
III.2.2.3 -	Les cellules progénitrices endothéliales (CPE).....	79
III.2.2.4 -	Les MAPC (<i>Multipotent Adult Progenitor Cell</i>).....	79
III.2.2.5 -	Les cellules souches mésenchymateuses (CSM).....	81
III.3 -	<i>Facteurs de croissance, facteurs mécaniques et différenciation endothéliale.</i>	88
III.3.1 -	Facteurs de croissance	88
III.3.1.1 -	La matrice de culture.....	88
III.3.1.2 -	Les densités d'ensemencement	88
III.3.1.3 -	Le pourcentage de sérum de veau fœtal (SVF)	88
III.3.1.4 -	Le type de facteur de croissance utilisé.....	89
III.3.2 -	Contraintes mécaniques.....	95
III.3.2.1 -	Paroi vasculaire et forces mécaniques.....	95
III.3.2.2 -	Différenciation en cellules endothéliales	95
IV -	Objectifs du travail de thèse	99
MATERIELS ET METHODES		100
I -	Culture cellulaire	101
I.1 -	<i>Définition</i>	101
I.1.1 -	Réactifs utilisés	101
I.1.1.1 -	HUVEC.....	101
I.1.1.2 -	CSM.....	102
I.1.2 -	Méthodologie	102
I.1.2.1 -	Isolement des HUVEC.....	102
I.1.2.2 -	Isolement des CSM humaines de la moelle osseuse	103
I.2 -	<i>Mise en culture, passage et congélation</i>	103
I.2.1 -	Réactifs utilisés	103
I.2.1.1 -	HUVEC.....	103
I.2.1.2 -	CSM.....	104
I.2.2 -	Méthodologie	104
I.2.2.1 -	HUVEC.....	104
I.2.2.2 -	CSM.....	105
I.3 -	<i>Ensemencement sur plaques de culture</i>	106
I.3.1 -	Ensemencement des HUVEC sur du PTFEe.....	106

I.3.1.1 -	Solutions de polyélectrolytes	106
I.3.1.2 -	Surfaces étudiées.....	107
I.3.1.3 -	Matériels et supports	107
I.3.1.4 -	Méthodologie	107
I.3.2 -	Ensemencement des CSM sur du verre.....	109
I.3.2.1 -	Polyélectrolytes utilisés.....	109
I.3.2.2 -	Surfaces étudiées.....	109
I.3.2.3 -	Matériels et supports	109
I.3.2.4 -	Méthodologie	109
I.3.3 -	Ensemencement des CSM sur du PTFEe	110
I.3.3.1 -	Solutions de polyélectrolytes	110
I.3.3.2 -	Surfaces étudiées.....	111
I.3.3.3 -	Matériels et supports	111
I.3.3.4 -	Méthodologie	111
II -	Stimulation des CSM.....	112
II.1 -	<i>Stimulation biochimique : facteur de croissance angiogénique (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor)</i>	112
II.2 -	<i>Stimulation mécanique : contraintes de cisaillement</i>	112
III -	Méthodologies analytiques.....	114
III.1 -	<i>Analyse du métabolisme cellulaire</i>	114
III.1.1 -	Réactifs.....	114
III.1.2 -	Principe.....	114
III.1.3 -	Méthodologie	115
III.2 -	<i>Analyse du cycle cellulaire</i>	116
III.2.1 -	Réactifs.....	116
III.2.2 -	Principe.....	116
III.2.3 -	Méthodologie	118
III.3 -	<i>Fluorescence-Immunofluorescence</i>	119
III.3.1 -	Les anticorps et réactifs utilisés.....	119
III.3.1.1 -	Les anticorps	119
III.3.1.2 -	Réactifs annexes.....	120
III.3.2 -	Marquage en immunofluorescence	120
III.3.2.1 -	Principe (Annexe 1)	120
III.3.2.2 -	Marquage pour analyse en cytométrie de flux	121
III.3.2.3 -	Marquage pour analyse en microscopie confocale.....	123
III.3.3 -	Marquage du cytosquelette.....	125

III.3.3.1 - Réactifs	125
III.3.3.2 - Principe	125
III.3.3.3 - Procédure	125
III.4 - Microscopie électronique à balayage	125
III.4.1 - Réactifs	125
III.4.2 - Principe	126
III.4.3 - Méthodologie	126
III.5 - Dosage des nitrites	126
III.5.1 - Réactifs	126
III.5.2 - Principe	127
III.5.3 - Méthodologie	127
IV - Analyses statistiques	128
RESULTATS ET DISCUSSION	129
I - Construction d'un film multicouche de polyélectrolytes sur la surface luminale d'un substitut vasculaire synthétique à base de PTFEe	130
I.1 - Résultats expérimentaux	131
I.1.1 - Mise en évidence du dépôt	131
I.2 - Discussion	132
I.3 - Conclusion	133
II - Evaluation de l'endothélialisation des substituts synthétiques	133
II.1 - Définition	133
II.2 - Résultats expérimentaux	134
II.2.1 - Viabilité des cellules endothéliales	134
II.2.2 - Etalement des cellules endothéliales	137
II.2.3 - Phénotype des cellules adhérentes	137
II.3 - Discussion	138
II.4 - Conclusion	141
III - Evaluation de la biocompatibilité du film multicouche de polyélectrolytes vis-à-vis des cellules souches mésenchymateuses	141
III.1 - Résultats expérimentaux	142
III.1.1 - Viabilité des cellules souches mésenchymateuses	142
III.1.2 - Morphologie cellulaire	144

III.1.3 -	Étalement des cellules souches mésenchymateuses sur substitut vasculaire synthétique	145
III.2 -	<i>Discussion</i>	147
III.3 -	<i>Conclusion</i>	149
IV -	Contrôle qualité et comparaison de l'expression de marqueurs de surface cellulaire et intracellulaires par les CSM et les CE	150
IV.1 -	<i>Résultats expérimentaux</i>	150
IV.2 -	<i>Discussion</i>	152
IV.3 -	<i>Conclusion</i>	152
V -	Étude de l'influence du support de culture sur l'expression de marqueurs cellulaires	153
V.1 -	<i>Résultats expérimentaux</i>	153
V.1.1 -	Apparition du phénotype endothélial	153
V.1.1.1 -	Expression des marqueurs cellulaires par microscopie confocale	155
V.1.1.2 -	Expression des marqueurs cellulaires par cytométrie en flux	155
V.1.2 -	Fonctionnalité des cellules endothéliales	157
V.2 -	<i>Discussion</i>	158
V.3 -	<i>Conclusion</i>	160
VI -	Influence de la présence de contraintes mécaniques sur la prolifération cellulaire et la différenciation en cellules endothéliales	161
VI.1 -	<i>Résultats expérimentaux</i>	162
VI.1.1 -	Développement d'un protocole dynamique	162
VI.1.2 -	Organisation du cytosquelette	162
VI.1.3 -	Marquage PECAM/vWF	163
VI.1.4 -	Cycle cellulaire	165
VI.2 -	<i>Discussion</i>	166
VI.3 -	<i>Conclusion</i>	168
DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES		169
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		177
ANNEXES		215
I -	Annexe 1 : principe de l'immunofluorescence	216
II -	Annexe 2 : principe de la cytométrie en flux	217

III -	Annexe 3 : principe de la microscopie confocale à balayage laser.....	219
IV -	Annexe 4 : principe de la microscopie électronique à balayage laser.	220
PUBLICATIONS.....		221

Liste des Publications et Communications

Liste des publications et communications

Publications dans des revues internationales

- **Moby V**, Kadi A, de Isla N, Stoltz JF, Menu P. Polyelectrolyte multilayer films: Effect of the initial anchoring layer on the growth of mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng.* (in press 2008).
- Kadi A, **Moby V**, de Isla N, Menu P, Stoltz JF. Mechanotransduction pathways implicated in NO production in endothelial cells treated with a selective β_1 -adrenergic receptor antagonist. *Biomed Mater Eng.* (in press 2008).
- Kerdjoudj H, Boura C, **Moby V**, Montagne K, Schaaf P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Re-endothelialization of human umbilical arteries treated with polyelectrolyte multilayers: a tool for damaged vessels replacement. *Adv. Funct. Mater.*, 2007, 17 : 2667-2673.
- **Moby V**, Boura C, Kerdjoudj H, Voegel JC, Marchal L, Dumas D, Schaaf P, Stoltz JF, Menu P. (Poly(styrene Sulfonate)/Poly(allylamine)) Multilayers: A route to favor Endothelial Cell Growth on ePTFE Vascular Grafts. *Biomacromolecules*, 2007, 8 : 2156-2160.
- **Moby V**, Kerdjoudj H, Berthelemy N, Gentils M, Boura C, Bordenave L, Stoltz JF, Menu P. The ideal small arterial substitute: role of cell seeding and tissue engineering. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2007, 37 : 89-98.
- Boura C, Kerdjoudj H, **Moby V**, Vautier D, Dumas D, Schaaf P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Initial adhesion of endothelial cells on polyelectrolyte multilayer films. *Biomed Mater Eng*, 2006, 16 : 115-121.

Brevet Français

« Procédé de prolifération de cellules sur des multicouches de polyélectrolytes et son application, notamment à la préparation de biomatériaux cellularisés »

Inventeurs : Menu P, Kerdjoudj H, Boura C, **Moby V**, Berthelemy N, Voegel JC, Schaaf P, Stoltz JF.

Date de dépôt : 18 juin 2007

Référence : 07/04313.

Publications de chapitres dans des ouvrages scientifiques et/ou dans des comptes rendus de congrès

- Kerdjoudj H, Boura C, **Moby V**, Marchal L, Dumas D, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Interst of polyelectrolyte multilayer thin films in tissue engineering : application to vascular allograft. J Biomed Eng, 2005, 22 : 116.

Liste des communications affichées

- **Moby V**, Kadi A, de Isla N, Stoltz JF, Menu P. Polyelectrolyte multilayer films: Effect of the initial anchoring layer on the growth of mesenchymal stem cells. 4^{ème} Séminaire École doctorale BIOSE “Bioingénierie et Biothérapies” Nancy-France, 26-28 septembre 2007.
- Kadi A, **Moby V**, de Isla N, Stoltz J.F, Menu P. Nitric oxide production in Human Endothelial Cells in Response to Shear Stress Stimulation and/or $\beta 1$ Adrenergic Receptor Antagonist. 4^{ème} Séminaire École doctorale BIOSE “Bioingénierie et Biothérapies” Nancy-France, 26-28 septembre 2007.
- **Moby V**, Kerdjoudj H, Boura C, Berthelemy N, Marchal L, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Improvement of endothelial cells adhesion on vascular substitutes modified with a polyelectrolyte multilayer film. First International Symposium on “Cardiovascular Biology” Prague-République Tchèque, 30 juin-1^{er} juillet 2006.
- **Moby V**, Boura C, Kerdjoudj H, Marchal L, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Functionalization of ePTFE with a polyelectrolyte multilayer film to improve endothelial cells adhesion. 3^{ème} Colloque International en “Ingénierie Médicale et Thérapie” Nancy-France, 15-16 mai 2006.
- Kerdjoudj H, Boura C, Berthelemy N, **Moby V**, Montagne K, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Biomechanical properties of re-endothelialized cryopreserved umbilical arteries. 3^{ème} Colloque International en “Ingénierie Médicale et Thérapie”, Nancy-France, 15-16 mai 2006.

- Boura C, Kerdjoudj H, **Moby V**, Schaaf P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Interest of polyelectrolyte multilayer thin films use in vascular tissue engineering. 2^{ème} Colloque international en “Ingénierie Médicale et Thérapie”, Nancy-France, 10-11 mai 2005.
- Kerdjoudj H, Boura C, **Moby V**, Dumas D, Marchal L, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Potentiel use of polyelectrolyte multilayer thin films in tissue engineering : application to vascular allograft. 2^{ème} Colloque international en “Ingénierie Médicale et Thérapie”, Nancy-France, 10-11 mai 2005.

Présentations orales

- **Moby V**, Boura C, Kerdjoudj H, Voegel JC, Marchal L, Dumas D, Schaaf P, Stoltz JF, Menu P. Comportement des cellules endothéliales ensemencées sur du PTFEe fonctionnalisé par un film multicouches de polyélectrolytes. Journées de la Recherche en Odontologie. Nancy-France, 9 février 2006.
- **Moby V**, Boura C, Kerdjoudj H, Voegel JC, Marchal L, Dumas D, Schaaf P, Stoltz JF, Menu P. Amélioration de l’adhésion et de la croissance des cellules endothéliales sur du PTFEe modifié par un film multicouches de polyélectrolytes. Journée Pharma-Recherche. Nancy-France, 29 Mars 2007.

Liste des abréviations

LISTE DES ABREVIATIONS

> : Augmentation	Il : interleukine
< : Diminution	IP : iodure de propidium
Å : Angstrom	LIF : <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
AcLDL: LDL (<i>Low Density Lipoprotein</i>)	MAPC : <i>Multipotent Adult Progenitor Cell</i>
acétylée	MEB : microscopie électronique à balayage
Ang : angiopoïétine	MEC : matrice extracellulaire
bFGF : <i>basic Fibroblast Growth Factor</i>	NO : <i>Nitric Oxide</i>
BSA: <i>Bovine Serum Albumin</i>	NP : non précisé dans l'article
CD : cluster de différenciation	NU: non utilisé
CE : Cellules endothéliales	ON : ouverture numérique
CEC : circulation extra-corporelle	PAA : acide polyacrylique
CFU-F : <i>Colony Forming Unit–Fibroblast</i>	PAF : paraformaldéhyde
CLMS : <i>Confocal laser microscopy scanning</i>	PAH : chlorhydrate de poly (allylamine)
CML : Cellules Musculaires Lisses	PBS : <i>Phosphate buffer saline</i>
CMMO : cellules mononucléées de la moelle osseuse	PDADMA :
Coll : Collagène	poly(diallyldiméthylammonium)
CPE : cellules progénitrices endothéliales	PDGF : <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
CRRETAWAC : Séquence protéique cystéine-arginine-arginine-glutamine-thréonine-alanine-tryptophane-alanine-cystéine	PECAM: <i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
CSH : cellules souches hématopoïétiques	PEI : polyéthylèneimine
DMSO : <i>Diméthyl sulfoxyde</i>	PET : polyéthylène téréphtalate
FGF1: <i>Fibroblast Growth Factor 1</i>	PGA : acide polyglycolique
Fibro : Fibronectine	pHi : point isoélectrique
Gly : glycophorine	PLA : acide polylactique
H : Humain	PSS : poly (4-styrène sulfonate de sodium)
HUVEC: <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>	PTFE: polytétrafluoroéthylène expansé
	RGD : Séquence protéique arginine-glycine-aspartate
	r/r : Par rapport à
	sem : semaines

SVF : Sérum de veau fœtal

TCPS : *Tissue Culture Polystyrene Surface*

TGF- β : *Transforming Growth Factor- β*

UV : rayons ultra-violets

VEGF : *Vascular Endothelial Growth
Factor*

VJI : veine jugulaire interne

vWF : Facteur von Willebrand

Table des illustrations

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

<u>Figure 1</u> : les différentes étapes du développement vasculaire embryonnaire	34
<u>Figure 2</u> : le processus d'angiogenèse	34
<u>Figure 3</u> : les récepteurs VEGF et leurs ligands respectifs	38
<u>Figure 4</u> : résumé des différentes propriétés des cellules endothéliales	40
<u>Figure 5</u> : les différentes couches constitutives d'une artère	41
<u>Figure 6</u> : représentation schématique d'une artère sténosée	42
<u>Figure 7</u> : les étapes de formation de la sténose et de la thrombose	43
<u>Figure 8</u> : schéma d'un pontage vasculaire veineux (veine saphène) et artériel (artère mammaire interne)	44
<u>Figure 9</u> : représentation schématique des principaux acteurs de l'ingénierie tissulaire	47
<u>Figure 10</u> : Formule chimique du PTFEe $-(CF_2-CF_2-)_n$	49
<u>Figure 11</u> : A : aspect macroscopique du PTFEe, B : raccordement par suture d'une prothèse vasculaire en PTFEe à un vaisseau naturel <i>ex vivo</i>	49
<u>Figure 12</u> : aspect en microscopie électronique d'un fragment de PTFEe	50
<u>Figure 13</u> : les films multicouches de polyélectrolytes : étapes de construction	70
<u>Figure 14</u> : formules chimiques de PEI, PSS, PAH	72
<u>Figure 15</u> : schéma illustrant les différences de comportement des cellules souches de type MAPC et hématopoïétiques	80
<u>Figure 16</u> : morphologie des cellules souches mésenchymateuses	84
<u>Figure 17</u> : structure chimique des polyélectrolytes utilisés pour la construction du film multicouche PEI-(PSS-PAH) ₃	106
<u>Figure 18</u> : schéma d'une chambre d'écoulement et du système en flux	113
<u>Figure 19</u> : étalonnage de la pompe péristaltique	114
<u>Figure 20</u> : les quatre phases du cycle cellulaire et le stade G0	117
<u>Figure 21</u> : histogramme de répartition des phases du cycle cellulaire	118
<u>Figure 22</u> : principe du dosage des nitrites	127
<u>Figure 23</u> : recouvrement de la surface luminale du substitut vasculaire synthétique à base de PTFEe, par un film PEI-(PSS-PAH) ₂ (PSS-PAH-R*)	131

<u>Figure 24</u> : influence des différentes modifications de surfaces sur la prolifération des HUVEC après 1, 3 et 7 jours de culture	135
<u>Figure 25</u> : photographies en Microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface luminale de substituts vasculaires synthétiques à base de PTFEe non fonctionnalisée (A et B), fonctionnalisée par une monocouche de PAH (C et D) ou par un film multicouche PEI-(PSS-PAH) ₃ (E et F), 7 jours après ensemencement de CE	136
<u>Figure 26</u> : expression du facteur von Willebrand par les CE ensemencées sur la surface luminale des substituts vasculaires synthétiques à base de PTFEe fonctionnalisés par un film PEI-(PSS-PAH) ₃ .	138
<u>Figure 27</u> : évolution de l'activité métabolique des CSM cultivées sur lames de verre modifiées par fibronectine (contrôle positif), par un film PEI-FMP ou PAH-FMP	143
<u>Figure 28</u> : influence des différents supports de culture sur l'activité métabolique des CSM	144
<u>Figure 29</u> : images en lumière transmise en microscopie confocale à balayage laser de CSM adhérentes en passage 3 cultivées sur lames de verre modifiées par PAH-(PSS-PAH) ₃	145
<u>Figure 30</u> : photographies en Microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface luminale de substituts vasculaires synthétiques à base de PTFEe fonctionnalisée par un film multicouche PAH-(PSS-PAH) ₃ (A et B) ou par une monocouche de PAH (C et D), ou non fonctionnalisée (E et F), 7 jours après ensemencement de CSM	146
<u>Figure 31</u> : pourcentage de cellules positives exprimant des marqueurs de surface et intracytoplasmiques pour les CSM humaines (P3) et les HUVEC (P2)	151
<u>Figure 32</u> : expression de PECAM (figures B) et de vWF (figure D) par les CSM ensemencées sur des lames de verre fonctionnalisées par un film PAH-(PSS-PAH) ₃ et cultivées pendant 14 jours en présence de VEGF	154
<u>Figure 33</u> : moyennes d'intensité de fluorescence (MIF) de PECAM (PECAM couplé à alexa 488/ alexa 488 seul) par les CSM	156
<u>Figure 34</u> : moyennes d'intensité de fluorescence (MIF) de vWF (vWF couplé à alexa 488/ alexa 488 seul) par les CSM	156
<u>Figure 35</u> : rapports des moyennes d'intensité de fluorescence (MIF cellules stimulées par VEGF/cellules non stimulées) de PECAM et vWF par les CSM	157
<u>Figure 36</u> : libération de NO par les cellules cultivées sur film PAH-(PSS-PAH) ₃ en présence ou non de VEGF	158

<u>Figure 37</u> : organisation des filaments d'actine dans les CSM cultivées sur film (A et B) ou fibronectine (C et D) respectivement en condition statique ou en condition dynamique (24 h, 15 dyn/cm ² , la contrainte est dirigée de gauche à droite)	164
<u>Figure 38</u> : Analyse du cycle cellulaire	165

TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : études <i>in vitro</i>	60
<u>Tableau II</u> : modification de surface du PTFEe, études chez l'animal	64
<u>Tableau III</u> : modification de surface du PTFEe, études chez l'homme	67
<u>Tableau IV</u> : influence de PEI sur la rugosité et l'épaisseur des films	72
<u>Tableau V</u> : molécules exprimées par les CSM, les CE, les CPE précoces, les CPE tardives et les MAPC	83
<u>Tableau VI</u> : différenciation endothéliale induite <i>in vitro</i> par des facteurs de croissance	91
<u>Tableau VII</u> : différenciation endothéliale induite par stimulations mécaniques	97
<u>Tableau VIII</u> : composition du tampon PBS	116
<u>Tableau IX</u> : caractéristiques et références des anticorps permettant un immunomarquage indirect	119
<u>Tableau X</u> : caractéristiques et références des anticorps permettant un immunomarquage direct	120
<u>Tableau XI</u> : protocole du dosage des nitrites	127
<u>Tableau XII</u> : pourcentages de cellules positives exprimant des marqueurs de surface et intracytoplasmiques pour les CSM humaines (P3) et les HUVECs (P2)	151
<u>Tableau XIII</u> : répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire	166

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Les pathologies vasculaires coronaires et périphériques constituent l'une des principales causes de décès dans les sociétés occidentales. Ces pathologies relèvent majoritairement de l'athérosclérose qui entraîne un rétrécissement progressif de la lumière vasculaire conduisant à un défaut d'irrigation des tissus. Ces pathologies nécessitent, en dernier recours, la réalisation d'un pontage vasculaire pour remplacer les régions athérosclérotiques. Le matériau qui est utilisé en première intention est le vaisseau autologue. Malheureusement, un tiers des patients n'a pas de vaisseaux autologues disponibles du fait d'une utilisation antérieure, d'une taille inadéquate ou de leur mauvaise qualité. Dans ce cas, la principale alternative est l'utilisation d'une prothèse synthétique principalement à base de polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe). Actuellement, les prothèses synthétiques sont utilisées avec succès pour le traitement de pathologies touchant des artères de gros diamètre. Mais le remplacement des vaisseaux d'un diamètre interne inférieur ou égal à 6 mm pose problème : formation de caillot à court terme et hyperplasie intinale à plus long terme à proximité de l'anastomose. En effet, en dépit des progrès substantiels faits dans le développement des prothèses de petit diamètre, le développement d'une surface physiologiquement hémocompatible est encore un problème en chirurgie vasculaire. Les polymères synthétiques utilisés sont biocompatibles mais aussi thrombogènes dans les zones de faible flux. Pour limiter ces réactions, il est nécessaire d'utiliser des traitements antithrombotiques qui peuvent être responsables de complications hémorragiques. Pour éviter de tels traitements, la recherche en ingénierie vasculaire s'est développée de façon à mettre au point un substitut vasculaire se rapprochant le plus possible du vaisseau natif et donc ayant une surface luminale dont les propriétés interfaciques garantiraient une hémocompatibilité similaire à celle trouvée *in vivo*.

L'une des approches les plus utilisées dans la conception de vaisseaux de remplacement consiste en l'endothélialisation des prothèses synthétiques, c'est-à-dire le recouvrement du polymère par une monocouche de cellules endothéliales (CE). Un tel substitut biohybride posséderait ainsi les propriétés anti-thrombogéniques nécessaires à la fonctionnalité des substituts vasculaires. Cependant, la surface luminale des prothèses synthétiques est initialement hostile à l'adhésion des CE. Il est donc nécessaire de recourir à une modification de cette surface pour la rendre cytocompatible. Les principales techniques utilisées ont consisté en un dépôt de protéines, principalement issues de la matrice extracellulaire, sur cette surface luminale. Elles ont donné des résultats prometteurs chez les animaux. Cependant, des

performances moins satisfaisantes ont été obtenues lors d'essais cliniques. Il est donc essentiel de développer une modification de surface qui stimule à la fois l'attachement et la croissance cellulaire garants de résultats durables *in vivo*. Cette technique doit favoriser la formation d'un néo-endothélium et éviter son détachement après implantation, sous l'effet des contraintes exercées par le flux sanguin.

Depuis quelques années, une nouvelle méthode de modification de surface, reposant sur la construction d'un film multicouche de polyélectrolytes (FMP), tend à se développer dans différents domaines médicaux. C'est une technique simple, de faible coût et biocompatible.

Une autre limite majeure de l'endothélialisation est l'obtention des CE autologues, secondaire à un prélèvement de vaisseaux sains du patient. Depuis quelques années, afin de disposer d'une source cellulaire plus facilement accessible, plus abondante et moins traumatisante, de nombreux chercheurs se sont intéressés à l'utilisation de cellules souches comme source cellulaire pour les substituts vasculaires. Ces cellules indifférenciées peuvent donner naissance à une multitude de lignées cellulaires sous l'induction de stimuli appropriés incluant les cellules vasculaires. Un type particulier de cellules souches multipotentes, les cellules souches mésenchymateuses (CSM), semble avoir le potentiel à être utilisé en ingénierie vasculaire car elles sont constamment et facilement disponibles. Depuis quelques années, plusieurs cytokines et facteurs de croissance ont été identifiées comme induisant la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en une lignée cellulaire spécifique. Des études récentes ont montré que la différenciation des cellules souches est liée à la tension du cytosquelette qui est elle-même déterminée par l'environnement mécanique. L'utilisation de contraintes adaptées pourrait donc orienter la différenciation des cellules souches dans une voie spécifique.

Notre travail vise à concevoir une prothèse vasculaire originale cellularisée par des CE issues de CSM humaines autologues, différenciées sous l'influence de stimulations biochimiques ou mécaniques, adhérentes à des matrices synthétiques (PTFEe) de petit diamètre peu favorables à l'adhésion cellulaire, grâce à une modification de surface innovante comme l'utilisation d'un film multicouche de polyélectrolytes. Cette endothélialisation est une condition essentielle à la perméabilité vasculaire à court et à long terme.

Dans le *premier chapitre*, nous présenterons une étude bibliographique détaillant l'anatomie des vaisseaux sanguins, les pathologies vasculaires et l'ingénierie tissulaire des vaisseaux.

Le *deuxième chapitre* rapportera la méthodologie générale et le matériel utilisé dans le cadre des différentes expériences.

Dans le *troisième chapitre*, nous présenterons les résultats expérimentaux et les commentaires apportés. Nous déterminerons la faisabilité de la construction d'un FMP sur la surface luminale d'un substitut vasculaire en PTFEe. Nous observerons ensuite le comportement des CEensemencées sur des prothèses de PTFEe modifiées par des FMP en étudiant les principaux paramètres de biocompatibilité tels que la prolifération, l'adhésion et l'expression d'un marqueur phénotypique (facteur von Willebrand). Dans un troisième temps, dans le but de cellulariser ces matrices par des CE autologues, nous évaluerons, après les avoir caractérisées au niveau phénotypique, le comportement des CSM, notamment leur compatibilité avec les FMP et étudierons leur potentiel de différenciation en CE sous induction biochimique. La dernière étape visera à s'affranchir totalement de stimulations biochimiques en soumettant les CSMensemencées sur le substitut modifié, à des contraintes de cisaillement, représentatives du flux sanguin local. En effet, ces contraintes sembleraient favoriser la différenciation des cellules souches en différents types cellulaires, et plus particulièrement en CE en ce qui nous concerne.

Enfin, le *quatrième chapitre* sera consacré à une synthèse de nos résultats les plus significatifs et à la présentation des perspectives de notre travail.

Partie 1

Etude bibliographique

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Le principal but de ce travail de thèse est de transformer la surface luminale thrombogène de substituts vasculaires synthétiques de petit diamètre en une surface hémocompatible. Au travers des analyses de la littérature, différentes approches ont été envisagées et de nombreux travaux y ont été consacrés, l'apparentant à la quête du « Saint Graal ». Cette partie bibliographique est divisée en trois chapitres. Dans le premier chapitre, nous avons abordé le développement embryonnaire des vaisseaux sanguins et surtout le rôle majeur joué dans ce processus par les facteurs de croissance, notamment VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), et rappelé la structure ainsi que les fonctions des différentes couches constitutives de la paroi vasculaire. Nous avons ensuite étudié les pathologies artérielles et les différents substituts vasculaires employés par les cliniciens lors des chirurgies de pontage vasculaire. Dans le dernier chapitre, après un bref rappel sur l'ingénierie tissulaire, nous avons passé en revue les différentes techniques de modification de surface du PTFEe utilisées ces dix dernières années, et détaillé une technique de modification de surface novatrice en ingénierie vasculaire : le film multicouche de polyélectrolytes. Nous avons enfin décrit les différents types cellulaires utilisés en ingénierie vasculaire et étudié l'impact des facteurs de croissance et des facteurs mécaniques sur la différenciation en cellules endothéliales.

I - Les vaisseaux sanguins

Le premier système qui se forme chez l'embryon est la circulation, car l'apport d'oxygène et de nutriments et l'élimination des déchets sont essentiels au développement, au fonctionnement et à la survie de tous les organes.

I.1 - Développement embryonnaire des vaisseaux sanguins

I.1.1 - Vasculogenèse et angiogenèse

Le développement du système circulatoire se déroule selon deux phénomènes successifs : la vasculogenèse et l'angiogenèse (Figure 1).

Pendant la **vasculogenèse**, une cellule souche commune hématopoïétique et vasculaire, l'hémangioblaste, donne naissance à une cellule progénitrice endothéliale, l'angioblaste, qui ensuite se différencie en cellule endothéliale mature. Il s'ensuit une prolifération et une migration des cellules endothéliales pour former l'arbre vasculaire primitif [1-3]. Ce processus est stimulé principalement par un facteur de croissance, appelé *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF).

Lors de l'**angiogenèse** (Figure 2), cet arbre vasculaire primitif est remodelé en un réseau comprenant des vaisseaux sanguins de différents calibres afin d'établir un système circulatoire mature et fonctionnel. Avec la croissance de l'embryon, il y a donc formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de la microcirculation préexistante [4-5].

Le processus d'angiogenèse a lieu à la fois durant le développement embryonnaire et la vie postnatale [3, 6]. Il peut être divisé en plusieurs phases mettant en jeu différentes cytokines dont la famille des VEGF, des *Fibroblast Growth Factor* (FGF), des *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), des angiopoïétines (Ang) et des *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) [7]. Dans la partie de la paroi vasculaire destinée à émettre un nouveau capillaire, il se produit tout d'abord une perte de contact entre les cellules endothéliales et les péricytes (précurseurs mésenchymateux des muscles lisses vasculaires) avec une augmentation de la perméabilité vasculaire par Ang-2 et VEGF-A. Suite à cette activation, les cellules endothéliales (CE) dégradent protéolytiquement leur lame basale par l'action combinée de protéases et d'inhibiteurs de protéases, prolifèrent et migrent à travers la matrice extracellulaire vers la source angiogénique en formant un capillaire dépourvu de cellules péri-vasculaires. Ultérieurement, il y a recrutement et différenciation des cellules péri-vasculaires par TGF- β 1, PDGF-BB et Ang-2 afin de former un vaisseau sanguin avec une paroi non perméable et fonctionnelle.

Il a été longtemps suggéré que la formation des vaisseaux sanguins dans la vie postnatale était médiée uniquement par la prolifération des cellules endothéliales à partir des vaisseaux existants. Cependant, des études récentes ont montré que les cellules souches persistent chez l'adulte, où elles contribuent au renouvellement des vaisseaux sanguins sous la stimulation de VEGF [8-11].

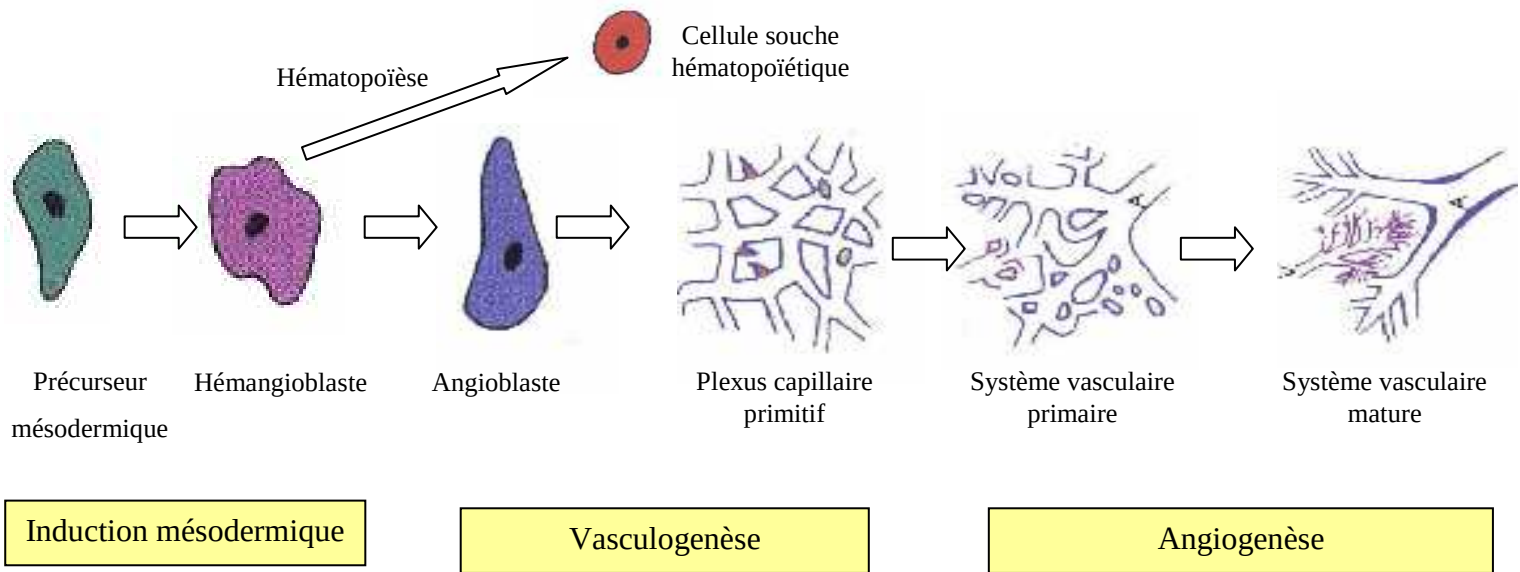


Figure 1 : les différentes étapes du développement vasculaire embryonnaire
(d'après Risau (*Nature*) 386 (1997))

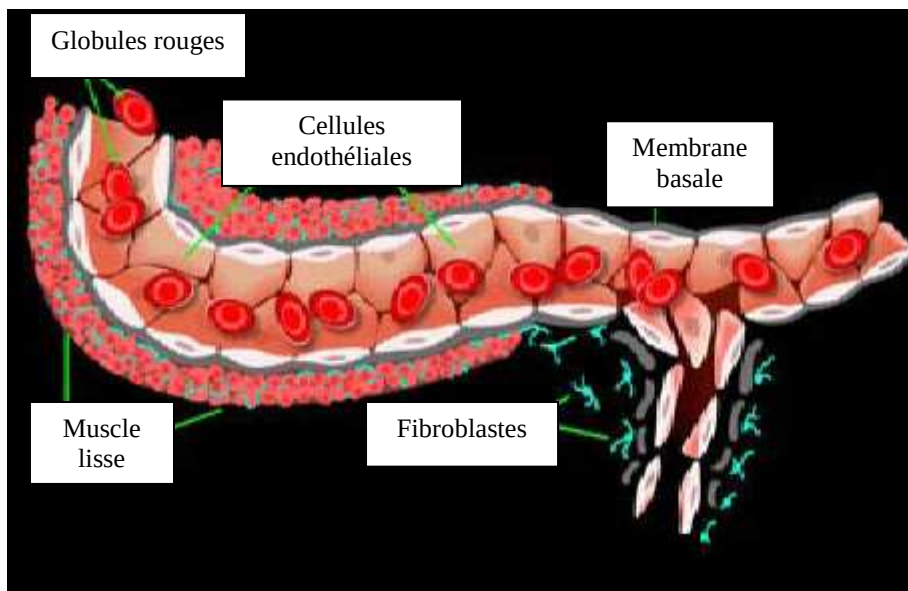


Figure 2: le processus d'angiogenèse

Il se fait en 4 étapes : désintégration de la membrane basale, migration des CE, prolifération cellulaire, formation d'une nouvelle membrane basale et maturation des vaisseaux.

(<http://www.dea-cardiopneumo.org>)

I.1.2 - La famille des VEGF et ses récepteurs

I.1.2.1 - Introduction

Les VEGF sont des dimères de glycoprotéines ayant en commun un domaine d'homologie composé de 8 cystéines impliquées dans les liaisons disulfure des dimères [12]. La famille des VEGF comprend plusieurs membres de protéines sécrétées, jouant un rôle important dans la physiologie et la pathologie du système vasculaire, incluant la vasculogénèse, l'hématopoïèse, l'angiogénèse et la lymphangiogénèse [13]. Le VEGF agit à tous les stades de l'angiogénèse : il augmente la perméabilité vasculaire, favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales et mobilise les angioblastes [14-16]. Cette famille se compose de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PLGF (*Placenta Growth Factor*), VEGF-E (VEGF viral) et VEGF-F (VEGF issu de venin de serpent). VEGF-A en est le principal représentant.

I.1.2.2 - VEGF-A

VEGF-A (quelquefois également appelé VPF (*Vascular Permeability Factor*) pour ses propriétés de contrôle de la perméabilité vasculaire ou encore vasculotropine) fut le premier facteur découvert ayant une activité mitotique spécifique sur les cellules endothéliales [17-20]. C'est une glycoprotéine de 45 kDa, exerçant son action sous forme dimérique grâce à un pont disulfure reliant 2 molécules. Son gène comprend 8 exons et code une forme longue de 206 acides aminés. Il existe plusieurs isoformes de VEGF-A produites par épissage alternatif des exons 6 et 7. On distingue les isoformes 189, 183, 165, 148, 145, 121. Récemment le VEGF₁₆₂ a été ajouté [21]. Le VEGF_{165b} correspondrait à une isoforme inhibant l'activité du VEGF₁₆₅ [22].

Les formes surexprimées dans les processus d'angiogénèse physiologique aussi bien que pathologique sont les VEGF₁₂₁, ₁₆₅ et ₁₈₉. L'isoforme la plus abondante et la plus étudiée est celle contenant 165 acides aminés, VEGF₁₆₅ [20, 23]. C'est d'ailleurs le VEGF₁₆₅ qui a la plus grande affinité de liaison aux récepteurs : VEGFR. C'est pour ces raisons que nous avons utilisé cette isoforme dans notre étude.

Le développement vasculaire (vasculogénèse et angiogénèse) est dépendant du niveau d'expression du VEGF-A comme le montrent des études de délétion de gènes [24-25]. En effet, l'importance de VEGF-A dans l'angiogénèse a été montrée dans divers modèles expérimentaux *in vivo*. Les animaux dont il manque un des allèles de VEGF meurent avant la

naissance à cause de défauts dans le développement du système cardiovasculaire [25-26]. Si l'on inactive spécifiquement, chez la souris, le gène de VEGF-A à partir de la période néonatale, il en résulte, entre autres, un retard de croissance létal [27]. Ceci démontre bien la nécessité de VEGF-A en ce qui concerne le développement physiologique de l'organisme. De même, son importance dans l'induction angiogénique lors de la croissance tumorale a été mise en évidence dans un modèle animal de transformation oncogénique des cellules bêta des îlots pancréatiques [28-29]. Le VEGF a, en outre, une action de régulation de la perméabilité capillaire, en favorisant l'extravasation de protéines telles que le fibrinogène, permettant ainsi la formation d'un gel de fibrine propice à la migration et à l'organisation des cellules endothéliales. Enfin, le VEGF stimule l'expression et le relargage de différentes enzymes protéolytiques telles que deux sérines protéases : *tissue type plasminogen activator* et *urokinase-type plasminogen activator*, mais également des métalloprotéinases et des collagénases, favorisant la lyse de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, préalable indispensable à l'invasion du tissu périadventiciel par des néovaisseaux [30-31]. L'hypoxie est un puissant stimulant de l'ARNm du VEGF *in vitro* et *in vivo* [32-34]. Elle semble augmenter à la fois la transcription et la stabilité du VEGF [35]. Il n'est donc pas étonnant que VEGF soit un facteur angiogénique majeur de pathologies cardiaques telles que l'ischémie myocardique, car la disponibilité en oxygène est alors compromise.

I.1.2.3 - VEGF-B

VEGF-B est un ligand spécifique pour VEGFR-1 [36]. Son transcrit subit un épissage alternatif produisant deux isoformes de 167 et 186 acides aminés. Suite à leur sécrétion, VEGF-B₁₆₇ reste associé à la surface cellulaire par un domaine liant l'héparine, tandis que VEGF-B₁₈₆ est librement diffusible [37]. L'inactivation du gène codant pour VEGF-B n'entraîne pas de perturbation de l'angiogenèse embryonnaire [38-40].

I.1.2.4 - Les récepteurs à VEGF

L'effet des VEGF se fait par l'intermédiaire de trois récepteurs nommés (Figure 3) [41-44] :

- VEGFR-1 (Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase*))
- VEGFR-2 (Flk-1 ou KDR (*Kinase domain containing receptor*))
- VEGFR-3 (Flt-4)

Une forme soluble de VEGFR-1 a été mise en évidence (sVEGFR-1).

Les VEGFR sont exprimés à un faible niveau dans beaucoup de tissus adultes, mais leur niveau d'expression dans les cellules endothéliales est augmenté pendant le développement ainsi que dans des pathologies où l'angiogenèse joue un rôle important.

L'interaction des VEGFR avec la neuropiline-1 (NRP-1) facilite la présentation et la liaison de VEGF à son récepteur.

Le profil de liaison des VEGF à ces récepteurs n'est pas spécifique à un membre en particulier. En effet, VEGFR-1 lie VEGF-A (isoformes 121 et 165), -B et PLGF-1, -2, VEGFR-2 lie VEGF-A (isoformes 121, 145, 165), -C et -D tandis que VEGFR-3 lie VEGF-C et -D [45]. VEGFR-2 est exprimé principalement à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et plus faiblement des lymphatiques [46-47].

L'inactivation des gènes codant pour VEGFR-1, VEGFR-2 ou VEGFR-3 résulte chacune en une létalité embryonnaire chez la souris, principalement parce que la différenciation des CE ne peut se faire et que les vaisseaux sanguins ne peuvent se former [48-49].

Les récepteurs à VEGF sont de type tyrosine-kinase. Après la dimérisation, suite à la stimulation par le ligand, une autophosphorylation des récepteurs est observée, ce qui stimule les voies de transmission du signal. L'interaction entre VEGF et son récepteur nécessite la présence de protéoglycanes, notamment l'héparine.

Il est actuellement décrit que VEGFR-1 est davantage impliqué dans la perméabilité cellulaire tandis que le récepteur VEGFR-2 est inducteur de la réponse proliférative des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins [49-50]. Il serait également responsable de l'activité mitogène du VEGF [51].

VEGFR-1 est exprimé à la surface de cellules hématopoïétiques et de monocytes dont le recrutement dans des foyers néo-angiogéniques semble important pour faciliter le développement de la néovascularisation [52]. VEGF-A a une affinité dix fois plus importante pour VEGFR-1 que pour VEGFR-2. Cependant, l'activité tyrosine-kinase de VEGFR-2 est fortement stimulée par le VEGF-A, contrairement à celle du VEGFR-1.

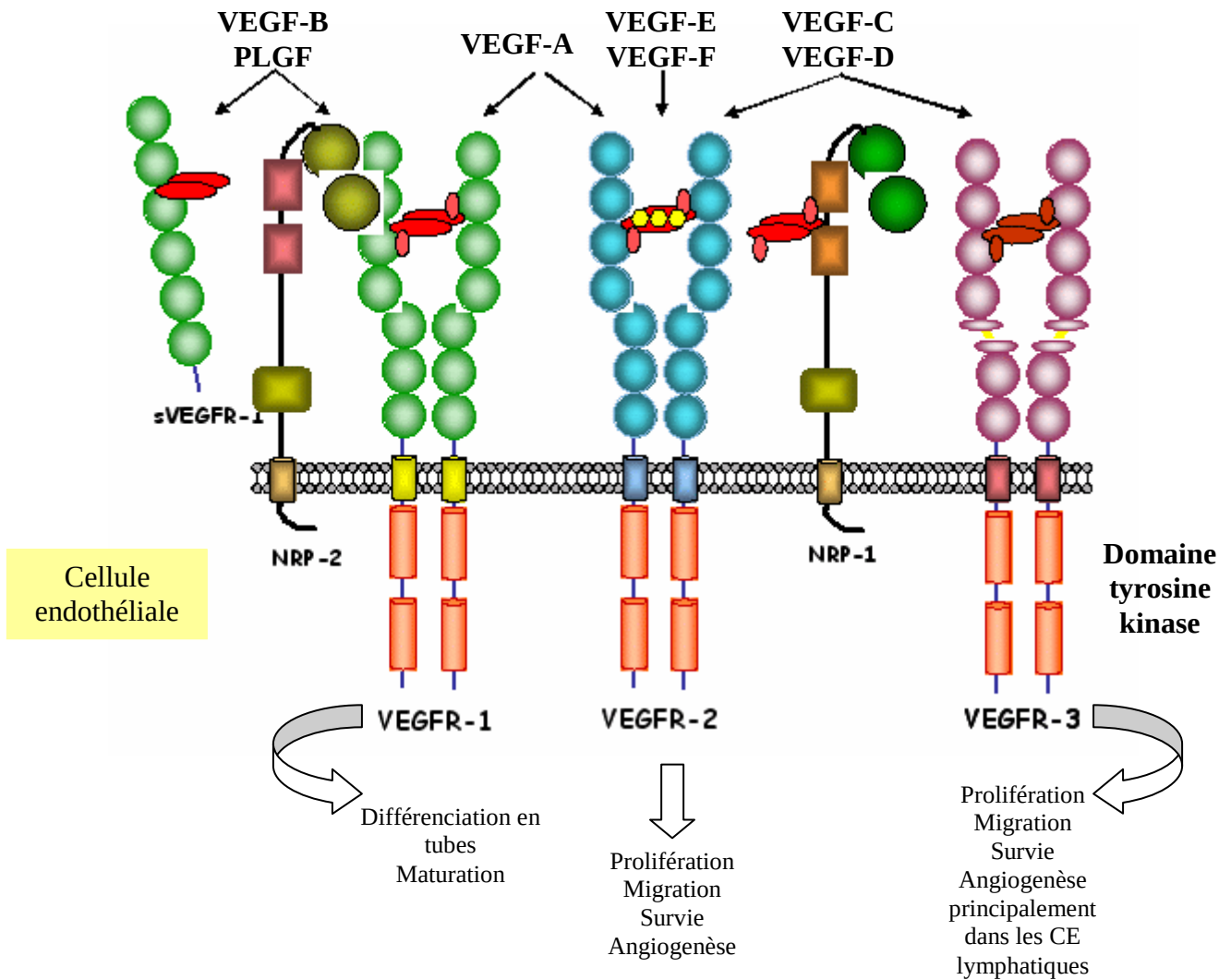


Figure 3 : les récepteurs VEGF et leurs ligands respectifs

Les 3 récepteurs de tyrosine-kinase de la famille VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3).
mcb.web.psi.ch/research/signal/sld001.html

I.2 - Structure et fonction des artères matures

Le système artériel sert classiquement au transport et à la distribution du sang aux différents organes. Au niveau macroscopique, toutes les artères et les larges artérioles ont une structure de paroi typique en 3 tuniques : intima, média et adventice.

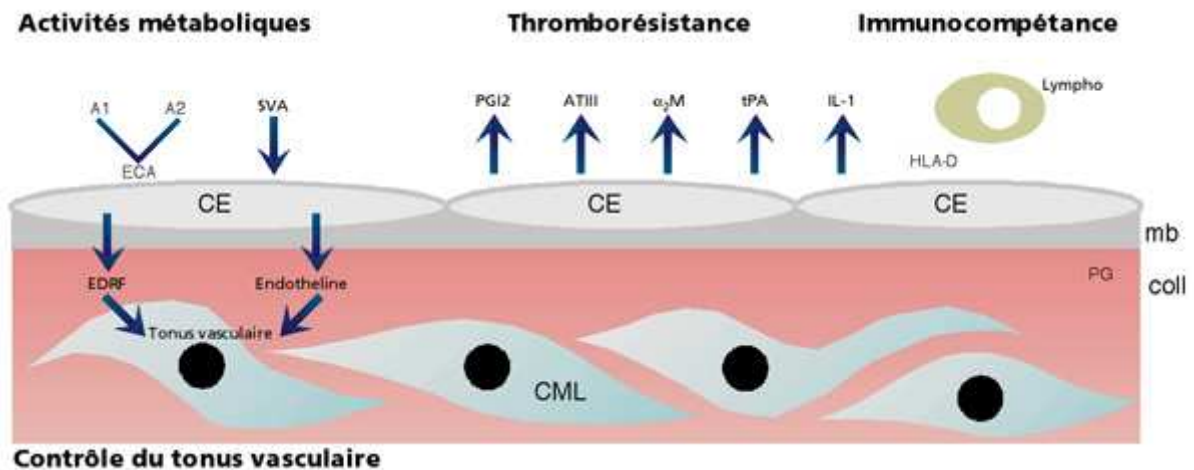
I.2.1 - La tunique interne ou intima

Elle borde directement la lumière vasculaire. Elle est formée d'une seule couche de cellules endothéliales (CE) imbriquées les unes dans les autres, formant une enveloppe étanche,

appelée **endothélium**, d'une couche de tissu conjonctif fibro-élastique (membrane basale), et d'une lame de fibres élastiques constituées d'élastine, la limitante élastique interne (absente dans de nombreux vaisseaux). Les CE se divisent lentement dans les conditions physiologiques (50 fois dans une durée de vie), mais elles ont un grand potentiel de prolifération et de migration quand la surface endothéliale est endommagée [53]. L'endothélium sert de régulateur biologique de la physiologie cardiovasculaire [54].

Ses principales propriétés sont (Figure 4) :

- de fournir l'intégrité structurale du vaisseau sanguin en formant une barrière continue, de perméabilité sélective, thromborésistante entre le sang circulant et la paroi artérielle [55]. La fonction antithrombogénique de l'endothélium est fournie par la surface endothéliale, qui est lisse et évite l'activation du système de thrombose. Cette fonction est également assurée par le **glycocalyx**, structure liée à l'endothélium, constituée de différents glycosaminoglycanes (notamment héparane sulfate), et qui repousse les plaquettes et les facteurs de thrombose. De plus, une protéine appelée **thrombomoduline**, liée à l'endothélium, ralentit le processus de thrombose en se liant à la **thrombine** (facteur de thrombose) qui circule dans le sang. Le complexe thrombine/thrombomoduline inactive alors les autres facteurs de la thrombose. Enfin, l'endothélium synthétise différentes molécules antithrombogéniques dont la **prostaglandine I₂**, l'**antithrombine III**, l'**α₂-macroglobuline** et l'**activateur tissulaire du plasminogène**.
- de contrôler le flux sanguin et le tonus vasculaire (synthèse de substances vaso-actives telles que *Endothelium Derived Relaxing Factor* (EDRF) encore appelé oxyde nitrique (*Nitric Oxide* (NO), *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor* (EDHF) et les endothélines [54, 56-57]) mais également l'adhésion des leucocytes [58], la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses [59].
- de contrôler les espaces intercellulaires par le biais de protéines de jonction présentes entre CE voisines et, de cette façon, de donner la possibilité à des protéines sanguines et à des cellules de pénétrer dans l'espace sous-endothélial.
- d'assurer des activités métaboliques : conversion de l'**angiotensine 1** en angiotensine 2.
- d'assurer une fonction immunitaire : synthèse d'**interleukine-1** (IL-1).



A1 : Angiotensine 1; **A2** : Angiotensine 2; **ECA** : Enzyme de Conversion de l'Angiotensine; **SVA** : Substances Vaso-Actives; **CE** : Cellule Endothéliale; **EDRF** : Endothelial Derived Relaxing Factor; **PGI2** : Prostaglandine I2 (Prostacycline); **AT-III** : Antithrombine III; **α_2M** : α_2 -Macroglobuline; **tPA** : Activateur tissulaire du Plasminogène; **IL-1** : Interleukine 1; **CML** : Cellules Musculaires Lisses; **HLA-D** : Antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité; **Lympho** : Lymphocyte; **mb** : membrane basale; **coll** : collagène; **PG** : Protéoglycannes.

Figure 4 : résumé des différentes propriétés des cellules endothéliales
Thromborésistance, contrôle du tonus vasculaire, fonction métabolique et fonction immunitaire
(<http://www.123bio.net>)

I.2.2 - La média

C'est la tunique la plus épaisse. Elle est formée de lamines élastiques qui alternent avec des couches de cellules musculaires lisses (CML). Une lame d'élastine, appelée limitante élastique externe, sépare la média de l'adventice, mais uniquement dans les vaisseaux de gros diamètre. Au niveau des artères proximales, les CML régulent la vasoactivité en augmentant et diminuant la séparation des lamines élastiques responsables de l'ouverture plus ou moins importante de la lumière. De cette façon, le flux sanguin est contrôlé. Les artères localisées en périphérie, contrôlent la distribution du sang aux différents organes. Les artérioles, les plus petits vaisseaux du système artériel, sont constituées principalement de CML. La contraction du muscle lisse produit un rétrécissement de la lumière, ce qui augmente la résistance périphérique.

I.2.3 - L'adventice

Elle est formée de fibres longitudinales de collagène et d'élastine et supporte le vaisseau. Cette couche est présente dans toutes les artères sauf les petites artérioles. Elle comporte des fibroblastes qui synthétisent le collagène et l'élastine. Les autres constituants sont des **péricytes**, précurseurs mésenchymateux des muscles lisses vasculaires, le **vasa vasorum**, qui fournit l'apport en sang et nutriments au vaisseau et les **neurones vasomoteurs** qui traversent l'adventice et innervent le muscle lisse dans la média (Figure 5).

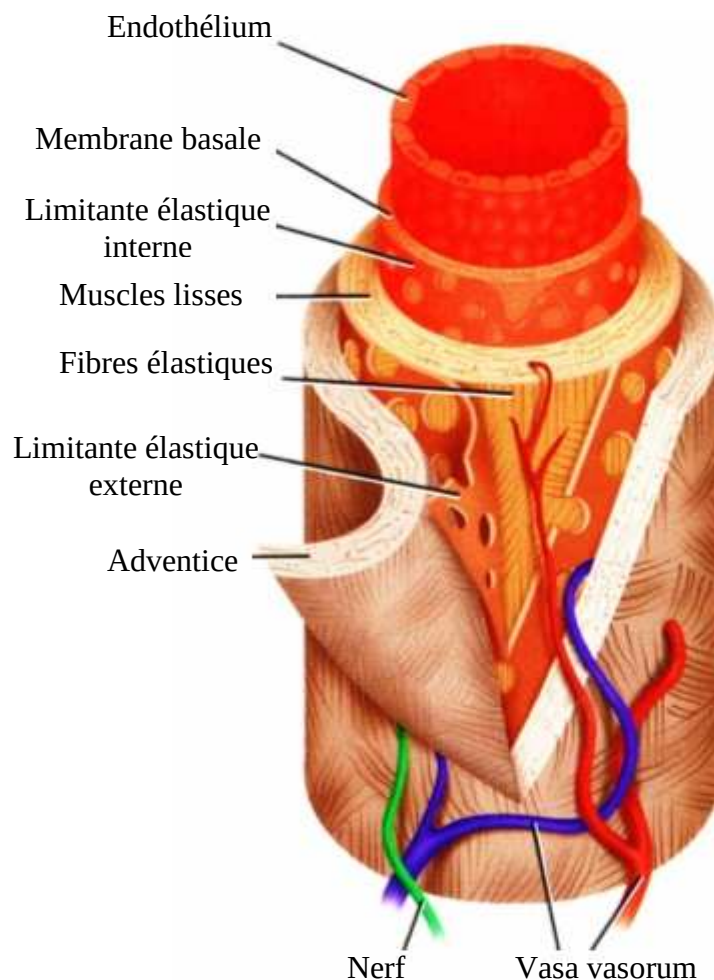


Figure 5 : les différentes couches constitutives d'une artère
(www.theses.ulaval.ca/2005/22413/ch02.html.)

II - Les pathologies vasculaires et la chirurgie de pontage vasculaire

Avec l'augmentation en âge, la sédentarité et l'alimentation déséquilibrée, la prévalence des pathologies cardio-vasculaires, incluant les pathologies vasculaires périphériques et les pathologies de l'artère coronaire, ne cesse d'augmenter. Elles représentent la première cause de mortalité et de morbidité en France avec 120 000 infarctus du myocarde et 130 000 accidents vasculaires cérébraux [60]. Leur prise en charge constitue donc un enjeu considérable en terme de santé publique.

Les pathologies vasculaires athéroscléreuses produisent une réduction localisée du calibre des artères (sténose) ce qui, en fin de compte, diminue le flux sanguin au niveau des vaisseaux atteints [61] (Figure 6). L'évolution se fait longtemps sans symptôme apparent, et lorsque l'accident survient, la maladie est souvent déjà à un stade avancé.



Figure 6 : représentation schématique d'une artère sténosée

Vue en coupe ; réduction de la lumière de l'artère par la plaque athérosclérotique

(http://www.ne.jp/asahi/sw/luke/coronary_stenosis.jpg)

L'athérosclérose est un processus dégénératif évolutif touchant l'intima et réduisant progressivement la lumière vasculaire. Elle résulte d'une cascade d'interactions complexes entre trois types d'acteurs :

- **cellulaires** : cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, plaquettes, leucocytes, monocytes,
- **autres constituants de la paroi artérielle** : le tissu conjonctif en particulier,
- **éléments plasmatiques** tels que les lipoprotéines.

La plaque d'athérome se constitue dans la paroi artérielle par accumulation de lipides et de tissu fibreux. Elle fait saillie à l'intérieur de l'artère, engendrant des turbulences et un obstacle au flux sanguin, ce qui favorise davantage son développement et aboutit à une obstruction de plus en plus importante de la lumière, responsable de troubles dans le territoire tissulaire en aval. C'est ce qu'on appelle la sténose. Elle peut s'associer à la thrombose qui est la formation d'un caillot (ou thrombus) au niveau d'une lésion induite par la rupture d'une plaque d'athérosclérose, obstruant complètement l'artère et entraînant la mort des tissus en aval (Figure 7).

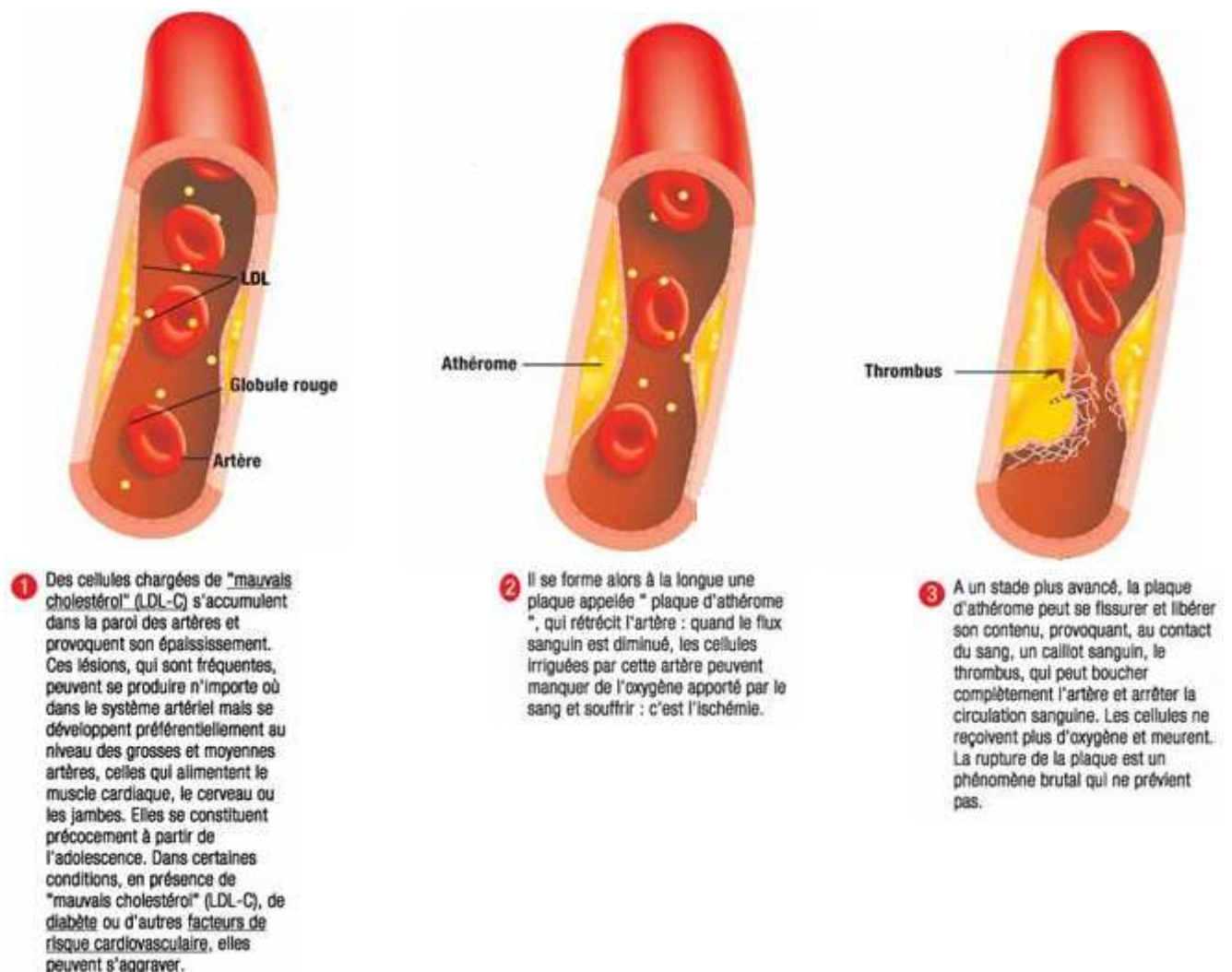


Figure 7 : les étapes de formation de la sténose et de la thrombose
(www.prevention-cardio.com)

Le traitement, en dernier recours, est chirurgical. Il consiste à réaliser un pontage des segments vasculaires touchés pour restaurer le flux. Le pontage instaure une dérivation, qui

contourne le point de sténose et restaure ainsi une circulation satisfaisante. En France, environ 40 000 pontages sont réalisés chaque année.

L'un des matériaux utilisés avec succès pour les procédures de pontage de faible diamètre est la veine saphène du patient lui-même [62]. On parle alors de **greffe autologue ou autogreffe**. Le chirurgien français Jean Kunlin a été le premier, en 1949, à décrire l'utilisation de veines comme conduits de pontage pour le traitement chirurgical de l'athérosclérose coronaire et la procédure reste à ce jour la technique de référence [63]. Ce greffon est utilisé de façon importante du fait de sa longueur et de son diamètre qui sont similaires à ceux des artères coronaires et fémorales ou poplitées [64]. Mais ces autogreffes peuvent être tout de même sujettes au développement de l'athérosclérose et à des complications tardives telles que la dégénérescence anévrysmale, la fibrose et l'hyperplasie intimale [65-68]. Ceci est principalement dû aux lésions endothéliales lors de la mise en place de la greffe [69]. De plus, le prélèvement de vaisseaux autologues implique des coûts importants et une morbidité du patient. L'artère mammaire interne représente également une prothèse vasculaire offrant d'excellentes performances, voire même supérieures à celles de la veine saphène, ce qui fait qu'elle tend aujourd'hui à être le greffon de pontage coronaire de choix (Figure 8). Toutefois, son utilisation est difficile et limitée par son accessibilité anatomique.

Les performances nettement supérieures des veines saphènes et des artères mammaires autologues à tout autre substitut artériel sont en grande partie liées à la présence de cellules endothéliales qui recouvrent leur surface luminale et à l'absence de réactions immunitaires.

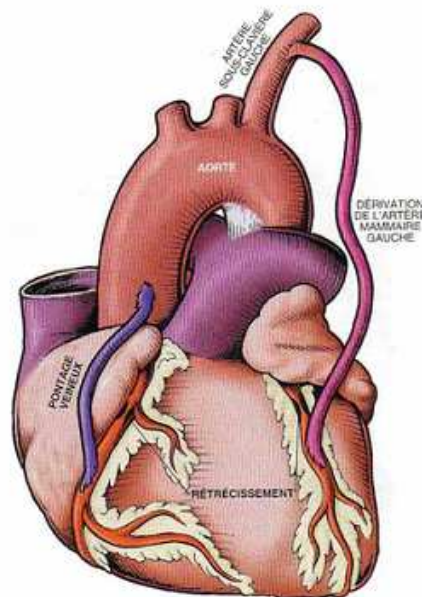


Figure 8 : schéma d'un pontage vasculaire veineux (veine saphène) et artériel (artère mammaire interne)

(dossier.coeur.free.fr)

Des **substituts homologues** ou allogreffes ont également été développés, tels que les veines ombilicales. Elles ont été utilisées au cours des années 1950 et 1960. Le taux de réussite de ces conduits a été rapporté comme étant très faible et leur utilisation a été abandonnée très tôt, dans les années 1970, en partie du fait de la formation d'anévrismes, de l'obstruction partielle ou totale des homogreffes et des réactions immunitaires.

Les **substituts xénologiques** ont été aussi largement utilisés dans la même période que les tissus homologues. Les xénogreffes sont des vaisseaux sanguins d'origine animale, traités contre le phénomène de rejet ou réaction immunologique, avant leur utilisation comme substitut vasculaire. Leur implantation s'est soldée par de nombreuses thromboses, ruptures et infections, réduisant leur application thérapeutique.

D'une façon générale, les autogreffes restent les substituts vasculaires de première intention, mais, **environ un tiers des patients** sujets à une reconstruction artérielle, n'a pas de vaisseau autologue disponible ou adapté (vaisseaux malades, de mauvais diamètre ou endommagés) principalement suite à une utilisation antérieure ou à une mauvaise qualité des veines [70-73]. Dans ce cas, les chirurgiens ont classiquement recours aux **greffes synthétiques** comme le polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe, Téflon[®]) ou le polyéthylène téréphtalate (PET, Dacron[®]). Les prothèses synthétiques sont utilisées avec succès pour le remplacement d'artères de gros calibre mais, pour le remplacement de vaisseaux de faible calibre (diamètre interne inférieur ou égal à 6 mm), elles sont marquées par une faible perméabilité (*patency*) du fait de la formation d'un thrombus à court terme [74-77] et une hyperplasie intimale péri-anastomosique à plus long terme [78-81], ce qui contribue à une occlusion précoce de la greffe [82-85]. Par exemple le taux de perméabilité primaire après 2 ans d'un pontage fémoropoplité est de 80 % pour un greffon veineux et 69 % pour un greffon synthétique (PTFEe) ; après 5 ans ces taux sont respectivement de 74 % et 39 % [86]. Le taux de perméabilité à 4 ans des greffes aorto-coronaires de PTFE est de 14 % [71].

Il est donc nécessaire de développer un substitut vasculaire de faible diamètre, biocompatible, dans le but d'augmenter sa perméabilité. En effet, le rôle d'une prothèse est de remplacer et de reproduire les fonctions naturelles des vaisseaux et plus précisément, celle de la paroi interne (intima) en contact direct avec le flux sanguin et constituée d'une monocouche de cellules endothéliales. Or, à la différence de l'animal, les greffes vasculaires ne « s'endothélialisent » pas spontanément chez l'homme, excepté au niveau de la petite région péri-anastomotique, lieu de l'anastomose [87]. C'est pourquoi l'absence d'endothélium est considérée comme critique à la fois pour la thrombose et l'hyperplasie intimale [88]. Le dépôt de CE autologues permettrait donc de fournir une surface polymérique artificielle

hémocompatible qui assurerait les principales fonctions d'un endothélium vasculaire sain intact. Un tel substitut vasculaire permettrait de réduire la formation de thrombus et d'améliorer la perméabilité à long terme des prothèses de petit diamètre [89].

Les caractéristiques idéales d'une artère artificielle sont donc : [85, 90-97]

- d'être biocompatible, particulièrement avec le sang qui la traverse, c'est-à-dire complètement non thrombogène et non immunogène
- de posséder des propriétés mécaniques appropriées : perméabilité et compliance. Le vaisseau doit être suffisamment résistant pour supporter des pressions internes considérables et permettre aux sutures de résister à des tensions importantes, mais conserver aussi une élasticité proche de celle du vaisseau adjacent
- de posséder des propriétés physiologiques appropriées (réponse vasoconstriction / relaxation)
- de faire preuve d'une excellente durabilité
- d'être résistante aux infections
- de pouvoir être fabriquée dans un espace de temps relativement court, bon marché et en nombre suffisant, avec des caractéristiques différentes (diamètre, longueur, ...) pour répondre à la demande clinique.

L'obtention de ce substitut artificiel idéal semble être possible grâce à une discipline en plein essor appelée **l'ingénierie tissulaire des vaisseaux**.

III - Ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire est un domaine scientifique qui combine les principes de la biologie cellulaire et de l'ingénierie dans le but de créer des substituts biologiques ou hybrides (biosynthétiques) qui restaurent, maintiennent ou améliorent la fonction tissulaire et apportent un résultat stable dans le temps [98].

Dans cette étude, nous nous intéresserons à l'application de l'ingénierie tissulaire dans le domaine vasculaire. En effet, l'ingénierie tissulaire des vaisseaux ou ingénierie vasculaire a suscité beaucoup d'intérêt depuis le milieu des années 80. Elle représente une nouvelle approche dans le but de résoudre les problèmes rencontrés avec l'utilisation des prothèses vasculaires de petit diamètre [75]. Elle vise à développer des matrices biocompatibles qui

présentent des propriétés mécaniques semblables aux conduits autologues tout en fournissant une structure favorable à une repopulation cellulaire et en permettant ainsi son intégration comme conduit vasculaire fonctionnel.

Elle implique l'interaction entre trois éléments principaux : le biomatériau ou matrice, les cellules et les facteurs mécaniques et/ou de croissance (Figure 9).

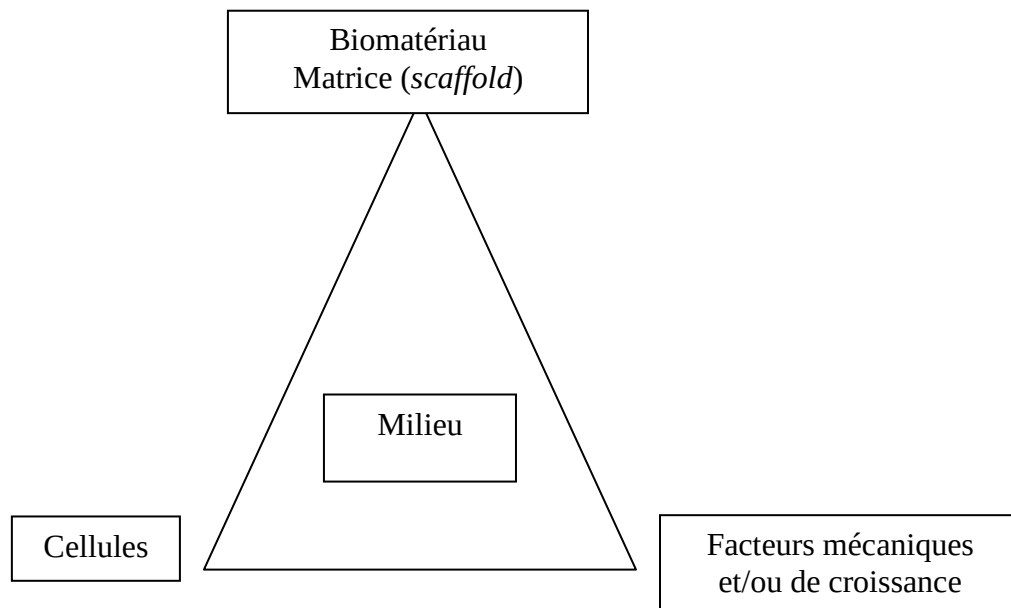


Figure 9 : représentation schématique des principaux acteurs de l'ingénierie tissulaire

III.1 - La matrice

La matrice ou *scaffold* définit l'environnement tridimensionnel et fonctionnel du tissu. Deux types de matrices, les polymères synthétiques et les polymères naturels, sont principalement utilisés. Le collagène et les glycosaminoglycanes sont les polymères naturels les plus couramment employés du fait de leurs effets sur la fonction cellulaire. En effet, le collagène a une bonne capacité à supporter la croissance, la différenciation et la fonctionnalité de nombreux types cellulaires [99]. Les matériaux synthétiques utilisés sont variables, allant de biomatériaux inertes tels que le Dacron[®], le PTFE et le poly(esteruréthane)urée, à des polymères synthétiques biodégradables tels que l'acide polyglycolique (PGA) et l'acide polylactique (PLA) [100-103].

Le collagène possède une bonne résistance mécanique, une biocompatibilité et une biodégradabilité contrôlables et elle joue un rôle favorable dans le développement cellulaire. Le collagène de type I est principalement utilisé pour la fabrication des biomatériaux. En effet, il est peu immunogène et son antigénicité peut être réduite par réticulation thermique ou chimique ou par élimination des télépeptides par une digestion avec la pepsine. Cependant, des anticorps contre le collagène ont été détectés chez des patients traités avec du collagène de derme bovin [104]. Cette réaction dépend de l'espèce d'origine du collagène ainsi que du site d'implantation [105]. En revanche, l'existence d'une corrélation entre les implants de collagène de type I bovin et des maladies auto-immunes n'a pas été démontrée à ce jour [106]. Par contre, le collagène de type II a été décrit comme responsable de maladies auto-immunes et ne peut donc pas être utilisé comme biomatériau implantable [107].

L'acide polyglycolique (PGA) et l'acide polylactique (PLA) sont des matrices biorésorbables. Ces prothèses prometteuses ont cependant déçu. En effet, leur résistance mécanique à long terme est faible et le tissu cicatriciel qui se développe à la place de la prothèse digérée n'est pas de bonne qualité. Leur application biomédicale a été freinée par le caractère acide de leurs produits de dégradation susceptibles de produire des réactions immunitaires et inflammatoires [108-109].

Les prothèses en PET se présentent sous une forme tricotée ou tissée. Elles sont mécaniquement instables et subissent des dégradations chimiques [110].

Le PTFEe est le matériau le plus utilisé en chirurgie de pontage vasculaire.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé le polymère synthétique non biodégradable PTFEe car il présente de nombreux avantages (voir ci-dessous).

III.1.1 - Les prothèses artérielles en PTFE expansé (PTFEe)

La découverte accidentelle, en 1938, du PTFE, par R.J. Plunkett de la compagnie Du Pont de Nemours Inc. a procuré à la médecine un polymère possédant des propriétés physico-chimiques uniques [111]. Le poly(tétrafluoroéthylène) $(-CF_2-CF_2-)_n$ est un polymère chimiquement inerte composé d'un squelette d'atomes de carbone, sur chacun desquels deux

atomes de fluor sont fixés (Figure 10). Il est obtenu par une polymérisation radicalaire à partir du monomère tétrafluoroéthylène.

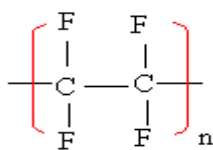


Figure 10 : Formule chimique du PTFEe $-(\text{CF}_2-\text{CF}_2)_n$

(<http://www.chimix.com>)

Ce polymère est très hydrophobe et fortement électronégatif. Les prothèses de Téflon microporeux ou PTFE expansé ont été introduites pour la première fois en mars 1975 par la compagnie Impra Inc, alors qu'au cours de la même année, la compagnie W.L. Gore and Associates lançait une prothèse d'un type similaire (Figure 11) [112].



Figure 11 : A : aspect macroscopique du PTFEe, B : raccordement par suture d'une prothèse vasculaire en PTFEe à un vaisseau naturel ex vivo

(A : <http://www.bardpvoem.com>, B : *l'actualité chimique* 2006; 301:99-105)

Ce polymère est fabriqué par chauffage et étirement mécanique, ce qui produit un matériau poreux ayant une structure caractéristique contenant des nodules solides interconnectés par de fines fibrilles (Figure 12). La taille des pores et la longueur des fibrilles varient et déterminent les caractéristiques de la greffe [113].

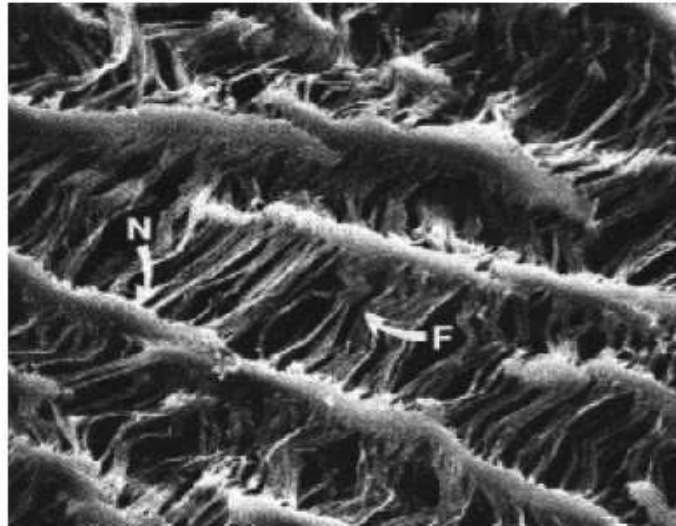


Figure 12 : aspect en microscopie électronique d'un fragment de PTFEe.

Aspect microporeux (N : nodule, F : fibre).

www.urofrance.org

Le PTFEe a des caractéristiques exceptionnelles. En effet, il n'est pas biodégradable, présente une excellente stabilité biologique, une résistance thermique à haute température (stérilisable à la chaleur contrairement au PET), et il conserve ses propriétés mécaniques et chimiques dans la plupart des environnements. Sa surface est hautement électronégative et hydrophobe [113]. De plus, il permet la croissance de vaisseaux à travers ses pores [114]. Ces propriétés en font le matériau de choix pour la réalisation de pontages vasculaires quand un substitut autologue n'est pas disponible.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, les prothèses en PTFEe présentent une faible hémocompatibilité. Dans le but d'obtenir une surface thromborésistante et ainsi de réduire la haute incidence d'occlusion de la greffe de petit diamètre, l'ensemencement de CE (exhibant un phénotype antithrombotique) sur la face luminale des prothèses est une approche qui a été proposée en ingénierie vasculaire depuis plusieurs années [60, 115-123]. En fait, l'endothélialisation spontanée des surfaces de greffe synthétique semble ne pas avoir lieu chez l'homme [124], ce qui contribue à l'échec thérapeutique. Cette technique de cellularisation est une procédure au cours de laquelle les cellules du patient sont prélevées et amplifiées *in vitro* directement sur la matrice avant qu'elle soit implantée à ce patient sous la forme d'une greffe endothélialisée.

Herring et al [125] ont été les premiers à suggérer le recouvrement *in vitro* des implants prothétiques avec les propres CE de l'hôte et ils ont démontré après implantation chez le chien, que ce concept était réalisable. En effet, les CE possèdent des propriétés antithrombogéniques connues en agissant comme barrière physique mais aussi par la

libération continue de facteurs inhibiteurs tels que NO, la thrombomoduline, la prostacycline (PGI₂) et l'activateur du plasminogène [126], la présence de glycosaminoglycanes à leur surface, la sécrétion d'antithrombine III [127] et la présence de sites aspécifiques de liaison pour l'héparine [128].

Néanmoins les polymères utilisés en chirurgie vasculaire ne sont pas compatibles avec la culture des CE [129]. En effet, le PTFEe est hautement hydrophobe, ce qui limite l'adhésion des CE [130]. Il existe des forces répulsives électrostatiques entre les CE chargées négativement et les matériaux des greffes qui le sont également [113, 131]. Ainsi, jusqu'à présent, sans modification de surface, l'ensemencement des CE sur les prothèses vasculaires est rédhibitoire et se traduit par un faible nombre de CE adhérentes, présentes sur de petites portions de surface après exposition aux contraintes de cisaillement, représentatives du flux sanguin dans la circulation périphérique [132]. Les greffes de PTFEe exhibent un attachement cellulaire de 10 +/- 7 % des CE appliquées et une rétention au flux de 4 +/- 3 % des cellules appliquées au départ [133-134].

Il est donc indispensable de trouver une technique de modification de surface qui permettrait le développement et la rétention d'une monocouche de CE confluentes sur la surface luminale des prothèses de PTFEe (amélioration de la cytocompatibilité) [135] sans interférer avec les qualités physiques du matériau. Cela permettrait ainsi d'améliorer l'hémocompatibilité de ce matériau.

III.1.2 - Modifications de surface des prothèses artérielles en PTFEe

III.1.2.1 - Ajout de molécules de la matrice extracellulaire et traitement des surfaces par butylamine ou rayons ultraviolets

Dans cette partie, les recherches de ces dix dernières années basées sur des modifications de surface des prothèses synthétiques artérielles de PTFEe, de calibre inférieur ou égal à 6 mm [136], seront présentées succinctement et abordées sous trois angles : les études *in vitro*, les études *in vivo* et les études cliniques. Les principales conditions expérimentales ainsi que les conclusions de ces études sont résumées sous la forme de tableaux à la fin de cette partie.

Une des premières techniques de modification de surface a consisté à immobiliser, sur la surface luminale de la greffe, des protéines et notamment celles de la matrice extracellulaire. La principale protéine utilisée, il y a une vingtaine d'années, pour potentialiser l'adhésion des CE sur le PTFEe, était la fibronectine. C'est une glycoprotéine adhésive, trouvée dans la membrane basale, à laquelle les CE s'attachent sur la paroi des vaisseaux sanguins natifs. Cette protéine matricielle est donc très efficace pour favoriser l'endothélialisation des substituts synthétiques de faible diamètre. Cependant, son affinité pour les CE est équivalente à celle pour les plaquettes, ce qui favorise l'initiation d'une thrombose [137-140]. De plus, il a été décrit que les CE ne développent pas de liaisons fortes sur la fibronectine au cours de la période d'ensemencement, ce qui se traduit, après restauration du flux, par une perte cellulaire significative [141]. Or, une surface de matériau compatible avec le sang doit être à la fois inerte envers les cellules circulantes comme les plaquettes, et permettre l'adhésion et la croissance des CE.

a) Etudes *in vitro*

Plusieurs études *in vitro* ont été réalisées dans le but de mesurer l'adhésion des plaquettes sur des surfaces ensemencées. D'autres ont été effectuées afin d'améliorer le recouvrement des surfaces luminales prothétiques par les cellules. Ces deux thèmes sont passés en revue dans cette section.

➤ *Etudes mesurant l'activité des plaquettes*

Ces études ont été effectuées afin de tester le comportement des plaquettes face aux matériaux prothétiques modifiés. Elles révèlent que le PTFEe modifié par de l'héparine [142-143] ou de la colle de fibrine [144] s'oppose aux dépôts de plaquettes. Par contre, le sang [144] et le fibrinogène [145] favorisent l'adhésion des plaquettes, d'où l'intérêt de déposer des CE.

➤ *Recouvrement*

Puisque la surface luminale du PTFEe ne favorise pas le recouvrement cellulaire, différentes approches telles que l'emploi de molécules de la matrice extracellulaire ou le traitement des surfaces par de la butylamine ont été proposées. Les études ont porté sur l'exploration de trois aspects : l'attachement, la croissance et la rétention des cellules exposées au flux.

– L'attachement cellulaire

L'obtention, *in vitro*, d'un recouvrement luminal complet par les cellules avant implantation *in vivo* du PTFEe est une condition indispensable [146]. Cependant, matrice et cellules ont la même charge. Les surfaces des polymères ont donc été modifiées afin de favoriser l'adhésion des cellules. Les surfaces luminales du PTFEe ont été recouvertes par des composants moléculaires issus de la matrice extracellulaire comme du collagène 1, 3 ou 4 [146-147], de la fibronectine [146, 148-151], de la laminine 5 [152], et de la colle de fibrine [60, 144, 146, 153], du plasma [146], de l'héparine [142-143], de la BSA (*Bovine Serum Albumin*) biotinylée [149], du fibrinogène [145], et des peptides notamment à fort contenu en RGD (Séquence protéique arginine-glycine-aspartate) [150-151].

Mais ces surfaces ont également été traitées par de la butylamine [134, 154] ou par des rayons ultraviolets (UV) [155]. A cet effet, Gumpenberger et al (2003) [155] ont étudié l'adhésion de CE humaines sur des échantillons de PTFEe modifié photochimiquement (exposition aux UV dans une atmosphère ammoniacale) et ont constaté une augmentation significative du nombre de cellules adhérentes. Après traitement, ce PTFEe présente un nombre relativement important de groupements amines chargés positivement, favorables à l'adhésion cellulaire [156].

Parmi ces études, l'attachement cellulaire, par rapport à celui obtenu sur PTFEe non modifié, est largement amélioré par l'emploi de laminine 5 [152] et de polymères peptidiques fluorosurfactants (FSP) contenant le motif CRRETAWAC (Cys-Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala-Cys) [151].

Il l'est beaucoup moins avec l'utilisation de la BSA biotinylée bien que les résultats soient supérieurs à ceux obtenus avec la fibronectine. Il est également amélioré par le collagène 1 et 3 [147] et RGD [150]. Par contre avec RGD, l'attachement est diminué par rapport à la fibronectine. La modification avec fibronectine combinée aux cellules musculaires lisses n'augmente pas l'attachement cellulaire par rapport à la fibronectine seule. En définitive, les meilleurs candidats à l'attachement cellulaire semblent être la laminine 5 et FSP-CRRETAWAC. Cependant, il s'avère difficile de comparer plus profondément ces études dans la mesure où elles ont été effectuées avec des cellules de diverses origines et selon différentes conditions de culture.

– Croissance

Il a été montré que l'obtention d'une monocouche confluite est un des éléments clés de la résistance au décrochement des cellules face aux contraintes engendrées par la circulation

sanguine [146]. Il est donc nécessaire d'utiliser une technique de modification de surface qui permette d'obtenir rapidement cette monocouche confluyente. La croissance des CE sur le PTFEe est stimulée par la colle de fibrine, la laminine 5, le traitement par butylamine et le traitement par UV.

Le traitement par butylamine permet d'altérer les caractéristiques de surface des prothèses sans changer leurs propriétés physiques [157].

Sur PTFE modifié par RGD, la croissance est moins forte, mais les cellulesensemencées sur ce support modifié présentent, tout de même, une quasi confluence à 5 jours de culture. FSP-CRRETAWAC permet une augmentation de croissance par rapport à la fibronectine. Les collagènes 1 et 3 ne permettent pas l'obtention d'une monocouche confluyente. Par contre, Gumpenberger et al (2003) [155] ont constaté sur PTFEe modifié photochimiquement, la formation d'une couche cellulaire confluyente après 8 jours de culture. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus sur des puits en polystyrène, support standard pour la culture cellulaire.

Les études de Vinard et al (1999) [146] et de Kidd et al (2005) [152] peuvent être comparées car les deux équipes ont utilisé des cellules humaines : HUVEC (Vinard) ou CE de microvaisseaux humains (Kidd). Vinard a montré l'obtention d'une monocouche confluyente sur PTFEe modifié par de la colle de fibrine avec une densité initiale d'ensemencement de 4×10^5 cellules/cm². Kidd et al (2005) ont montré la même chose mais avec une modification du PTFEe par de la laminine 5 et une densité initiale d'ensemencement de 2×10^5 cellules/cm². Cependant, Kidd et al (2005) ont obtenu le même résultat que Vinard et al (1999) avec des cellules adultes et une densité cellulaire deux fois moins importante. Par contre, les deux équipes ont constaté que l'adhérence cellulaire est augmentée quand les cellules sontensemencées sous pression et soumises à une rotation pendant 1 heure dans un incubateur à 37°C [152] ou à température ambiante [146], d'où l'importance des conditions d'ensemencement.

– La rétention des cellules exposées au flux

Une fois les CE immobilisées sur une prothèse artérielle, elles doivent aussi être capables de résister aux forces de cisaillement générées par le sang après implantation. Dans les artères en conditions physiologiques, les contraintes de cisaillement développées par le sang circulant sont en moyenne de 20 dynes/cm².

La rétention cellulaire dans les conditions d'écoulement peut être améliorée par la colle de fibrine [60], par la fibronectine couplée aux cellules musculaires lisses (CML) [148] ou par le

traitement par butylamine [134]. Le problème posé par l'action des CML est le manque de contrôle de leur croissance, ce qui peut engendrer une sténose de la greffe. Cependant, certaines études ont montré que les CE inhibent significativement la croissance des CML en coculture [158-159].

Sous l'action du cisaillement, la perte cellulaire est moindre si on augmente le temps d'incubation des cellules [149]. En effet, Chan et al (2005) [149] ont montré que la rétention cellulaire est significativement supérieure après 24 h d'incubation par rapport à 1 h.

Yu et al (2001) [148] et Fernandez et al (2005) [60] ont utilisé une pompe pulsée pour tester la rétention des CE de veine saphène humaine ensemencées sur du PTFEe. Yu et al [148] ont utilisé une modification par fibronectine + CML et un système de flux parallèle alors que Fernandez et al ont utilisé de la colle de fibrine et une pompe de circulation extra-corporelle. Fernandez et al [60], après un flux de 15 dynes/cm² pendant 2 heures, ont montré que la monocouche confluite était conservée alors que les greffons de Yu et al [148], après 1 heure de flux à 6,1 dynes/cm², n'ont conservé que 73 % de cellules. Il semble que le traitement par colle de fibrine permette une meilleure rétention cellulaire vis-à-vis du flux mais, les systèmes de flux n'étant pas rigoureusement les mêmes, des investigations devront être étendues.

Larsen et al (2007) [151], quant à eux, ont utilisé un système rotatif mais non pulsé et ont soumis des CE humaines d'artères pulmonaires ensemencées sur PTFEe modifiés par FSP-CRRETAWAC, à un flux de 47,8 dynes/cm² pendant 4 heures. Au terme de ce flux, ils n'ont pas observé de perte significative de cellules. Cette modification de surface a donc permis une rétention cellulaire sur une période de flux plus longue que les deux études précédentes. Mais le système de flux n'est pas pulsé contrairement aux deux études précédentes, ce qui ne nous permet pas de confirmer cette hypothèse.

L'importance de l'intensité du flux et son mode de propulsion jouent donc un rôle prépondérant dans l'arrachement des CE.

➤ *Intérêts et limites des modifications de surface in vitro*

Ces différentes études *in vitro* nous ont montré que la colle de fibrine semble avoir un effet positif à la fois sur la diminution de l'activité plaquettaire, et sur la formation et le maintien, après exposition au flux, d'une monocouche confluite de CE. Cependant, l'utilisation clinique de ce composé présente de nombreux inconvénients. Tout d'abord, il s'agit d'un dérivé sanguin, il est donc associé au risque, au moins théorique, de transmission d'agents viraux tels que les virus hépatiques et le *Virus Immunodéficient Humain* (VIH) [146]. Il peut également entraîner des réactions immunitaires indésirables dans la mesure où les protéines le

constituant sont isolées et purifiées à partir d'un organisme vivant [160]. Il est également d'un coût élevé. De plus, le procédé de recouvrement par la colle de fibrine présente une hétérogénéité d'épaisseur avec des dépôts supérieurs à 0,8 mm d'épaisseur dans 15 % des greffes, entraînant une réduction de la lumière vasculaire [60].

Enfin, ces études *in vitro* ne prennent pas en compte l'action potentielle des leucocytes. Or, il semble qu'ils jouent un rôle important dans le décrochement des cellules, ce qui nécessite l'évaluation de leur action *in vivo* [161].

b) Etudes chez l'animal

Concernant les études sur les prothèses artérielles implantées chez l'animal, les équipes de recherche se sont intéressées à différents aspects : l'amélioration du recouvrement endothélial sur les prothèses implantées et les interactions sang-prothèse.

➤ *Amélioration du recouvrement endothélial*

Yu et al (2003) [162] ont ensemencé des prothèses artérielles puis les ont greffées chez le lapin. La procédure d'ensemencement a été précédée d'une phase de modification de la surface prothétique par de la fibronectine couplée à des CML. Un jour après rétablissement de la circulation, 90 % des CE étaient encore présentes contre 51 % pour les CE ensemencées sur du PTFE uniquement modifié par de la fibronectine.

Randone et al (2005) [163] ont implanté chez le rat des prothèses artérielles modifiées par du Matrigel® (laminine, collagène et entactine) combiné à du VEGF sans procédure d'ensemencement. Après 30 jours d'implantation, 52,8 % de la greffe est recouverte par des CE contre 20,8 % pour le PTFE non modifié. Par contre, Sipehia et al (2001) [164] ont implanté chez le lapin des prothèses artérielles modifiées par de la butylamine. Ils ont constaté après 1 mois d'implantation, la formation d'une monocouche de cellules semblables aux CE. Il semble donc que ce traitement soit plus efficace par rapport à Matrigel® combiné à VEGF pour améliorer le recouvrement endothélial.

Chan et al (2005) [149] n'ont pas observé de différence significative de recouvrement endothélial entre PTFE modifié par fibronectine ou par fibronectine combinée à BSA biotinylée. Par contre, ils ont observé une différence significative de rétention entre 24 h d'incubation des CE et 1 h, mais la période de flux n'était que de 15 minutes. Il faut cependant rester prudent car il est connu que chez le rongeur, l'endothélialisation spontanée est observée, contrairement à l'être humain.

➤ *Interactions sang-prothèse*

Nous avons vu précédemment (chapitre II) que les deux principales causes d'échec du PTFEe pour le remplacement des vaisseaux de faible diamètre sont la formation d'un caillot à court terme (conséquence d'un manque de compatibilité entre la surface du matériau non endothélialisée et le sang [165]) et l'hyperplasie intimale à plus long terme, caractérisée par la prolifération et la migration des CML de la média vers l'intima, consécutive à un défaut d'endothélialisation et de compliance du substitut.

- **Les plaquettes** font souvent l'objet d'études car elles interagissent avec les protéines sanguines qui ont adhéré préalablement aux surfaces non endothérialisées. Leur agrégation peut induire la thrombogenèse évoluant parfois vers l'occlusion. La formation du thrombus est la cause à court terme de l'échec d'implantation des prothèses de petit diamètre. Lin et al (2004) [166, 167] et Gosselin et al (1995) [168] ont constaté, tous les deux, une diminution du dépôt de plaquettes sur PTFEe modifié par rapport à celui obtenu sur PTFEe non modifié. Lin et al ont utilisé, comme modification de surface, l'héparine, et Gosselin et al la colle de fibrine combinée à l'héparine et FGF1. Ces derniers ont constaté une réduction de 60 % du dépôt de plaquettes après 2 heures de circulation, Lin et al [167], une réduction de 84 % après le même temps. Il semble donc que l'héparine seule soit plus efficace pour limiter l'adhésion plaquettaire que la colle de fibrine combinée à l'héparine et FGF1, d'autant plus que Gosselin et al ont effectué cette étude chez le chien alors que Lin et al l'ont effectuée chez le singe. Or, les singes ont une architecture vasculaire et une hémodynamique comparables à celles existant chez l'homme [167]. Enfin, Yu et al (2003) [162] ont constaté, chez le lapin, après 100 jours d'implantation de prothèsesensemencées et modifiées par de la fibronectine couplée à des CML, l'absence de thrombus, contrairement aux prothèsesensemencées et modifiées uniquement par de la fibronectine.
- Le deuxième facteur d'échec d'implantation des prothèses de petit diamètre en PTFEe est **l'hyperplasie intimale**. Elle apparaît à plus long terme. Lin et al (2004) ont utilisé chez le singe et le chien des prothèses en PTFEe modifiées par de l'héparine. Ils ont constaté pour ces deux espèces, après 30 jours d'implantation, une diminution de l'hyperplasie intimale par rapport à celle constatée sur PTFEe non modifié. Par contre, Randone et al (2005) [163] ont implanté chez le rat des prothèses modifiées par du Matrigel combiné à VEGF. Ils ont observé après 30 jours d'implantation une augmentation de la densité des CML par rapport à celle obtenue sur PTFEe non modifié.

Yu et al (2003) [162] ont constaté après 30 jours d'implantation, une augmentation de l'hyperplasie intimale chez le lapin sur des prothèses ensemencées et modifiées par de la fibronectine combinée à des CML par rapport à celles cellularisées et modifiées uniquement avec de la fibronectine (contrôle). Par contre, après 100 jours d'implantation, l'épaisseur intimale devient plus faible que celle obtenue après 30 jours d'implantation et on n'observe plus de différence avec celle obtenue avec le contrôle.

Les prothèses modifiées par de l'héparine semblent être plus propices à limiter l'hyperplasie intimale, mais, ces études s'effectuant avec des contrôles différents et surtout chez des espèces différentes, il est difficile d'affirmer cette hypothèse.

➤ *Synthèse des études chez l'animal*

L'héparine semble être une des plus efficaces modifications de surface car elle permet à la fois la diminution du dépôt précoce de plaquettes et la diminution de l'hyperplasie intimale. Son efficacité a de plus été testée chez de grands mammifères (singe). Mais l'étude d'ensemencement menée par Yu et al (2003) [162] a également montré des résultats prometteurs après 100 jours d'implantation à la fois par l'absence de thrombus et d'hyperplasie intimale sur PTFEe de petit diamètre modifié par de la fibronectine combinée à des CML.

c) Etudes cliniques

Les études chez l'animal font abstraction des conditions adverses retrouvées en situation clinique (par exemple l'athérosclérose, les maladies concomitantes telles que le diabète). Aussi, à cause des différences inter-espèces, les résultats obtenus chez l'animal doivent être soigneusement extrapolés à l'homme [169]. Les animaux ont une capacité d'endothélialisation spontanée, contrairement à l'homme chez qui l'endothélialisation ne se produit qu'au niveau de l'anastomose. De ce fait, les résultats obtenus chez les animaux sont optimistes. Noishiki et al (2000) [170] ont suggéré que ce problème pouvait être surmonté en utilisant des animaux âgés. En effet, l'endothélialisation de la greffe est différée chez les animaux âgés, qui peuvent donc mimer les attentes chirurgicales typiques des patients.

La plupart des études cliniques de ces dix dernières années portent sur le PTFEe modifié par de l'héparine ou de la colle de fibrine. Les résultats obtenus avec l'héparine sont assez prometteurs [136, 171-173] mais souvent il n'y a pas de groupes contrôles, l'échantillon est de petite taille et le suivi s'effectue sur une durée relativement courte, ce qui fait que des

comparaisons statistiques sont difficiles à établir. De plus, il existe quelques cas rapportés de systèmes médicaux implantables modifiés par de l'héparine et qui ont contribué à une thrombocytopénie [174-175]. Mais ces patients ont été traités sans enlever ces systèmes.

Les études de Laube et al (2000) [139] et l'équipe de Deutsch [89, 140, 176] ont consisté à implanter chez l'homme des prothèses artérielles, à base de PTFEe, cellularisées et modifiées par de la colle de fibrine. Laube et al ont observé l'absence de thrombus après 45 mois d'implantation au niveau de l'artère coronaire et un taux de survie des greffes (90,5 % à 27,7 mois) comparable à celui d'un substitut autologue (92,9 % à 2 ans [177]). Mais il s'agit également d'études non randomisées avec un faible effectif. Meinhart et al (2001) [140] et Deutsch et al (1999) [89] ont obtenu un maintien de la perméabilité de 65 % respectivement à 7 et 9 ans pour les prothèses cellularisées et modifiées par de la colle de fibrine par rapport à 16 % pour les prothèses non modifiées. Ce taux d'efficacité est proche de celui obtenu avec un vaisseau autologue. Il n'existe pas à ce jour, à notre connaissance, une étude de si longue durée avec un substitut modifié par de l'héparine.

d) Synthèse des études

Même si l'endothélialisation du PTFEe a été réalisée avec succès chez l'animal, les résultats chez l'homme restent assez nuancés en raison principalement du faible effectif de patients utilisés dans les études, l'absence fréquente de randomisation et surtout d'études prospectives. Il serait également bénéfique et sécurisant d'utiliser une modification de surface qui ne serait pas réalisée avec un dérivé sanguin.

e) Résumé

Sous forme de tableaux récapitulatifs non exhaustifs sont présentés les différentes études de modification de surface du PTFEe qui ont été réalisées *in vitro* (Tableau I), chez l'animal (Tableau II) ou chez l'homme (Tableau III).

Tableau I : modifications de surface du PTFE, études *in vitro* (par ordre chronologique)

Références	Gosselin et al. (1996) [153]	Zarge et al (1997) [144]	Tseng et al (1998) [134]	Vinard et al (1999) [146]
Type de CE (espèce)	CE de VJE (chiens)	NU	Aorte (bovins)	HUVEC
Matrice ou Traitement	Colle de fibrine +FGF1+héparine	Colle de fibrine +FGF1+héparine	Butylamine	Fibronectine, Coll1, Coll4, plasma, plasma+fibro, colle de fibrine, fibrine
Densité d'ensemencement	3×10^5 cellules/cm ²	NU	10^5 cellules/cm ²	$0,5-6 \times 10^5$ cellules/cm ²
Période d'incubation avant flux	12 h en incubateur	NU	NP	NU
Système de flux	Système de flux pulsatile 1 h de flux 90 mL/min	Système de flux pulsatile en boucle 1 h de flux 90 mL/min sang total de chien	Pompe péristaltique (flux constant) et pompe pulsatile 5 J de flux 1 dyn/cm ² (flux constant) 65, 108 ou 259 dyn/cm ² (flux pulsatile)	NU
Conclusions	> de la rétention r/r PTFE+fibro	< du dépôt de plaquettes r/r PTFE+sang H	En statique : 51 % de surface couverte avec PTFE modifié, 13 % si PTFE non modifié Flux : Recouvrement stable avec PTFE modifié et formation d'une monocouche confluyente de CE (flux constant ou pulsé), chute du nombre de cellules si PTFE non modifié	Le meilleur recouvrement est obtenu avec colle de fibrine, fibrine et plasma et avec une densité d'ensemencement supérieur ou égale à 4×10^5 cellules/cm ² et incubées pendant 60 minutes avant comptage cellulaire

Références	Yu et al (2001) [148]	Gumpenberger et (2003) [155]	Choi et al (2005) [145]	Chan et al (2005) [149]
Type de CE (espèce)	CE de veine saphène H	HUVEC (lignée)	NU	HUVEC
Matrice ou Traitement	Fibronectine ± CML	Traitement photochimique	Fibrinogène ou albumine	Fibronectine ± BSA biotinylée (BSAb)
Densité d'ensemencement	3x10 ⁵ cellules/mL	76x10 ³ cellules/cm ²	NU	2x10 ⁶ cellules/mL
Période d'incubation avant flux	1J	NU	NU	1h d'attachement ± 23 h d'incubation (système rotatif en incubateur)
Système de flux	Pompe pulsée parallèle 1 h de flux 6,1 dyn/cm ²	NU	Pompe (système de perfusion) 5 min de flux Taux de contrainte = 9/s Sang de chien	Système rotatif 15 min de flux 15,3 dyn/cm ²
Conclusions	Statique : pas de modification Flux : > de la rétention cellulaire (73 % versus 39 % pour fibro seule)	Les cellules commencent à proliférer au troisième jour et atteignent la confluence à 8 J	Avec fibrinogène, > du nombre de cellules sanguines adhérentes r/r à PTFE±albumine	précoce sur PTFE + fibro-BSAb r/r PTFE + fibro mais pas la rétention Pour les 2 supports, > de la rétention après 24 h d'incubation et > de la libération de prostacyclines

Références	Kidd et al (2005) [152]	Zhu et al (2005) [142]	Fernandez et al (2005) [60]	Feugier et al (2005) [132]
Type de CE (espèce)	CE de microvaisseaux H (graisse)	NU	CE de veine saphène H	HUVEC
Matrice ou Traitement	Laminine 5	Chitosan-héparine	Colle de fibrine	Coll 1 et Coll 3
Densité d'ensemencement	2×10^5 cellules/cm ²	NU	15×10^4 cellules/cm ²	105×10^3 cellules/cm ²
Période d'incubation avant flux	NU	NU	5 h dans un système rotatif (incubateur)	6 J en incubateur
Système de flux	NU	Système statique : mise en contact du PTFE pendant 3 h avec du sang frais total	Pompe de CEC pulsatile A 8 J, 2 h de flux 15 dyn/cm ²	Système <i>cone and plate</i> (rhéomètre) Flux constant 1 h de flux 10 et 20 dyn/cm ²
Conclusions	> de l'adhésion cellulaire Cellules étalées 1 h après ensemencement Monocouche	Diminution de l'adhésion plaquettaire r/r PTFE non modifié	Monocouche confluite sur PTFE modifié. Maintien après flux	En statique : > de la densité cellulaire et du pourcentage de recouvrement de surface avec PTFE+Coll, < de l'attachement initial mais pas de monocouche confluite Flux : perte cellulaire considérable mais > du degré d'étalement des cellules restantes

Références	Heyligers et al (2006) [143]	Larsen et al (2006) [150]	Larsen et al (2007) [151]
Type de CE (espèce)	NU	CE d'artères pulmonaires H	Artères pulmonaires H
Matrice ou Traitement	Héparine	Polymère fluorosurfactant peptidique (PFSP)-RGD (Arg-Gly-Asp), Fibronectine	Polymère fluorosurfactant peptidique (PFSP)-CRRETAWAC, Fibronectine, PFSP-RGD
Densité d'ensemencement	NU	15×10^3 cellules/cm ²	Statique : 15×10^3 cellules/cm ² Flux : 65×10^3 cellules/cm ²
Période d'incubation avant flux	NU	NU	18-22 h
Système de flux	Veine antécubitale connectée à PTFE Flux constant 6 min de flux 20 mL/min (taux de contrainte 74/s)	NU	Système de disques rotatifs 4 h de flux 9,6-57,4 dyn/cm ²
Conclusions	< de la thrombogénicité (fibrinopeptide A) Pas de quantité mesurable de thrombose (prothrombine, P sélectine) ni de plaquettes r/r PTFE non modifié	< de l'attachement cellulaire initial r/r PTFE + fibro mais > PTFE non modifié > du taux de croissance r/r PTFE + fibro Quasi confluence à 5 J Production de prostacycline équivalente à celle sur PTFE + fibro	> de l'attachement et taux de croissance r/r PTFE + fibro et PTFE non modifié. Même taux de production de prostacyclines que sur PTFE + fibro. < adhésion plaquettaire r/r PTFE + fibro et PTFE+ PFSP-RGD. Confluence atteinte en 7,5 h sur PTFE + PFSP, pour les 3 supports, pas de perte significative après 4 h de flux à 47,8 dyn/cm ²

Tableau II : modification de surface du PTFE, études chez l'animal

Références	Gosselin et al (1995) [168]	Nishibe et al (2000) [137]	Sipehia et al (2001) [164]	Yu et al (2003) [162]
Diamètre	4 mm	4 mm	4 mm	4 mm
Site d'implantation	Pontage aorto-iliaque	Artère carotide	Aorte infrarénale	Aorte
Sujets	Chien	Chien	Lapin	Lapin
Taux de perméabilité de la greffe	100 %	Pas de différence significative (80 % versus 70 %) à 6 semaines	100 % à 1 mois	100%
Matrice	Colle de fibrine+FGF1 +héparine	Fibronectine	Butylamine	Fibronectine +/- CML+CE (veine jugulaire de lapin)
Conclusions	<dépôts de plaquettes après 2 h de circulation (38 % versus 62 %) mais pas de différences à 5 et 30 min	La surface sans thrombus est significativement plus importante (86,9 % versus 34 %). Présence de tissu conjonctif fibreux recouvert d'une couche de cellules semblables aux CE. Croissance tissulaire transmurale	A 1 mois, couche de cellules semblables à des CE	Après 1 h de flux, la rétention cellulaire est plus importante sur PTFE + fibro+CML r/r à PTFE + fibro (98 % versus 65 %). Même chose après 1J (90 % versus 51 %). Après 30 J d'implantation, la néointima est plus épaisse sur les greffes avec CML. Mais pas après 100 J. Pas de thrombus après 100 J

Références	Shimada et al (2004) [113]	Lin et al (2004) [166]	Lin et al (2004) [167]
Diamètre	4 mm	4 mm	4 mm
Site d'implantation	Artère iliofémorale-artère fémorale	Pontage fémorofémoral	Pontage aorto-iliaque
Sujets	Chien	Chien	Singe
Taux de perméabilité de la greffe	Même taux de perméabilité que le contrôle (PTFE non modifié) (43 % à 12 sem)	4 semaines 89 % versus 44 %	4 semaines 100 %
Matrice	Fibronectine	Héparine	Héparine
Conclusions	Après 12 semaines, néointima presque complète avec monocouche de CE. > zone sans thrombus (96,4 % versus 69,4 %)	Dépôt immédiat de plaquettes (4 h) similaire dans les deux groupes. Réduction du dépôt de plaquettes 24 heures après implantation (72 % de réduction). Réduction de l'hyperplasie intinale au niveau de l'anastomose et de la prolifération des CML.	Réduction du dépôt précoce de plaquettes après 1 à 4 heures. Réduction de l'hyperplasie néointimale au niveau de l'anastomose et de la prolifération des CML

Références	Kidd et al (2005) [152]	Chan et al (2005) [149]	Randone et al (2005) [163]	Zhu et al (2005) [142]
Diamètre	Disques (4 mm de diamètre)	1 mm	2 mm	5 mm
Site d'implantation	Tissu souscutané de la hanche	Artère fémorale	Aorte abdominale	Veine saphène
Sujets	Souris	Rat	Rats	Chien
Taux de perméabilité	NP	100 % de perméabilité à 15 min versus 75 % pour PTFE non modifié	100% à 30 J	100 % à 2 semaines
Matrice	Laminine 5	Fibronectine ± BSA biotinylée ± HUVEC	Matrigel+VEGF	Chitosan-héparine
Conclusions	Après 5 semaines, la croissance vasculaire dans le tissu environnant (angiogenèse) et dans les pores (néovascularisation) est stimulée. Pas d'augmentation de la réponse inflammatoire	Après 15 min de flux, pas de différence significative de la densité cellulaire entre les 2 supports mais significativement plus de cellules après 24 h d'attachement avant flux que 1 h. Recouvrement par un caillot est plus marquée pour les zones non endothélialisées	A 30 J, > endothélialisation (52,8 % de greffe recouverte versus 20,8 % pour PTFE non modifié, > hyperplasie myointimale, > densité des CML r/r à greffe non modifié	A 2 semaines, tissu de granulation dense qui peut être causé par une régénération endothéliale. Pas de thrombus

Tableau III : modification de surface du PTFE, études chez l'homme

Référence	Deutsch et al (1997) [176]	Deutsch et al (1999) [89]	Laube et al (2000) [139]	Devine et al (2004) [173]
Diamètre	6 mm	6 mm	4 mm	6 mm
Site d'implantation	Pontage fémoropoplité	Pontage fémoropoplité	Artère coronaire	Pontage fémoropoplité
Cellules	Veine céphalique (CE)	VJE (CE)	Veine cutanée (CE)	NU
Taux de perméabilité	Présence de lésions athérosclérotiques	A 9 ans perméabilité de 65 % versus 16 % pour PTFE non modifié	En moyenne 90,5 % de perméabilité à 27,7 mois.	A 1 an : 70 %
Matrices	Colle de fibrine	Colle de fibrine	Colle de fibrine et bFGF	héparine
Tps de culture/densité d'ensemencement	Après ensemencement, rotation pendant 3 h puis maturation pendant 12 J (monocouche confluyente)	16x10 ⁶ CE par greffe Rotation pendant 3 h après ensemencement puis maturation pendant 11,6 ± 3J avant implantation	Après 6 semaines de culture ensemencement à 6x10 ⁴ cellules/cm ² puis 10 J de maturation avant implantation (obtention d'une monocouche confluyente de CE)	NU
Conclusions	A 41 mois, maintien de la couverture endothéliale intacte. Développement d'une matrice riche en actine entre la greffe et la couche de CE. Matrice n'existant pas sur le PTFE non modifié	Taux de perméabilité comprable à celui d'un vaisseau autologue	Pas de régions sténosées. Surface endoluminale sans dépôts de fibrine, plaquettes ou GR.	> perméabilité

Référence	Walluscheck et al (2005) [171]	Battaglia et al (2006) [172]	Bosiers et al (2006) [136]
Diamètre	6 mm	6 mm	6 mm
Site d'implantation	Pontage fémoropoplité	Pontage fémoropoplité	Pontage fémoropoplité
Cellules	NU	NU	NU
Taux de perméabilité	A 1an : 91 %, à 2 ans : 68 %	Patients à faible risque (à 24 mois, 95,8 % versus 92,9 % (veine saphène)) Patients à haut risque (40 % versus 72 %)	A 1an : 82 %
Matrices	héparine	héparine	héparine
Tps de culture/densité d'ensemencement	NU	NU	NU
Conclusions	Taux de perméabilité à court terme comparable à celui de la veine saphène autologue	Chez les patients à faible risque de thrombose, résultats comparables à ceux de la veine saphène.	Même élasticité que le PTFE non modifié

Pour pallier aux inconvénients des techniques précédentes, d'autres modifications de surface ont été proposées, notamment des modifications physiques basées sur des interactions électrostatiques entre les cellules et la matrice.

III.1.2.2 - Techniques de transplantation électrostatique de CE

La technique de transplantation électrostatique a été développée pour favoriser l'attraction des CE à la greffe en induisant une charge de la surface luminale de la greffe « temporairement » positive ou moins négative [178]. Une fois que la greffe est sortie du dispositif de transplantation électrostatique, la charge de la surface luminale s'inverse immédiatement à son état négatif naturel. Bowlin et al (1998) [179] ont exposé des segments de PTFEe (4 mm de diamètre), qui ont été soumis à une transplantation électrostatique avec des HUVEC, à des contraintes de cisaillement physiologique de 15 dyn/cm^2 (comparables aux contraintes de cisaillement moyennes dans une artère fémorale [180]) dans un système de flux constant en boucles. Les auteurs n'ont pas observé de perte significative de cellules. Mais il n'a pas non plus été constaté de production significative de prostacyclines qui sont des molécules antithrombogéniques. La néo-intima qui se forme dans la lumière de la greffe n'a donc pas de propriétés physiologiques comparables à celles d'un endothélium naturel [181].

III.1.2.3 - Les films multicouches de polyélectrolytes

Pour améliorer l'adhésion et la rétention cellulaire, une nouvelle voie de recherche a été développée. Il s'agit de la formation de films multicouches de polyélectrolytes.

Dans les années 1990, Decher et al ont généralisé la **méthode d'assemblage couche par couche des polyélectrolytes** [182]. Les polyélectrolytes sont des macromolécules qui ont un grand nombre de groupes chargés quand ils sont dissous dans des solvants polaires, principalement l'eau. La méthode d'assemblage est basée sur le dépôt alterné de polycations (charges positives) et polyanions (charges négatives) sur une surface chargée, ce qui mène à la construction de films appelés « multicouches de polyélectrolytes » (Figure 13) [183-185]. Ces films sont intensément étudiés actuellement du fait de leurs nombreuses applications potentielles [185-187]. C'est une méthode efficace de modification contrôlée de la surface [182, 187-189].

Dans cette méthode, un substrat chargé négativement ou positivement est recouvert d'une solution de polyélectrolytes de charge opposée pendant un temps court. Les polyélectrolytes présents en solution s'adsorbent sur la surface du substrat, et le surplus est éliminé par rinçage. La surcompensation (excès de charges) lors de l'adsorption conduit à inverser le signe de la charge de surface : la surface devient positive dans le cas d'un substrat initialement chargé négativement. Ceci permet l'adsorption d'un second polyélectrolyte de charge opposée au précédent. Cette nouvelle adsorption est également suivie d'une étape de rinçage et le signe de surface s'inverse à nouveau. Des étapes successives d'adsorption alternée de polyélectrolytes de charge opposée permettent la construction d'un film.

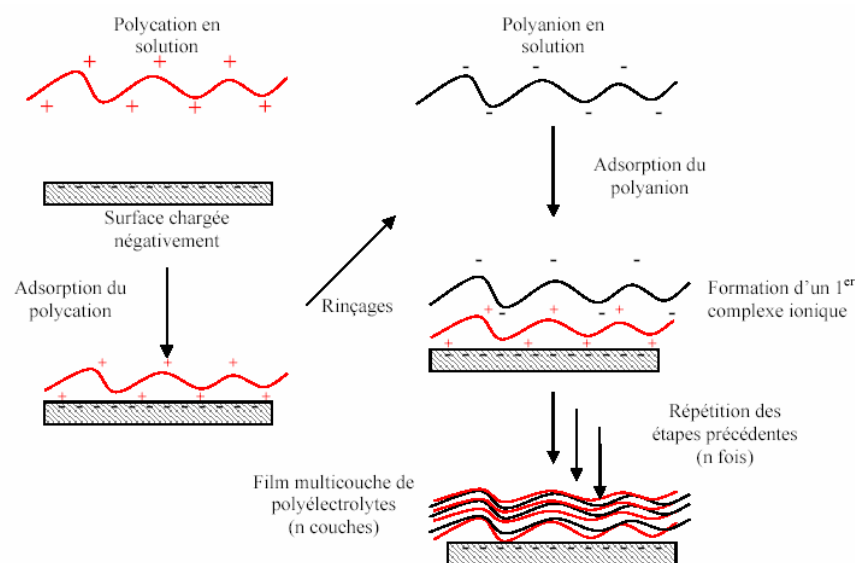


Figure 13 : les films multicouches de polyélectrolytes : étapes de construction

L'excès de charge constitue le moteur de la construction du film. Son existence est démontrée par le signe alterné du potentiel zêta (potentiel de surface) durant la construction du film [190-191].

Grâce aux multiples interactions électrostatiques entre les polyélectrolytes et le substrat et entre les couples de polyélectrolytes, les films présentent une bonne uniformité et une forte adhésion au substrat. Les interactions électrostatiques sont les forces les plus importantes pour l'adsorption, mais des interactions coulombiques, des forces de van der Waals et des effets entropiques renforcent la stabilité du système [192].

Le film multicouche forme un dépôt régulier, parfaitement contrôlé et de faible épaisseur (quelques dizaines de nanomètres). Son utilisation ne réduirait donc pas la lumière vasculaire contrairement à la modification de surface par colle de fibrine (voir chapitre III.1.2.1).

a) Films poly (4-styrène sulfonate de sodium) (PSS)/ chlorhydrate de poly (allylamine) (PAH)

Un des assemblages de polyélectrolytes le plus étudié dans la construction des multicouches est sans doute le couple PAH (polycation) et PSS (polyanion) [182, 193-197]. La masse et l'épaisseur de ces films croissent de façon linéaire avec le nombre de bicouches déposées [191, 198-200].

La structure des multicouches de polyélectrolytes est pseudo-stratifiée [201]. Chaque couche interpénètre un peu les voisines et leur mécanisme de croissance implique des interactions électrostatiques entre les molécules de polyélectrolytes venant de la solution et les polyélectrolytes de charge opposée formant la couche la plus externe du film [201-202]. Les films obtenus présentent une faible interpénétration entre les chaînes polycationiques et polyanioniques : ils présentent donc un degré de stratification assez élevé.

b) Propriétés physicochimiques

De larges possibilités existent pour modifier les propriétés physicochimiques des films. En faisant varier des paramètres tels que le pH et la force ionique des solutions, et le nombre de couches déposées, on va modifier principalement la rugosité de surface et l'épaisseur du film [190, 203-205]. Or, la rugosité est un paramètre important pour l'adhésion cellulaire [206-207].

➤ *Influence du polyéthylèneimine (PEI)*

Kolasinska et al (2007) [208] ont montré que les films ayant un nombre donné de couches construites sur une couche d'ancrage PEI, sont plus épais que les structures ayant le même nombre de couches de polyélectrolytes mais uniquement faites de PSS et PAH. PEI, utilisé en première couche, agit comme une matrice qui favorise la formation de structures multicouches plus épaisses.

Le tableau IV montre que les films préparés avec PEI sont beaucoup moins rugueux que ceux ayant le même nombre de couches mais construits uniquement avec PSS et PAH. La rugosité varie de 20 à 35 Angstrom (Å) pour PAH/PSS et de 4 à 8 Å pour les multicouches contenant PEI.

	Epaisseur (Å)	Rugosité (Å)
13 couches (terminaison PAH)		
PAH/PSS	126±16	35±11
PEI(PSS/PAH)	153±9	8±7
14 couches (terminaison PSS)		
PAH/PSS	129±10	20±9
PEI(PSS/PAH)	156±9	4±6

Tableau IV : influence de PEI sur la rugosité et l'épaisseur des films
(Kolasinska et al, 2007)

PEI a une forte capacité d'ancrage au substrat et son utilisation rend le film plus uniforme, plus homogène (avec une distribution en électrons plus homogène) que ceux contenant uniquement PAH/PSS (Figure 14) [193].

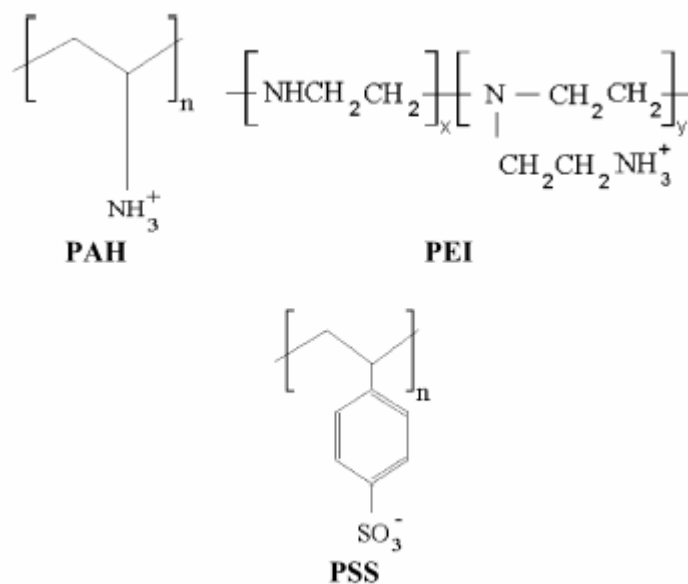


Figure 14 : formules chimiques de PEI, PSS, PAH
(Kolasinska et al 2007)

➤ *Influence de la dernière couche déposée*

Les multicouches terminées par PSS sont beaucoup plus lisses que ceux ayant PAH comme dernière couche. Cela peut être expliqué par la raideur des polyélectrolytes respectifs, conséquence de leur structure chimique. Comme les chaînes de PSS sont plus raides, elles sont adsorbées sur les surfaces des couches PAH sous-jacentes dans une conformation étalée.

A l'opposé, les chaînes PAH sont plus longues et plus flexibles que PSS, pour le même poids moléculaire, ce qui leur permet de former des boucles [208-209]. Les multicouches avec PAH comme dernière couche sont plus hydrophobes que celles terminées par PSS, ce qui entraîne une diminution de la mouillabilité [193].

La mouillabilité est une mesure classique de la charge de surface. Elle peut être déterminée sur la base des mesures de l'angle de contact de liquides (eau) sur une surface [210]. Une surface mouillable a une charge de surface positive et attire les molécules d'eau, ce qui favorise l'adhésion cellulaire. Inversement une surface chargée négativement repousse les molécules d'eau ; ce phénomène est responsable de la forme sphérique de la goutte d'eau. [179, 208]. Dans la mesure où nous recherchons une interaction favorable avec les CE qui sont chargées négativement, la dernière couche de polyélectrolyte que nous avons déposée est une couche de PAH (positive).

➤ *Influence de la force ionique*

La force ionique est un des paramètres qui influencent l'épaisseur du film. En effet, celle-ci est directement liée à la concentration de sel présent dans les solutions de polyélectrolytes qui servent à construire le film.

Jusqu'à une certaine limite de force ionique, l'épaisseur du film augmente avec la valeur de la concentration saline : l'épaisseur par paire de couches déposée semble être une loi de puissance de la concentration de sel jusqu'à une force ionique limite à partir de laquelle le film se décompose. A faible concentration de sel, les molécules de polyélectrolytes sont rigides et caractérisées par une conformation étalée due aux répulsions électrostatiques intramoléculaires. A forte concentration de sel, les charges du polyélectrolyte sont écrantées, conférant une conformation repliée. L'influence de la concentration saline sur la croissance des films a d'ailleurs été démontrée : plus la concentration de NaCl est importante, plus les films deviennent épais. Ces sels masquent les charges portées par les molécules de polyélectrolytes. Plus ils sont présents dans les solutions de polyélectrolytes, plus les interactions entre les chaînes de charge opposée diminuent, ce qui peut finalement conduire à une destruction totale du film [211]. Il en va de même pour la rigidité des polyélectrolytes : plus la concentration en sels est importante, plus les chaînes sont flexibles. Ces deux effets favorisent la formation de boucles au sein des macromolécules lorsqu'elles interagissent avec une surface. En jouant sur le nombre d'étapes et la concentration saline, on peut ajuster avec précision l'épaisseur totale des films, variable d'une dizaine à plusieurs centaines de nanomètres.

Il a également été démontré que la force ionique influe sur le comportement du film déjà construit. Certains auteurs ont ainsi observé par microscopie à force atomique une différence significative de morphologie, d'épaisseur et de rugosité de films (poly(allyldiméthylammonium chloride) (PDDA)/PSS) lorsque la concentration de sel est augmentée [212].

Une étude approfondie menée sur le système PSS/PAH a permis de démontrer l'influence de la force ionique de la solution sur l'épaisseur du film qui peut augmenter de quelques Å à 25 Å par couche déposée lorsque la concentration saline de la solution utilisée lors de la construction passe de 10^{-2} M à 0.9M NaCl [190]. Par contre, une fois formé, le film lui-même se restructure et gonfle s'il est rincé par l'eau ou par une solution à teneur saline plus faible que celle utilisée pour la construction, et l'inverse se produit si le rinçage est effectué par une solution saline plus concentrée.

➤ *Influence du pH des solutions*

Le pH joue un rôle important dans la construction de multicouches en particulier avec des polyélectrolytes faibles. Shiratori et al (2000) [203] ont étudié l'effet du pH sur la formation des multicouches de PAH/acide polyacrylique (PAA), en particulier sur l'épaisseur des films. Ainsi à pH 7, ces polyélectrolytes s'assemblent en couches très interpénétrées où les chaînes adoptent une conformation plate. L'épaisseur est de 3 à 5 Å par paire de couches [193]. Si le pH des solutions est proche d'un des pKa des polyélectrolytes, l'épaisseur des couches augmente alors fortement. Ainsi à pH 5, l'augmentation d'épaisseur est de 80 Å pour chaque couche de PAH et de 45 Å pour chaque couche de PAA, ce qui s'explique par la présence de boucles et de repliements des polymères. L'effet du pH est donc particulièrement important pour PAH qui est un polyélectrolyte faible (pK est égal environ à 8) [203, 209, 213].

➤ *Influence de la température*

Récemment a été étudié l'effet de la température sur les films PDADMA/PSS (poly(diallyldiméthylammonium)/PSS) et PAH/PSS [214]. Ainsi à 45°C, ces films croissent de façon exponentielle, si la température descend à 25°C, le régime devient linéaire puis une nouvelle augmentation de température à 45°C redonne une adsorption dans le régime exponentiel. Mais cet effet est plus marqué pour PDADMA/PSS qu'il ne l'est pour PAH/PSS. L'augmentation de la température entraîne donc l'augmentation de l'épaisseur du film, de la même façon que le ferait l'augmentation de la force ionique.

c) Avantages des multicouches

Un des avantages des multicouches pour modifier une surface, comme nous venons de le voir, est la façon dont on peut modifier leurs propriétés physicochimiques en ajustant certains paramètres tels que la nature des polyélectrolytes, leur concentration, la force ionique et le pH de la solution, et la température. Ces films sont faciles à construire sans nécessiter d'initiateurs ou d'énergie supplémentaire telle que la lumière [195]. Ils sont hydrosolubles et biocompatibles [208]. Cette méthode de dépôt couche par couche n'impose pas de restriction sur la taille ou la forme du support, ce qui permet de concevoir des structures bi- ou tridimensionnelles. La construction de ces films est de faible coût. Ils ont un fort taux d'adsorption et, en plus, il est possible d'y incorporer diverses molécules telles que des principes actifs, des protéines (par exemple des facteurs de croissance) ou des acides nucléiques [215].

d) Adhésion protéique et cellulaire

Les films ont été suggérés récemment comme une nouvelle technique de modification de surface pour améliorer l'adhésion de cellules sur des surfaces non adhésives [216-217].

Les films PSS/PAH présentent une très bonne biocompatibilité pour les CE [218] comme aussi observé pour les ostéoblastes [219] ou pour les cellules de chondrosarcome [220] ou pour les motoneurons de la moelle épinière [221]. Boura et al (2005) ont montré qu'un film PEI-(PSS-PAH)₃ permet une meilleure résistance des CE au flux physiologique qu'un support tel que la fibronectine [222].

La charge de surface est un paramètre important à considérer dans l'adhésion cellulaire [223]. Les protéines du sérum humain contenues dans le milieu de culture telles que la fibronectine, sont bien connues pour jouer un rôle important dans l'attachement cellulaire sur les surfaces [131]. Salloum et al (2004) ont montré que les films dont la couche externe était trop hydrophile (par exemple PAA), ne pouvaient pas adsorber de protéines [224]. Par contre, une étude de l'adsorption protéique basée sur un multidépôt de PSS/PAH menée par Ladam et al (2000) a permis de montrer que, quelle que soit la valeur du point isoélectrique (pHi) d'une protéine, celle-ci s'adsorbe aussi bien sur un film chargé positivement que négativement [190]. La quantité adsorbée et l'architecture du dépôt protéique dépendent cependant largement de la différence de charge entre le polyélectrolyte de la dernière couche et la protéine. Il en va de même pour la force ionique du milieu utilisé.

Ainsi, les paramètres physicochimiques peuvent affecter l'adsorption des protéines et l'adhésion cellulaire [206-207]. Des études précédentes ont démontré que la dernière couche joue un rôle déterminant dans l'adhésion des cellules [219-220]. Richert et al (2002) ont montré que, pour les chondrocytes, les films se terminant par des charges négatives (PSS) sont favorables à la formation de filaments d'actine et de contacts focaux, alors que sur les films se terminant par des charges positives (PAH, PEI), les cellules ne présentent pas de réorganisation du cytosquelette [225].

Cela rend le choix des polyélectrolytes d'une importance capitale quant à la construction de la matrice cellularisée ou non.

III.2 - Les cellules

La disponibilité d'une source cellulaire convenable et abondante est un des facteurs limitant en ingénierie vasculaire [226].

Bien que plusieurs sources cellulaires soient disponibles, les cellules autologues sont largement préférées pour éviter la médication immunosuppressive et les effets délétères du rejet [121]. Les CE représentent le seul type cellulaire ayant un potentiel antithrombogénique, parmi les nombreux types de cellules du corps, et résidant à l'interface entre le sang et le tissu vasculaire. Elles sont essentielles pour le maintien de l'homéostasie de la paroi vasculaire.

III.2.1 - Limites des cellules endothéliales matures

L'ensemencement des matrices par des CE a été préféré parce que la surface endothéliale ainsi formée est métaboliquement active et prévient *in vivo* la thrombose. De nombreuses études décrivent des méthodes d'isolation de CE autologues à partir de vaisseaux prélevés au niveau de différents sites tels que la veine saphène, la veine céphalique et les microvaisseaux [227-228]. En raison du faible nombre cellulaire initialement récupéré, il est nécessaire, pour générer un nombre suffisant de cellules, de les multiplier en culture par des passages répétés. Cependant, ces étapes conduisent à la perte progressive du potentiel de régénération des CE [229-231]. Leur activité proliférative et leur fonction spécifique sont progressivement perdues, limitant leur utilisation clinique [232].

Cette approche présente d'autres inconvénients comme la nécessité d'une expertise technique opérationnelle importante de la part du chirurgien, de sacrifier des structures vasculaires intactes du donneur ce qui augmente le traumatisme du patient, et d'une disponibilité de vaisseaux en bon état, chez un patient dont la santé est déjà compromise par des pathologies vasculaires [233].

Pour remédier à ces limites, le recours à d'autres CE circulantes a été entrepris. En particulier, des CE autologues dérivées du tissu adipeux sous-cutané avec lesquelles Park et al (1990) ont obtenu une monocouche qui persiste pendant 9 mois dans la portion moyenne des prothèses vasculaires en Dacron® [234]. Schmidt et al (1998) ont publié une étude impliquant des patients qui subissent une reconstruction périphérique vasculaire avec des greffes de PTFEe ensemencées avec des CE microvasculaires provenant de la graisse sous-cutanée du patient [235]. Les auteurs font part de leur déception quant au faible taux de perméabilité des greffes cellularisées, prétextant un biais de l'étude car tous les patients sont en mauvaise santé et subissaient cette chirurgie vasculaire comme ultime traitement de sauvetage des membres.

Une autre voie de production de CE peut se faire par l'isolement et la prolifération de CE matures à partir de cellules souches. En effet, le corps humain possède une source inépuisable de cellules souches qui peuvent être isolées principalement de la moelle osseuse avec une relative facilité et sans entraîner d'amputations. Plusieurs sources de cellules souches peuvent être envisagées dans le cadre de l'ingénierie tissulaire.

III.2.2 - Les cellules souches et progéniteurs

Une cellule souche est classiquement définie par deux propriétés essentielles que sont l'autorenouvellement et la différenciation.

III.2.2.1 - Les cellules souches embryonnaires

Elles sont issues de la masse interne du "blastocyste", une structure de 16-40 cellules issues des divisions de l'ovocyte fécondé. Implanté dans l'utérus, le blastocyste entier peut se développer en un fœtus viable. Au stade de blastocyste (5^{ème} jour de développement), chacune des cellules de sa masse interne est pluripotente, voire totipotente puisqu'elle peut donner tous les feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme) et les tissus qui en dérivent.

Une fois le blastocyste dissocié, les cellules embryonnaires perdent la possibilité de se développer ultérieurement en un embryon ; cependant, cultivées au laboratoire, elles conservent à l'infini leur caractère de “ pluripotence ” et gardent un génome intact. Il est donc possible d'obtenir des millions de cellules embryonnaires pluripotentes à partir d'un petit nombre de cellules embryonnaires de blastocyste.

Lors de l'induction par des composés de différenciation spécifique, ces cellules souches embryonnaires peuvent se différencier *in vitro* en une variété de cellules matures incluant les neurones, les cellules de la peau (différenciation ectodermique), le sang, le muscle, le cartilage, les cellules endothéliales et les cellules cardiaques (différenciation mésodermique) [236-240].

Cependant, les cellules souches embryonnaires sont sujettes à beaucoup de controverses car leur extraction se fait à partir d'embryons et donc à partir d'êtres humains potentiels, ce qui soulève des dilemmes éthiques et religieux. Pour cette raison, les chercheurs ont étudié d'autres types de cellules souches ou de progéniteurs.

III.2.2.2 - Cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Ces cellules rares ($< 1/10^5$ cellules mononucléées) produisent toutes les cellules sanguines telles que les globules rouges, blancs, les lymphocytes et les plaquettes, et certaines structures vasculaires. Trois sources de CSH existent chez l'homme : la moelle osseuse, le sang de cordon ombilical et le sang périphérique.

Des études sur les CSH humaines ou de souris ont montré leur capacité à se différencier en 3 types principaux de cellules cérébrales (neurones, oligodendrocytes et astrocytes), en cellules musculaires squelettiques [241], cardiaques [242] et hépatiques [243-245]. L'étude de Orlic et al (2001) montre que des populations de CSH [Lin- (Lineage -) ckit+] peuvent se différencier en endothélium vasculaire, en cellules musculaires lisses et en cardiomyocytes à la suite de leur injection directement dans une zone infarctée du myocarde [242]. Cependant, dans une étude récente, Murry et al (2004) ont controversé cette étude et démontré que les CSH ne se transdifférencient pas en cardiomyocytes [246].

Si l'intérêt des CSH en thérapeutique humaine est indiscutable, leur application est plutôt rare. Les principales restrictions sont liées à la barrière immunologique dans le cas de greffes allogéniques, à la pathologie elle-même et surtout à la difficulté d'accroître le nombre des CSH sans qu'elles ne perdent leur potentiel de différenciation. Leur prolifération *in vitro* à l'état indifférencié est donc impossible, ce qui les distingue donc radicalement des cellules

souches mésenchymateuses (CSM) [247]. Cette caractéristique freine leur utilisation dans des situations de greffes autologues et empêche la création de banques de cellules souches primaires purifiées, disponibles à la demande, telles qu'elles peuvent être envisagées pour les CSM.

III.2.2.3 - Les cellules progénitrices endothéliales (CPE)

Des études récentes ont montré l'existence de CPE circulantes dans le sang périphérique de l'adulte humain [11, 248-249]. La moelle osseuse est également une source de CPE [11]. Les CPE ont la capacité de circuler, proliférer et se différencier en CE matures en réponse à différents stimuli tels les facteurs de croissance, incluant VEGF et autres cytokines [9, 250-251]. Elles ne sont plus multipotentes. Quand les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture, elles adhèrent au substrat, deviennent fusiformes et s'assemblent pour donner des structures tubulaires ressemblant aux vaisseaux sanguins. Cependant, les CPE montrent des chevauchements phénotypiques avec les cellules hématopoïétiques et les CE matures [252], ce qui a conduit à des controverses quant à l'origine et l'identification des CPE [253].

Elles ont un faible potentiel d'autorenouvellement, mais elles gardent la capacité de se différencier en CE et, dans certaines conditions, en CML vasculaires [254].

Des études récentes ont montré l'utilité des contraintes de cisaillement à provoquer la différenciation des CPE en CE [254-255]. Cependant, ces études ont généralement utilisé une population précurseur initialement assez hétérogène, et il est difficile d'en identifier les CPE. Avec des marqueurs cellulaires, portés à la fois par les CE et les CSH, il paraît délicat de caractériser des CPE isolées. De ce fait, Gang et al (2006) pensent que le recueil des CPE adultes en quantités appropriées pour la transplantation et la thérapie cellulaire semble n'être ni adaptée ni reproductible [256].

III.2.2.4 - Les MAPC (*Multipotent Adult Progenitor Cell*)

La description des MAPC par l'équipe de Verfaillie en 2002 est certainement un événement capital [257]. Il s'agit d'une nouvelle population de cellules souches multipotentes, dont la localisation n'est probablement pas restreinte à la moelle osseuse, et dont le potentiel de différenciation les apparente aux cellules souches embryonnaires [257]. En effet, ce potentiel est extraordinaire, puisque *in vivo*, elles peuvent se différencier en de multiples types tissulaires, émanant de feuillets embryonnaires différents. Une seule de ces MAPC adopte, si

on la place dans des conditions de cytokines et de nutriments adéquates, un destin d'hépatocytes (endodermiques), de cellules endothéliales et hématopoïétiques (mésodermiques), et probablement ectodermiques (neurones, cellules gliales) (Figure 15).

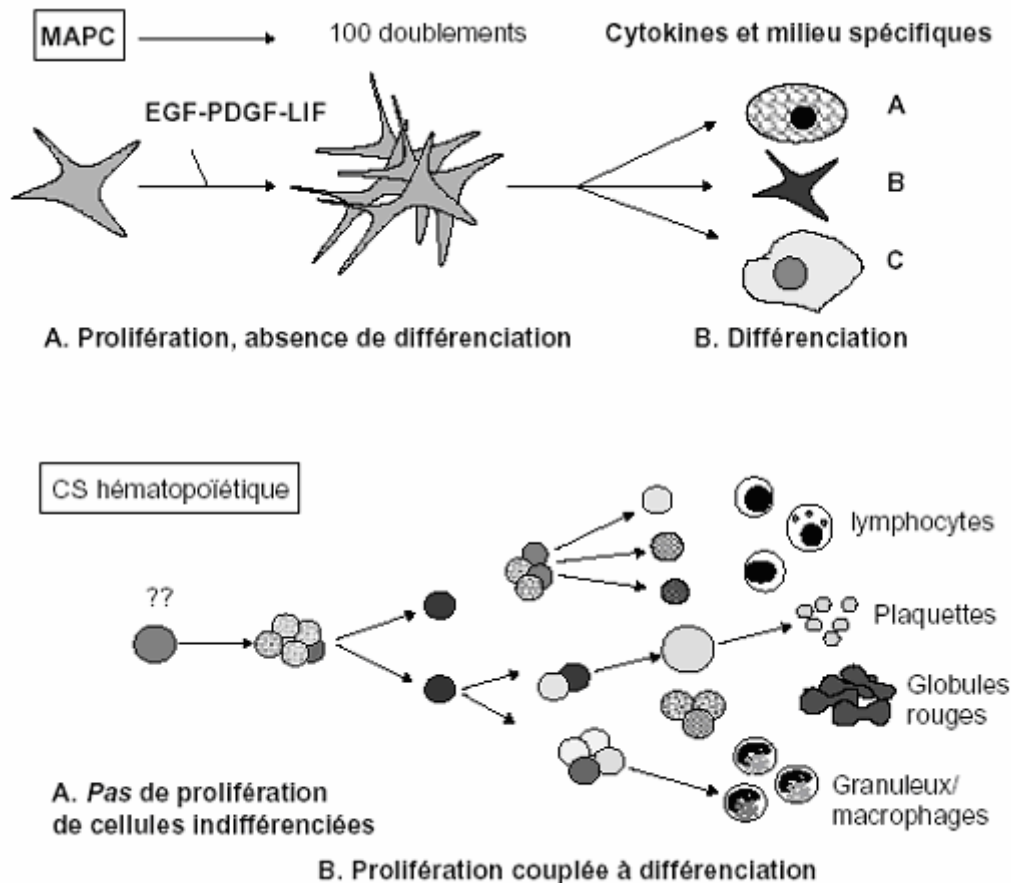


Figure 15 : schéma illustrant les différences de comportement des cellules souches de type MAPC et hématopoïétiques
(Coulombel et al (2003) [247])

Jiang et al (2002) ont montré qu'une micro-injection, dans un blastocyste, d'une seule de ces cellules, participe à la formation de l'ensemble des tissus du nouveau-né, à l'exception du tissu nerveux. Cependant, cette expérience doit être reproduite pour être validée [257].

Les MAPC ne peuvent être amplifiées efficacement que si elles sontensemencées dans un milieu de culture très pauvre en sérum et à une très faible densité cellulaire, ce qui représente deux avantages en culture cellulaire, notamment à orientation clinique. En présence de cytokines comme le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et le LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), une telle cellule peut proliférer à l'état indifférencié sans subir de sénescence répllicative pendant plus de 100 doublements. A la

différence des cellules souches adultes connues, elles partagent certains marqueurs moléculaires restreints jusqu'à maintenant aux cellules souches embryonnaires (Oct-4, Rex). Reyes et al (2002) ont montré que les MAPC pouvaient se différencier, en présence de VEGF, en cellules ayant la morphologie, le phénotype (expression de vWF) et la fonctionnalité *in vitro* et *in vivo* des CE [258].

III.2.2.5 - Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Friedenstein et al (1966) ont identifié des progéniteurs capables de produire des colonies de cellules d'allure fibroblastique [259]. Ces progéniteurs ont été appelés CFU-F pour *Colony Forming Unit-Fibroblast*. Ce n'est que très récemment que le concept de l'existence de CSM post-natales a émergé pour une utilisation thérapeutique. Les travaux de Prockop et al (1997) [260] et de Pittenger et al (1999) [261] ont permis l'identification, parmi la population des CFU-F, de cellules possédant des propriétés biologiques de cellules souches et depuis, de nombreuses études ont montré que les CSM constituent un potentiel énorme pour l'ingénierie tissulaire. Les CSM sont généralement collectées lors d'une ponction de moelle osseuse extraite de la crête iliaque supérieure [261-262]. Elles peuvent également être collectées dans les compartiments de la moelle tibiale et fémorale [263] ainsi que dans la colonne lombaire et thoracique [264]. Le nombre de CSM est estimé au niveau de la moelle à 0,01 à 0,0001 % des cellules nucléées [265]. D'ailleurs, Wexleir et al (2003) [266] et Bonab et al (2006) [267] estiment qu'il y a respectivement une CSM sur $3,4 \times 10^4$ et $3,1 \times 10^4$ cellules mononucléées de la moelle osseuse. Leur quantité est encore plus faible dans le sang de cordon et le sang périphérique. Cette faible proportion nécessite leur expansion *in vitro* avant toute utilisation clinique, et les CSM peuvent être amplifiées *in vitro* en centaines de millions de cellules à partir de 10 à 20 mL de moelle osseuse aspirée [268-272], ce qui permettrait la colonisation d'une surface importante de substituts vasculaires.

a) Localisations

A ce jour, la moelle osseuse est considérée comme la source la plus sûre et la plus accessible de CSM. Cependant, d'autres CSM ayant des caractéristiques biologiques similaires ont été isolées à partir d'organes incluant :

- le tissu adipeux [273-275],
- le sang périphérique adulte [276-277],

- le sang de cordon [278-283],
- le placenta [284-285], la veine et les artères de cordon ombilical [280, 286], la gelée de Wharton du cordon [287], le liquide amniotique [288-289],
- le cartilage [280, 290],
- le tissu synovial [291] et la membrane synoviale [292],
- les dents de lait [293], la pulpe dentaire [294] et le ligament périodentaire [295],
- le muscle cardiaque [296],
- le pancréas [297],
- la rate [298],
- le périoste [299],
- l'os trabéculaire [300],
- le poumon [301],
- le muscle squelettique [302-303],
- le derme [304].

b) Les marqueurs de surface

À ce jour, aucun antigène spécifique des CSM humaines n'a encore été identifié [305]. Cependant, de nombreux anticorps réagissant avec les antigènes de surface des CSM ont été développés et les CSM sont donc définies par un profil d'expression d'antigènes, et de molécules d'adhésion caractéristiques (Tableau V) [261, 268, 306-309].

Elles sont identifiées principalement par l'expression de Thy-1 (CD90) et d'endoglobine (CD105), et sont négatives pour les marqueurs hématopoïétiques (CD34, 45, 14) [310]. Les CSM isolées directement de la moelle osseuse sont positives pour CD34 (antigène spécifique des CSH), mais perdent cet antigène lors de la culture *in vitro*.

Tableau V : molécules exprimées par les CSM, les CE, les CPE précoces, les CPE tardives et les MAPC (liste non exhaustive) [11, 261, 268, 270, 289, 308, 311-322]

	CSM	CE	CPE précoces	CPE tardives	MAPC
CD105 (endoglobin)	+	+			
CD54 (ICAM1)	+				
CD55	+				
CD13 (aminopeptidase)	+				+
CD44 (récepteur hyaluronate, H-CAM)	+				-
CD166 (SB-10, ALCAM)	+				
CD29 (intégrine β 1)	+				
CD90 (thy-1)	+	-			
Stro1	+				
VE-cadhérine (CD144)	-	+	-	+	-
HLAclasse1	+				-
CD106 (VCAM-1)	+				-
CD71 (transferrine)	+				
CD120a	+				
CD124 (récepteur interleukine-4)	+				
CD73	+	+			
CD146	+	+			
CD49a	+				
CD49b	+				+
ICAM-2 (CD102)	+				
CD58 (LFA-3)	$\pm$				
Intégrine α 5	+				
Intégrine α 1	+				
CXCR4	+				
Lsélectine	+				
Intégrine α 2	+/-				
Intégrine α 3	+/-				
Intégrine α 6	+/-				
Intégrine α v	+/-				
Intégrine β 3	+/-				

	CSM	CE	CPE précoces	CPE tardives	MAPC
Intégrine $\beta 4$	+/-				
CD34 (marqueur hématopoïétique et endothélial)	-	+/-	+	+/-	-
CD45 (marqueur hématopoïétique)	-				-
CD14 (marqueur hématopoïétique, récepteur lipopolysaccharidique)	-	-			
CD31 (marqueur endothélial)	-	+	+	+	-
CD133	-	-	+	-	-
CD117	-				
KDR/Flk1	-	+	+	+	+
HLA-DR (HLA-classeII)	-				-
CD11a	-				
CD11b (marqueur hématopoïétique)	-				
CD41	-				
PSGL-1	-				
L-sélectine (CD62L)	-				-
CD24	-				
E-sélectine (CD62E)	-			+	-
P-sélectine (CD62P)	-				-
ICAM3 (CD50)	-				
Intégrine $\beta 2$	-				
Intégrine $\alpha 4$	-				
Intégrine αL	-				

c) Morphologie cellulaire

Dans leur état indifférencié, les CSM ont une forme de fuseau et ressemblent aux fibroblastes (Figure 16) [265, 323].

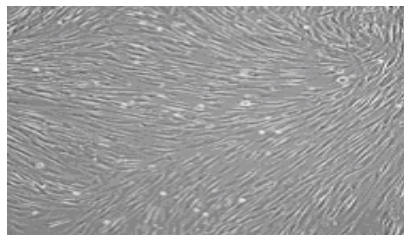


Figure 16 : morphologie des cellules souches mésenchymateuses
(Oswald et al 2004 [335])

d) Propriétés

Récemment, les CSM dérivées de la moelle osseuse ont émergé comme source prometteuse, alternative aux CPE pour la médecine régénératrice basée sur les cellules souches. Leurs avantages sont : les faibles inquiétudes éthiques et légales, la relative facilité d'isolement et d'expansion *in vitro*, une cryopréservation à long terme, leur plasticité extraordinaire, leur manipulation génétique facile et leur multipotentialité [324].

D'une façon générale, on définit une cellule souche par une propriété essentielle qui la distingue des autres cellules : l'absence de spécialisation à la suite de longues périodes de division cellulaire ce qui caractérise donc une capacité à l'auto-renouvellement [325].

Ses autres propriétés sont :

➤ *Multipotentialité*

Les CSM sont des cellules souches multipotentes puisqu'elles ont la capacité de se différencier (acquérir des caractéristiques spécifiques leur permettant d'assurer une fonction particulière) sous certaines conditions en plusieurs tissus mésenchymateux incluant :

- l'os [268, 326-328],
- le cartilage [329-332],
- le tendon [333],
- le muscle [331, 334],
- le ligament [333],
- les cardiomyocytes, et le tissu endothélial [258, 261, 335-336],
- et probablement le stroma de la moelle osseuse [261, 308, 337]. Le lignage stromal assure le maintien de l'hématopoïèse [338].

➤ *Pouvoir de prolifération élevé*

Il permet de créer des banques de cellules souches compatibles. Elles se développent rapidement sous l'influence de mitogènes tels que le PDGF, le bFGF et l'IGF-1 [339, 340].

➤ *Soutien de l'hématopoïèse*

Les CSM sécrètent un ensemble de cytokines et de facteurs de croissance indispensables à la prolifération et à la différenciation des cellules hématopoïétiques : entre autres interleukine (IL)1, IL6, IL7, IL8, IL11, IL12, IL14, IL15, M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating*

Factor), Flt3 ligand, *Stem Cell Factor* (SCF), *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) [308-309, 324, 341-343].

➤ *Facilité et efficacité de transfert des gènes*

Le transfert de gènes n'induit pas d'altération du phénotype ni de la fonction cellulaire [344-345].

➤ *Plasticité*

La plasticité des cellules souches adultes est leur capacité à générer un type cellulaire spécialisé d'un autre tissu. Ce phénomène est appelé plasticité ou transdifférenciation. En effet, dans certaines conditions, elles peuvent se transdifférencier en cellules spécialisées matures, incluant le tissu neural [346-347], la peau [348], le tissu adipeux [331, 349-351].

➤ *Adhérence au plastique (TCPS (Tissue Culture Polystyrene Surface))*

Traditionnellement, les CSM sont isolées en utilisant leur adhérence sélective, comparée aux CSH, sur les surfaces en plastique [352-353]. Bien que leur capacité d'y adhérer ait été exploitée pour définir ces cellules [269], ceci a été contesté par Phinney et al (1999) [354], qui ont montré que les progéniteurs pré-cellules B et les précurseurs monocytiques/granulocytiques adhèrent aussi au plastique dans les cultures de cellules de moelle de rongeur. De même, les macrophages, les CE, les lymphocytes et les CML adhèrent au plastique et contaminent les préparations de moelle osseuse [324, 355]. Cependant, si les CSM sont cultivées dans un milieu nutritif standard additionné de 10% de sérum de veau fœtal, alors les cellules différenciées du microenvironnement médullaire, telles que les ostéoblastes, les adipocytes ou les CE, ne prolifèrent pas ce qui évite leur contamination [262, 339, 356].

➤ *Sécrétion de cytokines*

IL6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, LIF, M-CSF, Flt-3, SCF [261, 308]. Ces protéines peuvent orienter l'engagement des CSM dans une des nombreuses voies de différenciation.

➤ *Propriétés immunomodulatrices et inhibitrices de la prolifération des cellules T in vitro*

Les CSM, par leurs propriétés immunomodulatrices, inhibent la prolifération des cellules T *in vitro* [357-362]. Plusieurs études *in vitro* ou *in vivo*, aussi bien chez l'animal que chez

l'homme, ont mis en évidence l'influence des CSM, grâce à leurs propriétés immunosuppressives, non seulement sur la différenciation des lymphocytes mais aussi sur la réponse immunitaire T. *In vitro*, les CSM humaines ont une action suppressive sur la prolifération des lymphocytes T, en partie liée à la production du *Transforming Growth Factor beta 1* (TGFβ1) et à l'*Hepatocyte Growth Factor* (HGF) [357]. De par leurs propriétés immunosuppressives, il devient évident que les CSM peuvent avoir une incidence sur la fréquence de survenue et l'intensité des réactions de greffon contre l'hôte (*Graft versus Host Disease* ou GvHD).

- *Relative facilité d'isolement et d'expansion in vitro à travers plusieurs générations en conservant leur capacité à se différencier [363-364]*

Bien que ce soit une population rare, 10 fois moins abondante que les CSH, les CSM sont rapidement amplifiées en culture [365]. Cependant, les cellules ont un potentiel variable d'expansion en fonction de l'âge du donneur, de sa condition physique et des techniques de prélèvement [262, 271, 339].

- *Stabilité du phénotype in vitro*

Les CSM sont génétiquement stables en culture et cela sur plusieurs passages [261, 352, 366].

Les CSM semblent donc avoir le potentiel nécessaire pour être utilisées en clinique par le biais de l'ingénierie tissulaire des vaisseaux. Elles peuvent être employées pour cellulariser des prothèses vasculaires quand les patients n'ont plus de vaisseaux sanguins disponibles. En effet, elles sont constamment et facilement disponibles chez tous les humains. Elles peuvent être prélevées directement du patient par une ponction de moelle, ce qui élimine les risques de transmission d'infections virales et des complications associées avec le rejet immunitaire et donc élimine le recours aux médicaments immunosuppresseurs.

Leur utilisation en ingénierie vasculaire implique l'obtention d'une différenciation en cellules vasculaires. Depuis quelques années, plusieurs cytokines et facteurs de croissance ont été identifiés comme induisant la différenciation des CSM en une lignée cellulaire spécifique et notamment en lignée vasculaire [309, 335].

III.3 - Facteurs de croissance, facteurs mécaniques et différenciation endothéliale

III.3.1 - Facteurs de croissance

Différents chercheurs ont utilisé quatre type de cellules souches pour tenter d'obtenir des cellules endothéliales : les cellules embryonnaires, les CPE, les MAPC et les CSM [254-255, 335, 367-384].

Ces auteurs ont mis en évidence le rôle important joué par quatre facteurs dans la différenciation.

III.3.1.1 - La matrice de culture

Trois matrices de culture ont été utilisées à savoir, la fibronectine, le collagène et le Matrigel®. Certaines matrices n'ont pas été mentionnées par les auteurs. Pour cette raison et comme les paramètres expérimentaux sont très variables, il est difficile de comparer l'influence de ces différentes matrices.

III.3.1.2 - Les densités d'ensemencement

Elles sont aussi très variables, allant de 3 cellules/ cm² à 10⁶ cellules/cm² pour les CSM, 2x10⁴ cellules/cm² pour les MAPC, 5x10⁵ à 1x10⁶ cellules/cm² pour les CPE.

III.3.1.3 - Le pourcentage de sérum de veau fœtal (SVF)

Lorsque les cellules utilisées ont été des CSM ou des MAPC, le pourcentage en SVF du milieu de culture était très faible : 0 % ou 2 % sauf pour Tang (2006) [367] avec des CSM issues du rat 10 %. Pour les CPE, il était de 5 % [255,368], 15 % [369] ou 20 % [254] et pour les embryonnaires, de 10 % [370-371]. Le taux de SVF varie donc fortement en fonction du type cellulaire utilisé.

III.3.1.4 - Le type de facteur de croissance utilisé

Reyes et al (2001 et 2002) ont montré que les MAPC se différenciaient en présence de VEGF en cellules ayant la morphologie de CE, ainsi que le phénotype (expression de vWF) et la fonctionnalité *in vivo* (augmentation de la vascularisation de tumeurs induites chez la souris) [258, 372].

Les CPE ont la capacité de circuler, de proliférer et de se différencier en CE matures en réponse à différents facteurs de croissance incluant VEGF et d'autres cytokines [254-255, 369, 373].

Yamamoto et al (2005) ont différencié des cellules embryonnaires en CE en utilisant VEGF [370].

Oswald et al (2004) [335], Wu et al (2005) [374], Tang et al (2006) [367] et Miao et al (2006) [375] ont différencié des CSM en CE, uniquement sous la stimulation de VEGF. Les CSM à l'état indifférencié n'expriment pas les marqueurs de surface des CE (notamment CD31, CD34 et vWF). Il a été démontré que les CSM humaines ont la capacité de se différencier en CE *in vitro* [335, 374-375], et *in vivo* en cellules CD31+ [376-377] et jouent ainsi un rôle dans la néovascularisation.

Cao et al (2005) [378] et Wu et al (2007) [379] ont montré que l'injection de cellules souches de graisse humaine pour le premier ou de cellules de cordon pour le second, dans un modèle d'ischémie de membre postérieur chez le rongeur, entraîne la différenciation de ces cellules CD31- en cellules CD31+ et eNOS+, 2 semaines après injection et une augmentation de la perfusion de la zone ischémique.

Davani et al (2003) [380] ont montré que les CSM implantées dans une zone d'infarctus myocardique chez le rat, se différencient en cellules CD31+, qu'il y a augmentation de la densité vasculaire et augmentation des performances du ventricule gauche par rapport aux zones nonensemencées. Tang et al (2004) [381] et Tang et al (2006) [367] ont montré que, chez le rat, les CSM stimulent la production de VEGF, augmentent la densité vasculaire et le flux sanguin dans la zone infarctée. Ces auteurs ont apporté l'évidence que certaines CSM se différencient directement en CE (vWF+). La néovascularisation entraîne une diminution de l'apoptose des myocytes hypertrophiés et une augmentation marquée de la contractilité du ventricule gauche. Shyu et al (2006) [382] ont montré, chez la souris, que 28 jours après induction de l'infarctus, la taille de ce dernier est réduite dans le groupe ayant reçu une injection de CSM (concomitante à l'induction de l'infarctus) par rapport aux groupes traités

par VEGF seul ou par angiopoïétine-1 seule. De même l'augmentation de la densité capillaire est supérieure dans le groupe ayant eu une injection de CSM.

Ces auteurs s'accordent pour indiquer que les CSM représentent une stratégie thérapeutique prometteuse, dépourvue de préoccupations éthiques et de rejet immunitaire pour obtenir une néovascularisation et que leur utilisation pourrait donc avoir des implications dans le traitement clinique des patients présentant des pathologies artérielles. De plus, le VEGF semble reproduire *in vitro* et *in vivo* l'effet proangiogénique qu'il a au cours de la vie embryonnaire.

Dans un tableau récapitulatif non exhaustif sont décrites les différentes études qui ont été réalisées *in vitro* pour différencier des cellules souches en CE sous stimulations biochimiques (Tableau VI).

Tableau VI : différenciation endothéliale induite *in vitro* par des facteurs de croissance

Références	Kaushal et al (2001) [254]	Reyes et al (2001 et 2002) [258, 372]	Oswald et al (2004) [335]
Type cellulaire	CM $\Rightarrow$ CPE	Cellules CD45- Gly A-	CMMO
Source cellulaire	Sang VJI (agneau)	Moelle osseuse (Homme)	Moelle osseuse (homme)
Matrice	Fibronectine	Fibronectine	NP
Milieu de différenciation	EBM2	DMEM-LG + MCDB-201+acide ascorbique + dexaméthasone + VEGF (10 ng/mL)	DMEM-LG + VEGF (50 ng/mL)
Ensemencement	NP	2x10 ⁴ cellules/cm ²	5x10 ³ cellules/cm ²
% de SVF	20 %	0 % ou 2 %	2 %
Durée de différenciation	21 jours	14 jours	7 jours
Résultats	Morphologie pavimenteuse Cellules CD31+, vWF+, acLDL+, KDR+	Plus de 80 % des cellules expriment CD34, vWF, KDR, Flt1	Les cellules sont vWF+, KDR+, Flt1+, VEcadhérine+, VCAM-1 + mais CD31- CD34- Formation de structures tubulaires sur Matrigel

Références	Wijelath et al (2004) [369]	Wu et al (2005) [374]	Cao et al (2005) [378]
Type cellulaire	CD34+ (lignée)	CSM	Cellules souches
Source cellulaire	Homme	Moelle osseuse (homme)	Graisse (Homme)
Matrice	Fibronectine	NP	Matrigel
Milieu de différenciation	MCDB-131 + VEGF (50 ng/mL) +bFGF +IGF + hydrocortisone + héparine	DMEM + VEGF (50 ng/mL)	M199 + bFGF + VEGF (50 ng/mL)
Ensemencement	NP	3 cellules/cm ²	5x10 ⁴ cellules/cm ²
% de SVF	15 %	NU	3 %
Durée de différenciation	3 semaines	5 jours	48 h
Résultats	Expression de cellules vWF+, VEcadhérine+	Expression de vWF par 30 % des cellules	Formation d'un réseau vasculaire Apparition de cellules CD31+, CD34+, eNOS+

Références	Cho et al (2005 et 2006) [383, 384]	Gang et al (2006) [256]	Miao et al (2006) [375]
Type cellulaire	CMMO	CSM	CSM
Source cellulaire	Moelle osseuse (chien)	Sang de cordon ombilical (Homme)	Placenta (Homme) ou moelle osseuse (Homme)
Matrice	Fibronectine	NP	NP
Milieu de différenciation	EBM2 + bFGF + IGF +EGF + acide ascorbique + VEGF (10 ng/mL)	DMEM-LG + EGF + hydrocortisone + VEGF (100 ng/mL)	DMEM + VEGF (50 ng/mL)
Ensemencement	NP	10 ⁶ cellules/cm ²	10 ³ cellules/cm ²
% de SVF	NU	5 %	2 %
Durée de différenciation	3 semaines	3 semaines	7 jours
Résultats	A 3 sem, morphologie pavimenteuse et expression de vWF et CD31	Pas de changts morphologiques avant la fin 3 sem, 50 % des cellules Flk1+ à 3 sem, > expression de vWF, VCAM1, Flt1, et VEcadherine à 1 sem puis < vWF et VCAM1 à 2 sem et disparition vWF à 3sem, > VEcadherine à 2 sem	Expression de vWF (> intensité de fluorescence)

Références	Tang et al (2006) [367]	Zhang et al (2007) [368]	Wu et al (2007) [379]
Type cellulaire	CSM	CMMO $\Rightarrow$ CPE	Cellules souches de cordon
Source cellulaire	Moelle osseuse (rat)	Moelle osseuse (homme)	Nouveau-né (Homme)
Matrice	NP	Fibronectine	Matrigel
Milieu de différenciation	DMEM-LG + VEGF (20 ng/mL)	EGM2 + VEGF + bFGF + EGF + IGF + acide ascorbique + hydrocortisone + héparine	M199 +bFGF +VEGF (50ng/mL)
Ensemencement	NP	1×10^6 cellules/cm ²	$2,5 \times 10^4$ cellules/cm ²
% de SVF	10 %	5 %	2 %
Durée de différenciation	7 jours	Cellules en P5	2 jours
Résultats	A 12 jours, cellules de forme pavimenteuse A 7 jours, > expression de CD31 par les cellules	Les cellules sont vWF-	A 2 jours, formation de structures vasculaires, cellules CD34+, CD31+ et ac-LDL+

III.3.2 - Contraintes mécaniques

III.3.2.1 - Paroi vasculaire et forces mécaniques

Les cellules de la paroi vasculaire sont soumises à quatre forces hémodynamiques principales [121] :

- **Étirement cyclique** (*cyclic stretching*) correspondant à une distension de la paroi induite par un gradient de pression transmurale. Il est fonction de l'épaisseur du vaisseau, de sa composition et du degré de contraction des CML. Le principal effet de l'étirement cyclique est l'induction d'un stress oxydatif au niveau des CE.
- **Pression luminale** : force cyclique normale attribuée à la pression sanguine.
- **Tension** : en direction longitudinale.
- **Contraintes de cisaillement** (*shear stress*) : les cellules recouvrant la surface luminale sont constamment soumises à cette force de friction tangentielle exercée à la surface apicale des CE par le flux sanguin, et sur les CML du fait à la fois du flux interstitiel transmurale et de l'action des signaux secondaires libérés par les CE [385-386]. La valeur moyenne de cette contrainte est comprise entre 10 et 20 dyn/cm² selon le type de vaisseaux. Les contraintes de cisaillement ont été reconnues comme un important modulateur du phénotype des CE, de leur morphologie, de l'expression de gènes, et surtout de leur différenciation [255, 387]. Quand les CE vasculaires sont exposées aux contraintes de cisaillement générées par le flux sanguin, elles s'allongent avec leur grand axe en direction du flux et elles augmentent la production de substances vasodilatatrices, incluant l'oxyde nitrique, les prostacyclines, l'adrénoméduline et le peptide natriurétique de type C [388].

Toutes ces forces agissent indépendamment et synergiquement pour moduler le comportement des tissus vasculaires [389-390].

III.3.2.2 - Différenciation en cellules endothéliales

Des études récentes ont montré la capacité des contraintes de cisaillement à provoquer la différenciation des CPE en CE [255, 391]. Ces auteurs ont obtenu, après exposition des CPE à

des contraintes de cisaillement, l'expression de marqueurs des CE. Ye et al (2007) [391] ont obtenu ce résultat avec un temps de culture statique et de flux plus court que celui utilisé par Yamamoto et al (2003) [255]. Ces résultats sont peut-être liés au fait que les cellules utilisées par Ye et al proviennent du sang de cordon par rapport à Yamamoto et al dont les cellules proviennent de sang périphérique. Or, il est connu que l'origine des cellules souches influe sur leurs capacités. Ces deux études présentent l'inconvénient d'avoir été réalisées avec un flux plus faible que le flux physiologique.

Yamamoto et al en 2005 [370] et Wang et al [371] ont différencié des cellules souches embryonnaires en cellules endothéliales sous l'action de contraintes de cisaillement. Les deux équipes ont visualisé, après 24 heures de flux, l'expression de PECAM par les cellulesensemencées. Wang et al ont utilisé des contraintes de cisaillement physiologiques d'une artère, contrairement à Yamamoto et al qui n'ont pas utilisé de flux physiologique mais un flux plus faible.

Enfin, l'utilisation des cellules embryonnaires par Yamamoto et al (2005) [370] leur ont permis de réduire le temps de culture, avant exposition au flux, de 14 jours par rapport à leur étude de 2003 avec utilisation de CPE, ce qui est un avantage considérable en ingénierie tissulaire. Avec les cellules embryonnaires, le temps de culture avant flux n'est plus que de 7 jours.

Les quatre expériences ont été réalisées avec un flux constant et dans une chambre de flux parallèle, sauf pour Yamamoto et al (2003) [255] qui ont utilisé un système de flux rotatif.

Une avancée importante a été réalisée par l'équipe de Ye, car ils ont mis en évidence l'implication de la voie de signalisation Akt dans la différenciation endothéliale. En effet, ils ont montré que l'inhibition de cette voie diminuait l'expression des marqueurs endothéliaux spécifiques par les CPE après exposition au flux.

L'exposition des cellules souches à des contraintes de cisaillement dans une chambre de flux parallèle semble être une voie prometteuse pour les différencier en CE. Mais cette approche n'a pas encore été testée sur les CSM.

Dans un tableau récapitulatif non exhaustif sont décrites les différentes études qui ont été réalisées pour différencier des cellules souches en CE sous contraintes mécaniques (Tableau VII).

Tableau VII : différenciation endothéliale induite par stimulations mécaniques

Références	Yamamoto et al (2003) [255]	Wang et al (2005) [371]
Type cellulaire	Cellules mononucléées	Lignée de cellules progénitrices
Source cellulaire	Sang périphérique (homme)	Embryon (rongeur)
Matrice	Fibronectine	Collagène 1
Milieu de différenciation Système de flux	EBM2 + FGF2 + EGF + IGF1 + acide ascorbique + VEGF → CPE Système de flux rotatif laminaire de 0,1 à 2,5 dyn/cm ² (pas de VEGF)	MEM Chambre de flux parallèle : flux constant de 15 dyn/cm ²
% de SVF	5 %	10 %
Durée de différenciation	21 jours de culture cellulaire puis 24 h de diff° (flux ou statique)	Culture statique de durée non précisée (80 % de confluence) puis 6, 12 et 24 h de flux
Résultats	Avec flux, > prolifération, >expression de VEcadhérine, KDR, Flt1 r/r statique, formation de structures tubulaires + rapide	> expression vWF et CD31 dès 6 h Alignement des cellules dans le sens du flux

Références	Yamamoto et al (2005) [370]	Ye C 2007 [391]
Type cellulaire	Cellules embryonnaires Flk1+	Cellules mononucléées
Source cellulaire	souris	sang de cordon (homme)
Matrice	Collagène 4	Fibronectine
Milieu de différenciation Système de flux	DMEM + β -mercaptoéthanol + VEGF (50ng/mL)(statique) ou système de flux laminaire parallèle de 1,5 et 5 dyn/cm ² pendant 24 h (flux)	M199+VEGF (10 ng/mL) + FGF $\rightleftharpoons$ CPE Coculture avec CML Chambre de flux parallèle : flux de 5 dyn/cm ²
% de SVF	10 %	20 %
Durée de différenciation	7 J de culture puis 24 h de diff°	3 jours de culture statique puis 12 h de flux
Résultats	>expression de PECAM, VEcadhérine, Flt1 et Flk1 en présence de VEGF ou flux 1,5 dyn/cm ² et encore plus après un flux de 5 dyn/cm ² pendant 24 h et > taux de prolifération avec flux ou VEGF	Les CML favorisent la différenciation des CPE en CE. Les contraintes de cisaillement favorisent la différenciation des CPE cultivées seules en CE (vWF+ CD31+), et encore plus en coculture. Implication de la voie de signalisation Akt

IV - Objectifs du travail de thèse

L'objectif de ce travail de thèse est d'élaborer une nouvelle matrice synthétique vasculaire dont la lumière est fonctionnalisée par un film multicouche de polyélectrolytes et possédant des fonctions antithrombogéniques grâce aux cellulesensemencées sur sa surface. Cela permettrait de s'affranchir de l'utilisation de médicaments anticoagulants, source potentielle d'importants effets secondaires.

Dans un premier temps, nous avons construit un film multicouche de polyélectrolytes sur la surface luminale de prothèses vasculaires synthétiques à base de PTFEe. Son dépôt homogène sur la totalité de la surface luminale a été vérifié par microscopie confocale à balayage laser.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'adhésion, la viabilité et la conservation du phénotype des cellules endothélialesensemencées sur ces substituts fonctionnalisés, et donc l'effet potentialisateur de ces films multicouches sur la cytocompatibilité de ces substituts initialement hostiles à l'adhésion cellulaire.

Un deuxième type de cellules autologues humaines a ensuite été utilisé : les cellules souches mésenchymateuses. La caractérisation phénotypique de ces cellules a été réalisée et leur cytocompatibilité vis-à-vis du film multicouche a été étudiée.

Dans un quatrième temps, le potentiel de différenciation de ces cellules en cellules endothéliales sous l'action d'un stimulus biochimique pro-angiogénique a été évalué.

Enfin, nous avons soumis ces cellules à des contraintes de cisaillement et évalué leur comportement notamment prolifératif ainsi que l'apparition d'un phénotype endothélial.

Partie 2

Matériels et méthodes

MATERIELS ET METHODES

I - Culture cellulaire

Dans notre travail, nous avons utilisé deux types de cellules : des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) et des cellules souches mésenchymateuses humaines (CSM).

I.1 - Définition

Les HUVEC sont prélevées à partir de cordons ombilicaux de nouveaux-nés (dons de la Maternité Régionale de Nancy). Les cordons proviennent de donneurs sains, après leur consentement.

Les CSM sont isolées à partir de prélèvements de moelle osseuse humaine saine. Ces cellules sont utilisées pour étudier leur différenciation en cellules endothéliales (CE).

Ces prélèvements sont réalisés conformément aux procédures approuvées par les comités éthiques des hôpitaux.

I.1.1 - Réactifs utilisés

I.1.1.1 - HUVEC

- **Tampon HBSS** (*Hank's balanced salts solution*): HBSS (réf. H2387, Sigma, France) sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} contenant 0,4 g/L de KCl, 8 g/L de NaCl, 0,06 g/L de KH_2PO_4 , 0,04778 g/L de Na_2HPO_4 , 1 g/L de D-glucose, 0,011 g/L de rouge de phénol, pour 1L d'eau distillée (pH 7,2). Il doit être filtré sur 0,22 μm et conservé à 4°C.
- **Solution de digestion trypsine-EDTA** à 0,5 % diluée avec du tampon HBSS. La concentration finale de la solution de trypsine-EDTA est alors de 0,25 %. La trypsine est une enzyme protéolytique qui hydrolyse les liaisons peptidiques.

- **Milieu de culture** ou « milieu complet » constitué de :
 - Milieu M 199 et milieu RPMI 1640 volume par volume (réf. 31150, Gibco, France et R0883, Sigma, France)
 - 20 % de sérum humain AB décomplémenté (provenant de donneurs volontaires sains)
 - 2 mM de glutamine (réf. G7513, Sigma, France)
 - 100 U/mL de pénicilline (réf. 15070, Gibco, France)
 - 100 µg/mL de streptomycine (réf. 15070, Gibco, France)
 - 2,5 µg/mL de Fungizone®-Amphotéricine B (réf. 15290, Invitrogen, France)
 - 20 mM d'HEPES (réf. H7006, Sigma, France)

I.1.1.2 - CSM

- **Solution Leucoplate** (réf. 3101.002, Sobioda, France) : pour lyser les globules rouges dans la moelle osseuse.

I.1.2 - Méthodologie

I.1.2.1 - Isolement des HUVEC

Recueilli dès l'expulsion placentaire, le cordon est coupé à une dimension de 20 à 25 cm et immédiatement mis dans un flacon de culture de 75 cm² contenant 150 mL de HBSS stérile. Placé rapidement à 4°C, le cordon est utilisé le plus tôt possible. Il peut se garder entre 4 et 6 heures.

a) Lavage de la veine ombilicale

Le tampon HBSS est éliminé de la boîte et le cordon est déposé dans une boîte de culture stérile. L'extérieur du cordon est nettoyé à l'éthanol 75 %. Un robinet est fixé à l'un des orifices de la veine ombilicale et ligaturé fortement au cordon. A l'aide d'une seringue, la veine est lavée trois fois avec du tampon HBSS pour en éliminer le sang. Puis, l'autre extrémité du cordon est clampée.

b) Détachement des cellules de la veine ombilicale

On injecte 15-20 mL de la solution de digestion dans la veine jusqu'à ce qu'elle soit suffisamment dilatée. Le cordon est immergé dans 200 mL d'HBSS ; l'ensemble est placé 10 minutes à 37°C dans un bain-marie. Le cordon est ensuite posé délicatement sur une boîte de culture et massé quelques secondes. Il est ensuite déclampé au-dessus d'un tube plastique de 50 mL (Polylabo, France) contenant 20 mL de milieu complet pour arrêter l'action de la trypsine et dans lequel est recueillie la solution de digestion contenant les CE libres. La veine est alors rincée avec du tampon HBSS pour entraîner dans le tube les cellules encore présentes. La suspension cellulaire est centrifugée à 300 *g* pendant 6 minutes, à température ambiante. Après centrifugation et dépôt du surnageant, le culot cellulaire est remis en suspension dans 10 mL d'HBSS. Puis on effectue une deuxième centrifugation.

I.1.2.2 - Isolement des CSM humaines de la moelle osseuse

La moelle osseuse est aspirée au niveau de la crête iliaque du donneur en utilisant une seringue remplie d'héparine pour éviter la formation d'un caillot sanguin.

Après prélèvement, un comptage cellulaire est réalisé à partir de 10 µL de suspension mélangée avec 40 µL de solution Leucoplate[®] qui lyse les globules rouges. Après 3 minutes d'incubation, les cellules nucléées sont comptées au moyen d'une cellule de Thoma (réf. A4500T, Bioblock, France) par observation microscopique.

I.2 - Mise en culture, passage et congélation

I.2.1 - Réactifs utilisés

I.2.1.1 - HUVEC

- **Solution de digestion trypsine-EDTA** à 0,5 % diluée avec du tampon HBSS (réf. H2387, Sigma, France). La concentration finale de la solution de trypsine-EDTA est alors de 0,125 %.

I.2.1.2 - CSM

- **Tampon HBSS** sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}
- **Solution de trypsine-EDTA** à 0,5 %, diluée avec du tampon HBSS. La concentration finale de la solution de trypsine-EDTA est alors de 0,25 %.
- **Milieu de culture :**
 - *Alpha Modification of Eagle's Medium* (α -MEM) (réf. BE12169F, Lonza, Belgique).
 - Sérum de veau foetal (réf. 10270, Gibco, France) utilisé à 10% (v/v dans α -MEM, décomplémenté à 56°C pendant 30 min).
 - 2 mM de Glutamine (réf. G7513, Sigma, France)
 - 100 U/mL Pénicilline (réf. 15070, Gibco, France)
 - 100 $\mu\text{g/mL}$ de Streptomycine (réf. 15070, Gibco, France)
 - 2,5 $\mu\text{g/mL}$ Fungizone[®]-Amphotéricine B (réf 15290, Gibco, France)

Le milieu alpha a été choisi car il fournit les meilleures conditions pour une croissance optimale des CSM [269].
- **Milieu de congélation DMSO** (*Diméthyl sulfoxyde*, réf. D5879, Sigma, France) dilué à 10 % (v/v) dans du SVF.
- **Bleu de Trypan** (réf.T8154, Sigma, France) dilué à 50 % v/v dans du milieu de culture.

I.2.2 - Méthodologie

I.2.2.1 - HUVEC

a) Mise en culture

La mise en culture des cellules est effectuée selon la méthode de Jaffe modifiée [392]. Après la deuxième centrifugation (décrite dans le paragraphe I.1.2.1), les cellules sont remises en suspension dans 5 mL de milieu complet,ensemencées dans un flacon de culture de 25 cm² et placées dans un incubateur à 37°C (5% CO₂ et 95% d'air) et à saturation en humidité. Ceci est le passage 0 (P0). Le jour suivant l'extraction des CE, les cellules sont lavées deux fois avec du tampon HBSS en effectuant de petits mouvements oscillatoires de façon à éliminer les globules rouges. Puis les cellules sont remises dans l'incubateur avec 5 mL de milieu complet.

Le milieu est renouvelé tous les deux jours. Normalement, après 5-7 jours, les cellules sont confluentes.

b) Passages

À confluence, les cellules sont lavées par deux fois avec 5 mL d'HBSS et placées en contact avec 5 mL de trypsine-EDTA 0,125 %, à 37°C, pendant 3 minutes. L'action de digestion de la trypsine est arrêtée grâce à l'ajout de 5 mL de milieu complet. La suspension cellulaire est recueillie dans des tubes coniques stériles puis centrifugée à 300 *g* pendant 6 minutes. Les cellules sont alors remises en suspension dans du milieu complet et déposées dans des boîtes de culture. Les cellules au deuxième passage sont utilisées pour les expériences.

I.2.2.2 - CSM

a) Mise en culture

On dilue $3,75 \times 10^6$ cellules nucléées, issues de la moelle osseuse totale et obtenues lors de l'étape décrite dans le paragraphe I.1.2.2, dans 15 mL de milieu de culture puis on les dépose dans une boîte de culture de 75 cm² (soit 5×10^4 cellules/cm²). Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C, en atmosphère humide avec 5 % CO₂. Après 48 heures, le milieu de culture est renouvelé pour éliminer les cellules non adhérentes. Il sera ensuite changé 2 fois par semaine jusqu'à obtention d'un tapis cellulaire à 90 % de confluence. Ceci est le passage 0 (P0).

b) Passage

Afin d'amplifier les CSM arrivées à 90 % de confluence, les cellules sont lavées 2 fois avec 5 mL de tampon HBSS, le tampon HBSS est ensuite retiré des boîtes de culture et 3 mL de trypsine-EDTA 0,5 % sont ajoutés dans chaque boîte. Les cellules sont alors incubées 5 minutes à 37°C avec 5 % CO₂. Afin d'inhiber l'action de la trypsine, 3 mL de milieu de culture sont ajoutés dans chaque boîte. Les cellules en suspension sont alors récupérées dans un tube de 50 mL afin d'être centrifugées (400 *g* pendant 10 minutes). A l'issue de la centrifugation, le culot cellulaire est suspendu dans un volume de milieu de culture. Le comptage cellulaire est alors réalisé à partir de 50 µL de suspension cellulaire mélangée avec 50 µL de Bleu de Trypan. Les cellules sont ensuite comptées au moyen d'une cellule de Thoma (réf. A4500T, Bioblock, France) par observation microscopique. On va remettre en culture $3,75 \times 10^5$ cellules au premier passage (P1) soit 5×10^3 cellules par cm² dans des boîtes de culture de 75 cm². Les cellules pourront ainsi continuer à être amplifiées par

l'intermédiaire des passages et ne seront utilisées qu'à partir du passage 3 : passage à partir duquel il est considéré que l'on ne trouve en culture que des CSM. Les CSM seront utilisées pour les expériences jusqu'au passage 5.

c) Congélation des cellules

Le culot cellulaire obtenu après digestion est suspendu dans du milieu de congélation à la concentration de 1×10^6 cellules/mL. La suspension cellulaire est ensuite répartie dans des cryotubes stériles (réf. C23954, Fisher, France). Après une incubation d'une heure à 4°C , 30 minutes à -20°C , puis 24 heures à -80°C , les cellules sont immergées et conservées à -180°C dans l'azote liquide.

Pour la décongélation, les suspensions cellulaires sont plongées dans un bain-marie à 37°C jusqu'au décollement du glaçon. Les cellules sont lavées avec du milieu complet afin d'éliminer le DMSO. Elles sont enfinensemencées dans des boîtes de culture de 75 cm^2 (5×10^3 cellules/ cm^2) et sont cultivées jusqu'à sub-confluence.

I.3 - Ensemencement sur plaques de culture

I.3.1 - Ensemencement des HUVEC sur du PTFEe

I.3.1.1 - Solutions de polyélectrolytes

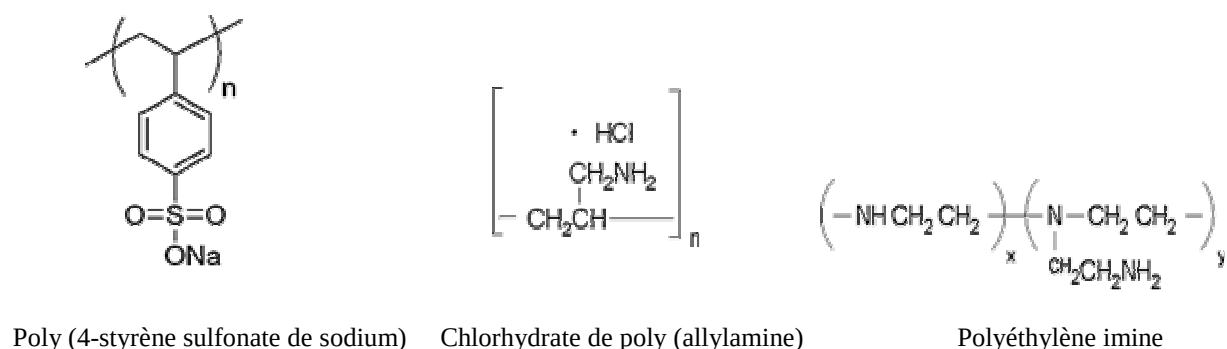


Figure 17 : structure chimique des polyélectrolytes utilisés pour la construction du film multicouche PEI-(PSS-PAH)₃

- Polycations utilisés : PAH ou chlorhydrate de poly(allylamine) (réf. 283223, Sigma, France) PM = 70 000 Da, et PEI ou polyéthylène imine (réf. 181978, Sigma, France) PM = 750 000 Da
- Polyanion utilisé : PSS ou poly(4-styrène sulfonate de sodium) (réf. 243051, Sigma, France) PM = 70 000 Da (Figure 17)

Les multicouches de polyélectrolytes sont construites à partir de solutions de PEI à 10 mg/mL, de PSS et de PAH à 5 mg/mL, dissous dans une solution tampon NaCl 1 M filtrée (filtre Millipore 0,22 μ m).

I.3.1.2 - Surfaces étudiées

Nous allons étudier quatre types de surfaces : polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe) seul (réf. VT06070L, Gore[®]), PTFEe modifié avec une monocouche de PAH, PTFEe modifié avec un film PEI-(PSS-PAH)₃ et TCPS (*Tissue Culture Polystyrene Surface*) (contrôle positif).

Le polystyrène (TCPS), matériau le plus couramment utilisé pour la culture cellulaire, représente un polymère largement employé pour l'étude des mécanismes des interactions entre cellules et matériau artificiel.

I.3.1.3 - Matériels et supports

- Plaques 48 puits (réf. 677180, Dutscher, France)
- Lamelles de verre rondes de 9 mm de diamètre (réf. CB00090, Menzel-Gläser, Allemagne)
- PAH couplé à un fluorochrome : la **rhodamine** (λ excitation = 541 nm, λ émission = 572 nm, INSERM U595, Strasbourg).

I.3.1.4 - Méthodologie

➤ Préparation des surfaces

Le film multicouche de polyélectrolytes est construit sur des patches de PTFEe de 9 mm (réalisés à l'emporte-pièce) collés sur des lamelles de verre du même diamètre. Préalablement, des irrégularités sont créées sur les lamelles de verre à l'aide de papier de

verre puis celles-ci sont nettoyées avec de l'éthanol à 75 %. Les patchs sont alors collés (colle Bostik®) sur les lamelles, puis déposés dans des plaques de culture de 48 puits. Des études préliminaires ont montré l'absence de cytotoxicité de la colle.

➤ *Construction des films*

Ces assemblages sont réalisés à température ambiante par des « trempages » successifs du support alternativement dans une solution de polycations et de polyanions. Trois étapes de lavage séparent deux dépôts successifs permettant de déplacer les polyélectrolytes libres. Une couche primaire de PEI (chargé positivement) est d'abord adsorbée par simple mise en contact de la solution de PEI avec la surface. Après 20 minutes de contact, trois rinçages à l'eau distillée filtrée sont effectués (3 x 3 minutes). Puis la première couche de polymère anionique est réalisée (temps de contact = 10 min). Le même temps de contact est utilisé pour les couches suivantes. Toutes les étapes de construction se font en maintenant le substrat dans une solution de polyélectrolytes ou d'eau distillée pour éviter le dessèchement de la surface. Le dépôt des différents polyélectrolytes permet d'obtenir l'architecture suivante sur le PTFEe : **PEI-(PSS-PAH)₃**.

Les films sont ensuite séchés au minimum une nuit à 4°C avant leur utilisation et sont conservés au maximum 15 jours à 4°C.

➤ *Vérification du dépôt du film multicouche*

De façon à vérifier le dépôt du film sur la surface du PTFEe, du PAH couplé à un fluorochrome : la rhodamine a été utilisée pour le dépôt de la dernière couche.

➤ *Ensemencement*

Les cellules sontensemencées dans des plaques de culture de 48 puits contenant les différents échantillons, après leur deuxième passage (P2) à la densité cellulaire de 5×10^4 cellules/puits en fonction du protocole expérimental. Avant l'ensemencement, les plaques sont irradiées sous une lampe UV germicide pendant 10 minutes.

I.3.2 - Ensemencement des CSM sur du verre

I.3.2.1 - Polyélectrolytes utilisés

Il s'agit des mêmes solutions de polyélectrolytes qu'en présence des HUVEC (voir chapitre I.3.1.1).

I.3.2.2 - Surfaces étudiées

- Lamelles de verre recouvertes de fibronectine humaine (*Fibronectin plasma human*, réf. F2006, Sigma, France), de film PEI-(PSS/PAH)₃, ou de film PAH-(PSS/PAH)₃.

I.3.2.3 - Matériels et supports

- Lamelles de verre rondes : diamètre 14 mm (réf. 0111540, VWR, France) et 32 mm (réf. 0111710, VWR, France)
- Lamelles de verre rectangulaires (réf. 803495, Polylabo, France)
- Plaques 24 puits (réf. 662160, Dutscher, France)
- Plaques 6 puits (réf. CLS3516, Sigma, France)

I.3.2.4 - Méthodologie

- Nettoyage et stérilisation des lamelles de verre avant dépôt de la solution de fibronectine : plonger les lamelles dans l'éthanol à 70 % pendant 24 heures, déposer stérilement les lamelles dans les plaques, exposer l'ensemble sous une lampe UV germicide pendant 15 min sous hotte.
- Préparation et revêtement des lames de verre avec une solution de fibronectine :
 - Préparation : On va diluer une solution initiale de fibronectine (réf. F 2006, Sigma, France) de 1 mg/ml dans de l'HBSS pour obtenir une solution finale à 0,1 µg/µL. Cette solution va être répartie dans des aliquots et stockée à -20°C jusqu'à utilisation.

- Revêtement : On va déposer 100 μL de solution de fibronectine sur lamelles rondes déposées dans des plaques 24 puits et 300 μL dans les plaques 6 puits. On va également déposer 200 μL au centre d'une lame rectangulaire déposée dans une boîte de Pétri. On obtiendra ainsi un recouvrement de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ des puits.
- Préparation des lames de verre avant le dépôt des films multicouches de polyélectrolytes :
Afin de mettre en évidence la silice (Si-) et de rendre la surface des lames négative, les lames de verre sont lavées pendant 15 min à 100°C dans une solution de *Sodium Dodécyl Sulfate* (SDS) (0,01 M) (préparée par dissolution de 0,721 g de SDS dans 250 mL d'eau distillée), suivis de lavages avec de l'eau distillée filtrée sur 0,22 μm . Ensuite, les lames sont lavées pendant 15 min à 100°C dans une solution d'HCl (0,12 M) (préparée par dilution de 918 μL de HCl à 37 % dans 250 mL d'eau distillée) suivis de lavages avec de l'eau distillée filtrée. Les lames de verre sont gardées dans l'eau distillée filtrée avant leur utilisation.
- Construction des films : le dépôt des polyélectrolytes se fait dans les mêmes conditions que dans le chapitre I.3.1.4, de façon à obtenir deux types de multicouches : **PEI-(PSS/PAH)₃**, ou **PAH-(PSS/PAH)₃**.
- Ensemencement :
Les cellules sontensemencées dans des plaques de culture de 6 et 24 puits, ou dans des boîtes de Pétri contenant les différentes surfaces, à la densité cellulaire de 2×10^4 cellules/ cm^2 . Avant l'ensemencement, les plaques sont irradiées sous une lampe UV germicide pendant 10 minutes.

I.3.3 - Ensemencement des CSM sur du PTFEe

I.3.3.1 - Solutions de polyélectrolytes

Voir chapitre I.3.1.1

I.3.3.2 - Surfaces étudiées

Nous allons étudier quatre types de surfaces : PTFEe seul, PTFEe modifié avec une monocouche de PAH, PTFEe modifié avec un film PAH-(PSS-PAH)₃.

I.3.3.3 - Matériels et supports

Voir chapitre I.3.1.3

I.3.3.4 - Méthodologie

➤ *Préparation des surfaces*

Voir chapitre I.3.1.4

➤ *Construction des films*

Voir chapitre I.3.1.4

La couche initiale de dépôt : PEI a été remplacée par une couche PAH.

Le dépôt des différents polyélectrolytes permet d'obtenir l'architecture suivante sur le PTFEe : **PAH-(PSS-PAH)₃**.

➤ *Vérification du dépôt du film multicouche*

De façon à vérifier le dépôt du film sur la surface du PTFEe, du PAH couplé à un fluorochrome : la rhodamine a été utilisée pour le dépôt de la dernière couche.

➤ *Ensemencement*

Les cellules sontensemencées dans des plaques de culture de 48 puits contenant les différents échantillons, après leur troisième passage (P3) à la densité cellulaire de 2×10^4 cellules/puits. Avant l'ensemencement, les plaques sont irradiées sous une lampe UV germicide pendant 10 minutes.

II - Stimulation des CSM

II.1 - Stimulation biochimique : facteur de croissance angiogénique (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VEGF est appliqué sur les CSM cultivées en plaques dans le but d'étudier la réponse cellulaire à une stimulation biochimique.

La solution de VEGF (1 mg/mL, réf. VT259, Sigma, France) est diluée dans du milieu de culture sans sérum et aliquotée à une concentration de 500 ng/mL. Cette solution est conservée à -20°C jusqu'au moment de l'expérience. Les CSM sont stimulées avec VEGF ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 50 ng/mL. Le milieu de culture est constitué de 2 % de SVF. Il est changé tous les deux jours pendant 14 jours.

II.2 - Stimulation mécanique : contraintes de cisaillement

L'influence des contraintes de cisaillement sur les CSM cultivées sur les films multicouches, et sur de la fibronectine a été réalisée dans une **chambre d'écoulement** (Figure 18). C'est une chambre rectangulaire, où les conditions hydrodynamiques sont parfaitement connues, et qui permet de simuler les conditions d'écoulements laminaires. La chambre de perfusion est conçue pour obtenir un **flux uniforme et laminaire**. Elle consiste en un canal avec une section longitudinale rectangulaire. L'assemblage de la chambre est effectué par un vide de - 500 mbar grâce à une pompe à vide. La chambre est connectée à un circuit d'écoulement. La pompe péristaltique (Masterflex®, L/S™, model 7519-25, Bioblock Scientific, France) permet une circulation du milieu de culture. Le débit est contrôlé par la vitesse du rotor de la pompe. Une seringue contenant de l'air est ajoutée au circuit en amont de la chambre, permettant de créer une modulation sinusoïdale, afin d'amortir les fluctuations parasites de l'écoulement grâce à la compressibilité de l'air. Un mélange gazeux (5 % de CO₂ et 95 % d'air) est introduit dans le réservoir de milieu pour réguler les variations de pH et maintenir les conditions de culture. La température du milieu de culture est maintenue à 37°C dans un bain marie. Les CSM sont exposées à un flux laminaire de 1,5 Pa (15 dyn/cm²) pendant 24 heures. Un joint de silicone a été déposé sur la chambre de flux conférant un canal où l'écoulement

est laminaire. La chambre, la lame de verre ensemencée avec les CSM et le joint en silicone sont assemblés sous un vide de - 500 mbar grâce à une pompe à vide.

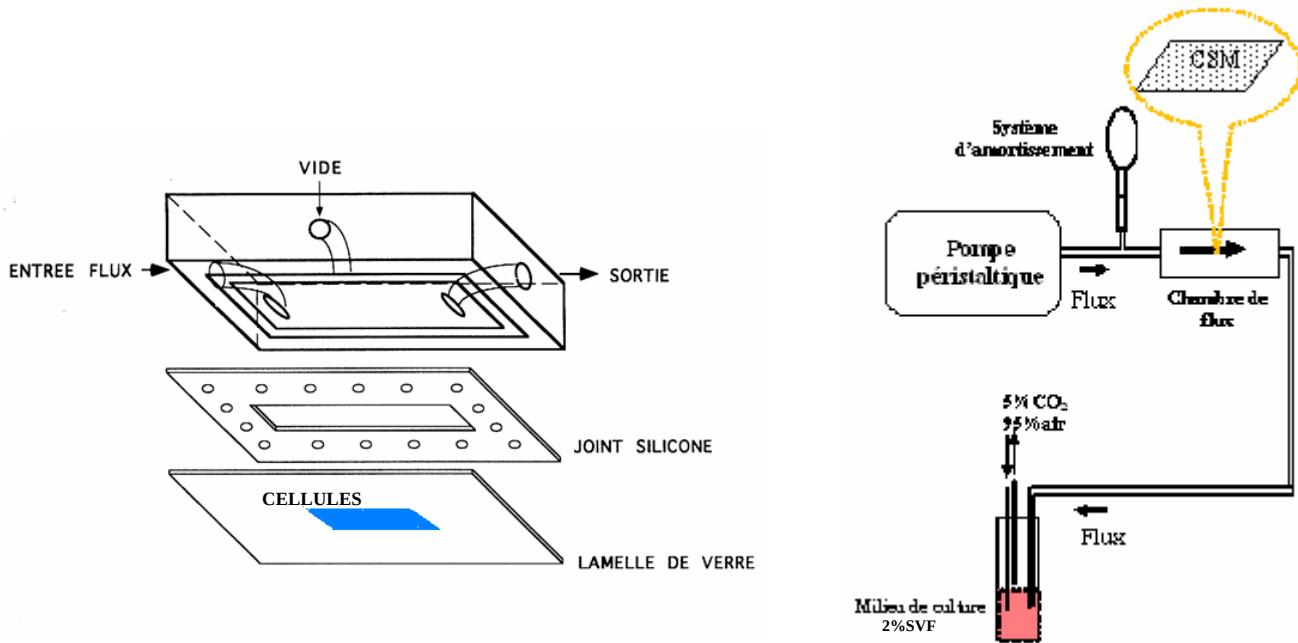


Figure 18 : schéma d'une chambre d'écoulement et du système en flux.

La contrainte de cisaillement est uniforme dans la partie centrale de la chambre.

Elle est calculée par l'équation suivante :

$$\tau = 6 Q \mu / H^2 W$$

τ = contrainte de cisaillement (dyn/cm²)

μ = viscosité du milieu (milieu de culture = 0,80 mPa.s ; à 37°C). La viscosité du milieu a été mesurée avec un viscosimètre de type Couette

Q = débit (mL/s)

w = longueur de la chambre (1,8 cm)

H = hauteur de la chambre (0,025 cm)

Par conséquent, la valeur du débit de la pompe péristaltique permet de connaître la contrainte de cisaillement exercée au niveau des cellules. Nous avons étalonné la pompe en réalisant une mesure du débit en fonction de la vitesse de rotation (Figure 19).

Suite à cet étalonnage, nous avons obtenu la relation suivante par régression linéaire :

Débit (mL/min) = 13,842 x vitesse de rotation (graduation) – 10,391, nous permettant de choisir précisément la contrainte de cisaillement appliquée.

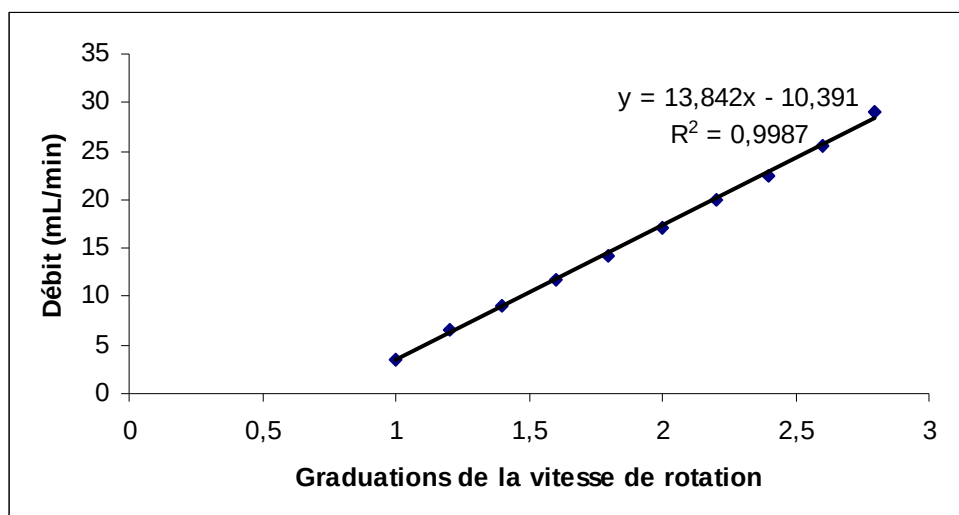


Figure 19 : étalonnage de la pompe péristaltique

III - Méthodologies analytiques

III.1 - Analyse du métabolisme cellulaire

La mesure de l'activité métabolique des HUVEC et des CSM a été réalisée par le test Alamar blue™.

III.1.1 - Réactifs

- **DMEM** (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) sans rouge de phénol (réf. 11880, Gibco, France)
- **Alamar blue™** (réf. BUF012B, Sérotec, France) utilisé à 10 % (v/v dans DMEM sans rouge de phénol)

III.1.2 - Principe

Le test Alamar blue™ est conçu pour mesurer quantitativement la prolifération cellulaire, la viabilité et la cytotoxicité des drogues sur les cellules. Alamar blue est composé d'un indicateur Rédox (indicateur colorimétrique) qui change de couleur en fonction de la

réduction chimique du milieu de culture. Alamar blue est réduit par l'activité mitochondriale, représentative de l'activité métabolique cellulaire et donc de la viabilité cellulaire.

Alamar Blue™ a des propriétés intéressantes car il est soluble dans le milieu, stable en solution, non toxique pour les cellules et il produit des changements facilement mesurables. Le test ne nécessite pas la lyse des cellules, ce qui permet de suivre la cinétique du signal.

Des cellules en bonne santé et/ou en prolifération produisent des composés réducteurs tels que FADH₂, NADH, NADPH et ont une activité cytochromique préservée contribuant à réduire Alamar blue™. Par contre, des cellules atteintes par un stimulus cytotoxique ne réduisent pas l' Alamar Blue™ et produisent des composés oxydants.

La mesure de la viabilité cellulaire est donc déterminée par la différence entre la mesure densitométrique à 570 nm (absorbance du composé réduit) et celle à 630 nm (absorbance du composé oxydé). Compte tenu du recouvrement partiel des spectres d'absorption du composé réduit (rouge) et du composé oxydé (bleu), l'absorbance est mesurée à 2 longueurs d'onde et la différence de densité optique (DO) est déterminée selon la formule :

$$\Delta DO = [DO(570nm)_{exp.} - DO(630nm)_{exp.}] - [DO(570nm)_{tém.} - DO(630nm)_{tém.}]$$

exp. = expérimental tém. = témoin sans cellules Δ = différence

III.1.3 - Méthodologie

Afin d'éliminer l'interférence du rouge de phénol présent dans le milieu de culture, les cellules sont lavées deux fois avec du DMEM sans rouge de phénol pendant 5 minutes. Puis 0,5 mL d'une solution d' Alamar blue™ à 10 % sont ajoutés dans chaque puits de plaques 24 puits (CSM) ou 48 puits (HUVEC). La plaque de culture est placée dans l'incubateur à 37°C. Après 3 heures d'incubation, le milieu de chaque puits est prélevé et la mesure densitométrique est réalisée en utilisant un spectrophotomètre (DU 640, Beckman USA). La différence de densité optique (indice de la viabilité cellulaire) est alors déterminée. Pour chaque manipulation, des puits nonensemencés font office de témoin négatif. Ce test est réalisé après 1, 3 et 7 jours de culture pour les HUVEC et 2, 3 et 7 jours de culture pour les CSM.

III.2 - Analyse du cycle cellulaire

La cytométrie en flux est une méthode rapide pour mesurer la teneur des cellules en ADN, et fournit un outil commode de recherche pour surveiller la régulation du cycle des cellules.

III.2.1 - Réactifs

- **Kit Coulter DNA-Prep Reagents** (réf. PN 6607055, Beckman Coulter, USA) contenant DNA Prep™ LPR (< 0,1 % cyanure de potassium, < 0,1 % NaN₃, détergents non ioniques, salins et stabilisateurs), DNA Prep™ Stain (50 µg/mL iodure de propidium (< 0,5 % iodure de propidium), RNase [Type III-A, bovine pancrease (4 KU/mL)], < 0,1 % NaN₃, salins et stabilisateurs)
- **DMEM sans rouge de phénol**
- **Tampon PBS** (*Phosphate Buffered Saline*)

Produits	Concentration	Référence
NaCl	137 mM	Réf. 10241, BDH, France
KCl	27 mM	Réf. 96120, Merck, France
Na ₂ HPO ₄	10 mM	Réf. S9390, Sigma, France
KH ₂ PO ₄	1,4 mM	Réf. 26925, VWR Prolabo, France

Tableau VIII : composition du tampon PBS

III.2.2 - Principe

Le cycle cellulaire des cellules des eucaryotes supérieurs comprend **quatre phases** qui se succèdent dans un ordre immuable : G1, S, G2 et M (Figure 20). Durant deux de ces phases, phase S et phase M, les cellules exécutent les deux événements fondamentaux du cycle :

réplication de l'ADN (**phase S**, pour synthèse) et partage rigoureusement égal des chromosomes entre les 2 cellules filles (**phase M**, pour mitose). Les deux autres phases du cycle, **G1** et **G2**, représentent des intervalles (*Gap*) : au cours de la phase G1, la cellule effectue sa croissance, intègre les signaux mitogènes ou anti-mitogènes et se prépare pour effectuer correctement la phases S ; au cours de la phase G2, la cellule se prépare pour la phase M. Après la mitose, les cellules peuvent soit passer en G1, soit entrer en **G0**, stade quiescent de non division.

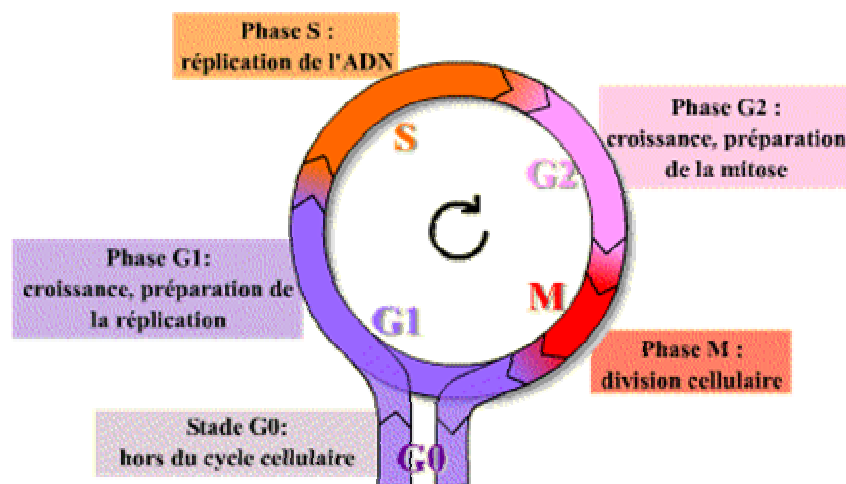


Figure 20 : les quatre phases du cycle cellulaire et le stade G0

(<http://www.snv.jussieu.fr>)

Les méthodes d'analyse des cycles cellulaires par cytométrie en flux sont basées sur l'émission de la fluorescence des cellules marquées à l'iodure de propidium. Une population à croissance exponentielle de cellules aura une distribution de son contenu d'ADN montrant un premier pic de cellules G0/G1, une vallée de cellules en phase S, et un deuxième pic contenant des cellules G2/M. Les cellules de la phase G2/M ont deux fois le contenu d'ADN des cellules de la phase G0/G1. Les cellules en phase S possèdent une teneur en ADN comprise entre 2N et 4N et correspondent à l'espace situé entre les deux pics (Figure 21). La distinction entre G0 (phase quiescente) et G1 (phase de préparation à la synthèse d'ADN) ainsi que G2 (préparation de la mitose) et M (mitose) est impossible avec une méthode utilisant un intercalant comme l'iodure de propidium.

L'ADN est marqué par l'iodure de propidium (IP) ($\lambda_{\text{ex}}=488\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=617\text{nm}$). C'est un fluorochrome qui s'intercale entre les bases de la double hélice d'ADN. L'intensité de fluorescence de chaque cellule est proportionnelle à leur teneur en ADN.

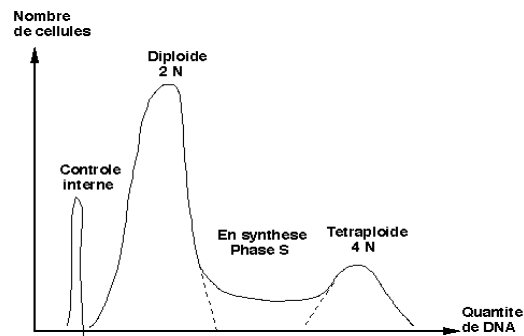


Figure 21 : histogramme de répartition des phases du cycle cellulaire
 (<http://www.med.univ-tours.fr>)

III.2.3 - Méthodologie

Après 72 heures de culture statique sur lames de verre déposées dans des boîtes de Pétri ou 48 h de culture statique suivies de 24 h de culture sous contraintes de cisaillement (15 dyn/cm^2), les CSM sont incubées 5 min à 37°C avec 1 mL de trypsine 0,25 % par boîte. L'action chimique de la trypsine est complétée par l'utilisation d'un grattoir (action mécanique) (réf. 7340386, VWR, France). Le détachement du tapis cellulaire est contrôlé au microscope optique inversé, et la trypsine est inactivée par l'ajout de 1 mL de milieu complet dans chaque boîte. La suspension présente dans chaque boîte est homogénéisée à l'aide d'une micropipette. La totalité du contenu de la boîte est versée dans un tube d'hémolyse (réf. 080053 Dutscher, France), les tubes sont centrifugés à $400 g$ pendant 10 min. Les culots sont lavés avec du PBS, le surnageant est jeté, 2 mL de PBS sont ajoutés, les tubes sont centrifugés 10 min à $400 g$. Un deuxième lavage est effectué et les cellules sont suspendues dans $200 \mu\text{L}$ de PBS. On répartit la suspension cellulaire à raison de $50 \mu\text{L}$ par tube, puis on ajoute $50 \mu\text{L}$ DNA prep LPR dans chaque tube pour fixer les cellules. Cette étape est suivie d'une agitation pendant 60 secondes au vortex. On réalise un marquage des cellules avec l'iodure de propidium en ajoutant $500 \mu\text{L}$ de DNA-Prep Stain, et l'ensemble est agité pendant 60 secondes avant une mesure extemporanée en cytométrie en flux (dans l'heure qui suit le marquage).

Pour l'interprétation de ses différentes phases, le cycle cellulaire fait l'objet d'une modélisation mathématique en utilisant une analyse polynomiale du modèle de Dean et Jett

[Multi Cycle AV (Phoenix Flow System, Sn Diego, USA)] afin de calculer le pourcentage de cellules dans les différentes phases. Ces études ont été effectuées au laboratoire d'Immunologie (Faculté de Médecine, Nancy).

III.3 - Fluorescence-Immunofluorescence

Chaque type cellulaire est caractérisé par une combinaison unique de protéines membranaires et/ou intracellulaires communément appelés marqueurs cellulaires. Ces marqueurs cellulaires peuvent être liés à des anticorps marqués par un fluorochrome et ainsi être détectés par microscopie d'immunofluorescence ou cytométrie de flux.

III.3.1 - Les anticorps et réactifs utilisés

III.3.1.1 - Les anticorps

Nous distinguons deux types d'anticorps : ceux permettant de réaliser un immunomarquage indirect (Tableau IX) et ceux permettant un immunomarquage direct (Tableau X).

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Clone	Fournisseur (réf.)
Anti-vWF	Humain	IgG (Souris)	F8/86	Dako (M0616)
Anti-PECAM	Humain	IgG (Souris)	JC7OA	Dako (M0823)
Anti-IgG-Alexa fluor 488	Souris	IgG (Chèvre)	A11001	Invitrogen (A11017)

Tableau IX : caractéristiques et références des anticorps permettant un immunomarquage indirect

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Isotype	Fournisseur (réf.)
Anti-CD34/PE	Humain	IgG (Souris)	BD (réf.555822)
Anti-CD45/FITC	Humain	IgG (Souris)	BD (réf. 555482)
Anti-CD73/PE	Humain	IgG (Souris)	BD (réf.550257)
Anti-CD90/FITC	Humain	IgG (Souris)	BD (réf. 555595)
Anti-CD105/PE	Humain	IgG (Souris)	Serotec (réf. MCA1557PE)
Contrôle isotypique/PE	Humain	IgG (Souris)	BD (réf. 555749)
Contrôle isotypique/FITC	Humain	IgG (Souris)	BD (réf. 555748)

Tableau X : caractéristiques et références des anticorps permettant un immunomarquage direct

III.3.1.2 - Réactifs annexes

- **Tampon PBS**
- **DMEM sans rouge de phénol**
- **Sérum de veau fœtal (SVF)** : il est utilisé afin d'empêcher toute fixation aspécifique des anticorps. Lorsque le SVF est ajouté au PBS à raison de 2 % v/v, cela forme ce que nous appellerons la **solution d'immunomarquage**.
- **Solution de trypsine-EDTA** 0,5 % (réf. 25300, Sigma, France) utilisée à 0,25 % (v/v dans HBSS)
- **Solution de fixation** : paraformaldéhyde (PAF) (réf. P-6418, Sigma, France) : 4 % (p/v dans PBS)
- **Solution de perméabilisation** : Triton X-100 (0,5 % v/v dans du PBS)

III.3.2 - Marquage en immunofluorescence

III.3.2.1 - Principe (Annexe 1)

III.3.2.2 - Marquage pour analyse en cytométrie de flux

a) Caractérisation des CSM à P3 et des HUVEC à P2

Plusieurs auteurs décrivent qu'à partir de la moelle osseuse, il faut trois passages pour obtenir une population cellulaire composée majoritairement de CSM [261, 270]. Afin d'être sûr de ne travailler par la suite qu'avec des CSM, nous avons caractérisé la population de cellules obtenues au troisième passage.

Enfin nous avons voulu comparer le phénotype des CSM à celui des HUVEC.

Les procédés d'immunomarquage direct ou indirect se font en conditions saturantes.

➤ *Immunomarquage direct*

Cet immunomarquage direct concerne les récepteurs CD34, CD45, CD73, CD90 et CD105. A l'issue du troisième passage, les cellules sont trypsinées, selon le protocole décrit au paragraphe I.2.2.2, et sont réparties à raison de 10^5 cellules/tube. Les cellules sont lavées par centrifugation avec 2 mL de PBS (10 min, 400 g). Le surnageant est décanté et resuspendu dans 45 μ L de solution d'immunomarquage et 5 μ L d'anticorps spécifiques sont ajoutés. Les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière. A l'issue de l'incubation, 2 mL de PBS sont ajoutés dans chaque tube puis une centrifugation est faite afin d'éliminer les anticorps en excès (10 min, 500 g). Cette étape est renouvelée une fois. Le culot est repris dans 300 μ L de PBS avant d'être analysé en cytométrie en flux (EPICS XL Coulter ; Beckman-Coulter).

➤ *Immunomarquage indirect*

Cet immunomarquage concerne *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule* (PECAM ou CD31) et *Von Willebrand Factor* (vWF). Tout comme pour le marquage direct, les cellules sont trypsinées. A l'issue de la centrifugation, le culot cellulaire est repris dans 200 μ L de solution d'immunomarquage et 4 μ L d'anticorps primaire sont déposés dans chaque tube. Les échantillons sont incubés pendant 45 minutes à 37°C puis lavés deux fois par centrifugation avec 2 mL de PBS (10 min, 500 g). Le culot cellulaire est suspendu dans 200 μ L de solution d'immunomarquage et 2 μ L d'anticorps secondaires sont déposés dans chaque tube. Les échantillons sont incubés 30 minutes à 37°C dans l'obscurité. A l'issue de cette incubation, tout comme pour le protocole d'immunomarquage direct, les cellules sont lavées deux fois par centrifugation et le culot est resuspendu dans 300 μ L de PBS.

Un tube pour le contrôle négatif (cellules non marquées dans du PBS) et un tube pour le contrôle isotypique sont préparés en même temps que les échantillons (cellules incubées avec un anticorps spécifique du contrôle isotypique pour le marquage direct ou avec l'anticorps secondaire pour le marquage indirect). Ces contrôles négatif et isotypique permettent, respectivement, de s'affranchir de l'autofluorescence des cellules et du marquage aspécifique.

b) Suivi du phénotype des CSM après différenciation

Quand les cellules ensemencées au paragraphe I.3.2.4 arrivent à 90 % de confluence, le milieu de culture 10 % SVF est retiré et remplacé par du milieu à 2 % de SVF avec ou sans adjonction de VEGF pendant 14 jours. Les cellules sont ensuite détachées par adjonction de trypsine-EDTA à 0,25 % pendant 5 minutes complétée par l'utilisation d'un racleur. Il a été nécessaire d'utiliser un racleur car les cellules, quelque soit le support sur lequel elles étaient ensemencées, présentaient un décollement incomplet même si le temps d'incubation de la solution de trypsine était prolongé jusqu'à 15 minutes. Les cellules sont ensuite traitées comme dans le paragraphe précédent pour évaluer l'expression de CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, PECAM et vWF, avant analyse sur cytomètre.

c) Analyse des échantillons cellulaires en cytométrie en flux

➤ *Principe*

(voir annexe 2)

➤ *Méthodologie*

Les cellules sont analysées sur un cytomètre (EPICS XL Coulter, Beckman-Coulter). Un minimum de 10 000 événements a été collecté lors de chaque analyse. La population cellulaire est repérée sur le scattogramme en fonction de la taille et de la granulosité. Une fenêtre, prenant en compte uniquement cette population, est dessinée afin d'éliminer les débris cellulaires, ou les doublets et triplets de cellules.

Sur le cytogramme représentant la taille cellulaire en fonction de la granulosité, les valeurs de SSC (*Side Scatter*) (taille) et de FSC (*Forward Scatter*) (granulosité) sont réglées de façon à bien visualiser la population cellulaire.

Sur l'histogramme de la fluorescence, la tension du photomultiplicateur (PMT) est réglée de manière à ce que les cellules non marquées (le contrôle négatif qui permet de s'affranchir de l'autofluorescence des cellules) ainsi que les cellules incubées en présence d'immunoglobulines non spécifiques (le contrôle isotypique qui permet de s'affranchir de la

fluorescence du marquage aspécifique) apparaissent négatives, entre 0 et 1 sur l'échelle logarithmique. La tension du PMT ne doit plus être touchée après ce réglage afin de ne pas faire d'erreur sur la lecture des intensités de fluorescence des échantillons analysés. L'intensité de fluorescence de la population cellulaire est mesurée automatiquement par le cytomètre et analysée à l'aide du logiciel système (Beckman Coulter).

Les résultats obtenus par cytométrie en flux sont exprimés en pourcentage de cellules positives ou en intensité relative de fluorescence (MFI, *Mean Fluorescence Intensity*).

III.3.2.3 - Marquage pour analyse en microscopie confocale

a) Evaluation de l'expression de marqueurs spécifiques des CE

En raison de la présence spécifique du facteur Von Willebrand (vWF) dans les CE [393], l'identification des HUVEC et donc la vérification de l'absence de dédifférenciation de ces cellules, cultivées pendant 7 jours sur du PTFEe recouvert de film multicouches, sont effectuées par la visualisation du vWF à l'intérieur des cellules en utilisant une technique d'immunofluorescence.

De la même façon, son expression ainsi que celle de PECAM ont été recherchées chez des CSM exposées à 14 jours de différenciation en présence de VEGF ou exposées à 24 h de flux. Ces deux marqueurs sont exprimés par les CE.

➤ *Immunomarquage indirect*

Cet immunomarquage concerne PECAM et vWF.

Les cultures cellulaires sont lavées deux fois 5 minutes avec du DMEM sans rouge de phénol pour éliminer les restes de rouge de phénol du milieu de culture. Les cellules sont alors prêtes pour le marquage.

Pour un marquage intracellulaire (marquage vWF), il existe deux étapes préliminaires : fixation et perméabilisation.

- Fixation et perméabilisation :
 - Fixation : PAF à 4 % (p/v), 10 minutes à 37°C
 - Les cellules sont ensuite rincées trois fois avec du DMEM
 - Ajouter 0,5 % (v/v) Triton X-100 pour la perméabilisation pendant 5 min à température ambiante

- Après deux rinçages dans du DMEM, les cellules sont alors prêtes pour le marquage
 - Marquage de PECAM et du facteur Von Willebrand
- Marquage des cellules avec un anticorps primaire dilué au 1:50 à 37°C pendant 45 min
- Rinçage trois fois avec du DMEM pendant 5 minutes
- Marquage avec un anticorps secondaire (chèvre anti-IgG de souris conjugué avec l’Alexa-488) dilué au 1:100, à température ambiante pendant 30 minutes, à l’abri de la lumière
- Rinçage trois fois avec du DMEM pendant 5 minutes
- Marquage du noyau avec de l’iodure de propidium (IP, réf. P-1304, Molecular Probes, France) dilué au 1:1000 dans DMEM pendant 30 minutes
- Après 3 rinçages, les cellules sont prêtes pour l’examen au microscope confocal.

b) Analyse des échantillons en microscopie confocale à balayage laser

➤ *Principe*

(voir annexe 3)

➤ *Méthodologie*

L’observation de l’expression de vWF et PECAM est réalisée en microscopie confocale Leica TCS SP2-AOBS (Leica Microsystems, Germany) équipée d’un filtre opto-acoustique accordable, de laser solide argon (457 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm), laser hélium-néon (543 nm et 633 nm) et oscillateur femtoseconde VERDI (600-1100 nm), avec un objectif (x 40 /1,4 ; à immersion à eau). La longueur d’onde d’excitation de 488 nm et la longueur d’émission de 519 nm correspondant au fluorochrome (Alexa Fluor 488) couplé à l’anticorps secondaire ont été optimisées. Des images de haute résolution (512 x 512 pixels) sont obtenues, avec une taille de voxel : 250 nm x 250 nm x 400 nm et avec un critère de Rayleigh de 1.

III.3.3 - Marquage du cytosquelette

III.3.3.1 - Réactifs

- Phalloïdine-Alexa 488 (réf. A12379, Invitrogen, France)

III.3.3.2 - Principe

Le marquage du cytosquelette est réalisé par le marquage direct avec un marqueur spécifique de la F-actine, la **phalloïdine**. La phalloïdine est une toxine présente dans un champignon (*Amanita phalloides*), qui a une grande affinité pour la F-actine. Le marquage des microfilaments de F-actine est réalisé en présence de phalloïdine-alexa 488 ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 519 \text{ nm}$).

III.3.3.3 - Procédure

Le marquage s'effectue après fixation par le PAF et perméabilisation par le Triton X-100. La phalloïdine-Alexa 488 diluée au 1:100 dans du triton 0,5 % est déposée pendant 45 min à 37°C sur les cellules, à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite rincées abondamment avec du DMEM sans rouge de phénol. Elles sont alors prêtes à être observées en microscopie confocale.

III.4 - Microscopie électronique à balayage

Le MEB a été utilisé pour visualiser la distribution des HUVEC ou des CSM sur les différents échantillons de PTFEe, leur densité et leur étalement.

III.4.1 - Réactifs

- **Glutaraldéhyde** 25 % (réf. R1011, Oxford Instruments, France) dilué à 2,5 % dans du tampon cacodylate

- **Tampon sodium cacodylate trihydraté** (réf. 12300, Euromedex, France)
- **Héxaméthylidisilazane** $((\text{CH}_3)_3\text{SiNH}\text{Si}(\text{CH}_3)_3)$ (réf. 16700, Euromedex, France)
- **Éthanol**

III.4.2 - Principe

(voir annexe 4)

III.4.3 - Méthodologie

Après 7 jours de culture, les différents échantillons de PTFEe sont lavés dans du DMEM sans rouge de phénol pendant 15 minutes puis ils sont fixés par une immersion dans du glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,4 pendant une nuit à 4°C. Après rinçage dans ce tampon, les échantillons sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol de concentration croissante, de 10 minutes chacun (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, et deux bains de 100 %). Les échantillons sont ensuite traités par un bain d'héxaméthylidisilazane de 10 minutes et séchés sous hotte aspirante. Ils sont fixés sur des supports d'aluminium avec une colle au carbone colloïdal et ensuite métallisés à l'or-palladium (couche de 5 à 10 nm) (Polaron SC 7640 spotter coater). Les échantillons sont observés au MEB (Stéréoscan S 240, Cambridge, GB). Cette étude a été faite au laboratoire de Microscopie électronique (Pr Folliguet, Faculté de Médecine, Nancy).

III.5 - Dosage des nitrites

III.5.1 - Réactifs

- **Kit réactif de Griess** pour la quantification des nitrites (réf. G-7921, Molecular Probes, France) contenant N-(1-naphtyl) éthylènediamine, acide sulfanilique (dans 5% d'acide phosphorique), solution standard de nitrites (1,0 mM). L'acide sulfanilique et la (N-naphtyléthylène diamine) forment le réactif de Griess.

III.5.2 - Principe

Le NO est un réactif instable. Une fois formé dans le milieu, il est rapidement converti en nitrites (NO_2^-). Le dosage direct du NO est donc difficile, c'est pourquoi nous doserons les NO_2^- présents dans nos échantillons.

Il s'agit d'une réaction de diazotation en deux étapes : les nitrites forment un sel de diazonium avec l'acide sulfanilique qui est ensuite couplé avec une amine (N-naphtyléthylène diamine) pour donner un colorant azoïque qui absorbe à 570 nm (Figure 22). Ce composé peut donc être quantifié spectrophotométriquement en se basant sur son absorbance à cette longueur d'onde.

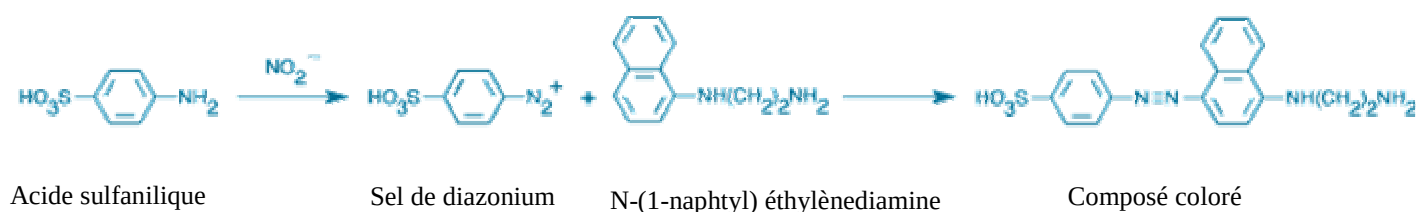


Figure 22 : principe du dosage des nitrites

III.5.3 - Méthodologie

Le dosage des nitrites est effectué sur plaque 96 puits selon les directives du fabricant. Une gamme étalon de 1 à 100 μM de NO_2^- est réalisée en diluant la solution standard de nitrites dans de l'eau ultrapure. Un blanc avec de l'eau ultrapure est également réalisé (Tableau XI). Les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 30 min avec l'acide sulfanilique (25 mM) dissous dans de l'eau ultrapure et avec la N-naphtyléthylène diamine (1,8 mM). La DO est lue après 30 minutes d'incubation.

Réactifs	Volume (μL)
Echantillon ou eau ultrapure ou solution standard de nitrites diluée	150
Eau ultrapure	130
Réactif de Griess	20

Tableau XI : protocole du dosage des nitrites

IV - Analyses statistiques

Toutes les données sont présentées en moyenne $\pm$ écart type pour chaque surface étudiée ($n = 6$ ou 9 , excepté pour les expériences sous flux, $n = 3$). Une analyse de la variance a été réalisée avec comparaison des échantillons par un test ANOVA (Statview IV®, Abacus Concepts Inc., Berkley, CA, USA). Les valeurs p inférieures à $0,05$ ont été considérées comme significatives statistiquement (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Partie 3

Résultats et discussion

Du fait de la thrombogénicité intrinsèque de la surface luminale des prothèses vasculaires synthétiques de faible diamètre, de nombreuses tentatives ont été réalisées dans le but d'améliorer leur hémocompatibilité, telles que des modifications de leur surface [394]. Parmi ces techniques, l'ensemencement des biomatériaux avec des cellules endothéliales (CE) avant implantation a été suggéré. Cette procédure est appliquée dans les études *in vitro*, les modèles animaux et les essais cliniques des prothèses artificielles. L'ensemencement des CE sur les prothèses vasculaires synthétiques a prouvé qu'il augmentait la perméabilité des greffes chez l'homme [89]. Mais les résultats restent encore assez mitigés. De plus, les CE autologues sont marquées par une faible disponibilité, ce qui nous a conduit à nous intéresser à un autre type cellulaire : les cellules souches mésenchymateuses (CSM).

Notre étude *in vitro* s'inscrit dans ces problématiques et tente d'apporter des alternatives selon plusieurs ordres : (1) investiguer la faisabilité d'un dépôt de film multicouche de polyélectrolytes sur une prothèse vasculaire synthétique, (2) obtenir une monocouche confluyente de CE sur ce substitut, (3) caractériser les CSM avant de les différencier et comparer les marqueurs phénotypiques des CSM et des CE, (4) étudier le comportement prolifératif et d'étalement des CSM sur le PTFEe (5) différencier une monocouche de CSM en CE sous induction biochimique, (6) évaluer les effets des contraintes mécaniques sur la prolifération et la différenciation des CSM.

I - Construction d'un film multicouche de polyélectrolytes sur la surface luminale d'un substitut vasculaire synthétique à base de PTFEe

Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont été consacrés au dépôt de film multicouche de polyélectrolytes (FMP) sur des lames de verre [395] et dans la lumière d'artères ombilicales cryoconservées et désendothélialisées [396]. Plusieurs films ont été testés. Sur la base des résultats obtenus, nous avons choisi, comme couple de polyélectrolytes, pour la construction d'un film multicouche sur la surface luminale de prothèses vasculaires synthétiques, le chlorhydrate de poly(allylamine) (PAH) et le poly(4-styrène sulfonate de sodium) (PSS) combiné au polyéthylène imine (PEI) comme première couche.

I.1 - Résultats expérimentaux

Le film multicouche de polyélectrolytes PEI-(PSS-PAH)₃ a été construit par dépôt de PEI en première couche puis alternance de PSS et PAH pour les 6 couches suivantes.

I.1.1 - Mise en évidence du dépôt

Nous avons d'abord entrepris de vérifier que le film multicouche s'était déposé sur toute la surface interne du substitut vasculaire de manière homogène et régulière car c'est un paramètre important à considérer pour l'adhésion cellulaire. Pour cela, nous avons déposé du PAH couplé à de la rhodamine (PAH-R*), comme dernière couche, lors de la construction du film. La figure 23 représente l'image obtenue en microscopie confocale à balayage laser du recouvrement de la surface luminale du substitut synthétique traité par un film PEI-(PSS-PAH)₂-(PSS-PAH-R*).

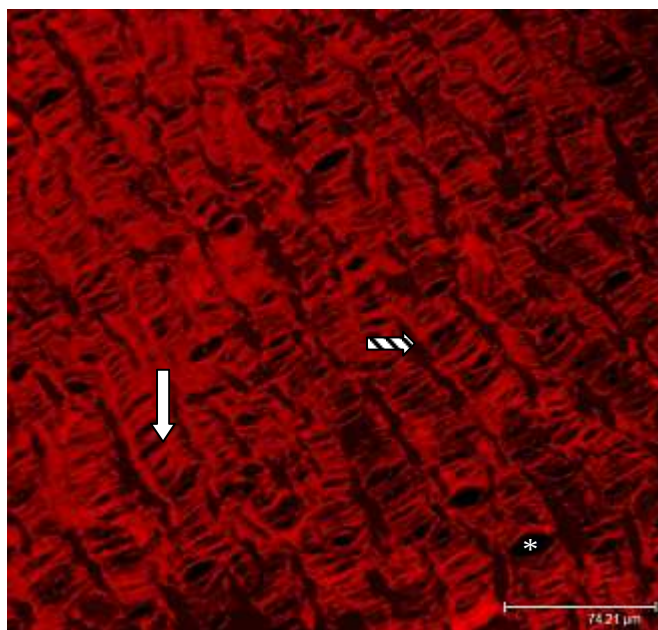


Figure 23 : recouvrement de la surface luminale du substitut vasculaire synthétique à base de PTFEe, par un film PEI-(PSS-PAH)₂ (PSS-PAH-R*) :

La structure tridimensionnelle de la surface luminale du substitut vasculaire synthétique montre un recouvrement homogène de la surface synthétique et un maintien de la structure typique du PTFEe en nœuds et fibrilles. La flèche hachurée montre un nœud, la flèche blanche, des microfibrilles, et l'astérisque, un pore. Microscopie confocale à balayage laser, objectif x 40, immersion eau, ON 0,8 (Leica, Allemagne).

Cette image montre un recouvrement total et un dépôt homogène de ce type de film sur toute la surface interne du substitut synthétique. Cette visualisation a été confirmée par trois fois.

De plus, le film ne semble pas altérer la microstructure typique du PTFEe car nous pouvons visualiser, sur la figure 23, l'architecture typique du PTFEe à base de nœuds et fibrilles.

I.2 - Discussion

Le principe de construction d'un film multicouche de polyélectrolytes s'est développé depuis quelques années. Cette méthode de traitement de surface présente de nombreux avantages : simple d'utilisation, elle ne nécessite pas l'utilisation d'initiateurs ou d'apport d'énergie telle que la lumière pour commencer le processus de dépôt, et s'applique aux géométries de supports. Les polyélectrolytes sont hydrosolubles et les propriétés physicochimiques des films peuvent être modifiées en changeant les conditions de préparation (nombre de couches déposées, types de polyélectrolytes utilisés, force ionique et pH de la solution, ...) [222]. Enfin, l'utilisation de ces films permet de fonctionnaliser les supports par insertion de facteurs biologiques (protéines, médicaments, ADN, facteurs de croissance) dans l'architecture lors de la construction [397-398]. Enfin, les films ont quelques dizaines de nanomètre d'épaisseur, ce qui ne réduit pas le diamètre interne de la prothèse vasculaire, contrairement aux recouvrements par colle de fibrine, par exemple, dont l'épaisseur peut atteindre 0,8 mm d'épaisseur dans certains cas [60].

Nous avons montré dans ce premier chapitre, que la construction d'un film multicouche de polyélectrolytes par dépôt de trois bicouches de PSS/PAH avec PEI comme première couche permettait de modifier la surface luminale des prothèses vasculaires synthétiques à base de PTFEe sans altérer sa microstructure. Les images de microscopie confocale à balayage laser attestent bien que le recouvrement de la surface luminale du substitut vasculaire par le film est total et qu'il ne semble pas altérer la microstructure du substitut synthétique. Celle-ci présente un aspect semblable à celui observé par d'autres auteurs [146, 152].

Lors de la construction du film, le premier polyélectrolyte déposé est un polycation (PEI) car la surface luminale du PTFEe est chargée négativement [113]. Le PEI a été choisi du fait de sa capacité à fortement s'ancrer au substrat [208]. Le dernier polyélectrolyte déposé est chargé positivement ce qui nous permet d'espérer une interaction favorable avec les cellules, leur charge globale étant négative.

Les films multicouches présentent des propriétés intéressantes en terme d'adhésion et de viabilité des CE comme cela a été précédemment démontré sur lames de verre [218]. Ces auteurs ont obtenu une amélioration de l'adhésion, de l'étalement et de la fonctionnalité de CE ensemencées sur lames de verre modifiées par un film PEI-(PSS-PAH)₃. Nous avons réussi, au cours de cette étude, à construire un film comparable sur la surface luminale de PTFEe.

I.3 - Conclusion

En résumé, nous avons montré dans ce premier chapitre, qu'il était possible de construire un film multicouche de polyélectrolytes qui recouvre totalement la surface luminale de prothèses synthétiques. A l'instar des études de Boura et al (2003) [218] qui ont montré la cytocompatibilité de ce film déposé sur verre, vis-à-vis des CE, nous voulons maintenant étudier si l'association PTFEe/film est favorable à l'adhésion et la viabilité cellulaire. En d'autres termes, est-ce que le film déposé sur un substitut vasculaire synthétique présente les mêmes propriétés potentialisatrices que celles qu'il développe lorsqu'il est déposé sur de simples lames de verre? Ou bien est-ce que le PTFEe modifie les qualités du film?

II - Evaluation de l'endothélialisation des substituts synthétiques

II.1 - Définition

Les cellules endothéliales issues de cordons ombilicaux humains (HUVEC) ont été amplifiées jusqu'au deuxième passage puis ensemencées à une densité de 5×10^4 cellules/cm², sur la surface luminale de prothèses synthétiques vasculaires, à base de PTFEe, fonctionnalisées par un film multicouche de polyélectrolytes PEI-(PSS-PAH)₃. Ces cellules sont alors cultivées pendant 7 jours et nous avons procédé à l'évaluation de leur viabilité et de leur étalement sur la surface luminale, puis à l'identification des cellules pour nous assurer qu'elles n'ont subi aucune modification phénotypique.

II.2 - Résultats expérimentaux

II.2.1 - Viabilité des cellules endothéliales

Nous avons tout d'abord vérifié, dans des études préliminaires, que la colle utilisée pour fixer les patches de PTFEe n'était pas toxique pour les cellules (données non présentées).

Puis, l'activité métabolique et donc la viabilité des HUVEC ensemencées sur du TCPS (*Tissue Culture Polystyrene Surface*), du PTFEe, du PTFEe modifié par une monocouche de PAH et du PTFEe modifié par un film PEI-(PSS-PAH)₃ a été évaluée après 1, 3 et 7 jours de culture grâce à un dosage biochimique colorimétrique (test Alamar blue™). Ce dosage présente le double avantage d'être facile d'utilisation et non toxique pour les cellules, ce qui permet de respecter la viabilité cellulaire. Le TCPS est le contrôle positif alors que deux contrôles négatifs ont été retenus : le PTFEe non modifié et le PTFEe modifié par une monocouche de PAH. Le PTFEe non modifié est réputé pour être peu favorable à l'adhésion cellulaire et le PTFEe modifié par une monocouche de PAH a été utilisé de façon à s'assurer que les effets potentialisateurs du film n'étaient pas seulement du à la dernière couche de dépôt mais à l'architecture en multicouche.

La mesure spectrophotométrique de l'activité métabolique des cellules, au cours du temps, qualifie la cytotoxicité des différentes surfaces. En effet, l'action cytotoxique potentielle des surfaces entraînerait une diminution de la viabilité cellulaire, et donc de l'activité métabolique.

L'influence des modification des surfaces sur l'activité métabolique des CE est représentée sur la figure 24.

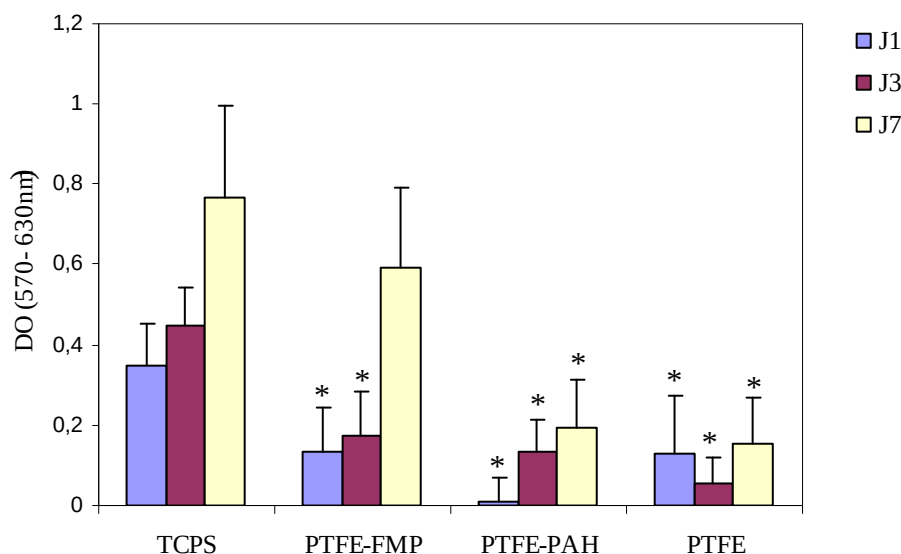


Figure 24 : influence des différentes modifications de surfaces sur la prolifération des HUVEC après 1, 3 et 7 jours de culture.

Les cellules sont ensemencées à une densité de 5×10^4 cellules/cm² sur TCPS (témoin positif), PTFEe recouvert de PEI-(PSS-PAH)₃, PTFEe recouvert d'une monocouche de PAH et PTFEe non recouvert (témoins négatifs). (n = 9, * p<0,05 versus TCPS). L'activité métabolique des CE, à 7 jours de culture, est identique sur TCPS et sur PTFEe modifié par PEI-(PSS-PAH)₃.

Par contre, elle est très nettement supérieure à celle obtenue sur PTFEe recouvert d'une monocouche de PAH et PTFEe non recouvert.

Nous avons observé que l'activité métabolique des cellules ensemencées sur les différents supports de PTFEe est significativement plus faible dès le premier jour de culture en comparaison aux valeurs observées sur le TCPS. La même constatation est faite après 3 jours de culture. Par contre, nous avons mesuré, à 7 jours de culture, une activité métabolique des cellules ensemencées sur PTFEe modifié par une monocouche de PAH et PTFEe non modifié inférieure à celle des cellules ensemencées sur PEI-(PSS-PAH)₃. A la même période, nous n'avons pas noté de différence entre l'activité métabolique des cellules ensemencées sur du PTFEe modifié par PEI-(PSS-PAH)₃ et celle des cellules ensemencées sur du TCPS, ce qui signifie qu'à 7 jours de culture, les CE se développent autant sur le film que sur le support réputé pour être le plus favorable.

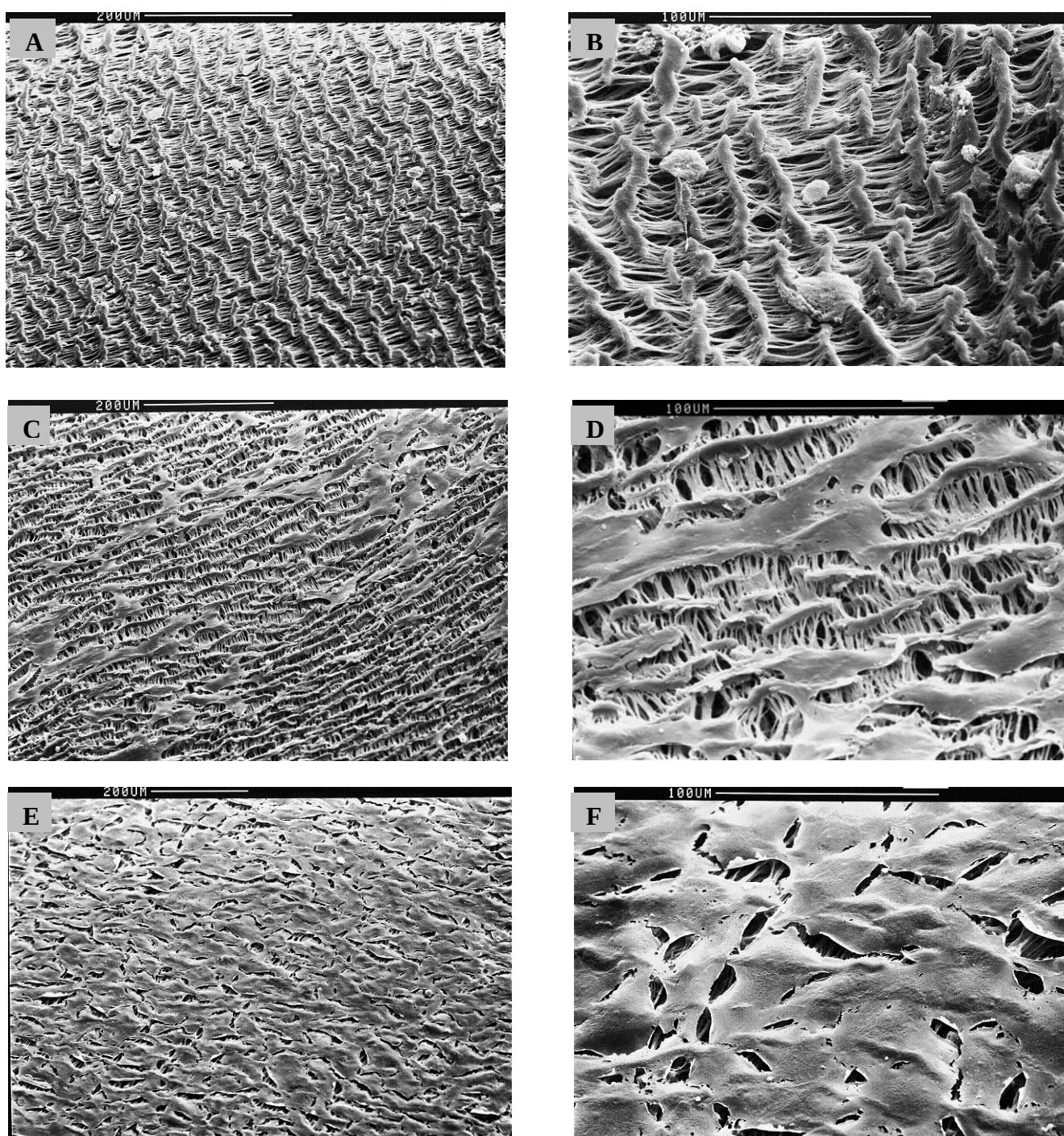


Figure 25 : photographies en Microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface luminale de substituts vasculaires synthétiques à base de PTFEe non fonctionnalisée (A et B), fonctionnalisée par une monocouche de PAH (C et D) ou par un film multicouche PEI-(PSS-PAH)₃ (E et F), 7 jours après ensemencement de CE.

Une monocouche cellulaire confluite est observable à la surface des substituts recouverts par le film, alors qu'en présence d'une monocouche de PAH ou en l'absence de film, il n'y a respectivement que quelques rares cellules étalées ou arrondies et faiblement adhérentes (grossissement x 169 (A), x 508 (B), x 149 (C), x 503 (D), x 112 (E) et x 513 (F)). MEB, Cambridge Instruments Stéréoscan S240, UK) à 30 kV.

II.2.2 - Etalement des cellules endothéliales

La vérification du bon étalement des CE sur la surface luminale des substituts vasculaires synthétiques à base de PTFE a été effectuée par des observations en MEB. Les figures 25-A et -B montrent que, sur la surface luminale prothétique non fonctionnalisée, il n'y a présence que de quelques cellules arrondies et faiblement adhérentes. La fonctionnalisation de la surface luminale par une monocouche de PAH a permis l'étalement des cellules mais en nombre très limité (Figures 25-C et -D). Par contre, l'observation des surfaces lumineuses fonctionnalisées par un film PEI-(PSS-PAH)₃ révèle non seulement la présence de nombreuses cellules étalées, mais en plus que ces cellules forment une monocouche confluyente (Figures 25-E et F). De plus, elles présentent la forme habituelle des CE, c'est-à-dire polygonale et étalée.

II.2.3 - Phénotype des cellules adhérentes

Le maintien du phénotype endothélial des cellulesensemencées sur la surface luminale de prothèses fonctionnalisées par un film PEI-(PSS-PAH)₃ est évalué, après une semaine de culture *in vitro*, grâce à l'expression d'un marqueur spécifique des cellules endothéliales : le facteur von Willebrand (*von Willebrand Factor* (vWF)). Les noyaux ont été marqués en rouge par de l'iodure de propidium afin de s'assurer que l'ensemble des cellules exprime vWF.

L'observation en microscopie confocale à balayage laser montre l'expression intracytoplasmique du vWF, et ceci dans toutes les cellules présentes à la surface luminale des substituts fonctionnalisés (Figure 26). On peut donc en déduire que les cellules adhérentes ont conservé leur phénotype endothélial.

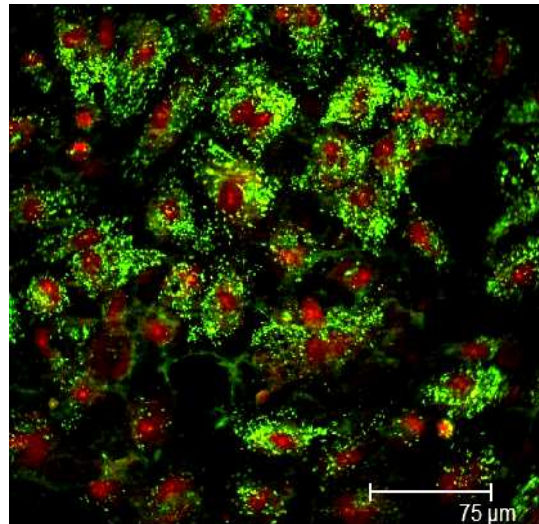


Figure 26 : expression du facteur von Willebrand par les CE ensemencées sur la surface luminale des substituts vasculaires synthétiques à base de PTFEe fonctionnalisés par un film PEI-(PSS-PAH)₃.

Les cellules ensemencées sur la surface luminale des substituts traités par le film expriment vWF. Le marquage de vWF est indirect, la couleur verte correspond à la fluorescence du fluorochrome (Alexa 488[®]). Les noyaux sont marqués en rouge par de l'iodure de propidium. Microscopie confocale à balayage laser, objectif x 40 ; ON 0,8, Leica Allemagne ; n = 6.

II.3 - Discussion

L'absence totale ou même le recouvrement seulement partiel, par des CE, de la surface luminale des prothèses de petit calibre peut conduire à une thrombose. La formation d'une monocouche cellulaire confluyente est donc une condition favorisant la « durabilité » de ces prothèses synthétiques [146]. L'endothélium vasculaire participe à l'intégrité structurale des vaisseaux sanguins en formant une barrière à perméabilité sélective et thromborésistante entre le sang et la paroi. Il contrôle l'activation, l'adhérence et l'agrégation des plaquettes [55]. L'ensemencement des CE dans la lumière des prothèses vasculaires synthétiques de faible diamètre est donc une approche qui a été proposée pour améliorer l'hémocompatibilité de la surface luminale. L'endothélialisation se fait de manière spontanée chez l'animal mais, chez l'homme, elle ne se produit qu'au niveau de l'anastomose [124].

Différentes techniques ont été utilisées pour améliorer l'adhésion des CE sur la surface luminale de substituts synthétiques à base de PTFEe initialement peu favorable à l'adhésion cellulaire. La principale approche a consisté à déposer des protéines sur la surface luminale

des substituts, notamment l'héparine et la colle de fibrine [89, 136, 139, 171-173]. Les résultats sont assez encourageants mais nuancés par les risques inhérents à l'utilisation de dérivés sanguins. Ces protéines sont non seulement d'un coût élevé mais elles présentent le risque de transmission d'agents viraux et de développement de réactions immunitaires indésirables.

Nous avons donc proposé le développement d'un greffon vasculaire de faible diamètre basé sur le dépôt de CE sur la surface luminale d'un substitut synthétique en PTFEe, fonctionnalisée par un film multicouche de polyélectrolytes (FMP) afin d'obtenir des substituts vasculaires hémocompatibles. En effet, cette technique de faible coût, dépourvue de préoccupations infectieuses, a déjà montré son intérêt dans la fonctionnalisation d'artères ombilicales cryoconservées en vue de développer un substitut vasculaire [399], mais il serait intéressant d'appliquer cette technique aux substituts synthétiques. Ces vaisseaux, les plus utilisés, quand les autogreffes ne sont pas disponibles, nécessitent à vie un traitement anticoagulant. Le développement d'un substitut vasculaire synthétique, qui permettrait de s'affranchir de ce lourd traitement médicamenteux, présente donc un enjeu considérable aussi bien médical qu'économique.

Nous avons évalué l'efficacité de l'adhésion de CE sur la surface luminale de substituts vasculaires à base de PTFEe fonctionnalisée par un FMP. La morphologie cellulaire doit être prise en considération. L'observation au MEB de la surface luminale des substituts, fonctionnalisée ou non, montre une différence morphologique des CE en fonction de la présence et du type de fonctionnalisation. En effet, les CE,ensemencées sur la surface luminale non fonctionnalisée de substituts, sont grossièrement arrondies, alors que sur celle modifiée avec une monocouche de PAH, elles sont étalées mais en nombre limité. Les CE ensemencées sur le film multicouche de polyélectrolytes présentent une forme pavimenteuse caractéristique des CE et constituent une monocouche confluite. La présence d'une seule couche de polyélectrolyte (monocouche de PAH) a permis d'augmenter l'attachement cellulaire car les cellules, présentes sur la surface luminale de ce substitut modifié, ont une forme étalée, témoin d'un attachement cellulaire efficace, contrairement aux cellules rondes présentes sur la surface luminale du substitut non modifié, témoin d'un faible attachement cellulaire. Mais cette amélioration de l'attachement ne s'accompagne pas de la formation d'une monocouche cellulaire confluite. Par contre, avec une modification de surface par un FMP, on trouve non seulement la présence de cellules étalées, mais la croissance de ces cellules est telle qu'elles constituent une monocouche confluite. Donc, ce n'est pas

seulement la dernière couche de polyélectrolytes qui favorise la croissance cellulaire mais vraiment l'architecture en multicouche.

Une densité cellulaire initiale relativement faible de 5×10^4 cellules/cm² est suffisante pour obtenir la formation d'une monocouche cellulaire confluente. La densité cellulaire est parfois tellement importante qu'il nous est difficile de différencier les cellules les unes des autres comme cela a été décrit précédemment par Bowlin et al (1998) pour une densité d'ensemencement initiale plus importante que dans notre cas [179]. De plus, dans leur étude, la néo-intima qui se forme dans la lumière de la greffe n'a pas de propriétés physiologiques comparables à celles d'un endothélium naturel (production de prostacyclines ou de thromboxane A2). Laube et al (2000) [139] et Deutsch et al (1999) [89] ont également obtenu, avec une modification par colle de fibrine, une monocouche confluente de CE dont l'intégrité a été maintenue après implantation clinique. Cependant, ils ont eu ce résultat, sur une prothèse en PTFEe de diamètre comparable au nôtre, avec une densité d'ensemencement initiale supérieure à celle que nous avons utilisée et un temps de culture jusqu'à trois fois supérieur. Or ces deux paramètres doivent être les plus réduits possible pour répondre aux exigences d'une application clinique.

Nous avons montré par ailleurs qu'à 7 jours de culture, les cellulesensemencées sur FMP présentent une activité métabolique comparable à celle des cellulesensemencées sur TCPS. Or TCPS est un support classiquement utilisé en culture cellulaire car il est connu comme favorable à l'adhésion et la croissance cellulaires. La culture des CE sur FMP est donc aussi efficace que sur ce support de référence. Le PTFEe modifié par FMP constitue donc une excellente matrice pour la croissance des CE.

La surface d'adhésion peut influencer le phénotype cellulaire après plusieurs jours de culture et les cellules tendent à se différencier [400-401]. Dans cette étude, nous avons voulu vérifier qu'aucune différenciation ni perte du phénotype endothélial ne s'était produite sur la surface luminale des substituts fonctionnalisés et cellularisés après 7 jours de culture. Nous avons effectué cette vérification par l'observation en microscopie confocale d'un marqueur endothélial spécifique: vWF. C'est un facteur uniquement exprimé par les CE et les mégacaryocytes et il est couramment utilisé comme marqueur phénotypique endothélial [402]. Les HUVEC adhérentes sur la surface luminale fonctionnalisée des substituts synthétiques expriment le marqueur vWF, montrant qu'il n'y a pas eu de modification phénotypique. Dans des études complémentaires, on pourrait confirmer cette observation par un marquage par un autre marqueur spécifique : PECAM, quoique vWF est un marqueur à lui seul, suffisamment convaincant.

II.4 - Conclusion

Le FMP construit à partir de chlorhydrate de poly(allylamine) et du poly(4-styrène sulfonate de sodium) sur la surface luminale des substituts vasculaires synthétiques à base de PTFE favorise la formation d'un néo-endothélium étalé.

La modification de la surface luminale des substituts par dépôt d'un FMP sur lequel est pratiquée une endothélialisation ouvre de larges perspectives pour l'élaboration de substituts vasculaires synthétiques de faible diamètre hémocompatibles.

Nos résultats supportent l'hypothèse que la présence d'un FMP sur les substituts synthétiques fournit un substrat favorable à l'adhésion des CE sans influencer leur viabilité ni leur phénotype, et permet la formation d'une monocouche cellulaire confluyente.

Cependant, les CE autologues étant faiblement disponibles et nécessitant le sacrifice de structures vasculaires intactes, il était intéressant de se tourner vers une autre source de cellules autologues. Nous avons donc cherché à différencier des CSM en CE.

III - Evaluation de la biocompatibilité du film multicouche de polyélectrolytes vis-à-vis des cellules souches mésenchymateuses

Avec leur relative facilité de prélèvement, leur prolifération élevée et leur plasticité, les CSM constituent les candidats idéaux pour l'ingénierie tissulaire d'autant plus qu'elles sont dépourvues de considérations éthiques contrairement aux cellules souches embryonnaires [352].

L'adhésion des cellules au substrat est un phénomène important qui contrôle leur comportement telles que leur morphologie, croissance, migration et différenciation. Il est reconnu que l'évaluation des propriétés d'adhésion des cellules au substrat permet d'évaluer l'affinité d'un matériau pour les cellules [403]. Pour cette raison, nous avons cherché, dans cette partie de notre travail, à vérifier l'influence des films sur la prolifération et l'étalement des CSM.

Pour ce faire, afin d'évaluer la viabilité cellulaire, des CSM ont été cultivées sur des lames de verre fonctionnalisées par un film PEI-(PSS-PAH)₃ que nous avons comparées à des CSM cultivées sur des lames de verre modifiées par un film PAH-(PSS-PAH)₃ ou par de la fibronectine. L'étalement des cellules a ensuite été observé après leur culture sur du PTFEe modifié par un film PAH-(PSS-PAH)₃ ou par une monocouche de PAH ou non modifié.

III.1 - Résultats expérimentaux

III.1.1 - Viabilité des cellules souches mésenchymateuses

Nous avons étudié l'effet de différents supports d'ancrage synthétiques (films PEI-(PSS-PAH)₃ et PAH-(PSS-PAH)₃) et naturel (fibronectine) sur l'activité métabolique de CSM, en 3^{ème} passage, cultivées sur ces supports pendant différents temps (2, 3 et 7 jours).

L'évolution intragroupe de l'activité métabolique des CSM en fonction du temps de culture est représentée sur la figure 27.

Nous avons observé que l'activité métabolique des CSM ensemencées sur film PEI-(PSS-PAH)₃, est très faible tout au long de l'étude, bien qu'on observe une augmentation significative au troisième jour mais qui reste cependant très inférieure au témoin. Cela nous a conduit à écarter ce support pour la suite de nos études. L'activité métabolique sur fibronectine augmente significativement entre le deuxième et le troisième jours de culture ($p < 0,001$) puis se stabilise au septième jour de culture.

Les cellules ensemencées sur film PAH-(PSS-PAH)₃ ne présentent guère de modification de leur activité métabolique entre le deuxième et le troisième jours de culture, cependant au septième jour, on constate une augmentation significative ($p < 0,001$) de l'activité métabolique.

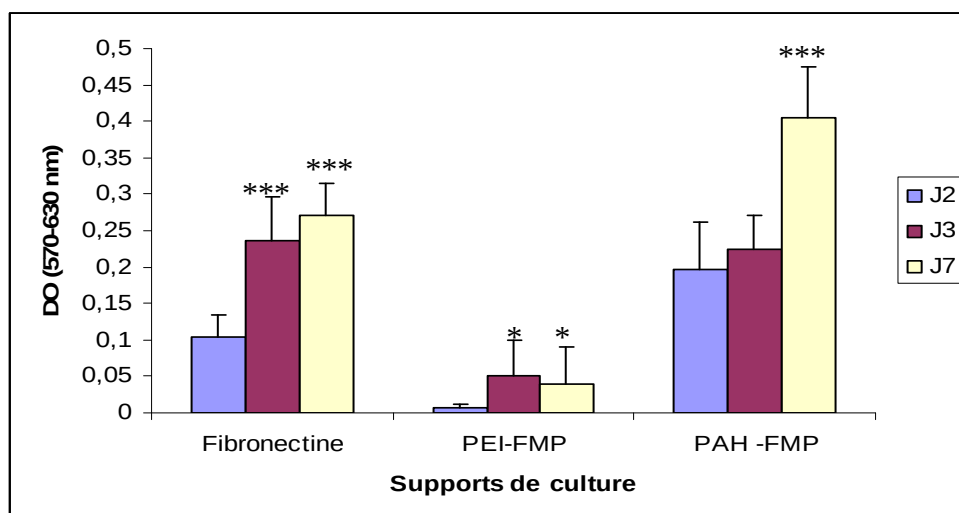


Figure 27 : évolution de l'activité métabolique des CSM cultivées sur lames de verre modifiées par fibronectine (contrôle positif), par un film PEI-FMP ou PAH-FMP.

Les cellules sont cultivées pendant 2, 3 et 7 jours, $n = 9$. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ versus J2 de chaque groupe. Les CSM cultivées sur fibronectine, présentent une augmentation de leur activité métabolique entre J2 et J3 puis une stagnation à J7. Les CSM cultivées sur PEI-(PSS-PAH)₃ [PEI-FMP] présentent une faible activité métabolique sur toute la durée de l'étude. Les CSM cultivées sur PAH-(PSS-PAH)₃ [PAH-FMP] présentent une augmentation importante de leur activité métabolique à J7.

L'influence des modifications de surface sur l'activité métabolique intergroupe des CSM, reflétant la cytotoxicité des surfaces au cours du temps, est représentée sur la figure 28. À J2, l'activité métabolique des CSM cultivées sur fibronectine est statistiquement supérieure ($p < 0,05$) à celle des CSM cultivées sur film PEI-(PSS-PAH)₃. Par contre, elle est inférieure ($p < 0,05$) à celle des CSM cultivées sur PAH-(PSS-PAH)₃. À J3, l'activité métabolique des CSM cultivées sur fibronectine ou sur film PAH-(PSS-PAH)₃ est comparable, mais significativement supérieure ($p < 0,001$) à celle obtenue sur film PEI-(PSS-PAH)₃. Cependant, à J7, on retrouve les mêmes évolutions qu'à J2 : l'activité métabolique sur fibronectine est statistiquement supérieure ($p < 0,001$) à celle sur film PEI-(PSS-PAH)₃ mais inférieure ($p < 0,001$) à celle sur film PAH-(PSS-PAH)₃.

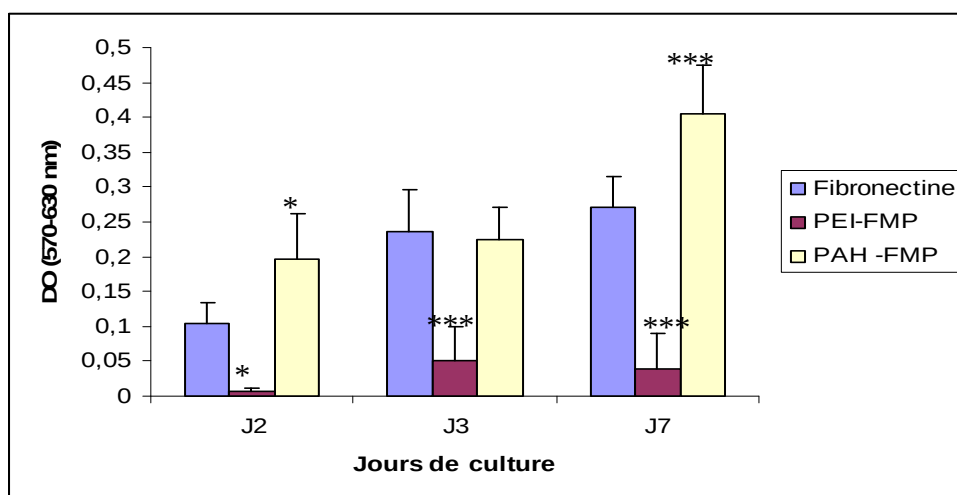


Figure 28 : influence des différents supports de culture sur l'activité métabolique des CSM.

Les cellules sont cultivées pendant 2, 3 et 7 jours sur lames de verre modifiées par de la fibronectine (contrôle positif), un film PEI-(PSS-PAH)₃ ou PAH-(PSS-PAH)₃, n=9.

* p<0,05 ; ***p<0,001 versus fibronectine. L'activité métabolique des CSM cultivées sur fibronectine est constamment supérieure à celle obtenue sur PEI-(PSS-PAH)₃ ; par contre elle est inférieure à celle obtenue sur PAH-(PSS-PAH)₃ sauf à J3, où elle est comparable.

III.1.2 - Morphologie cellulaire

La morphologie cellulaire est un paramètre important à considérer dans l'évaluation de la cytocompatibilité d'un substrat. En effet, un substrat compatible avec un type cellulaire donné, doit permettre un développement cellulaire de morphologie comparable à celui obtenu sur un support standard de culture.

Après une semaine de culture sur PAH-(PSS-PAH)₃, les cellules en P3 ressemblent à de longs fuseaux, confluent, qui forment des colonies (Figure 29). Cet aspect est comparable à celui classiquement trouvé sur TCPS. Cette expérience a été réalisée par six fois.

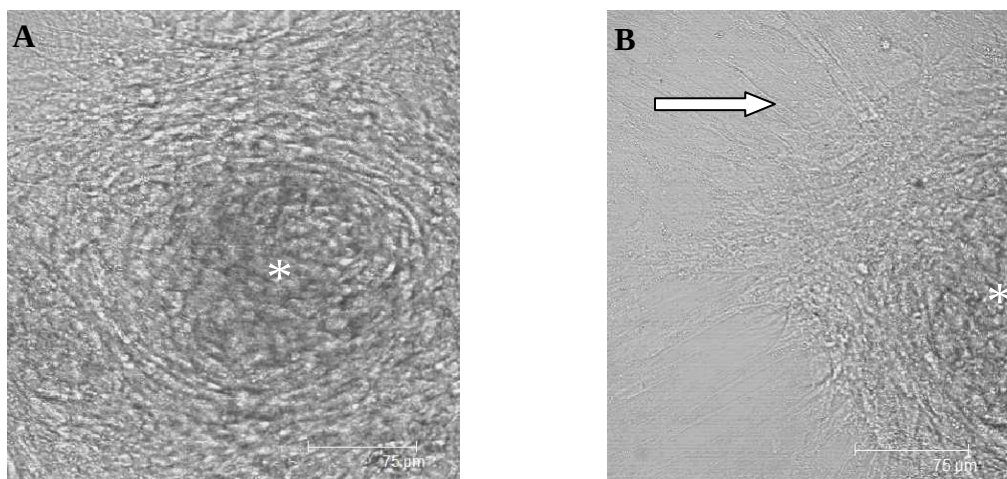


Figure 29 : images en lumière transmise en microscopie confocale à balayage laser de CSM adhérentes en passage 3 cultivées sur lames de verre modifiées par PAH-(PSS-PAH)₃.

Les cellules fusiformes constituent des colonies. À partir d'un cluster de cellules (astérisque) (Figure III-7-A) partent des cellules radiantes fusiformes (flèche blanche) (Figure III-7-B).

Microscope confocal à balayage laser, objectif x 40 ; ON 0,8, Leica Allemagne.

III.1.3 - Étalement des cellules souches mésenchymateuses sur substitut vasculaire synthétique

Les figures 30-A et B montrent que la surface luminale prothétique fonctionnalisée par un film PAH-(PSS-PAH)₃ présente de nombreuses cellules étalées, fusiformes et subconfluentes. La fonctionnalisation de la surface luminale par une monocouche de PAH a permis l'accrochage de cellules étalées mais en nombre très limité (Figures 30-C et D). Par contre, les surfaces lumineuses non fonctionnalisées ne présentent que quelques cellules grossièrement arrondies (Figures 30-E et F).

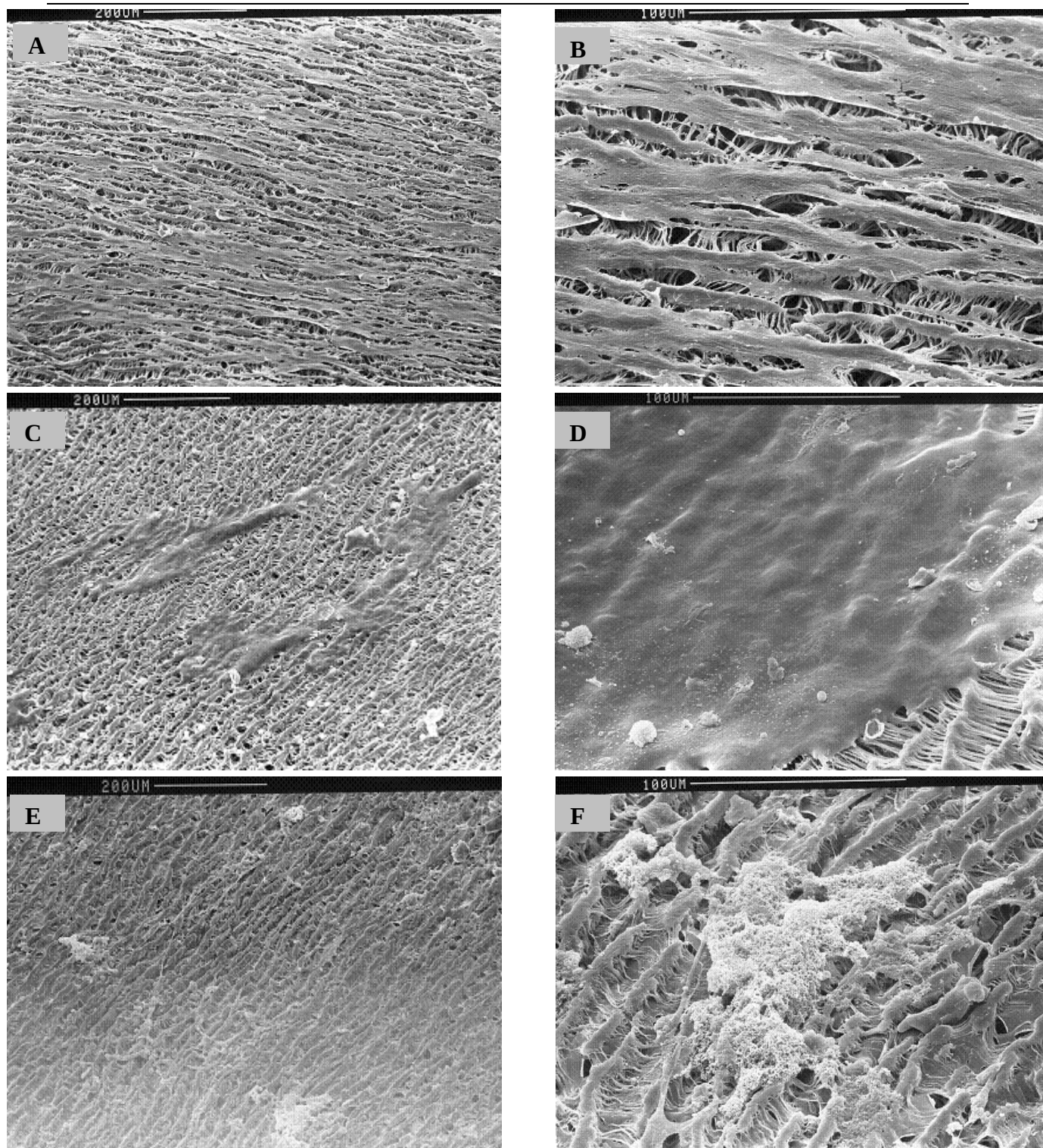


Figure 30 : photographies en Microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface luminale de substituts vasculaires synthétiques à base de PTFEe fonctionnalisée par un film multicouche PAH-(PSS-PAH)₃ (A et B) ou par une monocouche de PAH (C et D), ou non fonctionnalisée (E et F), 7 jours après ensemencement de CSM.

Une couche de cellules fusiformes est observée à la surface des substituts recouverts par le film, alors qu'en présence d'une monocouche de PAH, il n'y a que quelques rares cellules étalées, et en l'absence de film, que quelques cellules grossièrement arrondies (grossissement x 117 (A), x 490 (B), x 117 (C), x 479 (D), x 117 (E) et x 495 (F)). MEB, Cambridge Instruments Stéréoscan S240, UK à 30 kV).

III.2 - Discussion

Les structures vasculaires autologues cellularisées construites par ingénierie tissulaire, présentent de nombreux avantages car elles ont la capacité de se développer et de se remodeler au cours du temps dans la mesure où elles contiennent des cellules vivantes. Elles présentent moins de risque de rejets par le système immunitaire car les cellules proviennent du patient lui-même.

Mais la disponibilité d'une source cellulaire convenable et abondante est un des facteurs limitants en ingénierie tissulaire [226]. Les principales cellules autologues utilisées sont les CE. Mais leur utilisation se heurte à plusieurs limites : la tendance à se différencier en culture, la capacité limitée à proliférer, et le prélèvement très invasif d'un segment vasculaire, nécessitant au préalable une intervention chirurgicale. Certains patients n'ont pas de vaisseaux convenables, sources potentiels de ces cellules, du fait de pathologies pré-existantes ou de leur utilisation dans d'autres procédures. Pour pourvoir à cette indisponibilité cellulaire, il était nécessaire d'utiliser une autre source de cellules autologues, comme les CSM. A notre connaissance, celles-ci n'ont jamais étéensemencées sur des prothèses vasculaires synthétiques à base de PTFE. Seuls Kanki-Horimoto et al (2006) ont cultivé sur du PTFE des CSM modifiées génétiquement par le gène eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) mais leur comportement d'adhésion notamment, n'a pas été étudié [404].

Dans la mesure où nous recherchons une modification de surface qui stimulerait à la fois l'attachement, la croissance des CSM et leur différenciation en CE, nous avons examiné, dans cette partie de notre travail, la biocompatibilité du FMP, déposé sur le verre ou le PTFE, utilisé pour en modifier la surface et améliorer ainsi l'adhésion et le développement des CSM. Nous avons évalué deux types de films, PEI-(PSS-PAH)₃ et PAH-(PSS-PAH)₃, et un support protéique : la fibronectine, dans le but de déterminer quel était le plus favorable au développement des cellules. Nous avons étudié deux types de films (seule la couche initiale diffère) car, au cours de travaux préliminaires, nous avons observé que les CSM cultivées sur PEI-(PSS-PAH)₃ présentaient une forme arrondie en microscopie optique, caractéristique des cellules faiblement adhérentes. Cela suggérerait que le support était peu favorable à leur culture. Deux supports sont classiquement utilisés pour la culture des CSM : la gélatine et la fibronectine. La gélatine est une protéine d'origine bovine dont l'utilisation reste très controversée. De plus, son utilisation comme matrice de culture des CE a été marquée par une augmentation du taux de cellules apoptotiques et une mauvaise organisation du cytosquelette

[232]. Enfin, l'uniformité de sa distribution et sa rétention sur les surfaces sont incertaines [405]. Nous avons écarté ce témoin pour lui préférer la fibronectine. D'origine humaine, elle est réputée pour favoriser l'adhésion cellules/substrat [403].

Il était important de vérifier en premier lieu, que les films ne possédaient pas d'éventuels effets indésirables sur le comportement des CSM. En effet, il a été montré que les interactions électrostatiques peuvent entraîner des changements des propriétés électriques des membranes, altérant ainsi certaines fonctions cellulaires telles la viabilité, la croissance ou la différenciation cellulaires [406]. De plus, il est reconnu que les propriétés physicochimiques des biomatériaux sont des éléments-clés de l'attachement des cellules à leur surface et dans le comportement des cellules. Nous avons montré que les CSM commencent à proliférer sur le film PAH-(PSS-PAH)₃ à 3 jours de culture tel que l'ont constaté Tang J et al (2007) avec des CSM cultivées sur TCPS [367]. Au septième jour, les cellulesensemencées sur PAH-(PSS-PAH)₃ présentent une activité métabolique supérieure à cellesensemencées sur fibronectine (contrôle positif). Le film PAH-(PSS-PAH)₃ constitue donc une excellente matrice pour la culture des CSM.

Dans notre étude, le film PEI-(PSS-PAH)₃ ne semble pas favorable à la croissance des CSM. Les faibles valeurs d'activité métabolique des cellulesensemencées sur ce support pourraient provenir d'un manque initial d'adhésion des cellules sur ce type de polyélectrolytes. Paradoxalement, ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans la première partie de notre travail avec les CE. Dans cette partie, nous avons utilisé le PEI comme première couche du fait de sa capacité à s'ancrer fortement au substrat [193]. Dans la mesure où nous recherchions la formation, sur la surface luminale du PTFEe, d'une monocouche confluente de CE, résistante au flux, il nous a paru judicieux d'utiliser ce polyélectrolyte, d'autant plus que Boura et al (2003) ont montré la résistance au flux de CEensemencées sur des lames de verre modifiées par le film PEI-(PSS-PAH)₃ [218]. Or, Kolasinska et al (2005) ont démontré que le type de polyélectrolytes utilisé comme première couche de dépôt joue un rôle important sur les propriétés du film multicouche [193]. Ces auteurs ont d'ailleurs récemment (2007) montré que l'absence de PEI comme première couche augmente la rugosité du film [208]. Nous pensons, pour cette raison, que le développement des CSM est favorisé par la présence d'une surface plutôt rugueuse.

Ceci renforce l'idée que les paramètres physicochimiques d'un FMP apparaissent très importants dans les phénomènes d'adhésion cellulaire.

Dans cette étude, les CSM proviennent de la moelle osseuse totale (ensemble hétérogène de cellules) et sont isolées au fur et à mesure des passages grâce à leur propriété d'adhérence au plastique. Les cellules ont été amplifiées à faible densité, puis ensemencées sur un film PAH-(PSS-PAH)₃ sur lequel elles se sont développées en colonies. Ces dernières sont caractérisées par un cluster central entouré de cellules fines et radiantes telles que l'ont montré Wu X et al (2005) [374]. Les CSM adoptent donc sur FMP, une morphologie comparable à celle des cellules cultivées sur TCPS, ce qui confirme bien que ce support est favorable au développement des CSM.

En conclusion de cette partie, il semble que le support de culture le plus intéressant parmi ceux que nous avons testé pour favoriser le développement des CSM est le film PAH-(PSS-PAH)₃.

Nous avons voulu enfin évaluer l'étalement des CSM sur des substituts vasculaires synthétiques à base de PTFEe fonctionnalisés par un film PAH-(PSS-PAH)₃. Après une semaine de culture, nous avons pu constater la présence d'un grand nombre de CSM fusiformes, mais sans atteindre une confluence comparable à celle obtenue sur lames de verre fonctionnalisées. Cela pourrait être lié au fait que les CSM semblent se disposer de façon plus importante et orientée sur les structures nodulaires du PTFEe plutôt que dans le sens des fibrilles de la matrice. Un temps de culture plus important semble nécessaire pour pouvoir atteindre un état de confluence comparable au verre. Par ailleurs, la culture des CSM sur PTFEe non modifié ou modifié par une simple couche de PAH n'a pas permis d'obtenir de résultat satisfaisant. Celui-ci est d'ailleurs comparable aux résultats que nous avons obtenus dans la partie précédente avec les CE.

III.3 - Conclusion

En résumé, nous avons montré que le film PAH-(PSS-PAH)₃ est biocompatible avec les CSM et qu'il permet l'obtention d'une monocouche quasi-confluente, préalable nécessaire à la réalisation d'une différenciation.

Nous devons maintenant vérifier le phénotype des CSM amplifiées avant leur utilisation dans le protocole de différenciation et déterminer quels sont les marqueurs phénotypiques permettant de suivre l'évolution des CSM vers les CE.

IV - Contrôle qualité et comparaison de l'expression de marqueurs de surface cellulaire et intracellulaires par les CSM et les CE

Avant d'ensemencer les CSM sur la surface luminale de prothèses vasculaires synthétiques, l'expansion cellulaire en monocouche est une étape essentielle pour obtenir une quantité suffisante de cellules. Comme les CSM proviennent de la moelle osseuse totale riche en différents types cellulaires, il est nécessaire de vérifier leur phénotype avant de réaliser le protocole de différenciation.

Le but de cette étude est de vérifier que les CSM ne se dédifférencient pas au cours de la culture et conservent leur profil phénotypique, et de comparer le phénotype des CSM et des CE. L'expression des marqueurs de surface (CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 et PECAM) ainsi que celle du marqueur intracellulaire (vWF) ont été analysées pour les CSM en P3 et les CE en P2, après culture en monocouche dans des boîtes de culture en TCPS sans modification de surface.

IV.1 - Résultats expérimentaux

La caractérisation phénotypique des CSM et des CE est réalisée par cytométrie en flux. La figure 31 et tableau XII donnent le pourcentage de cellules exprimant les marqueurs de surface cellulaire et le marqueur intracellulaire.

Comme les marqueurs CD34 et CD45 sont exprimés par moins de 5 % des cellules à la fois pour les CSM et les CE, nous avons donc écarté ces marqueurs pour différencier les deux types cellulaires.

Pour le marqueur CD73, les pourcentages sont voisins de 85 % pour les CSM et 15 % pour les CE. Même si le pourcentage de cellules positives est significativement plus important pour les CSM, nous avons préféré écarter ce marqueur que nous ne jugeons pas assez qualitatif.

Pour le marqueur CD105, le pourcentage de cellules positives est d'environ 50 % pour les CSM et de 65 % pour les CE. Dans la mesure où il n'existe pas de différence importante entre ces deux types cellulaires, nous n'avons pas eu recours à ce marqueur.

Pour le marqueur CD90, ces pourcentages sont d'environ 90 % pour les CSM et inférieur à 5% pour les CE. Nous aurions donc pu *à priori* utiliser ce marqueur, mais l'expression ou

l'absence d'expression de CD90 n'étant pas spécifique d'un type cellulaire donné, nous avons préféré l'écarter.

Pour le marqueur membranaire PECAM, les pourcentages de cellules positives sont inférieurs à 1 % pour les CSM et supérieur à 80 % pour les CE. Cet écart de pourcentage semble confortable ce qui fait que ce marqueur nous permettra de bien différencier les deux populations.

Enfin, pour le marqueur vWF, les pourcentages de cellules positives sont inférieurs à 2 % pour les CSM et d'environ 70 % pour les CE. Ce facteur constitue le deuxième marqueur que nous allons utiliser pour différencier les deux types cellulaires.

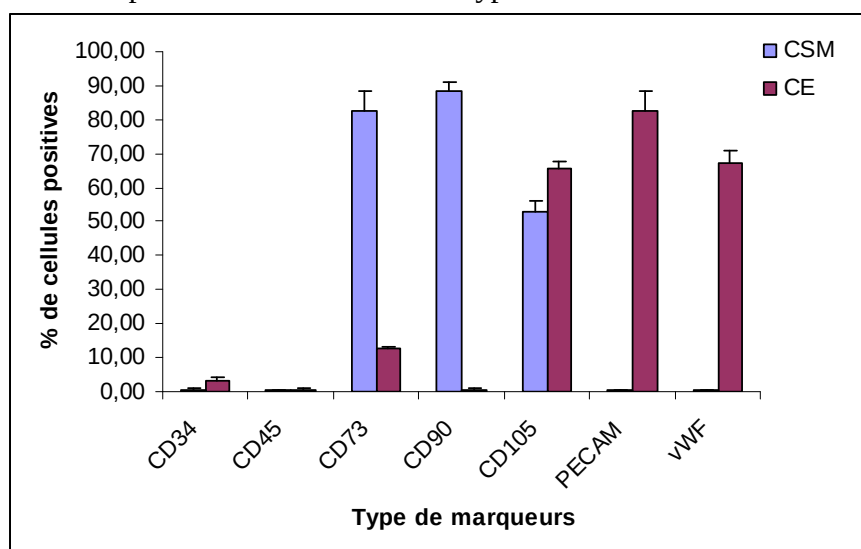


Figure 31 : pourcentage de cellules positives exprimant des marqueurs de surface et intracytoplasmiques pour les CSM humaines (P3) et les HUVECs (P2) :

Cellules cultivées en monocouche dans des boîtes de culture en TCPS, n = 9. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

	CSM	CE
CD34	0,35 $\pm$ 0,5	3,18 $\pm$ 1,2
CD 45	0,29 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,5
CD 73	82,65 $\pm$ 6	12,7 $\pm$ 0,5
CD 90	88,29 $\pm$ 4	0,5 $\pm$ 0,3
CD 105	53,08 $\pm$ 3	65,51 $\pm$ 2,2
PECAM	0,66 $\pm$ 0,1	82,63 $\pm$ 5,5
vWF	0,3 $\pm$ 0,5	67,25 $\pm$ 3,5

Tableau XII : pourcentages de cellules positives exprimant des marqueurs de surface et intracytoplasmiques pour les CSM humaines (P3) et les HUVEC (P2) :

Cellules cultivées en monocouche dans des boîtes de culture en TCPS, n = 9. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

IV.2 - Discussion

Dans cette partie, sur laquelle repose la mise au point du protocole de caractérisation des CSM cultivées sur FMP, nous avons contrôlé le phénotype de nos deux types cellulaires avant leur utilisation et comparé les marqueurs exprimés par ces deux types cellulaires afin de déterminer ceux que l'on pouvait utiliser pour les distinguer.

Il n'existe pas à ce jour, un marqueur spécifique des CSM. Ces cellules sont identifiées par un profil d'expression de certains marqueurs et l'absence d'expression d'autres marqueurs comme ceux hématopoïétiques [309]. Ainsi, CD73, CD90 et CD105 sont des marqueurs exprimés par les CSM, ce que nous avons pu confirmer. CD34 et CD45 sont des marqueurs caractéristiques des CSH, ils sont absents de la surface des CSM, y compris dans notre étude. L'ensemble de ces marqueurs nous a permis de vérifier que nos cultures cellulaires, avant la mise en place de notre protocole de différenciation, sont constituées uniquement de CSM, confirmant les études de Mareschi et al (2006) avec des CSM en deuxième passage [407]. Enfin, à l'état indifférencié, les CSM n'expriment pas les marqueurs spécifiques de CE, à savoir PECAM et vWF comme l'ont également souligné Tang et al (2004) [381].

Les HUVEC expriment les deux marqueurs spécifiques des CE, à savoir vWF et PECAM. CD34 n'est pas exprimé *in vitro* par ces CE comme cela a été mis en évidence par Muller et al (2002) [408].

Il ressort de cette étude que trois marqueurs pouvaient être retenus pour caractériser la présence de CE, par l'expression de PECAM et vWF ainsi que l'absence d'expression de CD90. Cependant, l'expression ou l'absence d'expression de CD90 n'étant pas suffisamment spécifique d'un type cellulaire donné, nous avons préféré restreindre le champ d'investigation à l'expression de PECAM et vWF par les CSM soumises à notre protocole de différenciation.

IV.3 - Conclusion

Nous avons montré que les cellules que nous allons utiliser pour le protocole de différenciation, sont bien des CSM, c'est-à-dire des cellules à la fois positives pour l'expression de CD73, CD90 et CD105, mais également négatives pour les marqueurs

hématopoïétiques CD34 et CD45. De plus, nous avons vérifié que ces cellules n'exprimaient ni PECAM ni vWF. Notre protocole de caractérisation des cellules en culture étant maintenant établi, nous allons maintenant rechercher l'évolution de l'expression de ces deux marqueurs par les CSM soumises à la stimulation de VEGF.

V - Étude de l'influence du support de culture sur l'expression de marqueurs cellulaires

Pour permettre la différenciation des CSM en une lignée cellulaire donnée, il est nécessaire d'ajouter dans le milieu de culture un ou des facteurs de croissance spécifiques. Le VEGF semble jouer un rôle important dans la différenciation endothéliale [335, 367, 374-375]. Nous avons déterminé si le film multicouche de polyélectrolytes avait un effet potentialisateur sur la différenciation des CSM en CE, en présence de VEGF dans le milieu de culture. Pour cela, des CSM à confluence ont été cultivées sur film pendant 14 jours dans un milieu de culture additionné de VEGF. En effet, l'état de confluence est connu pour inhiber la prolifération et favoriser la différenciation. Nous avons ensuite évalué l'expression des marqueurs phénotypiques spécifiques des CE (PECAM et vWF) par les CSM soumises au stimulus biochimique et la fonctionnalité de ces cellules stimulées.

V.1 - Résultats expérimentaux

V.1.1 - Apparition du phénotype endothélial

L'apparition du phénotype endothélial des cellules ensemencées sur des lames de verre fonctionnalisées par un film PAH-(PSS-PAH)₃ ou fibronectine est évaluée à travers l'expression des marqueurs spécifiques des CE : vWF et PECAM après deux semaines de culture, mise en évidence par deux techniques complémentaires : la microscopie confocale et la cytométrie en flux.

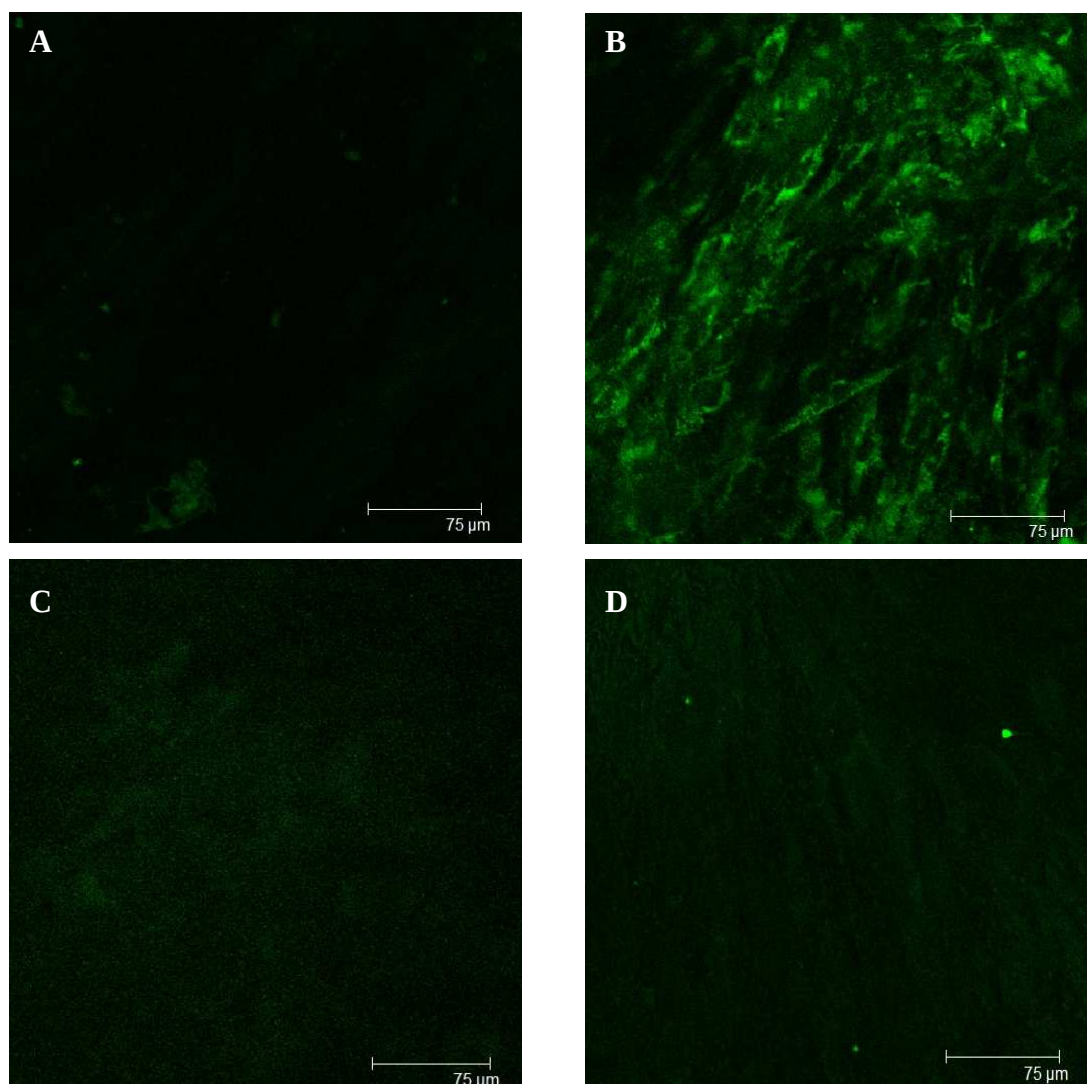


Figure 32 : expression de PECAM (figures B) et de vWF (figure D) par les CSM ensemencées sur des lames de verre fonctionnalisées par un film PAH-(PSS-PAH)₃ et cultivées pendant 14 jours en présence de VEGF.

Les cellules ensemencées sur la surface luminale des substituts traités par le film expriment PECAM. Le marquage de PECAM et de vWF est indirect, la couleur verte correspond à la fluorescence de la molécule fluorescente (Alexa 488®). Les contrôles négatifs (anticorps secondaire seul) de PECAM et vWF correspondent respectivement aux figures A et C. Microscopie confocale à balayage laser, objectif x 40, ON : 0,8, Leica Allemagne, n = 6.

V.1.1.1 - Expression des marqueurs cellulaires par microscopie confocale

Nous n'avons obtenu aucune apparition de vWF par les cellules cultivées sur fibronectine ou film (Figure 32-D). Pour PECAM, nous n'avons visualisé aucune fluorescence pour les cellules cultivées sur fibronectine. Par contre, une discrète apparition de fluorescence lors du marquage de PECAM a été observée pour les cellules cultivées sur film (Figure 32-B). La fluorescence du marquage de PECAM est apparue au niveau des zones quasiment supra-confluentes.

V.1.1.2 - Expression des marqueurs cellulaires par cytométrie en flux

Nous avons utilisé la cytométrie en flux afin de quantifier, en réponse à une stimulation biochimique, l'évolution de la moyenne d'intensité de fluorescence des CSM, pour deux marqueurs spécifiques des CE (PECAM et vWF).

- Dans un premier temps nous avons déterminé, pour les deux supports et en présence ou non de VEGF, le rapport entre les moyennes d'intensité de fluorescence de PECAM (Figure 33) ou de vWF (Figure 34) exprimées par ces cellules et celles de l'anticorps secondaire seul (contrôle négatif). Dans la mesure où il s'agit d'un rapport, le seuil liminaire a été fixé arbitrairement à 1. Les résultats présentés sur la figure 33 montrent qu'une stimulation par le VEGF des CSM cultivées pendant 14 jours sur film induit une augmentation significative (2,16 fois) de l'expression de PECAM par rapport à celle des cellules non stimulées (cultivées en l'absence de VEGF). Par contre, une très faible expression de PECAM dans les suspensions cellulaires stimulées et cultivées sur fibronectine pendant 14 jours est observée. Cette expression est juxtaliminaire et non significative.

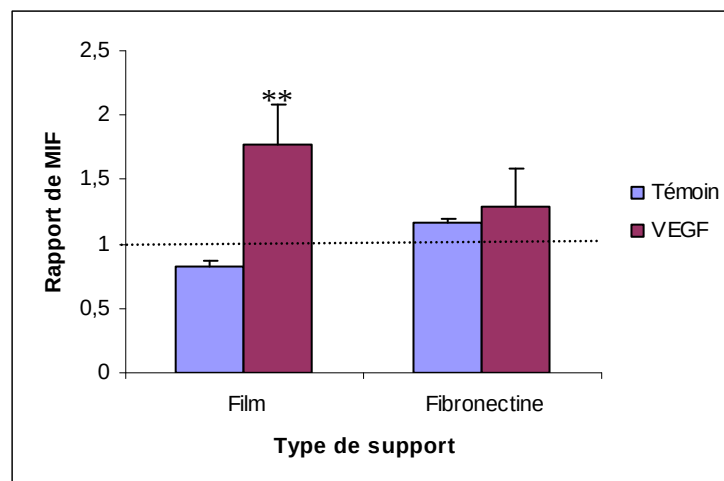


Figure 33 : moyennes d'intensité de fluorescence (MIF) de PECAM (PECAM couplé à alexa 488/ alexa 488 seul) par les CSM : cultivées en monocouche en présence ou non (témoin) de VEGF (50 ng/mL) pendant 14 jours (** $p < 0,01$ versus témoin, $n = 9$).

La figure 34 montre une très faible expression de vWF dans les suspensions cellulaires stimulées et cultivées au préalable sur film multicouche de polyélectrolytes ou fibronectine pendant 14 jours. Cette expression est juxtaliminale et non significative.

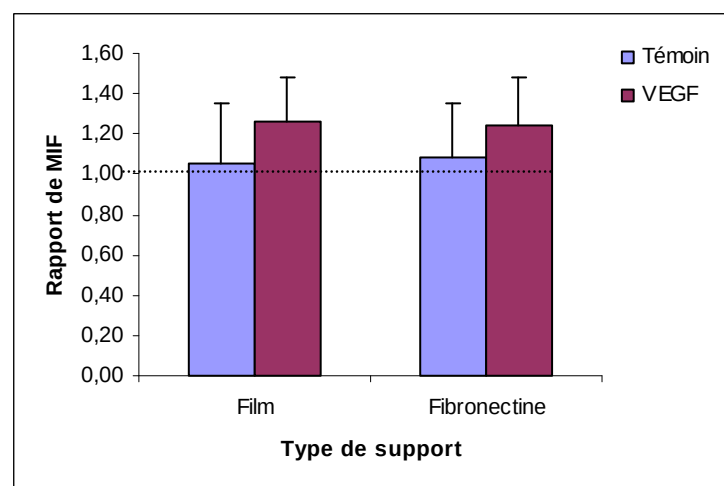


Figure 34 : moyennes d'intensité de fluorescence (MIF) de vWF (vWF couplé à alexa 488/ alexa 488 seul) par les CSM : cultivées en monocouche en présence ou non (témoin) de VEGF (50 ng/mL) pendant 14 jours, $n = 9$.

- Dans un deuxième temps, nous avons effectué le rapport entre les cellules stimulées et les cellules non stimulées pour les deux marqueurs selon les supports. Nous pouvons constater sur la figure 35 que l'intensité d'expression de PECAM par les CSM cultivées sur le film multicouche est double par rapport à celle sur fibronectine qui est

juxtaliminaire, alors que la très faible intensité d'expression de vWF par les CSM est comparable sur les deux supports et juxtaliminaire.

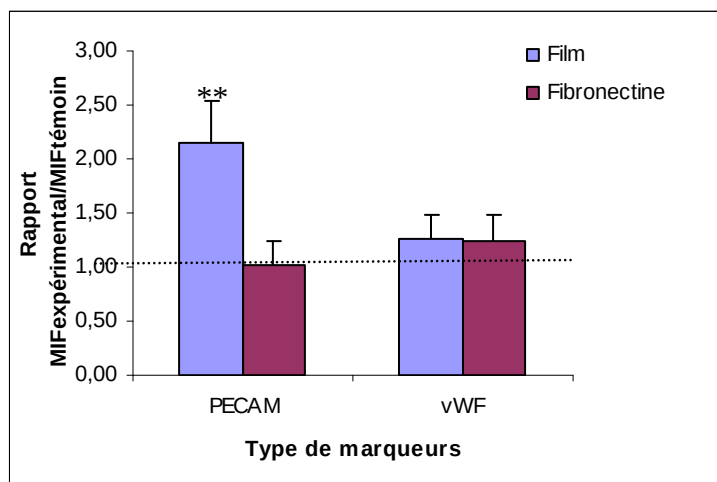


Figure 35 : rapports des moyennes d'intensité de fluorescence (MIF cellules stimulées par VEGF/cellules non stimulées) de PECAM et vWF par les CSM : cultivées pendant 14 jours sur film ou fibronectine (p<0,01 versus film)**

V.1.2 - Fonctionnalité des cellules endothéliales

NO est un composé instable dans le milieu et il est rapidement transformé en nitrites (NO_2^-). Sa production par les CE est, entre autres, sensible aux contraintes de cisaillement et permet la relaxation des CML afin de dilater le vaisseau sanguin [409]. La libération de NO par les cellules signe le fonctionnement vasodilatateur des CE par la capacité de production du NO. En présence de VEGF, les cellules cultivées sur film augmentent significativement ($p < 0,001$) leur production de NO de 37 % ($0,83 \mu\text{mol}$ à $1,14 \mu\text{mol}$ pour 10^5 cellules) par rapport au témoin (Figure 36).

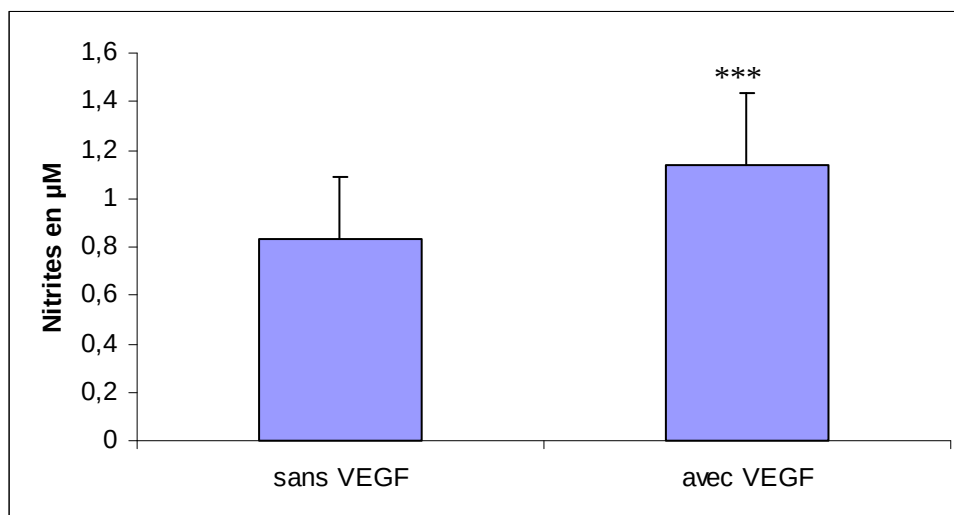


Figure 36 : libération de NO par les cellules cultivées sur film PAH-(PSS-PAH)₃ en présence ou non de VEGF.

Les cellules après 14 jours de culture sont incubées pendant 30 minutes avec le réactif de Griess, et la présence de nitrites dans le milieu est alors mesurée. L'axe des ordonnées correspond aux nitrites en μmol pour 10^5 cellules. moyenne $\pm$ écart-type, *** $p < 0,001$, $n = 6$.

V.2 - Discussion

Le rôle pivot des facteurs de croissance, dont le VEGF, dans les processus d'angiogenèse et de vasculogenèse est évident même si les mécanismes moléculaires ne sont pas encore bien compris [7, 24]. VEGF est connu pour être essentiel dans la différenciation *in vitro* des CPE purifiées en CE matures [373]. En effet, il a été montré que les cellules CD34⁺ cultivées 20 jours en présence de bFGF et IGF mais en absence de VEGF, ne formaient pas de colonies vWF⁺. Mais bFGF et IGF potentialisent la formation de ces colonies en présence de VEGF [373]. Wu X et al (2005) ont montré que l'utilisation d'anticorps anti-VEGF inhibe la différenciation des cellules souches en CE [374]. D'où le choix de ce facteur de croissance pour induire, dans notre étude, la différenciation des CSM en CE. Cependant, le support classiquement utilisé est la fibronectine, un matériau biologique qui peut être associé à des réactions indésirables, notamment immunologiques. Il était donc intéressant de recourir à un support synthétique biocompatible pour obtenir la différenciation. Curran et al (2005) ont montré que les qualités du support sur lequel les CSM étaient cultivées, affectaient le comportement cellulaire en terme d'adhésion cellulaire et de morphologie mais pouvaient également orienter leur potentiel de différenciation [410].

Nous avons donc, dans cette partie, étudié l'effet du VEGF sur les CSM cultivées en monocouche sur un film multicouche de polyélectrolytes.

Nous avons utilisé une faible concentration de sérum car plus la concentration en sérum augmente, plus le nombre de mitogènes est important et plus la prolifération est favorisée [411]. Or certains auteurs pensent que la prolifération inhibe la différenciation [372]. Pour la même raison, nous avons utilisé, dans notre protocole de différenciation, des cellules confluentes, qui sont donc faiblement prolifératives.

Nous avons obtenu une augmentation de l'intensité d'expression de PECAM par des cellules en troisième passage cultivées sur film, mais pas d'expression de vWF. Cela pourrait être lié au fait que l'expression de vWF serait plus tardive, ou bien que son intensité de fluorescence serait trop faible pour être détectée par les moyens d'investigation mises en oeuvre. Pour aller plus loin, il pourrait être judicieux d'appliquer une autre technique de cytométrie décrite par Oswald et al (2004) [335]: la cytométrie en image à balayage laser qui est une alternative à la cytométrie en flux pour l'analyse des faibles intensités de fluorescence, mais aussi de cultiver les cellules dans des conditions hypoxiques, car l'hypoxie est reconnue comme étant une condition favorisant l'expression de certains gènes impliqués dans l'angiogenèse comme le VEGF [412]. Cela nous permettrait peut-être de détecter l'expression de PECAM de façon plus marquée et l'apparition de celle de vWF.

Nos résultats sont similaires à ceux de Asahara et al (1997) qui, à partir d'un autre type cellulaire : des cellules CD34+ dérivées de la circulation périphérique, ont obtenu des colonies de cellules exprimant PECAM et produisant NO après stimulation par VEGF, sans pour autant exprimer vWF [11]. De même, Tang et al (2006) ont observé, après stimulation de CSM par du VEGF, une augmentation de l'expression de PECAM après 7 jours de culture, quoiqu'aucune image ne confirme cette affirmation [367].

Par contre, Oswald et al ont différencié des CSM en CE *in vitro* en se basant sur l'expression de vWF [335]. Cependant, ceci semble controversé car d'une part, le pourcentage de cellules présentant l'expression de vWF reste imprécis et d'autre part, Zhang et al (2007) pensent que l'expression de vWF pourrait provenir de macrophages à un stade précoce de culture [368]. En effet, Oswald et al [335] ont utilisé des cellules en premier passage et, il est connu qu'à ce stade, la moelle osseuse comporte encore différents types cellulaires et notamment des CSH et des macrophages [407]. De même, Wu X et al (2005) [374] ont différencié des CSM en CE mais, lorsqu'ils ont vérifié le phénotype des CSM avant différenciation, ils n'ont pas recherché l'expression de CD90 mais celle de CD105 ou l'absence d'expression de CD34. Or

CD105 est exprimé à la fois par les CE et les CSM. Il en est de même pour Miao et al (2006) [375]. Ces auteurs ont utilisé des cellules en premier passage donc susceptibles de contenir d'autres types cellulaires que les CSM. Gang et al (2006) [413] ont réalisé des études comparables, mais les cellules utilisées pour leurs expériences dérivait du cordon ombilical, dont l'utilisation comme source convenable de cellules souches a été mise en question [266]. Tout ceci montre combien il faut relativiser les résultats et combien il est difficile de faire des comparaisons.

En ce qui nous concerne, les cellules PECAM⁺ que nous avons obtenues sont fonctionnelles, quant à la vasodilatation, car une production significative de nitrites est observée. Cependant, il serait intéressant d'apprécier davantage la fonctionnalité globale des cellules par d'autres études telles que la formation de structures capillaires sur Matrigel[®] ou bien celles de fonctions hémostatiques représentatives de l'état fonctionnel des CE telles que la mesure de la production de prostaglandines (fonction antithrombotique) ou de l'activateur tissulaire du plasminogène (fonction fibrinolytique).

Concernant les témoins, on peut rester perplexe car certains auteurs ont montré que la fibronectine augmentait la différenciation des CPE en CE sous l'induction de VEGF [414]. En effet, cette protéine contient des sites de fixation pour VEGF, sites qui sont indispensables pour favoriser la réponse biologique de VEGF. A l'inverse des résultats de ces auteurs avec les CPE, nous n'avons pas mesuré de différenciation des CSM cultivées sur fibronectine en CE. Mais on pourrait expliquer cette absence de résultats par le fait que les cellules différenciées sont présentes en un trop faible effectif pour qu'il soit possible d'en mesurer les marqueurs par les techniques mises en œuvre.

V.3 - Conclusion

En conclusion, nous avons démontré que les films de polyélectrolytes constituent un excellent support pour le développement et la différenciation des CSM en CE, cellules matures qui expriment PECAM et synthétisent NO.

Cependant, certains auteurs pensent que l'utilisation en clinique du VEGF pour améliorer l'adhésion est peu favorable car elle pourrait, entre autres, produire une hyperplasie myointimale non désirée, l'un des facteurs d'échec des prothèses vasculaires de faible diamètre [163]. Il nous a donc paru souhaitable de recourir à une autre technique pour favoriser la différenciation des CSM en CE, en employant une action mécanique.

VI - Influence de la présence de contraintes mécaniques sur la prolifération cellulaire et la différenciation en cellules endothéliales

Des études récentes ont montré que la différenciation des cellules souches est, entre autre, liée à la tension du cytosquelette qui est elle-même déterminée par le micro-environnement mécanique [415-416]. Simmons et al (2003) ont vérifié que cela était également valable pour les CSM [417].

Néanmoins, le contrôle de la différenciation des CSM en CE par le simple fait des stimulations mécaniques a peu suscité l'attention jusqu'à présent. Des auteurs ont récemment découvert que l'exposition de CPE de la moelle humaine aux contraintes de cisaillement, affectait leur différenciation [255, 418]. Kurpinski K et al (2006) [419] et Park JS et al (2004) [420] ont différencié des CSM en CML sous l'action de contraintes cycliques.

Il semble évident, à partir de ces études, que les signaux mécaniques jouent un rôle crucial dans le développement des cellules vasculaires et la différenciation.

En effet, les vaisseaux sanguins sont constamment exposés à des forces mécaniques, notamment à des contraintes de cisaillement. De plus, ces dernières sont reconnues comme étant un modulateur important du phénotype endothélial, de la morphologie, de l'expression génétique et surtout de la différenciation [255, 387]. De plus, il est connu que l'angiogenèse implique l'expression des récepteurs de VEGF tels que Flt1 et Flk1, par les cellules souches. Quand le VEGF se lie à ces derniers, celui-ci est tyrosine-phosphorylé, ce qui déclenche une cascade de signalisation qui lui est associée, et entraîne la différenciation endothéliale. Or, il a été rapporté que les contraintes de cisaillement peuvent induire la tyrosine-phosphorylation du récepteur flk1 [255, 421].

Au vu de ces observations et afin d'étudier l'impact que pourraient avoir ces forces sur les CSM par le biais de la circulation sanguine, et notamment l'induction de leur différenciation en CE, nous avons mis au point un modèle de culture sous contraintes de cisaillement. Parallèlement à sa mise en place, il a été nécessaire de développer des techniques d'étude mesurant l'impact de ces contraintes sur les CSM, comme la microscopie confocale et la cytométrie en flux. Les réponses des CSM aux contraintes de cisaillement ont été déterminées par l'étude du cytosquelette, de l'expression de marqueurs spécifiques des CE et de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

VI.1 - Résultats expérimentaux

VI.1.1 - Développement d'un protocole dynamique

A notre connaissance, les contraintes de cisaillement ne sont pas perçues physiologiquement par les CSM issues de la moelle osseuse. Il ne paraissait donc pas évident de réussir à conserver l'adhérence de ces cellules après exposition à ces contraintes. Nous avons développé un protocole qui permet aux CSM de résister et de se développer sous contraintes de cisaillement. Différentes densités d'ensemencement (5×10^3 et 2×10^4 cellules/cm²), différents temps d'incubation avant exposition des cellules au flux (24 et 48 h), et différentes concentrations en SVF (0 %, 0,5 % et 2 %) ont été testés afin de définir les conditions expérimentales de notre étude. Nous avons obtenu une rétention de nos CSM, ensemencées à une densité de 2×10^4 cellules/cm² pendant 48 h sur film PAH-(PSS-PAH)₃, puis exposées à un flux physiologique de 15 dyn/cm² pendant 24 h, en présence de 2 % de SVF.

Nous pouvons conclure que notre système se prête tout à fait à l'étude des réponses cellulaires des CSM aux contraintes de cisaillement et ce, même si ces cellules ne sont pas physiologiquement exposées à ces contraintes.

VI.1.2 - Organisation du cytosquelette

L'attachement cellulaire, l'étalement et l'organisation du cytosquelette sur la surface des biomatériaux sont connus pour jouer un rôle décisif sur les performances *in vivo* des systèmes prothétiques [422]. Nous avons donc choisi de marquer le cytosquelette afin de visualiser son organisation.

Pour cela, dans un premier temps, les CSM ont été cultivées en statique sur film PAH-(PSS-PAH)₃ pendant 48 h de façon à atteindre un état de confluence reconnu favoriser la rétention des cellules lors de l'exposition au flux [146]. Dans un deuxième temps, les cellules ont été soit conservées en conditions statiques pendant 24 h dans un milieu contenant 2 % SVF, soit soumises à un flux laminaire de 15 dyn/cm² (1,5 Pa) pendant la même durée et en présence du même milieu. A la suite de cette période, les fibres d'actine du cytosquelette des cellules soumises aux deux conditions de culture ont été marquées par la phalloïdine 488 puis observées en microscopie confocale.

Nous avons pu constater que les CSM, cultivées sur film, présentaient en conditions statiques des fibres de stress d'actine organisées longitudinalement, orientées de façon régulière et bien formées (Figure 37-A), ce qui suggère un attachement stable grâce à des adhésions focales. De plus, cela prédispose ces cellules adhérentes à conserver un ancrage efficace sous contraintes de cisaillement [146]. C'est ce que nous avons constaté en conditions dynamiques (Figure 37-B) car, après exposition aux flux, non seulement les fibres d'actine avaient conservé une organisation régulière, mais en plus, s'étaient orientées dans le sens du flux.

Les CSM, ensemencées sur fibronectine, présentaient également des fibres d'actine ayant une organisation régulière mais leur orientation, que ce soit en conditions statiques (Figure 37-C) ou dynamiques (Figure 37-D), était plus aléatoire. De plus, les cellules présentent un état de confluence moins marqué qui pourrait être propice au décrochement cellulaire en cas de prolongation du temps de cisaillement.

Nous avons ensuite voulu déterminer si cet état de confluence et ce flux laminaire permettaient d'induire une différenciation des CSM en cellules ayant des caractéristiques phénotypiques endothéliales.

VI.1.3 - Marquage PECAM/vWF

Pour induire une différenciation, la confluence a été reconnue comme étant un critère indispensable [372]. Pour cette raison, nous avons utilisé des CSM confluentes, ensemencées sur film et nous les avons soumises à 24 h soit en conditions statiques, soit en flux laminaire de 15 dyn/cm² de façon à déterminer si l'application de contraintes de cisaillement avait une incidence sur leur différenciation en CE. Après cette période, nous avons effectué un marquage des cellules, pour deux marqueurs spécifiques des CE (vWF et PECAM). Nous n'avons obtenu en microscopie confocale aucune expression de ces deux marqueurs (données non communiquées). Enfin, nous avons voulu déterminer par une approche quantitative, dans quelle étape du cycle cellulaire se trouvaient les cellules après exposition au flux. En effet, il est connu qu'il se produit une augmentation du pourcentage de cellules en phase G0/G1 en cas de différenciation.

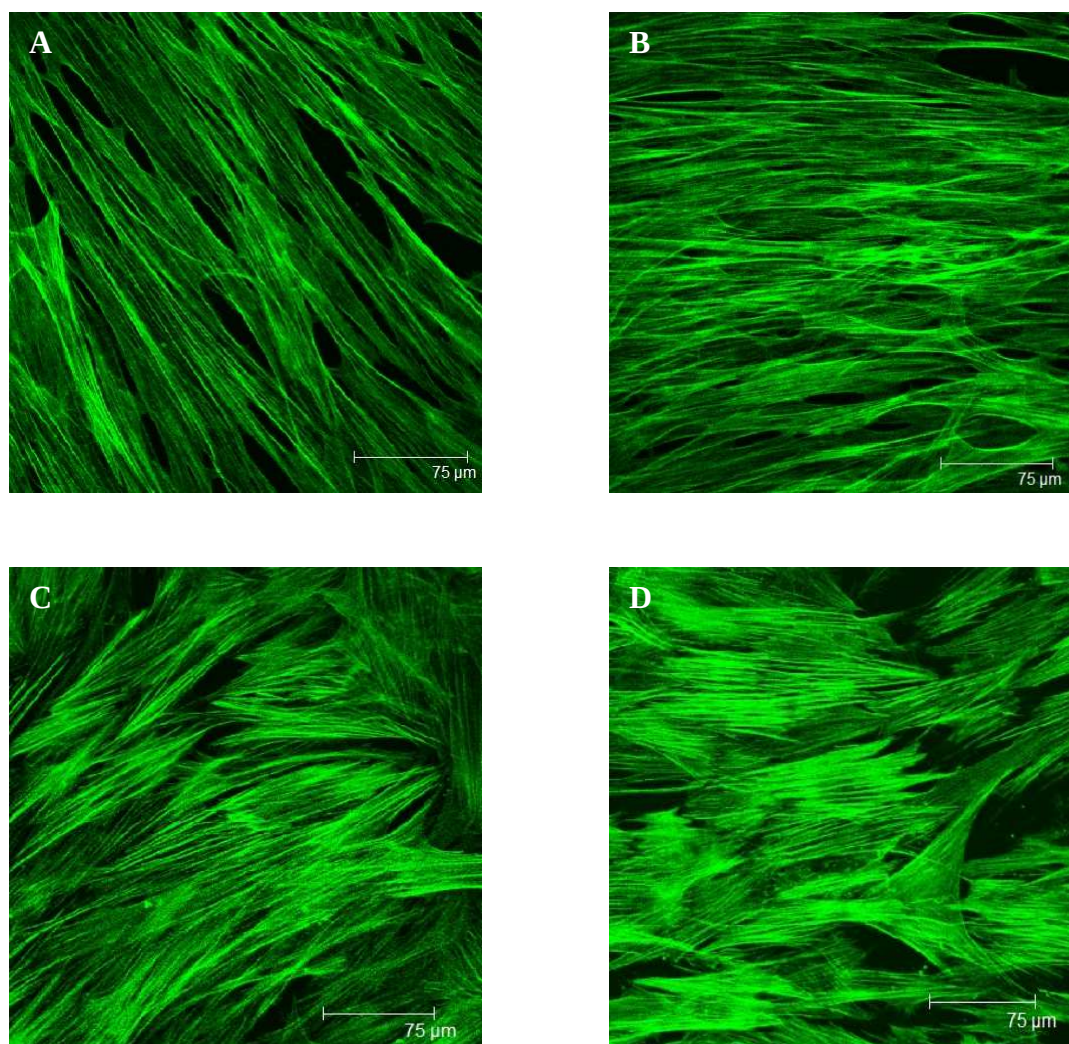


Figure 37 : organisation des filaments d'actine dans les CSM cultivées sur film (A et B) ou fibronectine (C et D) respectivement en condition statique ou en condition dynamique (24 h, 15 dyn/cm², la contrainte est dirigée de gauche à droite).

En condition statique, les CSM cultivées sur film présentent une orientation régulière des fibres (A) alors que sur fibronectine, les fibres sont orientées de façon aléatoire (C). En conditions dynamiques, les cellules, cultivées sur film, sont alignées parallèlement à l'axe de la contrainte, alors que, sur fibronectine, elles tendent à s'aligner dans l'axe du flux mais cela reste encore aléatoire. Le marquage est direct. Les fibres d'actine sont marquées en vert par la phalloïdine couplée à Alexa 488. Microscopie confocale à balayage laser, objectif x 40, ON 0,8, Leica Allemagne ; n = 3.

VI.1.4 - Cycle cellulaire

Nous avons déterminé la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Cette approche nous permet de connaître l'état métabolique des cellules vis-à-vis de la prolifération. Cette étude, contrôlée en cytométrie de flux, a permis d'évaluer la proportion de cellules en phase de quiescence (phases G0/G1), de synthèse d'ADN (phase S) ou encore de mitose (phases G2/M). Les phases S et G2/M permettent respectivement de connaître la proportion de cellules qui prolifèrent et en cours de division.

Cette étude a été réalisée sur les CSM dans les mêmes conditions que précédemment.

Le nombre de cellules en état de repos (phase G0/G1) alors que celui en phase S augmente après exposition au flux par rapport à ce qui est observé avec les cellules maintenues en conditions statiques ($p < 0,05$ dans les deux cas). Par contre, aucune variation de la proportion des cellules en phase G2/M n'a été observée entre les deux groupes. (Figure 38 et tableau XIII). Cela signifie que les contraintes de cisaillement semblent favoriser la prolifération des CSM.

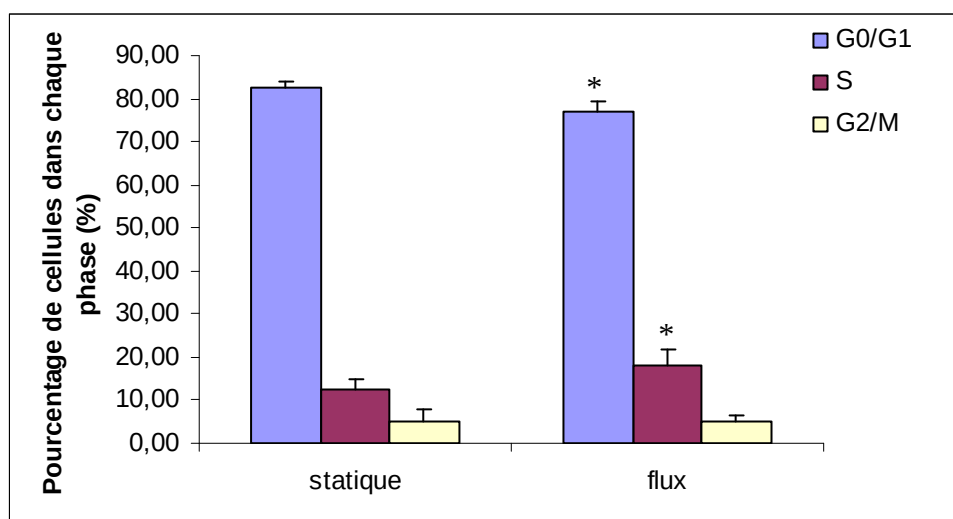


Figure 38 : analyse du cycle cellulaire.

Les pourcentages des cellules, cultivées sur film, dans les phases G0/G1, S et G2/M sont déterminés par cytométrie en flux après 3 jours de culture statique ou 2 jours de culture statique suivie de 24 h de flux laminaire (contraintes de cisaillement 15 dyn/cm²). Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type. * $p < 0,05$ versus statique, $n = 6$.

	G0/G1	S	G2/M
statique	82,44±1,7	12,50±2,2	5,02±2,7
flux	76,87±2,6	18,00±3,8	5,13±1,2

Tableau XIII : répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire après 24 h de flux (15 dyn/cm², flux laminaire) ou 24h de culture statique sur film PAH-(PSS-PAH)₃

VI.2 - Discussion

La dernière étape de notre étude est la validation de l'impact des contraintes de cisaillement sur les CSM.

A notre connaissance, c'est la première étude à examiner la réponse de CSM humaines à l'action unique d'un flux laminaire exerçant, sur ces cellules, des contraintes de cisaillement à une valeur physiologique. En effet, les études récentes concernent plutôt l'évaluation de l'adhésion des cellules, par le biais de tests de rétention et ceci après des périodes dynamiques extrêmement courtes (2 h) [423] ou l'évaluation de la différenciation ostéoblastique [424].

Il est bien connu que les contraintes mécaniques peuvent influencer, entre autres, des réactions cellulaires telles que l'activité métabolique et l'orientation des fibres d'actine du cytosquelette [419].

Nous avons montré que 24 h de culture sous flux laminaire à 1,5 Pa entraînaient une réaction des CSM à ces contraintes. Cette réaction se manifeste, d'une part par une orientation des CSM dans le sens du flux et d'autre part par une diminution du pourcentage de CSM en phase de repos et une augmentation de celui-ci en phase S.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés aux filaments d'actine. Ce sont un des composés structuraux les plus importants du cytosquelette, responsables de la forme de la cellule, la mobilité et les propriétés mécaniques de la cellule.

Les CSM cultivées sur film présentent, en statique, un cytosquelette bien défini et une orientation homogène des fibres comme décrit par Curran et al (2005) [410] avec des CSM cultivées sur des surfaces recouvertes de groupements -NH₂. La présence d'interactions électrostatiques importantes pourrait donc expliquer cet aspect très orienté en présence de

film. De plus, les CSM cultivées sur film se sont orientées en direction du flux à l'instar notamment des CE [388, 425-426]. Cette capacité des CSM à s'orienter dans le sens du flux a également été observée tout récemment par O'Cearbhaill et al (2008) [427]. Après une période de stimulations dynamiques comparable à celle de notre étude (24 h), les auteurs ont montré que les CSM, ensemencées sur fibronectine et soumises à trois stimulations simultanées (pression entre 40 et 120 mmHg, distension radiale de 5 % et flux pulsatile de 10 dyn/cm²), s'orientaient dans le sens du flux de façon comparable aux CE.

Nous avons donc obtenu des résultats similaires à ces auteurs, avec un seul type de stimulation et un flux laminaire, mais avec des contraintes supérieures (15 dyn au lieu de 10 dyn/cm²). Dans cette partie de notre étude, nous avons donc montré que les CSM ont une « mécanosensibilité » pouvant s'approcher de celle des CE. Il pourrait être utile de compléter ces données par une approche quantitative, en particulier en ce qui concerne l'orientation cellulaire.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché l'expression de marqueurs endothéliaux spécifiques après exposition des cellules au flux. Contre toute attente, nous n'avons pas constaté d'apparition de cette expression. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par O'Cearbhaill et al (2008) [427]. Après une période de stimulation dynamique comparable à la nôtre, à savoir 24 h, ces auteurs ont montré que les CSM, ensemencées sur fibronectine et soumises à trois types de stimulation simultanées, ne présentaient pas l'expression de marqueurs spécifiques des CE mais celle de CML tels que alpha SMA.

Dans un troisième temps, après exposition au flux, nous avons constaté une augmentation de la prolifération et une diminution du pourcentage de cellules en phase de repos, en conditions dynamiques, comme l'ont précédemment démontré Yamamoto et al (2005) avec des cellules souches embryonnaires qui se sont différenciées en cellules exprimant des marqueurs endothéliaux sous l'action d'un flux laminaire (1,5 dyn/cm²) [370]. Nous avons donc mis en évidence un profil cyclique comparable, même si la différenciation endothéliale n'a pu être mise en évidence.

Par conséquent, alors que l'orientation des fibres d'actine des CSM face au flux ressemble à celle des CE, les cellules n'expriment pas leurs marqueurs phénotypiques, du moins pendant cette période d'étude.

VI.3 - Conclusion

Les contraintes de cisaillement ne nous ont pas permis d'obtenir une différenciation endothéliale, bien que la culture des CSM sur film provoque une organisation très régulière des filaments d'actine propice à une bonne rétention des cellules au flux et une augmentation de la prolifération. Pour favoriser cette différenciation, on pourrait par exemple augmenter la période de stimulation ou bien combiner contraintes mécaniques et facteurs de croissance en début de culture pour initier le processus.

Partie 4

Discussion générale, conclusion et perspectives

Les pathologies des vaisseaux sanguins, principalement celles des artères de faible diamètre (≤ 6 mm), constituent une des principales causes de mortalité dans les pays occidentaux. Quand ils sont atteints par des pathologies telles que l'athérosclérose, les vaisseaux sanguins commencent à s'oblitérer, ce qui s'oppose au passage du sang. Le remplacement des artères est maintenant un traitement courant des pathologies vasculaires. Les vaisseaux autologues, incluant les veines saphènes et les artères mammaires, restent les greffons de référence pour les pontages. Cependant, environ un tiers des patients n'ont pas de vaisseaux convenables du fait de pathologies vasculaires préexistantes, ou d'une utilisation antérieure. De plus, le prélèvement des greffons autologues est associé à des coûts chirurgicaux et une morbidité importants.

Tous ces facteurs contribuent à un **besoin clinique important d'un greffon vasculaire de petit diamètre, fonctionnel**, et facilement disponible.

Du fait du manque de vaisseaux autologues convenables, les chirurgiens se sont tournés vers les matériaux synthétiques tels que le polyéthylène téréphtalate (Dacron[®]) et le polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe). Cependant, ces matériaux, utilisés avec succès pour le remplacement de vaisseaux d'un diamètre supérieur à 6 mm, sont marqués par une faible efficacité pour le remplacement de vaisseaux de plus petit diamètre. Les inconvénients des prothèses synthétiques incluent surtout un risque augmenté de thrombose, mais aussi un manque de compliance. On s'accorde à penser que l'ingénierie tissulaire offre le potentiel de fournir des vaisseaux qui pourraient être utilisés pour remplacer les vaisseaux sanguins natifs malades ou endommagés.

Le greffon vasculaire idéal doit avoir une surface luminale non thrombogénique, inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses, être biocompatible, avoir une résistance mécanique importante tout en ayant une flexibilité comparable à celle de l'artère native.

Pour répondre à ce cahier des charges, l'**endothélialisation des prothèses synthétiques** a été proposée car la surface endothéliale prévient *in vivo* la thrombose. Le PTFEe est un matériau biocompatible et ayant une bonne résistance mécanique mais il est marqué par une thrombogénicité importante lorsqu'il est utilisé pour remplacer des vaisseaux de faible diamètre. L'endothélialisation de ce substitut ne peut se faire qu'après modification de sa surface, les deux protagonistes possédant des charges similaires. Les principales modifications de surface, réalisées sur des greffons destinés à l'implantation clinique, ont été

des dérivés sanguins (colle de fibrine, fibronectine ou héparine), susceptibles de poser des problèmes immunologiques et infectieux. En outre, ils sont d'un coût élevé. Il nous a donc paru judicieux de tenter d'appliquer le principe de construction des films multicouches de polyélectrolytes aux prothèses vasculaires en PTFEe dans la mesure où ce procédé, de faible coût, est déjà utilisé dans d'autres domaines cliniques sans avoir montré d'effets secondaires potentiels.

Notre étude avait pour but premier de construire *in vitro* un substitut vasculaire synthétique de petit diamètre, fonctionnalisé par un film multicouche de polyélectrolytes et cellularisé. Cette cellularisation pouvait se faire selon deux origines autologues : CE matures ou CSM. Les cellules les plus couramment utilisées dans les procédures d'endothélialisation sont des CE provenant de veines, notamment la veine saphène autologue du patient. Or, les patients nécessitant ces procédures de pontage ne possèdent souvent plus de vaisseaux de suffisamment bonne qualité pour pouvoir être utilisés. De plus, l'utilisation des CE implique des étapes d'amplification en laboratoire pour obtenir un nombre suffisant de cellules pour couvrir toute la surface luminale de la greffe, car un nombre limité de CE est extrait des veines. Le problème posé par cette étape d'amplification est la perte du potentiel prolifératif et les modifications phénotypiques potentielles touchant les CE. En outre, le prélèvement de la veine nécessite une intervention chirurgicale. Au vu des inconvénients précédemment cités, il était intéressant de recourir à un autre type de cellules autologues : les CSM.

L'originalité de notre travail a été d'ensemencer des CSM humaines non modifiées génétiquement sur du PTFEe de petit diamètre, fonctionnalisé par un film multicouche de polyélectrolytes.

Dans une **première étape**, nous avons adapté à notre substitut synthétique en PTFEe un système d'endothélialisation sur lames de verre afin de développer une prothèse hémocompatible, et nous avons évalué, par une étude qualitative en microscopie confocale, la faisabilité de la fonctionnalisation de ce substitut par un film multicouche de polyélectrolytes.

L'observation du PTFEe modifié par un tel film, a mis en évidence la présence d'un recouvrement total et homogène de la surface luminale de ce substitut. Nous avons donc obtenu un recouvrement efficace, mais en plus sans altération visible de la microstructure

typique du matériau. Cette dernière a conservé son aspect régulier à base de nœuds et de fibrilles.

Dans une **deuxième étape**, nous avons analysé quantitativement et qualitativement la biocompatibilité cellulaire du PTFEe fonctionnalisé par le film multicouche de polyélectrolytes. Concernant l'adhérence des cellules, notamment des CE, aux surfaces prothétiques, il est bien connu qu'elle dépend fortement des propriétés et de la composition des surfaces sur lesquelles elles sontensemencées [132]. L'étude de la biocompatibilité du PTFEe fonctionnalisé vis-à-vis de deux types de cellules autologues : CE et CSM, a montré que le film multicouche de polyélectrolytes permet d'obtenir, avec les deux types cellulaires, la formation d'une monocouche sur un substitut initialement peu favorable à l'adhésion cellulaire. L'obtention d'une monocouche confluente de CE a été obtenue avec une densité initiale d'ensemencement peu élevée (5×10^4 cellules/cm²) et un temps de culture d'une semaine seulement. L'importance quantitative de ces paramètres étant relativement faible, cela répond aux impératifs de l'application clinique qui recommandent qu'ils soient le plus minoré possible.

De plus, l'obtention d'une monocouche cellulaire confluente est indispensable pour que les cellules puissent résister aux contraintes de cisaillement du sang [146]. Cette rétention des CE, soumises à des contraintes de cisaillement sur la surface luminale de la prothèse vasculaire hybride, est un prérequis important pour la durabilité antithrombogénique de cette dernière.

La présence d'un film multicouche de polyélectrolytes sur le substitut vasculaire en PTFEe a permis de développer une monocouche de CE pavimenteuses et de CSM fusiformes. Des morphologies identiques à celles retrouvées sur un substrat de référence, TCPS, nous confirment que notre protocole met en évidence la présence d'une adhésion cellulaire efficace. Or, l'adhérence des cellules au substrat permet d'évaluer l'affinité d'un matériau pour les cellules [403]. Ceci montre donc que le PTFEe modifié par un film multicouche de polyélectrolytes présente une très bonne affinité vis-à-vis des deux types cellulaires étudiés. Cette étude est, à notre connaissance, la première à montrer le bon comportement prolifératif et adhésif des CSM sur du PTFEe.

D'autres informations importantes ressortent également de ces études. Tout d'abord, l'utilisation du film PEI-(PSS-PAH)₃, bien qu'il ait favorisé le développement de CE confluentes, semble peu favorable à celui des CSM. Par contre, le film PAH-(PSS-PAH)₃ a

amélioré considérablement la prolifération des CSM sur le PTFEe. Nous pensons donc que ce type de film serait encore davantage propice au développement cellulaire et donc à la cellularisation du substitut synthétique (gain de temps pour l'obtention d'une monocouche confluente).

La deuxième information est que l'utilisation d'une couche unique de polyélectrolytes n'est pas suffisante pour favoriser la biocompatibilité du matériau prothétique vis-à-vis des deux types cellulaires. En effet, en sa présence, la prolifération cellulaire est extrêmement faible. C'est donc bien l'architecture en multicouche qui a un effet potentialisateur sur la cytocompatibilité du PTFEe.

Dans une **troisième étape**, nous avons étudié quantitativement et qualitativement, le comportement des CSM en présence de stimulations biochimiques ou mécaniques. Dans un panel de marqueurs, que nous avons testé avec notre protocole, nous avons choisi les deux marqueurs les plus caractéristiques : vWF et PECAM. Concernant la qualité des films, nous avons montré, par l'étude du comportement des CSM en présence d'une stimulation biochimique, à savoir VEGF, que le film multicouche de polyélectrolytes a un effet potentialisateur sur l'évolution des CSM en cellules ayant des caractéristiques à la fois phénotypiques (expression de PECAM) et fonctionnelles (production de NO) de CE. En effet, nous avons mis en évidence d'une part, par cytométrie en flux, une augmentation de l'intensité relative de fluorescence de PECAM qui est un des marqueurs spécifiques des CE, et d'autre part, par microscopie confocale, une discrète apparition de ce même marqueur. Par contre, nous n'avons observé ni une augmentation de l'intensité relative de fluorescence de vWF en cytométrie en flux, ni une expression de ce marqueur par microscopie confocale. Etant donné la demi-vie extrêmement courte du VEGF (60 minutes) [428], l'expression de ce marqueur et une majoration de l'expression du marqueur précédent pourraient être constatées en cultivant ces cellules en conditions hypoxiques. En effet, l'hypoxie est reconnue comme étant une condition favorisant l'expression de certains gènes impliqués dans l'angiogenèse comme VEGF [412], ce qui pourrait donc renforcer l'action de VEGF sur les CSM. De plus, Oswald et al (2004) ont montré la difficulté de détecter l'apparition de ces marqueurs phénotypiques par cytométrie en flux et ont utilisé une autre technique appelée cytométrie à balayage laser qui, selon eux, est plus efficace pour la détection de populations cellulaires de faible effectif [335].

D'autres informations importantes ressortent également de ces études. Tout d'abord, l'utilisation de fibronectine comme support de différenciation des CSM humaines, ne s'est pas accompagnée de l'apparition de marqueurs spécifiques des CE par nos techniques de détection, tant au niveau qualitatif que quantitatif. Ces résultats sont opposés à ceux de Wijelath et al (2002) [414] qui ont montré, avec un autre type cellulaire, les CPE, que la fibronectine favorisait leur différenciation en CE. Nos résultats ont donc mis en évidence que le film multicouche de polyélectrolytes est plus propice à la différenciation des CSM en CE que ne l'est la fibronectine.

La deuxième information est que les cellules à caractéristiques phénotypiques endothéliales, que nous avons obtenues sur ce film, sont fonctionnelles, car nous avons constaté qu'elles produisent NO en quantité significative, ce qui signifierait la capacité relaxatrice des cellules [409].

Nous avons enfin analysé les réponses des CSM aux contraintes de cisaillement, aussi bien en terme d'étalement cellulaire que d'évolution du profil cyclique et de différenciation cellulaire. En effet, Simmons et al (2003) ont montré que la différenciation des CSM était liée à la tension du cytosquelette [417].

L'approche des effets des contraintes de cisaillement sur les CSM a mis en évidence une orientation des cellules dans le sens du flux, comparable à celle des CE après 24 heures de stimulation. Ce résultat peut être rapproché de celui obtenu dans une publication très récente (2008) d'O'Cearbhaill et al [427]. L'utilisation du film multicouche de polyélectrolytes comme support s'accompagne d'une orientation très homogène des CSM en conditions statiques, contrairement aux CSM sur fibronectine, davantage aléatoire. Nous pensons que cet aspect régulier favorise la rétention des cellules vis-à-vis du flux car il y a peu de perte cellulaire. D'ailleurs, lors de l'exposition au flux, les fibres d'actine des CSM sur film conservent une orientation régulière et présentent un aspect confluent, alors que les fibres d'actine des CSM sur fibronectine présentent une orientation plus variable et semblent plus espacées.

Nous avons montré que les contraintes de cisaillement entraînent une diminution du pourcentage de cellules en phase G0 et une augmentation du pourcentage de cellules en phase S. Elles favorisent donc la prolifération des cellules comme l'ont montré Yamamoto et al (2005) [370]. Ces auteurs ont obtenu une différenciation de cellules embryonnaires en CE. Nous n'avons pas observé de différenciation similaire des CSM après 24 heures de flux à 15

dyn/cm². De façon comparable, O'Cearbhaill et al (2008) n'ont pas non plus obtenu de différenciation des CSM en CE, bien qu'ils aient combiné trois types de forces mécaniques : pression, distension radiale et flux pulsatile [427].

Nous pensons qu'une prolongation du temps de stimulation favoriserait l'apparition d'une telle différenciation. Nous ne pouvons d'ailleurs que regretter le manque d'études dans la littérature, sur la différenciation des CSM en CE sous l'effet de contraintes de cisaillement, ce qui est en faveur de la difficulté de ce mode de différenciation.

Pour potentialiser la différenciation des CSM en CE, il pourrait être judicieux de les mettre en coculture avec des CML. Les effets combinés des CML et des contraintes de cisaillement pourraient ainsi potentialiser la différenciation des CSM en CE comme l'ont montré Ye et al (2007) pour les CPE [391].

Des CSM pourraient êtreensemencées dans la surface luminale du PTFEe fonctionnalisé par un film multicouche de polyélectrolytes où elles seraient soumises à des contraintes de cisaillement laminaire. Des CML pourraient êtreensemencées au niveau de la surface externe où elles seraient maintenues en conditions statiques, les interactions entre CSM et CML étant permises grâce à la nature microporeuse du PTFEe. La source de CML pourrait être soit la veine ombilicale humaine comme utilisé par ces auteurs, soit des CSM autologues différenciées *in vitro* en CML par adjonction dans le milieu de culture de sphingosylphosphorylcholine, sphingolipide généré par une N-déacylation de la sphingomyéline, un des plus abondants lipides de la membrane cellulaire [429].

Cette construction originale permettrait d'allier les résultats obtenus dans les différentes parties de ce travail afin de créer un modèle d'étude plus complet.

Une autre possibilité pourrait être de développer une matrice synthétique en PTFEe fonctionnalisée par un film multicouche de polyélectrolytes qui augmenterait *in vivo* l'endothélialisation avec l'aide des CSM circulantes dont la mobilisation peut être augmentée par l'utilisation de chimiokines telles que par exemple SDF-1 (*Stromal cell-derived factor-1*). Le récepteur unique de cet attractant est le récepteur CXCR4, présent à la surface des CSM [430-431]. SDF-1 est cité fréquemment comme étant un facteur attractif pour le déplacement des cellules souches vers des zones de lésions cardiaques [432]. On pourrait donc envisager le développement d'une prothèse vasculaire synthétique en PTFEe dont la surface luminale serait fonctionnalisée par un film multicouche de polyélectrolytes qui serait recouvert ou dans

lequel seraient incorporées sous forme de réservoirs des substances favorisant la mobilisation et la fixation des CSM, et dont la surface externe aurait une fonctionnalisation comparable, en vue de favoriser la mobilisation et la fixation des CML dérivées de l'artère native avoisinante. Enfin, Koc et al (2001) [433], ayant montré que les CSM ont de faibles réponses immunologiques *in vivo*, les deux perspectives préalablement décrites pourraient être également réalisées à partir de cellules allologues.

Ces résultats encourageants ouvrent de très larges perspectives concernant la modification de surface de biomatériaux synthétiques par un film multicouche de polyélectrolytes et la différenciation de cellules souches mésenchymateuses. Et finalement, pour aller plus loin dans les domaines d'étude de l'ingénierie tissulaire, nous pouvons envisager d'appliquer ce modèle à d'autres secteurs médicaux et notamment dentaires comme la réparation des défauts osseux maxillaires ou muqueux.

Références bibliographiques

1. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11 : 73-91.
2. Rüegg C, Dormond O, Foletti A. Suppression of tumor angiogenesis through the inhibition of integrin function and signaling in endothelial cells: which side to target? *Endothelium*, 2002, 9 : 151-160.
3. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000, 95 : 952-958.
4. Flamme I, Frölich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol*, 1997, 173 : 206-210.
5. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 1997, 386 : 671-674.
6. Watt SM, Gschmeissner SE, Bates PA. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma*, 1995, 17 : 229-244.
7. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res*, 2000, 55 : 15-36.
8. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*, 1998, 125 : 1747-1757.
9. Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*, 2000, 95 : 3106-3112.
10. Rafii S, Shapiro F, Rimarachin J, Nachman RL, Ferris B, Weksler B, Moore MA, Asch AS. Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood*, 1994, 84 : 10-19.
11. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275 : 964-967.
12. McDonald NQ, Hendrickson WA. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*, 1993, 73 : 421-424.
13. Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev*, 2002, 82 : 673-700.

14. Zhang F, Oswald T, Lin S, Cai Z, Lei M, Jones M, Angel MF, Lineaweaver WC. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. *Br J Plast Surg*, 2003, 56 : 653-659.
15. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1996, 27 : 838-844.
16. Van Belle E, Bauters C. Facteur de croissance endothélial vasculaire et pathologie artérielle. *STV*, 1997, 9 : 114-119.
17. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 161 : 851-858.
18. Breier G, Risau W. The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends Cell Biol*, 1996, 6 : 454-456.
19. Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev*, 1993, 12 : 303-324.
20. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem*, 1996, 271 : 603-606.
21. Lange T, Guttmann-Raviv N, Baruch L, Machluf M, Neufeld G. VEGF₁₆₂, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *J Biol Chem*, 2003, 278 : 17164-17169.
22. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG, Sugiono M, Waine E, Perrin R, Foster R, Digby-Bell J, Shields JD, Whittles CE, Mushens RE, Gillatt DA, Ziche M, Harper SJ, Bates DO. VEGF_{165b}, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res*, 2004, 64 : 7822-7835.
23. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 2003, 9 : 669-676.
24. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996, 380 : 435-439.
25. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer*, 1996, 32 : 2413-2422.

26. Carmeliet P. Basic concepts of (Myocardial) angiogenesis: role of vascular endothelial growth factor and angiopoietin. *Curr Interv Cardiol Rep*, 1999, 1 : 322-335.
27. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*, 1999, 126 : 1149-1159.
28. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*, 2000, 2 : 737-744.
29. Inoue K, Chikazawa M, Fukata S, Yoshikawa C, Shuin T. Frequent administration of angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470) at an optimal biological dose inhibits tumor growth and metastasis of metastatic human transitional cell carcinoma in the urinary bladder. *Clin Cancer Res*, 2002, 8 : 2389-2398.
30. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Trends Cardiovasc Med*, 1993, 3 : 244-250.
31. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*, 1992, 13 : 18-32.
32. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 1992, 359 : 843-845.
33. Brogi E, Wu TG, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation*, 1994, 90 : 649-652.
34. Golberg MA, Schneider TJ. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem*, 1994, 269 : 4355-4359.
35. Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem*, 1996, 271 : 2746-2753.
36. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95 : 11709-11714.
37. Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U. Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem*, 1996, 271 : 19310-19317.

38. Aase K, von Euler G, Li X, Pontén A, Thorén P, Cao R, Cao Y, Olofsson B, Gebre-Medhin S, Pekny M, Alitalo K, Betsholtz C, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation*, 2001, 104 : 358-364.
39. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK, Kay GF. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res*, 2000, 86 : 29-35.
40. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93 : 2576-2581.
41. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 1992, 255 : 989-991.
42. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Böhlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 187 : 1579-1586.
43. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for VEGF are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest*, 1992, 89 : 244-253.
44. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 1999, 13 : 9-22.
45. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28 : 488-494.
46. Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhäger R, McCarthy JE, Weich HA, Christ B, Alitalo K, Wilting J. VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol*, 1997, 188 : 96-109.
47. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. Flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development*, 1993, 118 : 489-498.
48. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 1995, 376 : 66-70.

49. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 1995, 376 : 62-66.
50. Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem*, 2002, 277 : 3101-3108.
51. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Differential signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 1994, 269 : 26988-26995.
52. Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, Rafii D, Lyden D. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol*, 2002, 13 : 61-67.
53. Alberts GF, Peifley KA, Johns A, Kleha JF, Winkles JA. Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem*, 1994, 269 : 10112-10118.
54. Seifalian AM, Tiwari A, Hamilton G, Salacinski HJ. Improving the clinical patency of prosthetic vascular and coronary bypass grafts: the role of seeding and tissue engineering. *Artif Organs*, 2002, 26 : 307-320.
55. Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993, 22 : 1-14.
56. Nachman RL, Jaffe EA. Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. *J Clin Invest*, 2004, 114 : 1037-1040.
57. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980, 288 : 373-376.
58. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, 1991, 251 : 788-791.
59. Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells. Critical events in restenosis. *Circulation*, 1992, 86 : 723-729.
60. Fernandez P, Deguet A, Pothuau L, Belleannée G, Coste P, Bordenave L. Quality control assessment of ePTFE precoating procedure for in vitro endothelial cell seeding. *Biomaterials*, 2005, 26 : 5042-5047.
61. Mustard JF, Packham MA. The role of blood and platelets in atherosclerosis and the complications of atherosclerosis. *Thromb Diath Haemorrh*, 1975, 33 : 444-456.

62. Favaloro RG. Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion: operative technique. *Ann Thorac Surg*, 1968, 5 : 334-339.
63. Kunlin J. Le traitement de l'artérite oblitérante par la greffe veineuse. *Arch Mal Cœur*, 1949, 42 : 371-373.
64. Wang X, Lin P, Yao Q, Chen C. Development of small-diameter vascular grafts. *World J Surg*, 2007, 31 : 682-689.
65. Imparato AM, Bracco A, Kim GE, Zeff R. Intimal and neointimal fibrous proliferation causing failure of arterial reconstructions. *Surgery*, 1972, 72 : 1007-1017.
66. LiCalzi LK, Stansel HC Jr. Failure of autogenous reversed saphenous vein femoropopliteal grafting: pathophysiology and prevention. *Surgery*, 1982, 91 : 352-358.
67. Szilagyi DE, Elliott JP, Hageman JH, Smith RF, Dall'olmo CA. Biologic fate of autogenous vein implants as arterial substitutes: clinical, angiographic and histopathologic observations in femoro-popliteal operations for atherosclerosis. *Ann Surg*, 1973, 178 : 232-246.
68. Szilagyi DE, Hageman JH, Smith RF, Elliott JP, Brown F, Dietz P. Autogenous vein grafting in femoropopliteal atherosclerosis: the limits of its effectiveness. *Surgery*, 1979, 86 : 836-851.
69. Mehta D, Izzat MB, Bryan AJ, Angelini GD. Towards the prevention of vein graft failure. *Int J Cardiol*, 1997, 62 : 55-63.
70. Sayers RD, Raptis S, Berce M, Miller JH. Long-term results of femorotibial bypass with vein or polytetrafluoroethylene. *Br J Surg*, 1998, 85 : 934-938.
71. Biancari F, Railo M, Lundin J, Albäck A, Kantonen I, Lehtola A, Lepäntalo M. Redo bypass surgery to the infrapopliteal arteries for critical leg ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2001, 21 : 137-142.
72. Michaels AD, Chatterjee K. Cardiology patient pages. Angioplasty versus bypass surgery for coronary artery disease. *Circulation*, 2002, 106 : 187-190.
73. Alobaid N, Salacinski HJ, Sales KM, Hamilton G, Seifalian AM. Single stage cell seeding of small diameter prosthetic cardiovascular grafts. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2005, 33 : 209-226.
74. Matsuda T. Recent progress of vascular graft engineering in Japan. *Artif Organs*, 2004, 28 : 64-71.
75. Leon L, Greisler HP. Vascular grafts. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2003, 1 : 581-594.

76. Fernandez P, Bareille R, Conrad V, Midy D, Bordenave L. Evaluation of an in vitro endothelialized vascular graft under pulsatile shear stress with a novel radiolabeling procedure. *Biomaterials*, 2001, 22 : 649-658.
77. Teebken OE, Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2002, 23 : 475-485.
78. Brewster DC, LaSalle AJ, Robison JG, Strayhorn EC, Darling RC. Femoropopliteal graft failures. Clinical consequences and success of secondary reconstructions. *Arch Surg*, 1983, 118 : 1043-1047.
79. Bos GW, Poot AA, Beugeling T, van Aken WG, Feijen J. Small-diameter vascular graft prostheses: current status. *Arch Physiol Biochem*, 1998, 106 : 100-115.
80. Edelman ER. Vascular tissue engineering: designer arteries. *Circ Res*, 1999, 85 : 1115-1117.
81. Niklason LE, Langer RS. Advances in tissue engineering of blood vessels and other tissues. *Transpl Immunol*, 1997, 5 : 303-306.
82. Abbott WM, Megerman J, Hasson JE, L'Italien G, Warnock DF. Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. *J Vasc Surg*, 1987, 5 : 376-382.
83. Jackson MR, Belott TP, Dickason T, Kaiser WJ, Modrall JG, Valentine RJ, Clagett GP. The consequences of a failed femoropopliteal bypass grafting: comparison of saphenous vein and PTFE grafts. *J Vasc Surg*, 2000, 32 : 498-504.
84. Nolan KD, Benjamin ME, Murphy TJ, Pearce WH, McCarthy WJ, Yao JS, Flinn WR. Femorofemoral bypass for aortofemoral graft limb occlusion: a ten-year experience. *J Vasc Surg*, 1994, 19 : 851-856.
85. Bordenave L, Fernandez P, Rémy-Zolghadri M, Villars S, Daculsi R, Midy D. In vitro endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2005, 33 : 227-234.
86. Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, van Bockel JH. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2004, 27 : 357-362.
87. Sauvage LR, Berger K, Beilin LB, Smith JC, Wood SJ, Mansfield PB. Presence of endothelium in an axillary-femoral graft of knitted Dacron with an external velour surface. *Ann Surg*, 1975, 182 : 749-753.
88. Yu H, Dai W, Yang Z, Kirkman P, Weaver FA, Eton D, Rowe VL. Smooth muscle cells improve endothelial cell retention on polytetrafluoroethylene grafts in vivo. *J Vasc Surg*, 2003, 38 : 557-563.

89. Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, Preiss P, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery*, 1999, 126 : 847-855.
90. Voorhees AB Jr. The development of arterial prostheses. A personal view. *Arch Surg*, 1985, 120 : 289-295.
91. Abbott WM, Callow A, Moore W, Rutherford R, Veith F, Weinberg S. Evaluation and performance standards for arterial prostheses. *J Vasc Surg*, 1993, 17 : 746-756.
92. Kidson IG. Arterial prostheses. *Br J Hosp Med*, 1983, 30 : 248-254.
93. Miwa H, Matsuda T. An integrated approach to the design and engineering of hybrid arterial prostheses. *J Vasc Surg*, 1994, 19 : 658-667.
94. Wesolow A. The healing of arterial prostheses-the state of the art. *Thorac Cardiovasc Surg*, 1982, 30 : 196-208.
95. Kent KC, Oshima A, Whittemore AD. Optimal seeding conditions for human endothelial cells. *Ann Vasc Surg*, 1992, 6 : 258-264.
96. Salzmann DL, Kleinert LB, Berman SS, Williams SK. The effects of porosity on endothelialization of ePTFE implanted in subcutaneous and adipose tissue. *J Biomed Mater Res*, 1997, 34 : 463-476.
97. Campbell CD, Goldfarb D, Roe R. A small arterial substitute: expanded microporous polytetrafluoroethylene: patency versus porosity. *Ann Surg*, 1975, 182 : 138-143.
98. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*, 1993, 260 : 920-926.
99. Bottaro DP. The role of extracellular matrix heparan sulfate glycosaminoglycan in the activation of growth factor signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 961:158.
100. Guan J, Sacks MS, Beckman EJ, Wagner WR. Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane)ureas based on poly(caprolactone) and putrescine. *J Biomed Mater Res*, 2002, 61 : 493-503.
101. Niklason LE, Koh J, Solan A. Tissue engineering of the lymphatic system. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 979 : 27-38.
102. Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, 2002, 3 : 232-238.
103. Dong CM, Sun XL, Faucher KM, Apkarian RP, Chaikof EL. Synthesis and characterization of glycopolymer-polypeptide triblock copolymers. *Biomacromolecules*, 2004, 5 : 224-231.

104. McCoy JP, Schade WJ, Siegle RJ, Waldinger TP, Vanderveen EE, Swanson NA. Characterization of the humoral immune response to bovine collagen implants. *Arch Dermatol*, 1985, 121 : 990-994.
105. Kloppe PJ. Collagen in surgical research. *Eur Surg Res*, 1986, 18 : 218-223.
106. Aragona F, D'Urso L, Marcolongo R. Immunologic aspects of bovine injectable collagen in humans. A review. *Eur Urol*, 1998, 33 : 129-133.
107. Miyata T, Taira T, Noishiki Y. Collagen engineering for biomaterial use. *Clin Mater*, 1992, 9 : 139-148.
108. Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol*, 1998, 16 : 224-230.
109. Cao Y, Rodriguez A, Vacanti M, Ibarra C, Arevalo C, Vacanti CA. Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1998, 9 : 475-487.
110. Chakfé N, Dieval F, Thaveau F, Rinckenbach S, Hassani O, Camelot G, Durand B, Kretz JG. Vascular graft prosthesis. *Ann Chir*, 2004, 129 : 301-309.
111. McClurken ME. Saphenous vein is by far superior to PTFE as a femoropopliteal bypass. *Ann Surg*, 1986, 204 : 613-614.
112. Miura H, Nishibe T, Yasuda K, Shimada T, Hazama K, Katoh H, Watanabe S, Okuda Y, Kumada T. The influence of node-fibril morphology on healing of high-porosity expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Eur Surg Res*, 2002, 34 : 224-231.
113. Shimada T, Nishibe T, Miura H, Hazama K, Kato H, Kudo F, Murashita T, Okuda Y. Improved healing of small-caliber, long-fibril expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts by covalent bonding of fibronectin. *Surg Today*, 2004, 34 : 1025-1030.
114. Clowes AW, Kirkman TR, Reidy MA. Mechanisms of arterial graft healing. Rapid transmural capillary ingrowth provides a source of intimal endothelium and smooth muscle in porous PTFE prostheses. *Am J Pathol*, 1986, 123 : 220-230.
115. Ahlswede KM, Williams SK. Microvascular endothelial cell seeding of 1-mm expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14 : 25-31.
116. Ortenwall P, Wadenvik H, Kutti J, Risberg B. Reduction in deposition of indium 111-labeled platelets after autologous endothelial cell seeding of Dacron aortic bifurcation grafts in humans: a preliminary report. *J Vasc Surg*, 1987, 6 : 17-25.
117. Shindo S, Takagi A, Whittemore AD. Improved patency of collagen-impregnated grafts after in vitro autogenous endothelial cell seeding. *J Vasc Surg*, 1987, 6 : 325-332.

118. Rupnick MA, Hubbard FA, Pratt K, Jarrell BE, Williams SK. Endothelialization of vascular prosthetic surfaces after seeding or sodding with human microvascular endothelial cells. *J Vasc Surg*, 1989, 9 : 788-795.
119. Kidd KR, Patula VB, Williams SK. Accelerated endothelialization of interpositional 1-mm vascular grafts. *J Surg Res*, 2003, 113 : 234-242.
120. Hoerstrup SP, Zünd G, Sodian R, Schnell AM, Grünenfelder J, Turina MI. Tissue engineering of small caliber vascular grafts. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2001, 20 : 164-169.
121. Vorp DA, Maul T, Nieponice A. Molecular aspects of vascular tissue engineering. *Front Biosci*, 2005, 10 : 768-789.
122. Bos GW, Scharenborg NM, Poot AA, Engbers GH, Terlingen JG, Beugeling T, Van Aken WG, Feijen J. Adherence and proliferation of endothelial cells on surface-immobilized albumin-heparin conjugate. *Tissue Eng*, 1998, 4 : 267-279.
123. Kaehler J, Zilla P, Fasol R, Deutsch M, Kadletz M. Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg*, 1989, 9 : 535-541.
124. Herring M, Baughman S, Glover J. Endothelium develops on seeded human arterial prosthesis: a brief clinical note. *J Vasc Surg*, 1985, 2 : 727-730.
125. Herring M, Gardner A, Glover J. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery*, 1978, 84 : 498-504.
126. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 148 : 1482-1489.
127. Chan V, Chan TK. Antithrombin III in fresh and cultured human endothelial cells: a natural anticoagulant from the vascular endothelium. *Thromb Res*, 1979, 15 : 209-213.
128. Glimelius B, Busch C, Höök M. Binding of heparin on the surface of cultured human endothelial cells. *Thromb Res*, 1978, 12 : 773-782.
129. Schneider A, Melmed RN, Schwalb H, Karck M, Vlodavsky I, Uretzky G. An improved method for endothelial cell seeding on polytetrafluoroethylene small caliber vascular grafts. *J Vasc Surg*, 1992, 15 : 649-656.
130. Callow AD. Problems in the construction of a small diameter graft. *Int Angiol*, 1988, 7 : 246-253.

131. Van Wachem PB, Vreriks CM, Beugeling T, Feijen J, Bantjes A, Detmers JP, van Aken WG. The influence of protein adsorption on interactions of cultured human endothelial cells with polymers. *J Biomed Mater Res*, 1987, 21 : 701-718.
132. Feugier P, Black RA, Hunt JA, How TV. Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress. *Biomaterials*, 2005, 26 : 1457-1466.
133. Kent KC, Oshima A, Whittemore AD. Optimal seeding conditions for human endothelial cells. *Ann Vasc Surg*, 1992, 6 : 258-264.
134. Tseng DY, Edelman ER. Effects of amide and amine plasma-treated ePTFE vascular grafts on endothelial cell lining in an artificial circulatory system. *J Biomed Mater Res*, 1998, 42 : 188-198.
135. Kaehler J, Zilla P, Fasol R, Deutsch M, Kadletz M. Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg*, 1989, 9 : 535-541.
136. Bosiers M, Deloose K, Verbist J, Schroë H, Lauwers G, Lansink W, Peeters P. Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene vascular graft for femoropopliteal and femorocrural bypass grafting: 1-year results. *J Vasc Surg*, 2006, 43 : 313-319.
137. Nishibe T, Okuda Y, Kumada T, Tanabe T, Yasuda K. Enhanced graft healing of high-porosity expanded polytetrafluoroethylene grafts by covalent bonding of fibronectin. *Surg Today*, 2000, 30 : 426-431.
138. Kempczinski RF, Ramalanjaona GR, Douville C, Silberstein EB. Thrombogenicity of a fibronectin-coated, experimental polytetrafluoroethylene graft. *Surgery*, 1987, 101 : 439-444.
139. Laube HR, Duwe J, Rutsch W, Konertz W. Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 120 : 134-141.
140. Meinhart JG, Deutsch M, Fischlein T, Howanietz N, Fröschl A, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts. *Ann Thorac Surg*, 2001, 71 : 327-331.
141. Patterson RB, Keller JD, Silberstein EB, Kempczinski RF. A comparison between fibronectin and Matrigel pretreated ePTFE vascular grafts. *Ann Vasc Surg*, 1989 3 : 160-166.
142. Zhu AP, Ming Z, Jian S. Blood compatibility of chitosan/heparin complex surface modified ePTFE vascular graft. *Appl Surf Sci*, 2005, 241 : 485-492.

143. Heyligers JM, Verhagen HJ, Rotmans JI, Weeterings C, de Groot PG, Moll FL, Lismann T. Heparin immobilization reduces thrombogenicity of small-caliber expanded polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg*, 2006, 43 : 587-591.
144. Zarge JI, Gosselin C, Huang P, Vorp DA, Severyn DA, Greisler HP. Platelet deposition on ePTFE grafts coated with fibrin glue with or without FGF-1 and heparin. *J Surg Res*, 1997, 67 : 4-8.
145. Choi YJ, Choung SK, Hong CM, Shin IS, Park SN, Hong SH, Park HK, Park YH, Son Y, Noh I. Evaluations of blood compatibility via protein adsorption treatment of the vascular scaffold surfaces fabricated with polylactide and surface-modified expanded polytetrafluoroethylene for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*, 2005, 75 : 824-831.
146. Vinard E, Lesèche G, Andreassian B, Costagliola D. In vitro endothelialization of PTFE vascular grafts: a comparison of various substrates, cell densities, and incubation times. *Ann Vasc Surg*, 1999, 13 : 141-150.
147. Feugier P, Black RA, Hunt JA, How TV. Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress. *Biomaterials*, 2005, 26 : 1457-1466.
148. Yu H, Wang Y, Eton D, Rowe VL, Terramani TT, Cramer DV, Starnes VA, Weaver FA. Dual cell seeding and the use of zymogen tissue plasminogen activator to improve cell retention on polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg*, 2001, 34 : 337-343.
149. Chan BP, Liu W, Klitzman B, Reichert WM, Truskey GA. In vivo performance of dual ligand augmented endothelialized expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2005, 72 : 52-63.
150. Larsen CC, Kligman F, Kottke-Marchant K, Marchant RE. The effect of RGD fluorosurfactant polymer modification of ePTFE on endothelial cell adhesion, growth, and function. *Biomaterials*, 2006, 27 : 4846-4855.
151. Larsen CC, Kligman F, Tang C, Kottke-Marchant K, Marchant RE. A biomimetic peptide fluorosurfactant polymer for endothelialization of ePTFE with limited platelet adhesion. *Biomaterials*, 2007, 28 : 3537-3548.
152. Kidd KR, Dal Ponte D, Stone AL, Hoying JB, Nagle RB, Williams SK Stimulated endothelial cell adhesion and angiogenesis with laminin-5 modification of expanded polytetrafluoroethylene. *Tissue Eng*, 2005, 11 : 1379-1391.

153. Gosselin C, Vorp DA, Warty V, Severyn DA, Dick EK, Borovetz HS, Greisler HP. ePTFE coating with fibrin glue, FGF-1, and heparin: effect on retention of seeded endothelial cells. *J Surg Res*, 1996, 60 : 327-332.
154. Chevallier P, Janvier R, Mantovani D, Laroche G. In vitro biological performances of phosphorylcholine-grafted ePTFE prostheses through RFGD plasma techniques. *Macromol Biosci*, 2005, 5 : 829-839.
155. Gumpenberger T, Heitz J, Bäuerle D, Kahr H, Graz I, Romanin C, Svorcik V, Leisch F. Adhesion and proliferation of human endothelial cells on photochemically modified polytetrafluoroethylene. *Biomaterials*, 2003, 24 : 5139-5144.
156. Lee JH, Lee JW, Khang G, Lee HB. Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces. *Biomaterials*, 1997, 18 : 351-358.
157. Ratner BD. The engineering of biomaterials exhibiting recognition and specificity. *J Mol Recognit*, 1996, 9 : 617-625.
158. Fillinger MF, O'Connor SE, Wagner RJ, Cronenwett JL. The effect of endothelial cell coculture on smooth muscle cell proliferation. *J Vasc Surg*, 1993, 17 : 1058-1067.
159. Powell RJ, Cronenwett JL, Fillinger MF, Wagner RJ, Sampson LN. Endothelial cell modulation of smooth muscle cell morphology and organizational growth pattern. *Ann Vasc Surg*, 1996, 10 : 4-10.
160. Bacáková L, Mares V, Bottone MG, Pellicciari C, Lisá V, Svorčík V. Fluorine ion-implanted polystyrene improves growth and viability of vascular smooth muscle cells in culture. *Biomed Mater Res*, 2000, 49 : 369-379.
161. Emerick S, Herring M, Arnold M, Baughman S, Reilly K, Glover J. Leukocyte depletion enhances cultured endothelial retention on vascular prostheses. *J Vasc Surg*, 1987, 5 : 342-347.
162. Yu H, Dai W, Yang Z, Kirkman P, Weaver FA, Eton D, Rowe VL. Smooth muscle cells improve endothelial cell retention on polytetrafluoroethylene grafts in vivo. *J Vasc Surg*, 2003, 38 : 557-563.
163. Randone B, Cavallaro G, Polistena A, Cucina A, Coluccia P, Graziano P, Cavallaro A. Dual role of VEGF in pretreated experimental ePTFE arterial grafts. *J Surg Res*, 2005, 127 : 70-79.
164. Sipehia R, Liskowski M, Lu A. In vivo evaluation of ammonia plasma modified ePTFE grafts for small diameter blood vessels replacement. A preliminary report. *J Cardiovasc Surg*, 2001, 42 : 537-542.

165. Pawlowski KJ, Rittgers SE, Schmidt SP, Bowlin GL. Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts. *Front Biosci*, 2004, 9 : 1412-1421.
166. Lin PH, Bush RL, Yao Q, Lumsden AB, Chen C. Evaluation of platelet deposition and neointimal hyperplasia of heparin-coated small-caliber ePTFE grafts in a canine femoral artery bypass model. *J Surg Res*, 2004, 118 : 45-52.
167. Lin PH, Chen C, Bush RL, Yao Q, Lumsden AB, Hanson SR. Small-caliber heparin-coated ePTFE grafts reduce platelet deposition and neointimal hyperplasia in a baboon model. *J Vasc Surg*, 2004, 39 : 1322-1328.
168. Gosselin C, Ren D, Ellinger J, Greisler HP. In vivo platelet deposition on polytetrafluoroethylene coated with fibrin glue containing fibroblast growth factor 1 and heparin in a canine model. *Am J Surg*, 1995, 170 : 126-130.
169. Ortenwall P, Bylock A, Kjellstrom BT, Risberg B. Seeding of ePTFE carotid interposition grafts in sheep and dogs: species-dependent results. *Surgery*, 1988, 103 : 199-205.
170. Noishiki Y, Yamane Y, Ichikawa Y, Yamazaki I, Yamamoto K, Kosuge T, Manabe T, Mo M. Age dependency of neointima formation on vascular prostheses in dogs. *Artif Organs*, 2000, 24 : 718-728.
171. Walluscheck KP, Bierkandt S, Brandt M, Cremer J. Infrainguinal ePTFE vascular graft with bioactive surface heparin bonding. First clinical results. *J Cardiovasc Surg*, 2005, 46 : 425-430.
172. Battaglia G, Tringale R, Monaca V. Retrospective comparison of a heparin bonded ePTFE graft and saphenous vein for infragenicular bypass: implications for standard treatment protocol. *J Cardiovasc Surg*, 2006, 47 : 41-47.
173. Devine C, McCollum C. North west femoro-popliteal trial participants. Heparin-bonded Dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass: five-year results of a prospective randomized multicenter clinical trial. *J Vasc Surg*, 2004, 40 : 924-931.
174. Cruz D, Karlsberg R, Takano Y, Vora D, Tobis J. Subacute stent thrombosis associated with a heparin-coated stent and heparin-induced thrombocytopenia. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2003, 58 : 80-83.
175. Bittl JA. Heparin-coated stent and heparin-induced thrombocytopenia: true, and conceivably related. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2003, 58 : 84-85.
176. Deutsch M, Meinhart J, Vesely M, Fischlein T, Groscurth P, von Oppell U, Zilla P. In vitro endothelialization of expanded polytetrafluoroethylene grafts: a clinical case report after 41 months of implantation. *J Vasc Surg*, 1997, 25 : 757-763.

177. Battaglia G, Tringale R, Monaca V. Retrospective comparison of a heparin bonded ePTFE graft and saphenous vein for infragenicular bypass: implications for standard treatment protocol. *J Cardiovasc Surg*, 2006, 47 : 41-47.
178. Bowlin GL, Rittgers SE. Electrostatic endothelial cell transplantation within small-diameter (<6 mm) vascular prostheses: a prototype apparatus and procedure. *Cell Transplant*, 1997, 6 : 631-637.
179. Bowlin GL, Rittgers SE, Milsted A, Schmidt SP. In vitro evaluation of electrostatic endothelial cell transplantation onto 4 mm interior diameter expanded polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg*, 1998, 27 : 504-511.
180. Giddens DP, Zarins CK, Glagov S. Response of arteries to near wall fluid dynamic behavior. *Appl Mech Rev*, 1990, 43 : 98-102.
181. Fields C, Cassano A, Makhoul RG, Allen C, Sims R, Bulgrin J, Meyer A, Bowlin GL, Rittgers SE. Evaluation of electrostatically endothelial cell seeded expanded polytetrafluoroethylene grafts in a canine femoral artery model. *J Biomater Appl*, 2002, 17 : 135-152.
182. Decher G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science*, 1997, 277 : 1232-1237.
183. Knoll W. Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves. *Annu Rev Phys Chem*, 1998, 49 : 569-638.
184. Bertrand P, Jonas A, Legras R. Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure, properties. *Macromol. Rapid Commun*, 2000, 21 : 319-348.
185. Schonhoff M. Self-assembled polyelectrolyte multilayers. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2003, 8 : 86.
186. Decher G, Schlenoff JB and Eds. Multilayer thin films-sequential assembly of nanocomposite materials. 2003, Wiley-VCH, Weinheim.
187. Zhu H, Ji J, Shen J. Biomacromolecules electrostatic self-assembly on 3-dimensional tissue engineering scaffold. *Biomacromolecules*, 2004, 5 : 1933-1939.
188. Decher G, Schmitt J. Fine-tuning of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes. *Prog Polym Sci*, 1992, 89 : 160.
189. Dubas ST, Schlenoff JB. Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers. *Macromolecules*, 1997, 32 : 8153-8160.

190. Ladam G, Gergely C, Senger B, Decher G, Voegel JC, Schaaf P, Cuisinier FJ. Protein interactions with polyelectrolyte multilayers: interactions between human serum albumin and polystyrene sulfonate/polyallylamine multilayers. *Biomacromolecules*, 2000, 1 : 674-687.
191. Caruso F, Niikura K, Furlong DN, Okahata Y. Ultrathin multilayer polyelectrolyte films on gold: construction and thickness determination. *Langmuir*, 1997, 13 : 3422-3426.
192. Netz RR, Orland H. Variational charge renormalization in charged systems. *Eur Phys J E Soft Matter*, 2003, 11 : 301-311.
193. Kolasińska M, Warszyński P. The effect of support material and conditioning on wettability of PAH/PSS multilayer films. *Bioelectrochemistry*, 2005, 66 : 65-70.
194. Steitz R, Leiner V, Siebrecht R, Klitzing R. Influence of the ionic strength on the structure of polyelectrolyte films at the solid-liquid interface. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 2000, 163 : 63-70.
195. Mendelsohn JD, Yang SY, Hiller J, Hochbaum AI, Rubner MF. Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films. *Biomacromolecules*, 2003, 4 : 96-106.
196. Lowack K, Helm CA. Molecular mechanisms controlling the self-assembly process of polyelectrolyte multilayers. *Macromolecules*, 1998, 31 : 823-833.
197. Nabok AV, Hassan AK, Ray AK. Optical and electrical characterisation of polyelectrolyte self-assembled thin films. *Mat Sci Eng C*, 1999, 8 : 505-508.
198. Ruths J., Essler F., Decher G., Riegler H. Polyelectrolytes I: polyanion/polycation multilayers at the air/monolayer/water interface as elements for quantitative polymer adsorption studies and preparation of hetero-superlattices on solid surfaces. *Langmuir*, 2000, 16 : 8871-8878.
199. Ramsden JJ, Lvov YM, Decher G. Determination of optical constants of molecular films assembled via alternate polyion adsorption. *Thin Solid Films*, 1995, 254 : 246-251.
200. Picart C, Lavallo P, Hubert P, Cuisinier FJG, Decher P, Schaaf P, Voegel JC. Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface. *Langmuir*, 2001, 17 : 7414-7424.
201. Losche M, Schmitt J, Decher G, Bouwman WG, Kjaer K. Detailed of structure of molecularly thin polyelectrolyte multilayer films on solid substrates as revealed by neutron reflectometry. *Macromolecules*, 1998, 31 : 8893-8906.

202. Yoo D, Shiratori S, Rubner MF. Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules*, 1998, 31 : 4309-4318.
203. Shiratori SS, Rubner MF. pH-dependent thickness behaviour of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules*, 2000, 33 : 4213-4219.
204. Mendelsohn JD, Barrett CJ, Chan VV, Pal AJ, Mayes AM, Rubner MF. Fabrication of microporous thin films from polyelectrolyte multilayers. *Langmuir*, 2000, 16 : 5017-5023.
205. Fery A, Scholer B, Cassagneau T, Caruso F. Nanoporous thin films formed by salt-induced structural changes in multilayers of poly(acrylic acid) and poly(allylamine). *Langmuir*, 2001, 17 : 3779-3783.
206. Steele JG, Johnson G, McFarland C, Dalton BA, Gengenbach TR, Chatelier RC, Underwood PA, Griesser HJ. Roles of serum vitronectin and fibronectin in initial attachment of human vein endothelial cells and dermal fibroblasts on oxygen- and nitrogen-containing surfaces made by radiofrequency plasmas. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1994, 6 : 511-532.
207. Sanborn SL, Murugesan G, Marchant RE, Kottke-Marchant K. Endothelial cell formation of focal adhesions on hydrophilic plasma polymers. *Biomaterials*, 2002, 23 : 1-8.
208. Kolasińska M, Krastev R, Warszyński P. Characteristics of polyelectrolyte multilayers: effect of PEI anchoring layer and posttreatment after deposition. *J Colloid Interface Sci*, 2007, 305 : 46-56.
209. Buron CC, Filiâtre C, Membrey F, Perrot H, Foissy A. Mass and charge balance in self-assembled multilayer films on gold. Measurements with optical reflectometry and quartz crystal microbalance. *J Colloid Interface Sci*, 2006, 296 : 409-418.
210. Van Wachem PB, Beugeling T, Feijen J, Bantjes A, Detmers JP, van Aken WG. Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. *Biomaterials*, 1985, 6 : 403-408.
211. Sui Z, Salloum D, Schlenoff JB. Effect of molecular weight on the construction of polyelectrolyte multilayers: stripping versus sticking. *Langmuir*, 2003, 19 : 2491-2495.
212. McAloney RA, Sinyor M, Dudnik V, Goh MC. Atomic force microscopy studies of salt effects on polyelectrolyte multilayer film morphology. *Langmuir*, 2001, 17 : 6655-6663.

213. Chung AJ, Rubner MF. Methods of Loading and Releasing Low Molecular Weight Cationic Molecules in Weak Polyelectrolyte Multilayer Films. *Langmuir*, 2002, 18 : 1176-1183.
214. Salomäki M, Vinokurov IA, Kankare J. Effect of temperature on the buildup of polyelectrolyte multilayers. *Langmuir*, 2005, 21 : 11232-11240.
215. Groth T, Lendlein A. Layer-by-layer deposition of polyelectrolytes-a versatile tool for the in vivo repair of blood vessels. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004, 43 : 926-928.
216. Mao JS, Cui YL, Wang XH, Sun Y, Yin YJ, Zhao HM, De Yao K. A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. *Biomaterials*, 2004, 25 : 3973-3981.
217. Salloum DS, Olenych SG, Keller TC, Schlenoff JB. Vascular smooth muscle cells on polyelectrolyte multilayers: hydrophobicity-directed adhesion and growth. *Biomacromolecules*, 2005, 6 : 161-167.
218. Boura C, Menu P, Payan E, Picart C, Voegel JC, Muller S, Stoltz JF. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials*, 2003, 24 : 3521-3530.
219. Tryoen-Tóth P, Vautier D, Haikel Y, Voegel JC, Schaaf P, Chluba J, Ogier J. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *J Biomed Mater Res*, 2002, 60 : 657-667.
220. Vautier D, Karsten V, Egles C, Chluba J, Schaaf P, Voegel JC, Ogier J. Polyelectrolyte multilayer films modulate cytoskeletal organization in chondrosarcoma cells. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2002, 13 : 713-732.
221. Pointu D, thèse, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 2002.
222. Boura C, Muller S, Vautier D, Dumas D, Schaaf P, Claude Voegel J, François Stoltz J, Menu P. Endothelial cell-interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials*, 2005, 26 : 4568-4575.
223. Lee JH, Lee JW, Khang G, Lee HB. Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces. *Biomaterials*, 1997, 18 : 351-358.
224. Salloum DS, Schlenoff JB. Protein adsorption modalities on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules*, 2004, 5 : 1089-1096.
225. Richert L, Lavalle P, Vautier D, Senger B, Stoltz JF, Schaaf P, Voegel JC, Picart C. Cell interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules*, 2002, 3 : 1170-1178.

226. Nerem RM, Seliktar D. Vascular tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng*, 2001, 3 : 225-243.
227. Ford JW, Burkell WE, Kahn RH. Isolation of adult canine venous endothelium for tissue culture. *In Vitro*, 1981, 17 : 44-50.
228. Radomski JS, Jarrell BE, Williams SK, Koolpe EA, Greener DA, Carabasi RA. Initial adherence of human capillary endothelial cells to Dacron. *J Surg Res*, 1987, 42 : 133-140.
229. Yang J, Chang E, Cherry AM, Bangs CD, Oei Y, Bodnar A, Bronstein A, Chiu CP, Herron GS. Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J Biol Chem*, 1999, 274 : 26141-26148.
230. Sato I, Morita I, Kaji K, Ikeda M, Nagao M, Murota S. Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 195 : 1070-1076.
231. Maier JA, Voulalas P, Roeder D, Maciag T. Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 alpha antisense oligomer. *Science*, 1990, 249 : 1570-1574.
232. Prasad Chennazhy K, Krishnan LK. Effect of passage number and matrix characteristics on differentiation of endothelial cells cultured for tissue engineering. *Biomaterials*, 2005, 26 : 5658-5667.
233. Riha GM, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Review: application of stem cells for vascular tissue engineering. *Tissue Eng*, 2005, 11 : 1535-1552.
234. Park PK, Jarrell BE, Williams SK, Carter TL, Rose DG, Martinez-Hernandez A, Carabasi RA 3rd. Thrombus-free, human endothelial surface in the midregion of a Dacron vascular graft in the splanchnic venous circuit-observations after nine months of implantation. *J Vasc Surg*, 1990, 11 : 468-475.
235. Schmidt SP, Meerbaum SO, Anderson JM, Clarke RE, Zellers RA, Sharp WV. Evaluation of expanded polytetrafluoroethylene arteriovenous access grafts onto which microvessel-derived cells were transplanted to "improve" graft performance: preliminary results. *Ann Vasc Surg*, 1998, 12 : 405-411.
236. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol*, 1995, 168 : 342-357.
237. Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Müller PK, Rohwedel J. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation *in vitro*: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev*, 2000, 92 : 193-205.

238. Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol*, 1994, 164 : 87-101.
239. Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood*, 1996, 88 : 3424-3431.
240. Brivanlou AH, Gage FH, Jaenisch R, Jessell T, Melton D, Rossant J. Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science*, 2003, 300 : 913-916.
241. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 1998, 279 : 1528-1530.
242. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 938 : 221-230.
243. Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, 2000, 406 : 257.
244. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 1999, 401 : 390-394.
245. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*, 2000, 31 : 235-240.
246. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JJ, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 2004, 428 : 664-668.
247. Coulombel L. Cellules souches tissulaires adultes: *seing is not being*. *M/S*, 2003, 19 : 683-694.
248. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 2000, 408 : 92-96.

249. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*, 2000, 105 : 71-77.
250. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 1999, 85 : 221-228.
251. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 2001, 193 : 1005-1014.
252. Schmeisser A, Strasser RH. Phenotypic overlap between hematopoietic cells with suggested angioblastic potential and vascular endothelial cells. *J Hematother Stem Cell Res*, 2002, 11 : 69-79.
253. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*, 2004, 95 : 343-353.
254. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE Jr. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med*, 2001, 7 : 1035-1040.
255. Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, Ando J. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol*, 2003, 95 : 2081-2088.
256. Gang EJ, Jeong JA, Han S, Yan Q, Jeon CJ, Kim H. In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 2006, 8 : 215-227.
257. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418 : 41-49.
258. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*, 2002, 109 : 337-346.
259. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 1966, 16 : 381-390.

260. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997, 276 : 71-74.
261. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284 : 143-147.
262. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*, 1999, 107 : 275-281.
263. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2002, 46 : 704-713.
264. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res*, 1999, 14 : 1115-1122.
265. Roberts I. Mesenchymal stem cells. *Vox Sang*, 2004, 87 : 38-41.
266. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*, 2003, 121 : 368-374.
267. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol*, 2006, 7 : 14.
268. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 1992, 13 : 69-80.
269. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, 1980, 56 : 289-301.
270. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 1991, 78 : 55-62.
271. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*, 1997, 64 : 278-294.

272. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*, 2002, 46 : 3349-3360.
273. Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res*, 2003, 412 : 196-212.
274. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells*, 2005, 23 : 412-423.
275. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002, 13 : 4279-4295.
276. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*, 2001, 153 : 1133-1140.
277. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*, 2000, 2 : 477-488.
278. Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int*, 2003, 72 : 135-142.
279. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 2004, 22 : 625-634.
280. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, 2003, 21 : 105-110.
281. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 2000, 109 : 235-242.
282. Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2001, 7 : 581-588.
283. Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P. A new

- human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med*, 2004, 200 : 123-135.
284. Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen ML, Lee MC, Chen YC. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*, 2005, 23 : 3-9.
285. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*, 2004, 6 : 543-553.
286. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*, 2005, 23 : 220-229.
287. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 2004, 22 : 1330-1337.
288. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*, 2004, 19 : 1450-1456.
289. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*, 2003, 102 : 1548-1549.
290. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 2004, 50 : 1522-1532.
291. Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. *Osteoarthr Cartil*, 2003, 11 : 790-800.
292. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*, 2001, 44 : 1928-1942.
293. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 : 5807-5812.
294. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 : 13625-13630.

295. Seo BM, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res*, 2005, 84 : 907-912.
296. Warejcka DJ, Harvey R, Taylor BJ, Young HE, Lucas PA. A population of cells isolated from rat heart capable of differentiating into several mesodermal phenotypes. *J Surg Res*, 1996, 62 : 233-242.
297. Hu Y, Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, Jiang X, Zhao RC. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med*, 2003, 141 : 342-349.
298. Derubeis AR, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Osteogenic potential of rat spleen stromal cells. *Eur J Cell Biol*, 2003, 82 : 175-181.
299. Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, O'Driscoll SW. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthr Cartil*, 2003, 11 : 55-64.
300. Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res*, 2002, 20 : 1060-1069.
301. Sabatini F, Petecchia L, Tavian M, Jodon de Villeroché V, Rossi GA, Brouty-Boyé D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest*, 2005, 85 : 962-971.
302. Levy MM, Joyner CJ, Virdi AS, Reed A, Triffitt JT, Simpson AH, Kenwright J, Stein H, Francis MJ. Osteoprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissue: an in vitro study. *Bone*, 2001, 29 : 317-322.
303. Wada MR, Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, Yasumoto S, Hashimoto N. Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development*, 2002, 129 : 2987-2995.
304. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC Jr. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*, 2001, 264 : 51-62.
305. Lennon DP, Caplan AI. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, 2006, 34 : 1604-1605.

306. Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittinger M. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften*, 2002, 89 : 338-351.
307. Van den Heuvel RL, Versele SR, Schoeters GE, Vanderborght OL. Stromal stem cells (CFU-f) in yolk sac, liver, spleen and bone marrow of pre- and postnatal mice. *Br J Haematol*, 1987, 66 : 15-20.
308. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*, 1998, 176 : 57-66.
309. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med*, 2001, 226 : 507-520.
310. Noël D, Djouad F, Jorgense C. Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002, 3 : 1000-1004.
311. Rezai N, Podor TJ, McManus BM. Bone marrow cells in the repair and modulation of heart and blood vessels: emerging opportunities in native and engineered tissue and biomechanical materials. *Artif Organs*, 2004, 28 : 142-151.
312. Roberts I. Mesenchymal stem cells. *Vox Sang*, 2004, 87 : 38-41.
313. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*, 2004, 32 : 414-425.
314. Phinney DG. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem Suppl*, 2002, 38 : 7-12.
315. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36 : 568-584.
316. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 265 : 134-139.
317. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, Barry FP. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res*, 1998, 13 : 655-663.
318. Simmons PJ, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood*, 1991, 78 : 2848-2853.

319. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*, 2003, 10 : 228-241.
320. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*, 2003, 116 : 1827-1835.
321. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 13 : 201-206.
322. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 2003, 107 : 1164-1169.
323. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*, 1997, 6 : 125-134.
324. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*, 2000, 28 : 875-884.
325. Carlo-Stella C, Mangoni L, Rizzoli V. Biology and clinical applications of long-term bone marrow cultures. *Int J Artif Organs*, 1993, 16 : 76-79.
326. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, 1997, 64 : 295-312.
327. Long MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis*, 2001, 27 : 677-690.
328. Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D, Gazit Z. Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells*, 2006, 24 : 1728-1737.
329. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*, 1998, 80 : 1745-1757.
330. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 1994, 76 : 579-592.

331. Rogers JJ, Young HE, Adkison LR, Lucas PA, Black AC Jr. Differentiation factors induce expression of muscle, fat, cartilage, and bone in a clone of mouse pluripotent mesenchymal stem cells. *Am Surg*, 1995, 61 : 231-236.
332. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*, 1998, 238 : 265-272.
333. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*, 1998, 16 : 406-413.
334. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 1995, 18 : 1417-1426.
335. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, 2004, 22 : 377-384.
336. Kashiwakura Y, Katoh Y, Tamayose K, Konishi H, Takaya N, Yuhara S, Yamada M, Sugimoto K, Daida H. Isolation of bone marrow stromal cell-derived smooth muscle cells by a human SM22alpha promoter: in vitro differentiation of putative smooth muscle progenitor cells of bone marrow. *Circulation*, 2003, 107 : 2078-2081.
337. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997, 276 : 71-74.
338. Gartner S, Kaplan HS. Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980, 77 : 4756-4759.
339. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97 : 3213-3218.
340. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 2001, 19 : 180-192.
341. Anklesaria P, Kase K, Glowacki J, Holland CA, Sakakeeny MA, Wright JA, FitzGerald TJ, Lee CY, Greenberger JS. Engraftment of a clonal bone marrow stromal cell line in vivo stimulates hematopoietic recovery from total body irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84 : 7681-7685.
342. Nolta JA, Hanley MB, Kohn DB. Sustained human hematopoiesis in immunodeficient mice by cotransplantation of marrow stroma expressing human interleukin-3: analysis of gene transduction of long-lived progenitors. *Blood*, 1994, 83 : 3041-3051.

343. Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, Zanjani ED. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood*, 2000, 95 : 3620-3627.
344. Bulabois CE, Yerly-Motta V, Mortensen BT, Fixe P, Remy-Martin JP, Hervé P, Tiberghien P, Charbord P. Retroviral-mediated marker gene transfer in hematopoiesis-supportive marrow stromal cells. *J Hematother*, 1998, 7 : 225-239.
345. Brouard N, Chapel A, Thierry D, Charbord P, Péault B. Transplantation of gene-modified human bone marrow stromal cells into mouse-human bone chimeras. *J Hematother Stem Cell Res*, 2000, 9 : 175-181.
346. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96 : 10711-10716.
347. Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML, Laywell ED. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells*, 2006, 24 : 1054-1064.
348. Deng W, Han Q, Liao L, Li C, Ge W, Zhao Z, You S, Deng H, Murad F, Zhao RC. Engrafted bone marrow-derived flk-(1+) mesenchymal stem cells regenerate skin tissue. *Tissue Eng*, 2005, 11 : 110-119.
349. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res*, 1999, 14 : 700-709.
350. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci*, 1992, 102 : 341-351.
351. Justesen J, Stenderup K, Eriksen EF, Kassem M. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif Tissue Int*, 2002, 71 : 36-44.
352. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2004, 95 : 209-214.
353. Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res*, 1996, 11 : 312-324.

354. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem*, 1999, 72 : 570-585.
355. Clark BR, Keating A. Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, 770 : 70-78.
356. Galmiche MC, Koteliansky VE, Brière J, Hervé P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*, 1993, 82 : 66-76.
357. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002, 99 : 3838-3843.
358. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*, 2002, 30 : 42-48.
359. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*, 2003, 57 : 11-20.
360. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 2003, 75 : 389-397.
361. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 2003, 101 : 3722-3729.
362. Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, Koç ON. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant*, 2004, 33 : 597-604.
363. Bhatia R, Hare JM. Mesenchymal stem cells: future source for reparative medicine. *Congest Heart Fail*, 2005, 11 : 87-91.
364. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor

- cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92 : 4857-4861.
365. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*, 2001, 414 : 118-121.
366. Leo AJ, Grande DA. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Engineering. *Cells Tissues Organs*, 2006, 183 : 112-122.
367. Tang J, Xie Q, Pan G, Wang J, Wang M. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2006, 30 : 353-361.
368. Zhang SJ, Zhang H, Hou M, Zheng Z, Zhou J, Su W, Wei Y, Hu S. Is it possible to obtain "true endothelial progenitor cells" by in vitro culture of bone marrow mononuclear cells? *Stem Cells Dev*, 2007, 16 : 683-690.
369. Wijelath ES, Rahman S, Murray J, Patel Y, Savidge G, Sobel M. Fibronectin promotes VEGF-induced CD34 cell differentiation into endothelial cells. *J Vasc Surg*, 2004, 39 : 655-660.
370. Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, Miyazono K, Yamashita JK, Obi S, Ohura N, Matsushita A, Kamiya A, Ando J. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288 : 1915-1924.
371. Wang H, Riha GM, Yan S, Li M, Chai H, Yang H, Yao Q, Chen C. Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 : 1817-1823.
372. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 2001, 98 : 2615-2625.
373. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 1998, 92 : 362-367.
374. Wu H, Riha GM, Yang H, Li M, Yao Q, Chen C. Differentiation and proliferation of endothelial progenitor cells from canine peripheral blood mononuclear cells. *J Surg Res*, 2005, 126 : 193-198.
375. Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, Qian H, Zhang X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*, 2006, 30 : 681-687.

376. Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin'oka T, Ikada Y, Kurosawa H. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. *Circulation*, 2003, 108 : 1729-1734.
377. Al-Khaldi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75 : 204-209.
378. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332 : 370-379.
379. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*, 2007, 25 : 2648-2659.
380. Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Hervé P, Etievent JP, Kantelip JP. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation*, 2003, 108 : 253-258.
381. Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, Cheng L, Liu M, Shi J, Yang YZ, Pan C, Ge J, Phillips MI. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept*, 2004, 117 : 3-10.
382. Shyu KG, Wang BW, Hung HF, Chang CC, Shih DT. Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial performance in the mouse model of acute myocardial infarction. *J Biomed Sci*, 2006, 13 : 47-58.
383. Cho SW, Park HJ, Ryu JH, Kim SH, Kim YH, Choi CY, Lee MJ, Kim JS, Jang IS, Kim DI, Kim BS. Vascular patches tissue-engineered with autologous bone marrow-derived cells and decellularized tissue matrices. *Biomaterials*, 2005, 26 : 1915-1924.
384. Cho SW, Jeon O, Lim JE, Gwak SJ, Kim SS, Choi CY, Kim DI, Kim BS. Preliminary experience with tissue engineering of a venous vascular patch by using bone marrow-derived cells and a hybrid biodegradable polymer scaffold. *J Vasc Surg*, 2006, 44 : 1329-1340.
385. Ballermann BJ, Dardik A, Eng E, Liu A. Shear stress and the endothelium. *Kidney Int Suppl*, 1998, 67 : 100-108.
386. Lehoux S, Tedgui A. Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J Biomech*, 2003, 36 : 631-643.

387. Gloe T, Sohn HY, Meininger GA, Pohl U. Shear stress-induced release of basic fibroblast growth factor from endothelial cells is mediated by matrix interaction via integrin $\alpha(v)\beta_3$. *J Biol Chem*, 2002, 277 : 23453-23458.
388. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*, 1995, 75 : 519-560.
389. Kakisis JD, Liapis CD, Sumpio BE. Effects of cyclic strain on vascular cells. *Endothelium*, 2004, 11 : 17-28.
390. Zhao S, Suciu A, Ziegler T, Moore JE Jr, Bürki E, Meister JJ, Brunner HR. Synergistic effects of fluid shear stress and cyclic circumferential stretch on vascular endothelial cell morphology and cytoskeleton. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15 : 1781-1786.
391. Ye C, Bai L, Yan ZQ, Wang YH, Jiang ZL. Shear stress and vascular smooth muscle cells promote endothelial differentiation of endothelial progenitor cells via activation of Akt. *Clin Biomech*, 2007, *in press*.
392. Marin V, Kaplanski G, Grès S, Farnarier C, Bongrand P. Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J Immunol Methods*, 2001, 254 : 183-190.
393. Rémy-Zolghadri M, Laganière J, Oligny JF, Germain L, Auger FA. Endothelium properties of a tissue-engineered blood vessel for small-diameter vascular reconstruction. *J Vasc Surg*, 2004, 39 : 613-620.
394. Marois Y, Sigot-Luizard MF, Guidoin R. Endothelial cell behavior on vascular prosthetic grafts: effect of polymer chemistry, surface structure, and surface treatment. *ASAIO J*, 1999, 45 : 272-280.
395. Boura C, thèse, Université Henri Poincaré, Nancy 1, 2003
396. Kerdjoudj H, thèse, Université Henri Poincaré, Nancy 1, 2007
397. Jessel N, Oulad-Abdelghani M, Meyer F, Lavallo P, Haïkel Y, Schaaf P, Voegel JC. Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 : 8618-8621.
398. Benkirane-Jessel N, Schwinté P, Falvey P, Darcy R, Haïkel Y, Schaaf P, Voegel JC, Ogier J. Build-up of Polypeptide Multilayer Coatings with Anti-Inflammatory Properties Based on the Embedding of Piroxicam-Cyclodextrin Complexes. *Adv Funct Mat*, 2004, 14 : 174-182.

399. Kerdjoudj H, Boura C, Moby V, Montagne K, Schaaf P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Re-endothelialization of human umbilical arteries treated with polyelectrolyte multilayers: a tool for damaged vessels replacement. *Adv Funct Mater*, 2007, 17 : 2667-2673.
400. Romero LI, Zhang DN, Herron GS, Karasek MA. Interleukin-1 induces major phenotypic changes in human skin microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol*, 1997, 173 : 84-92.
401. Sreerekha PR, Krishnan LK. Cultivation of endothelial progenitor cells on fibrin matrix and layering on dacron/polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Artif Organs*, 2006, 30 : 242-249.
402. Risbud MV, Bhonde MR, Bhonde RR. Effect of chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel on proliferation and cytokine expression of endothelial cells: implications in islet immunoisolation. *J Biomed Mater Res*, 2001, 57 : 300-305.
403. Yamamoto A, Mishima S, Maruyama N, Sumita M. Quantitative evaluation of cell attachment to glass, polystyrene, and fibronectin- or collagen-coated polystyrene by measurement of cell adhesive shear force and cell detachment energy. *J Biomed Mater Res*, 2000, 50 : 114-124.
404. Kanki-Horimoto S, Horimoto H, Mieno S, Kishida K, Watanabe F, Furuya E, Katsumata T. Synthetic vascular prosthesis impregnated with mesenchymal stem cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 2006, 114 : 327-330.
405. Balcells M, Edelman ER. Effect of pre-adsorbed proteins on attachment, proliferation, and function of endothelial cells. *J Cell Physiol*, 2002, 191 : 155-161.
406. Santini MT, Cametti C, Indovina PL, Morelli G, Donelli G. Polylysine induces changes in membrane electrical properties of K562 cells. *J Biomed Mater Res*, 1997, 35 : 165-174.
407. Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, Aschero S, Gammaitoni L, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem*, 2006, 97 : 744-54.
408. Müller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Müller KM, Kirkpatrick CJ. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. *Exp Mol Pathol*, 2002, 72 : 221-229.
409. Wessels H, Teal TH, Engel K, Sullivan CJ, Gallis B, Tran KB, Chitaley K. Fluid shear stress-induced nitric oxide production in human cavernosal endothelial cells: inhibition by hyperglycemia. *B J U Int*, 2006, 97 : 1047-1052.

410. Curran JM, Chen R, Hunt JA. Controlling the phenotype and function of mesenchymal stem cells in vitro by adhesion to silane-modified clean glass surfaces. *Biomaterials*, 2005, 26 : 7057-7067.
411. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J Jr, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science*, 1999, 283 : 83-87.
412. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*, 2003, 9 : 677-684.
413. Gang EJ, Jeong JA, Han S, Yan Q, Jeon CJ, Kim H. In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 2006, 8 : 215-227.
414. Wijelath ES, Murray J, Rahman S, Patel Y, Ishida A, Strand K, Aziz S, Cardona C, Hammond WP, Savidge GF, Rafii S, Sobel M. Novel vascular endothelial growth factor binding domains of fibronectin enhance vascular endothelial growth factor biological activity. *Circ Res*, 2002, 91 : 25-31.
415. Settleman J. Tension precedes commitment-even for a stem cell. *Mol Cell*, 2004, 14 : 148-150.
416. Estes BT, Gimble JM, Guilak F. Mechanical signals as regulators of stem cell fate. *Curr Top Dev Biol*, 2004, 60 : 91-126.
417. Simmons CA, Matlis S, Thornton AJ, Chen S, Wang CY, Mooney DJ. Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway. *J Biomech*, 2003, 36 : 1087-1096.
418. Tao J, Yang Z, Wang JM, Tu C, Pan SR. Effects of fluid shear stress on eNOS mRNA expression and NO production in human endothelial progenitor cells. *Cardiology*, 2006, 106, : 82-88.
419. Kurpinski K, Park J, Thakar RG, Li S. Regulation of vascular smooth muscle cells and mesenchymal stem cells by mechanical strain. *Mol Cell Biomech*, 2006, 3 : 21-34.
420. Park JS, Chu JS, Cheng C, Chen F, Chen D, Li S. Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 88 : 359-368.
421. Chen KD, Li YS, Kim M, Li S, Yuan S, Chien S, Shyy JY. Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J Biol Chem*, 1999, 274 : 18393-18400.

422. Kumar TR, Krishnan LK. Fibrin-mediated endothelial cell adhesion to vascular biomaterials resists shear stress due to flow. *J Mater Sci Mater Med*, 2002, 13 : 751-755.
423. Segers VF, Van Riet I, Andries LJ, Lemmens K, Demolder MJ, De Becker AJ, Kockx MM, De Keulenaer GW. Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290 : 1370-1377.
424. Riddle RC, Taylor AF, Genetos DC, Donahue HJ. MAP kinase and calcium signaling mediate fluid flow-induced human mesenchymal stem cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290 : 776-784.
425. Nerem RM. Vascular endothelial responses to shear stress. *Monogr Atheroscler*, 1990, 15 : 117-124.
426. Galbraith CG, Skalak R, Chien S. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1998, 40 : 317-330.
427. O'Cearbhaill ED, Punchard MA, Murphy M, Barry FP, McHugh PE, Barron V. Response of mesenchymal stem cells to the biomechanical environment of the endothelium on a flexible tubular silicone substrate. *Biomaterials*, 2008, *in press*.
428. Serini G, Ambrosi D, Giraudo E, Gamba A, Preziosi L, Bussolino F. Modeling the early stages of vascular network assembly. *EMBO J*, 2003, 22 : 1771-1779.
429. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Bae YC, Jung JS, Kim JH. Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth-muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. *J Cell Sci*, 2006, 119 : 4994-5005.
430. Schantz JT, Chim H, Whiteman M. Cell guidance in tissue engineering: SDF-1 mediates site-directed homing of mesenchymal stem cells within three-dimensional polycaprolactone scaffolds. *Tissue Eng*, 2007, 13 : 2615-2624.
431. Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Janowska-Wieczorek A. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*, 2006, 24 : 1254-1264.
432. Goette A, Jentsch-Ullrich K, Lendeckel U, Röcken C, Agbaria M, Auricchio A, Mohren M, Franke A, Klein HU. Effect of atrial fibrillation on hematopoietic progenitor cells: a novel pathophysiological role of the atrial natriuretic peptide? *Circulation*, 2003, 108 : 2446-2449.

433. Koç ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant*, 2001, 27 : 235-239.

Annexes

I - Annexe 1 : principe de l'immunofluorescence

➤ Immunofluorescence directe :

A la différence de l'immunofluorescence indirecte, l'anticorps spécifique du marqueur cellulaire est directement couplé à un fluorochrome.

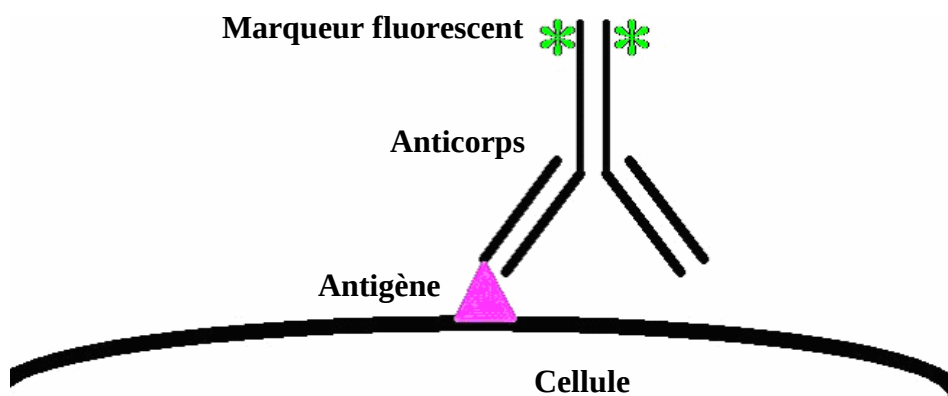


Schéma du principe d'immunofluorescence directe

➤ Immuno-fluorescence indirecte

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

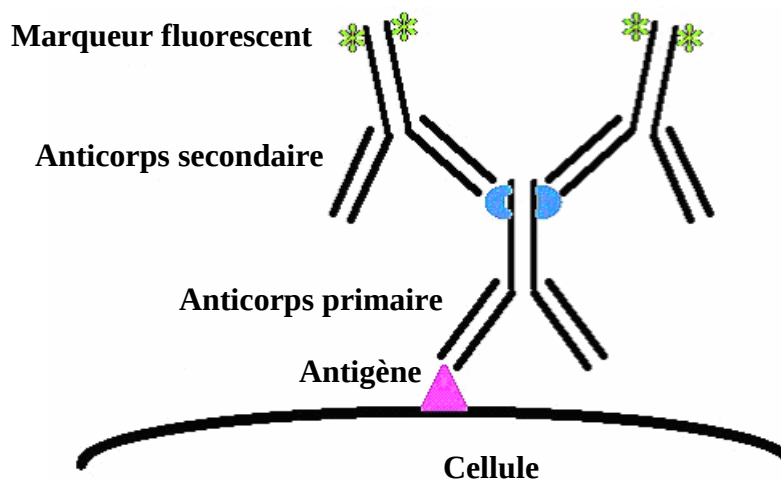


Schéma du principe d'immunofluorescence indirecte

II - Annexe 2 : principe de la cytométrie en flux

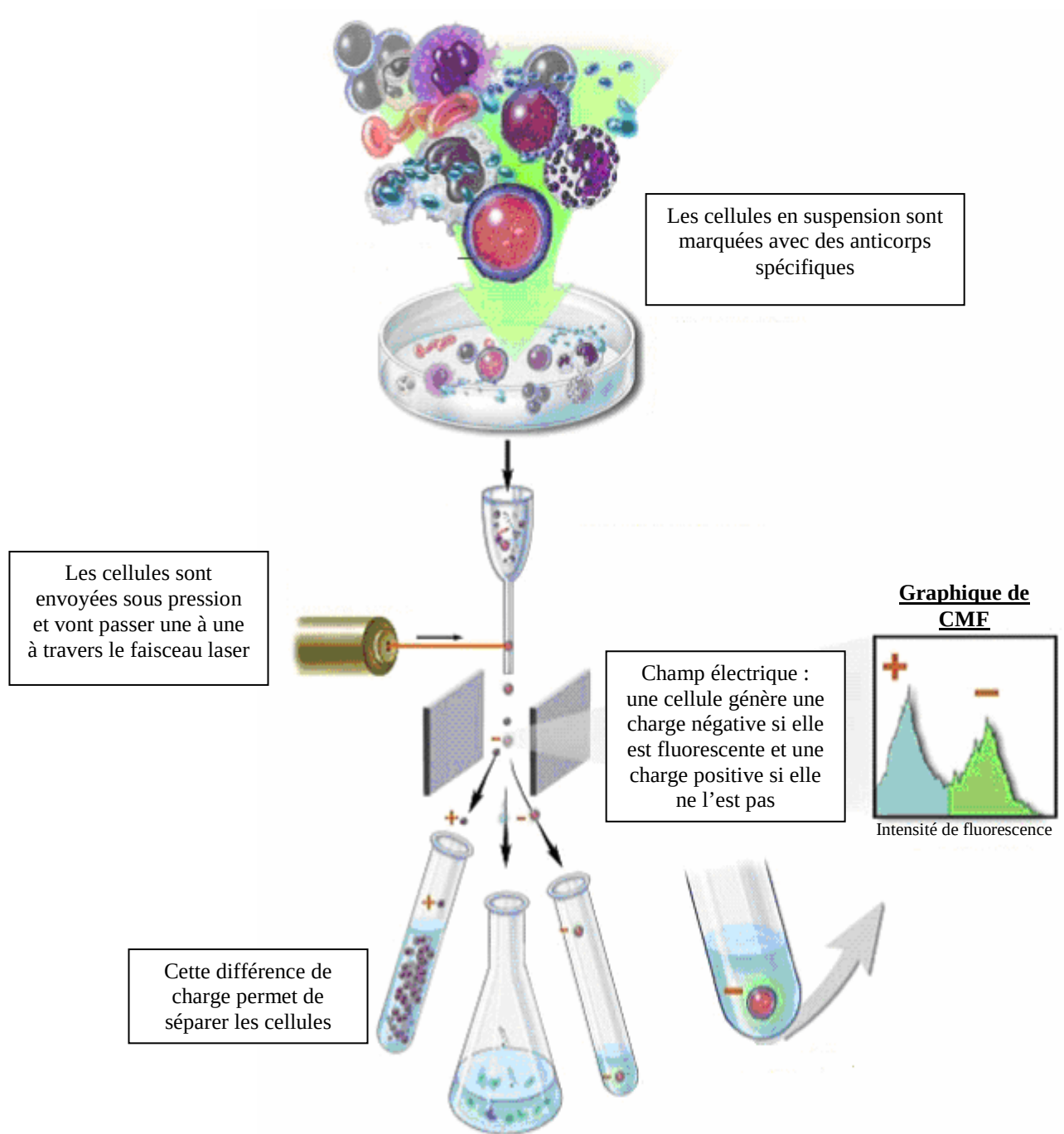
La cytométrie en flux est une technique permettant de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. La lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) permet de classer les populations suivant plusieurs critères et de les trier. La cytométrie en flux (CMF) est définie comme l'étude précise de particules isolées (cellules, bactéries, ...) entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser.

Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs :

- aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions des particules (taille, volume), à leur structure interne (granulosité) ou à l'autofluorescence de certaines cellules comme les végétaux, le phytoplancton, etc.
- aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur.

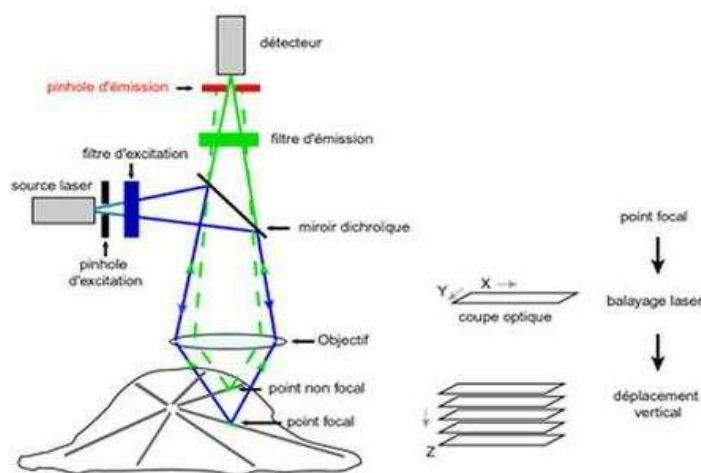
Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (un paramètre) ou de cytogrammes (deux paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.



Principe de la cytométrie en flux

III - Annexe 3 : principe de la microscopie confocale à balayage laser

Parmi les méthodes de microscopie à sectionnement optique qui permettent l'observation d'une cellule entière par coupes optiques successives horizontales selon l'axe optique vertical, la Microscopie Confocale à Balayage Laser (CLSM pour *Confocal Laser Scanning Microscope*) reste la technique de référence pour visualiser des échantillons biologiques en trois dimensions fournissant des images de haute résolution, en éliminant la lumière parasite. Selon les systèmes, l'illumination du spécimen par la lumière laser, ainsi que la détection du signal sont réduits à un point, grâce à l'utilisation d'un ou de deux diaphragme(s) de faible diamètre (« pinholes ») situé(s) dans les plans confocaux c'est-à-dire conjugués au plan de mise au point de l'objet. Ainsi, seule la lumière d'émission de fluorescence provenant du plan focal est collectée au niveau du détecteur (photomultiplicateur) pour constituer l'image. Le diamètre de la zone illuminée étant très petit, la constitution de l'image totale de l'objet nécessite de balayer le faisceau laser point par point sur l'objet à l'aide d'un système constitué de deux miroirs vibrants en x et en y (miroirs galvanométriques). Le déplacement selon l'axe vertical (en z) est réalisé grâce à une sur-platine (quartz piézo-électrique), faisant varier le plan de mise au point, ce qui permet d'obtenir une série de coupes optiques appelées séries Z et de constituer l'image. Ce microscope est constitué d'un microscope inversé (LEICA DMIRE2 HC Fluo TCS 1-B) associé à trois sources laser : argon (548, 476, 488 et 514 nm), Hélium-Néon 543 nm et Hélium Néon 633 nm.

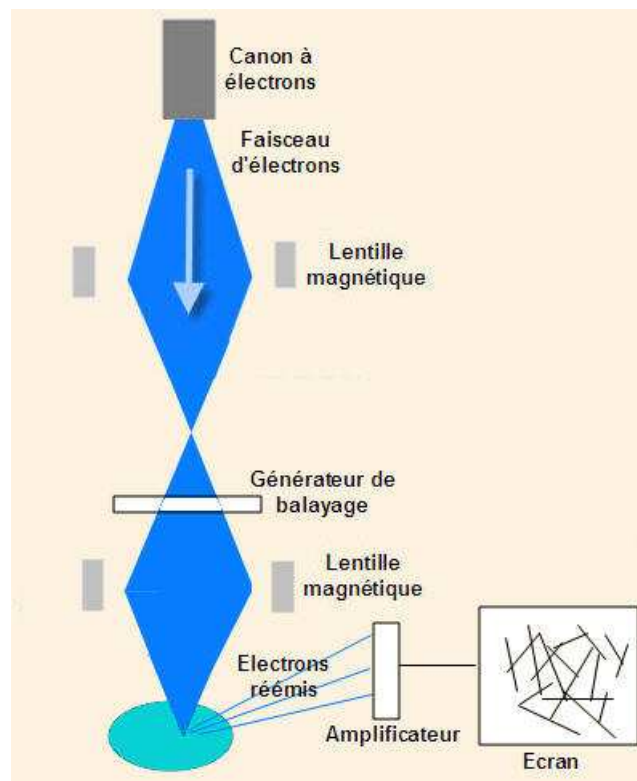


Principe de la microscopie confocale

(www.futura-sciences.com/img/principe_confocal.jpg)

IV - Annexe 4 : principe de la microscopie électronique à balayage laser

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour *Scanning Electron Microscopy*) est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons-matière. Un faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface.



Principe du Microscope électronique à balayage

Publications

Poly(styrenesulfonate)/Poly(allylamine) Multilayers: A Route To Favor Endothelial Cell Growth on Expanded Poly(tetrafluoroethylene) Vascular Grafts

Vanessa Moby,[†] Cédric Boura,[†] Halima Kerdjoudj,[†] Jean-Claude Voegel,[‡] Luc Marchal,[†] Dominique Dumas,[†] Pierre Schaaf,[§] Jean-François Stoltz,^{†||} and Patrick Menu^{*,†}

Mecanique et Ingenierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA-UMR CNRS 7563, Université Henri Poincaré - Nancy 1, Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-les-Nancy, France, INSERM UMR 595, Faculté de Chirurgie Dentaire, Université Louis Pasteur (ULP), 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Propre 22, Institut Charles Sadron, 6 rue Boussingault, 67085 Strasbourg Cedex, France, and Centre Hospitalier Universitaire Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, allée du Morvan, 54500 Vandœuvre-les-Nancy, France

Received March 28, 2007

Small-diameter synthetic vascular grafts of expanded poly(tetrafluoroethylene) (ePTFE) polymer concern one of the most common alternatives for the replacement of diseased vessels. However, high failure rates arise especially due to the lack of endothelial cells (ECs). EC seeding was developed to build a monolayer on the luminal surface. Because ECs show little or no adhesion on synthetic prostheses, it is necessary to promote their retention. On ePTFE surfaces we successfully deposited polyelectrolyte multilayer films (PMFs) consisting of poly(ethylenimine) (PEI), poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS), and poly(allylamine hydrochloride) (PAH) to obtain PEI-(PSS-PAH)₃ films. EC adhesion and spreading on modified ePTFE were assessed by scanning electron and confocal microscopies. Cell viability was evaluated by Alamar Blue assay. After 7 days of culture, the ePTFE modified with PMF exhibited improvements of EC viability as compared to that of the controls (nonmodified ePTFE) or even ePTFE coated by a PAH monolayer ($p < 0.05$). Moreover, the spreading of ECs was largely enhanced compared to that of the same controls, resulting in a healthy confluent cell monolayer formation. Positive staining for the von Willebrand factor confirmed the EC phenotype. Promoting EC attachment and function on ePTFE modified with PMFs could become in the future a promising treatment for synthetic small-diameter vascular grafts.

1. Introduction

Cardiovascular diseases, including coronary artery and peripheral vascular diseases, constitute major causes of mortality in both the United States and Europe. Their current treatment is bypass surgery, allowing the replacement of atherosclerotic domains of blood vessels. Autologous vascular grafts are the ideal vascular substitutes for the replacement of small-diameter vessels (internal diameter smaller than 5 mm).¹ However, often they cannot be used because of poor quality or inadequate size or length.^{2–3} For this reason, expanded poly(tetrafluoroethylene) (ePTFE) grafts have been developed as a synthetic alternative. However, such grafts are associated with high occlusion rates,^{4–5} in part due to the thrombogenicity of the graft inner surface resulting from a lack of a functional endothelial cell (EC) monolayer.^{2–4} This problem limits their use in current practice. To improve their long-term biocompatibility and hemocompatibility, it is necessary to recreate an internal environment similar to that found in native vessels.^{6–9} For such an objective, EC seeding and tissue engineering techniques have been previously developed.¹⁰ However, EC seeding on ePTFE has limited

success due to the existence of electrostatic repulsive interactions between the negatively charged ECs and the negatively charged graft material. For this reason, before cell seeding, the luminal surface of the graft has to be modified to promote EC adhesion and spreading^{11–12} on vascular prostheses. Because they are easy to carry out, biological coating techniques which use adhesion proteins were the first surface modifications prompted. Proteins (for example, collagen,¹³ heparin,¹ fibronectin,¹⁴ and fibrin glue^{8,10}) were chosen for their potentials to promote favorable interactions with the physiological environment and with the human body¹⁵ and to attract ECs. Nevertheless, such coatings led to limited improvements because the protein amount adsorbed on unmodified ePTFE is low. They can be desorbed and eventually lead to negative reactions (such as formation of thrombi in blood-contacting devices) and finally to clinical complications.¹⁶ Moreover, the use of proteins, especially those of xeno- and allogenic origin, is associated with the risk of pathogen transfer and immune reactions.¹⁷ Other approaches used an RGD peptide sequence¹⁸ or RGD-streptavidin³ to create specific interactions with integrin cell-surface receptors. The use of non-ligand-based techniques is another approach which has been proposed, such as photodischarge¹⁹ and plasma chemical vapor deposition.²⁰ It permits deposition of reactive groups onto polymer surfaces or a decrease of the protein adsorption (such as fibrinogen) on the surface. However, these techniques show a lack of specificity and poor control over protein orientation, and they alter the porosity and texture of

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +33-3-83-68-34-60. Fax: +33-3-83-68-34-59. E-mail: patrick.menu@medecine.uhp-nancy.fr.

[†] Université Henri Poincaré.

[‡] Université Louis Pasteur.

[§] Institut Charles Sadron.

^{||} Centre Hospitalier Universitaire Nancy.

vascular prosthesis surfaces. Recently, a technique of surface modification was developed by the alternate deposition of oppositely charged polyelectrolytes²¹ (layer-by-layer technique), which leads to the buildup of a polyelectrolyte multilayer film (PMF). This deposition method is simply based on electrostatic interactions between polyanions and polycations and on the excess of charges that appear on the top of the films (respectively positive and negative after polycation and polyanion deposition). The technique is of great simplicity and allows large possibilities in film property tuning such as film thickness, film structuration, surface roughness, wettability, and modification of viscoelastic properties.²² Scaffolds with an irregular shape and an inner structure can be successfully modified with this technique, whereas traditional methods are generally unavailable or at least difficult to use. Murphy et al.²³ recently used the PMF approach to build a membrane-mimetic film produced by the polymerization of a phospholipid assembly deposited on the top of an alginate/polylysine assembly. This biomimetic film type showed interesting properties in terms of blood compatibility.²⁴ We previously demonstrated on glass surfaces that PMFs terminated by poly(allylamine hydrochloride) (PAH) possess interesting properties in terms of initial cell adhesion and viability of ECs and that an interesting modified surface in terms of adhesion, viability, and growth concerns the PMF corresponding to poly(ethylenimine) (PEI)–(poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS)–PAH)₃.²⁵ Compared to a simple PAH layer, a film architecture constituted by three PSS/PAH layer pairs was found to increase importantly the adhesion properties of ECs. Moreover, such a number of PSS/PAH layer pairs appears to be sufficient to coat most of the underlying solid surface.²⁶

Thus, with the focus to prepare suitable small-diameter blood vessel substitutes, the aim of the present study was first to demonstrate the possibility of building up such a multilayered film on ePTFE and in particular inside an ePTFE tube. Second, we also wanted to investigate whether such a film improves the endothelialization of the inner ePTFE vascular graft and whether the cells on these surfaces keep their phenotype. This last point is of primary importance for future applications of such systems. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were used as a model for the endothelium. The cells were seeded on nonmodified ePTFE, on ePTFE modified with a PAH monolayer, and on ePTFE modified with a PEI–(PSS–PAH)₃ multilayer. Seeded ECs were characterized by von Willebrand factor (vWF) staining, scanning electron microscopy (SEM), and viability evaluation.

2. Materials and Methods

2.1. Modification of a Vascular Graft Polymer with a Polyelectrolyte Multilayer Film. Homemade patches of 9 mm diameter were prepared from thin-walled ePTFE graft polymer tubes (6 mm inner diameter, 25 μ m fibril length) and were glued in 48-well plates. Then, PMFs were constructed directly on the ePTFE within the wells. Thus, different polyelectrolyte solutions from Sigma-Aldrich (France) were prepared in 1 M NaCl solution (pH 6.5): at a concentration of 10 mg/mL for PEI (cationic, MW = 750 000) and 5 mg/mL for PSS (anionic, MW = 70 000) and PAH (cationic, MW = 70 000). The different polyelectrolyte solutions were incubated alternatively, and each individual polyelectrolyte adsorption was followed by three ultrapure water rinses. The alternated deposition procedure was pursued until a PEI–(PSS–PAH)₃ architecture as previously described²⁵ was obtained.

2.2. Visualization of the Polyelectrolyte Film by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). To visualize the buildup of the multilayer film on the ePTFE surface, PAH covalently coupled to rhodamine ($\lambda_{\text{excitation}} = 541$ nm, $\lambda_{\text{emission}} = 572$ nm; ICS, UPR 22 CNRS, Strasbourg, France) was used for the deposition of the outermost film

layer. The ePTFE patches, modified with this film, were observed using an SP2-AOBS Leica microscope (objective 40 $\times$, NA = 1.25; Germany).

2.3. Cell Culture and Seeding. HUVECs were isolated from fresh umbilical cords according to the method of Jaffe et al.²⁷ The cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂ in a 25 cm² tissue-culture-treated flask in complete medium. The medium consisted of an equal mixture of medium M199 and medium RPMI 1640, supplemented with 20% pooled human serum AB, 2 mM L-glutamin, 20 mM HEPES, 100 IU/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 2.5 mg/mL Fungizone. Confluent cultures at the second passage were used, and the cells were seeded at a density of 5×10^4 cells/cm² on ePTFE modified with PEI–(PSS–PAH)₃ PMF, on ePTFE modified with a PAH monolayer, on ePTFE, and on a tissue culture polystyrene surface (TCPS) used as a positive control. The media were replaced every 3 days.

2.4. Cell Viability. To measure cell viability, Alamar Blue redox assay (Serotec Ltd., Kidlington, Oxford, England) was used. ECs were seeded on the surface for 1, 3, or 7 days. These periods of time were chosen because we investigated endothelial growth on PMFs deposited on glass at identical contact times. Moreover, it appeared in the same study that the cell growth became less important after 7 days of culture.²⁸ At the set time, the medium was removed and the ECs were washed with DMEM (Dulbecco's medium without red phenol, Gibco BRL, France). Then, Alamar Blue reagent dissolved in DMEM at 10% was added to each well. After 3 h of incubation at 37 °C, the solution was removed and the color change, due to the mitochondrial activity, was measured by monitoring the absorbance with a spectrophotometer (Beckman DU640) at wavelengths of 570 and 630 nm. The optical density difference $OD = OD_{570\text{ nm}} - OD_{630\text{ nm}}$ was calculated to estimate the metabolic activity of the cells.²⁹ Wells without cells were used as a reference.

2.5. Cell Morphology. The morphology of ECs was analyzed after 7 days of culture by SEM. Thus, the seeded grafts were fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.4 overnight at 4 °C. After a short rinse in 30% ethanol (Sigma, France), the specimens went through a series of ethanol solution (30%, 50%, and 70%) at 10 min intervals for dehydration. The dehydrated specimens were treated in hexamethyldisilazane (Sigma, France) and dried under the hood. They were fixed on aluminum pieces with colloidal carbon and subsequently coated with a 5–10 nm layer of gold–palladium in a Polaron SC 7640 sputter coater. Finally, the specimens were examined with a scanning electron microscope (Autoscan S 240, Cambridge, U.K.) at 20 kV, at six magnifications (112 $\times$, 149 $\times$, 169 $\times$, 503 $\times$, 508 $\times$, and 513 $\times$), to evaluate the characteristics of the graft surface, such as the cell distribution, the cell density, and cell spreading.

2.6. Characterization of Endothelial Cells. The phenotype of the ECs was evaluated by the expression of the vWF by confocal microscopy. To visualize each cell, the nuclei were stained with propidium iodide (PI).

After 7 days of culture, the ECs were washed with DMEM at 37 °C. The cells were immediately fixed with 1% paraformaldehyde (PAF; w/v in PBS (phosphate-buffered saline)) at 37 °C, then permeabilized in the presence of 0.5% Triton X-100 (v/v in PBS, Sigma, France), and incubated for 45 min with 1/50 diluted monoclonal mouse anti-human vWF (clone F8/86, Dako, Trappes, France) in 0.1% Triton. The cells were washed with DMEM to remove the excess of antibody and were incubated for 30 min at room temperature with 1/100 diluted polyclonal goat anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Oregon) in DMEM. An isotype control was prepared in the same conditions. The cells were incubated for 30 min with 1/100 diluted PI (Molecular Probes) in DMEM. Fluorescently labeled cells were visualized with a confocal laser scanning microscope using a 40 $\times$ objective and a He–Ne laser for 543 nm excitation (PI) and an Ar laser for 488 nm excitation (vWF).

2.7. Statistical Analysis. All data are presented in this study as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) for each substrate ($n = 9$).

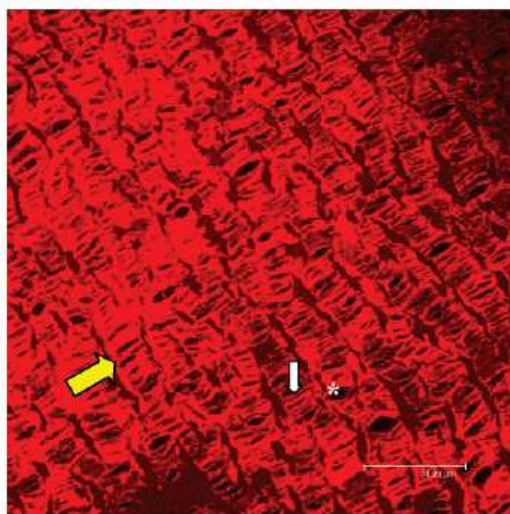


Figure 1. Visualization of the PMF deposited on ePTFE patches by using PAH covalently coupled to Rhodamine (PAH^{Rho}). The observed architecture corresponds to PEI-(PSS-PAH)₂-PSS-PAH^{Rho}. Scale bar 74.21 μ m. The white arrow corresponds to the microfibrils or to the distance between two nodes and the yellow arrow to the nodes. The pore size is expressed as the length of the microfibrils. The asterisk corresponds to the pore.

One-factor ANOVA with PLSD Fisher correction (Statview IVs, Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA) was used for data analysis. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and Discussion

ePTFE vascular grafts are the most common small-diameter vascular synthetic prostheses used nowadays.³⁰ They are constituted by expanded PTFE polymer, which is chemically inert, and present a unique microporous wall structure (as we can see in Figure 1). They also possess highly flexible mechanical properties. However, these prostheses have a hydrophobic and negative surface that limits negatively charged EC adhesion and finally often leads to graft failure. For this reason, several investigators tried to improve the patency of this synthetic vascular substitute through the development of an EC monolayer on the lumen of the grafts before implantation. In the current study, we evaluated the possibility of modifying ePTFE with a PMF to build a biocompatible surface for ECs and thus confer antithrombogenicity to the vascular grafts. Indeed, the PMFs present interesting properties in terms of adhesion and viability of ECs as previously demonstrated on glass surfaces.³¹ However, the properties found on glass cannot simply be extrapolated to ePTFE due to the difficulty of modifying such surfaces. The chosen PMF buildup is easy to carry out and does not need initiators or an energy supply to start the deposition process. The selected polyelectrolytes are also water-soluble, and the physicochemical properties of the PMF can be modified as needed by changing the preparation conditions (number of layers deposited, polyelectrolytes used, ionic strength, pH, ...).³² PEI was chosen as the first initiating layer because of its ability to strongly adsorb to a substrate surface such as ePTFE and to render the structure of the films more uniform.³³ The regular and homogeneous deposition of the PMF on the luminal surface of ePTFE is an important parameter to consider for cell adhesion. The PEI-(PSS-PAH)₃ PMF has been well characterized on glass surfaces by different

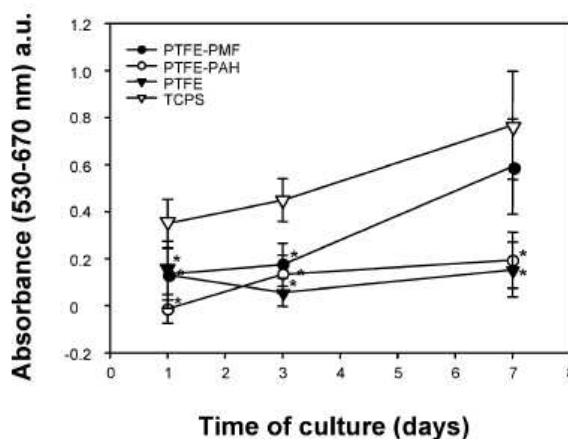


Figure 2. Viability of HUVECs seeded on ePTFE-PEI-(PSS-PAH)₃, ePTFE-PAH, ePTFE, and TCPS, after 1, 3, and 7 days of culture, tested by Alamar Blue assay (incubation time 3 h). An asterisk indicates $p < 0.05$ versus TCPS, $n = 9$.

techniques (quartz microbalance, optical waveguide light-mode spectroscopy, or atomic force microscopy).²⁵ The techniques usually used to characterize the PMF apply only for flat surfaces and cannot be used in the present case due to the porosity, opacity, shape, and texture of the polymer. The PMF deposited on the vascular graft luminal surface was thus characterized by means of confocal microscopy. This was possible by ending the film with a Rhodamine-labeled PAH (PAH^{Rho}) layer instead of a PAH layer. Figure 1 shows a typical image of a film of PEI-(PSS-PAH)₂-PSS-PAH^{Rho}. The fluorescence was distributed in a homogeneous manner over the entire surface, suggesting that the film was deposited uniformly (at least at the optical scale) over the whole luminal synthetic surface. Moreover, PMFs, a few tens of nanometers thick, do not reduce the cross-section of vascular grafts contrary to the fibrin glue coating, which presents fibrin deposits in some cases up to 0.8 mm thick.¹¹

It is also essential that the ECs adhere and remain viable on the polymer surface. Indeed, ECs seeded on nonmodified ePTFE cannot adhere due to its highly hydrophobic nature and negative charge.³⁴ The viability of cells seeded on tissue culture polystyrene surfaces, ePTFE, and ePTFE modified with a PMF or a PAH monolayer is presented in Figure 2. After 1 day of culture on the ePTFE surfaces, no real detectable metabolic activity was observed whatever the tested surface. After 3 days of culture, a significant increase of cell metabolic activity was measured only on the tissue culture polystyrene surface (0.45 ± 0.09 , $p < 0.0001$). On ePTFE surfaces, the metabolic activity remained equal to the value of day 1. After 7 days of culture, the values of the cell metabolic activity observed on ePTFE modified with PMF (0.59 ± 0.20) were not different from those on tissue culture polystyrene surfaces (0.76 ± 0.23 , $p = 0.0808$). On the contrary, for the same culture time, the values of the metabolic activity of cells on nonmodified ePTFE or on ePTFE modified with a PAH monolayer were significantly smaller than those for ePTFE modified with PMF (0.15 ± 0.11 , $p < 0.0001$, and 0.19 ± 0.11 , $p = 0.0003$, respectively). It appears, thus, that the cells started to proliferate on ePTFE modified with PMF after 3 days of culture and grew to a dense confluent cell layer within 7 days. It can be equally noted that only a low density of cells (5×10^4 cells/cm²) was required to obtain the formation of a confluent cell monolayer. On the contrary, it was found that the modification of ePTFE with only a PAH monolayer is

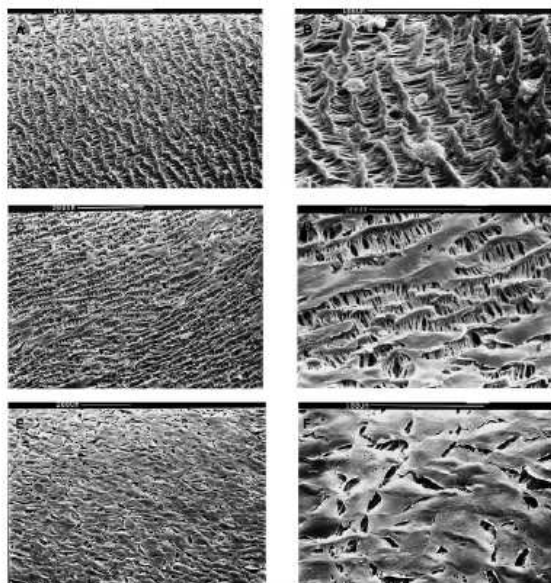


Figure 3. Scanning electron micrographs of the luminal surface of nonmodified ePTFE patches (A, D) and ePTFE patches modified with a PAH monolayer (B, E) and a PEI-(PSS-PAH)₃ PMF (C, F). All the surfaces were cultivated for 7 days with HUVECs (original magnification 169× (A), 508× (B), 149× (C), 503× (D), 112× (E), and 513× (F)).

not sufficient to reach a similar cell viability after an identical culture period. A comparable observation was made for a PAH monolayer deposited on glass.³¹ This also illustrates the efficiency of PMF coatings on the ePTFE surface.

The scanning electron micrographs taken of the luminal surface of ePTFE vascular prosthesis samples after a 7 day EC culture period exhibited a typical node-fibril organization, indicating that the surface modification does not seem to alter the ePTFE microstructure as confirmed by confocal microscopy. The observations of nonmodified samples (control grafts) revealed that only a few cells were present, but with a rounded aspect, a sign of cell suffering (Figure 3A,B). In the same way, ePTFE modified with a PAH monolayer presented some rare flattened cells (Figure 3C,D). On the contrary, the samples modified with PMF showed a great number of cells which adhered and spread on the ePTFE surface after 7 days of culture. They constitute a confluent cell monolayer (Figure 3E). The cell density was sometimes so high that it was difficult to differentiate the cells from one another, as previously described by Bowlin et al.³⁵ However, the cells were in general homogeneously distributed and presented a cobblestone shape (Figure 3F), which is a typical morphology of healthy endothelial cells. The cell densities observed by scanning electron microscopy also confirmed the viability values previously determined with Alamar Blue assay.

In addition, it is known that the adhesion surface can influence the cell phenotype after several days of culture. The vWF, which is an adhesive glycoprotein synthesized exclusively in vascular ECs and megakaryocytes, is widely used as a phenotype marker of ECs.³⁶ The balance of hemostasis and thrombosis in the cardiovascular system is directly affected by the EC function. We observed by confocal microscopy positive fluorescent labeling of ECs with an antibody specific for vWF on ePTFE modified with PMF (Figure 4). In this case, all cells expressed vWF and then exhibited this endothelial characteristic after 7

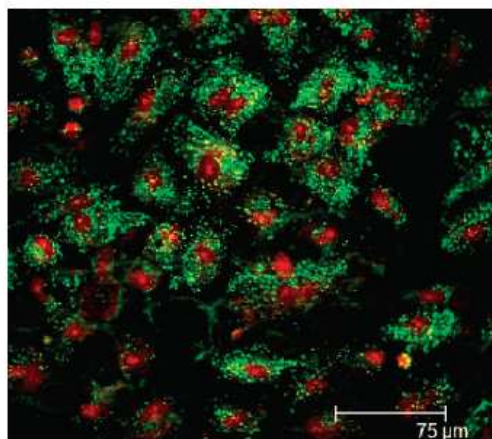


Figure 4. Visualization of the von Willebrand factor (green) and nuclei (red) of HUVECs seeded on ePTFE patches modified with PEI-(PSS-PAH)₃ after 7 days of culture. The von Willebrand factor was visualized using Alexa Fluor 488 fluorochrome (λ_{ex} = 494 nm, λ_{em} = 517 nm). Nuclei were labeled with propidium iodide (λ_{ex} = 536 nm, λ_{em} = 617 nm). Scale bar 75 μ m, objective 40×.

days of culture. No cells were detected for the expression of vWF on nonmodified ePTFE or ePTFE modified with a PAH monolayer (data not shown).

The confocal microscopy observations prove the absence of dedifferentiation. This suggests that ECs seeded on ePTFE modified with a PMF keep their endothelial functionality, which is essential for the use of this type of material for vascular grafts. The persistence of differentiation and functionality of EC cells seeded on ePTFE modified with PMF is in accordance with results obtained with such a PMF type deposited on glass.³¹ More sophisticated architectures could be built to get biofunctionalized films by means of peptide,³⁷ drug,³⁸ growth factor,³⁹ or DNA⁴⁰ embedding. Even if the functionalization is often realized with films made of hyaluronic acid or polyglutamic acid and polylysine, which are in general weakly adherent for cells, their adhering properties can be improved by capping such films by a few PSS/PAH layers. Such a capping allows functionalization and good cellular adherence.⁴¹ Finally, all these architectures can be seeded by ECs and represent an extremely promising route to achieve antithrombogenic vascular prostheses.

4. Conclusion

This study demonstrates for the first time to our knowledge that the luminal surface of expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular grafts can be modified with a PMF, made of PSS and PAH, to improve the adhesion and viability of human ECs. Rapidly, ECs form a confluent cell monolayer when they are seeded on ePTFE modified with a PEI-(PSS-PAH)₃ PMF. Moreover, these cells keep their endothelial phenotype after several days of culture. These results confirm the versatility of our system, which can be used to modify ePTFE vascular grafts. The concept would probably also hold more generally for other biomaterial surfaces.

Acknowledgment. We are very grateful to the staff of the Obstetric Department of Nancy Maternity Hospital for providing umbilical cords. This work was partly supported by region de

Lorraine (PRST Bioengineering) and the Association de la Recherche contre le Cancer (ARC).

References and Notes

- (1) Heyligers, J. M.; Verhagen, H. J.; Rotmans, J. I.; Weeterings, C.; de Groot, P. G.; Moll, F. L.; Lisman, T. *J. Vasc. Surg.* **2006**, *43*, 587–591.
- (2) Yow, K. H.; Ingram, J.; Korossis, S. A.; Ingham, E.; Homer-Vanniasinkam, S. H. *Br. J. Surg.* **2006**, *93*, 652–661.
- (3) Chan, B. P.; Liu, W.; Klitzman, B.; Reichert, W. M.; Truskey, G. A. *J. Biomed. Mater. Res., B: Appl. Biomater.* **2005**, *72*, 52–63.
- (4) Tilanus, H. W.; Obertop, H.; Van Urk, H. *Ann. Surg.* **1985**, *202*, 780–782.
- (5) Larsen, C. C.; Kligman, F.; Kottke-Marchant, K.; Marchant, R. E. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4846–4855.
- (6) Vara, D. S.; Salacinski, H. J.; Kannan, R. Y.; Bordenave, L.; Hamilton, G.; Seifalian, A. M. *Pathol. Biol.* **2005**, *53*, 599–612.
- (7) Liu, Y.; He, T.; Gao, C. *Colloids Surf., B: Biointerfaces* **2005**, *46*, 117–126.
- (8) Vinard, E.; Leseche, G.; Andreassian, B.; Costagliola, D. *Ann. Vasc. Surg.* **1999**, *13*, 141–150.
- (9) Ahlswede, K. M.; Williams, S. K. *Arterioscler. Thromb.* **1994**, *14*, 25–31.
- (10) Laube, H. R.; Duwe, J.; Rutsch, W.; Konertz, W. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2000**, *120*, 134–141.
- (11) Fernandez, P.; Deguet, A.; Pothuau, L.; Belleanne, G.; Coste, P.; Bordenave, L. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5042–5047.
- (12) Meinhardt, J. G.; Deutsch, M.; Fischlein, T.; Howanietz, N.; Froschl, A.; Zilla, P. *Ann. Thorac. Surg.* **2001**, *71*, S327–331.
- (13) Itoh, H.; Aso, Y.; Furuse, M.; Noishiki, Y.; Miyata, T. *Artif. Organs* **2001**, *25*, 213–217.
- (14) Rademacher, A.; Paulitschke, M.; Meyer, R.; Hetzer, R. *Int. J. Artif. Organs* **2001**, *24*, 235–242.
- (15) Sefton, M. V.; Sawyer, A.; Gorbet, M.; Black, J. P.; Cheng, E.; Gemmell, C.; Pottinger-Cooper, E. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *55*, 447–459.
- (16) Chevallier, P.; Janvier, R.; Mantovani, D.; Laroche, G. *Macromol. Biosci.* **2005**, *5*, 829–839.
- (17) Bacakova, L.; Mares, V.; Bottone, M. G.; Pellicciari, C.; Lisa, V.; Svorcik, V. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *49*, 369–379.
- (18) Walluscheck, K. P.; Steinhoff, G.; Kelm, S.; Haverich, A. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **1996**, *12*, 321–330.
- (19) Gumpenberger, T.; Heitz, J.; Bauerle, D.; Kahr, H.; Graz, I.; Romanin, C.; Svorcik, V.; Leisch, F. *Biomaterials* **2003**, *24*, 5139–5144.
- (20) Manso, M.; Rossini, P.; Malerba, I.; Valsesia, A.; Gribaldo, L.; Ceccone, G.; Rossi, F. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2004**, *15*, 161–172.
- (21) Decher, G. *Science* **1997**, *277*, 1232–1237.
- (22) Izquierdo, A.; Ono, S. S.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Decher, G. *Langmuir* **2005**, *21*, 7558–7567.
- (23) Murphy, M. R.; Faucher, K. M.; Sun, X. L.; Chaikof, E. L.; Dluhy, R. A. *Colloids Surf., B: Biointerfaces* **2005**, *46*, 226–232.
- (24) Jordan, S. W.; Faucher, K. M.; Caves, J. M.; Apkarian, R. P.; Rele, S. S.; Sun, X. L.; Hanson, S. R.; Chaikof, E. L. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3473–3481.
- (25) Boura, C.; Menu, P.; Payan, E.; Picart, C.; Voegel, J. C.; Muller, S.; Stoltz, J. F. *Biomaterials* **2003**, *24*, 3521–3530.
- (26) Lavallo, P.; Gergely, C.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Picart, C. *Macromolecules* **2002**, *35*, 4458–4465.
- (27) Jaffe, E. A.; Nachman, R. L.; Becher, C. G.; Minick, C. R. *J. Clin. Invest.* **1973**, *52*, 2745–2756.
- (28) Boura, C.; Muller, S.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Stoltz, J. F.; Menu, P. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2005**, *33*, 269–275.
- (29) Seifalian, A. M.; Salacinski, H. J.; Punshon, G.; Krijgsman, B.; Hamilton, G. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *55*, 637–644.
- (30) Shimada, T.; Nishibe, T.; Miura, H.; Hazama, K.; Kato, H.; Kudo, F.; Murashita, T.; Okuda, Y. *Surg. Today* **2004**, *34*, 1025–1030.
- (31) Boura, C.; Muller, S.; Vautier, D.; Dumas, D.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Stoltz, J. F.; Menu, P. *Biomaterials* **2005**, *26*, 4568–4575.
- (32) Shiratori, S. S.; Rubner, M. F. *Macromolecules* **2000**, *33*, 4213–4219.
- (33) Kolasinska, M.; Warszynski, P. *Bioelectrochemistry* **2005**, *66*, 65–70.
- (34) Tseng, D. Y.; Edelman, E. R. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *42*, 188–198.
- (35) Bowlin, G. L.; Rittgers, S. E.; Milsted, A.; Schmidt, S. P. *J. Vasc. Surg.* **1998**, *27*, 504–511.
- (36) Muller, A. M.; Hermanns, M. I.; Skrzynski, C.; Nesslinger, M.; Muller, K. M.; Kirkpatrick, C. J. *Exp. Mol. Pathol.* **2002**, *72*, 221–229.
- (37) Benkirane-Jessel, N.; Lavallo, P.; Meyer, F.; Audouin, F.; Frisch, B.; Schaaf, P.; Ogier, J.; Decher, G.; Voegel, J. C. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1507–1511.
- (38) Benkirane-Jessel, N.; Schwinté, P.; Falvey, P.; Darcy, R.; Haikel, Y.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Ogier, J. *Adv. Funct. Mater.* **2004**, *14*, 174–182.
- (39) Benkirane-Jessel, N.; Lavallo, P.; Hubsch, E.; Holl, V.; Senger, B.; Haikel, Y.; Voegel, J. C.; Ogier, J.; Schaaf, P. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 648–654.
- (40) Jessel, N.; Oulad-Abdelghani, M.; Meyer, F.; Lavallo, P.; Haikel, Y.; Schaaf, P.; Voegel, J. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 8618–8621.
- (41) Vodouhe, C.; Le Guen, E.; Garza, J. M.; Francius, G.; Dejuguat, C.; Ogier, J.; Schaaf, P.; Voegel, J. C.; Lavallo, P. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4149–4156.

BM070348N

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

Halima Kerdjoudj^{a,*,**}, Vanessa Moby^{a,*,**}, Nicolas Berthelemy^a, Monique Gentils^a,
Cédric Boura^a, Laurence Bordenave^b, Jean-François Stoltz^a and Patrick Menu^a

^a*Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA-UMR 7563, IFR 111, Faculté de Médecine
Université Henry Poincaré, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

^b*INSERM U577, Bordeaux, F-33076 France, Université Victor Segalen, Bordeaux 2,
Bordeaux F33076, France*

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

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

1. Introduction

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

The most usual alternative to autologous grafts is the use of synthetic vascular grafts. The two principal polymeric graft materials, which are used in vascular reconstructions, are expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) and woven polyethylene terephthalate (PET). These synthetic grafts are used with success in the replacement of high flow vessel with an internal diameter up than 6 mm [2]. However, the performance and the patency rate of small-diameter synthetic grafts are suboptimal [1]. The low patency of such polymeric materials is principally due to the thrombogenicity of their luminal surface and their

*Both authors contributed equally to this work.

** Corresponding authors: H. Kerdjoudj and V. Moby, Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Faculté de Médecine Université Henri Poincaré, Nancy 1, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 3 83 68 34 67, Fax: + 33 3 83 68 34 59; E-mail: halima.kerdjoudj@medecine.uhp-nancy.fr, vanessa.moby@medecine.uhp-nancy.fr.

poor mechanical characteristics in term of compliance [3,4]. In the same way, cryopreserved arterial segments from human tissue banks provide a new option of increasing interest in the search for arterial substitutes that can be used in vascular reconstructive procedures [5,6]. Cryopreservation provides the only prospect for long term preservation of arteries and veins. This approach has been studied extensively in a number of species using both *in vitro* and *in vivo* techniques [8,9]. Unfortunately, a significant number of these studies have limited value, either because they failed to describe the cryopreservation protocol used or because they involve procedures that are now known to be extremely damaging to cells and tissues [9–11].

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

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

2. Scaffolds

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

2.1. Synthetic scaffolds

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

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

The nonbiodegradable synthetic polymers are represented by ePTFE, PET and PU. ePTFE permits vessel ingrowth through its pores and induces little inflammatory [24]. However they exhibit poor compliance, high hydrophobicity that limits an endothelium formation. PU grafts have similar compliance to native arteries and a surface that promotes endothelial cell seeding [25,26]. However, they have variable

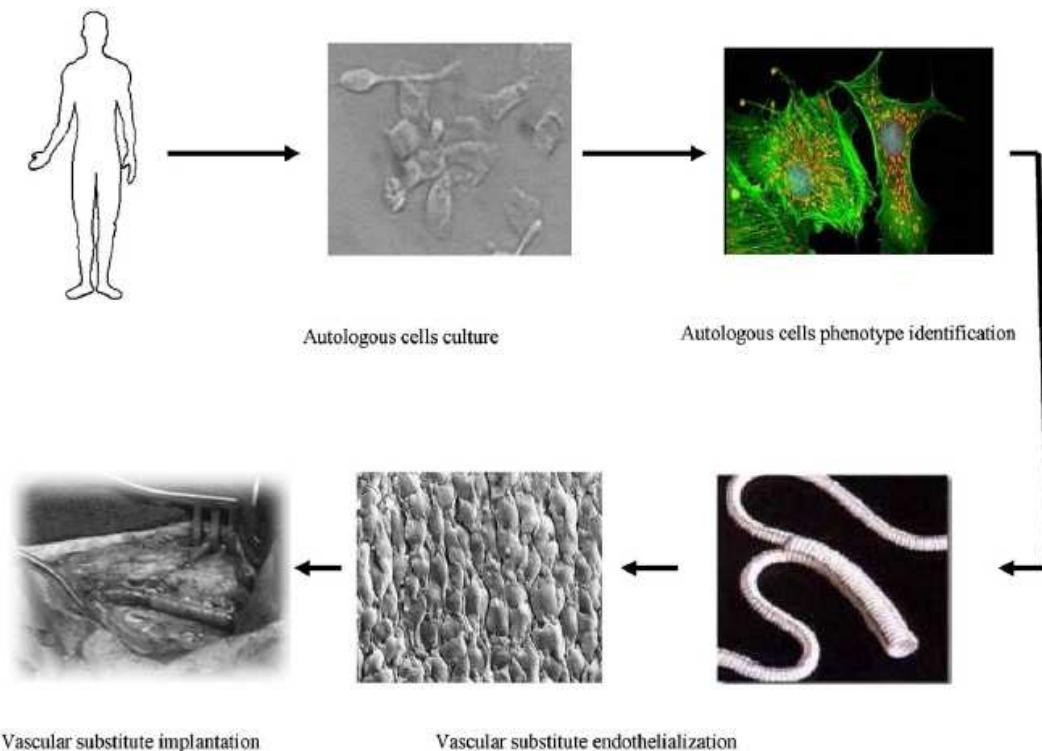


Fig. 1. Main stages of vascular tissue engineering.

clinical results with a tendency to degrade leading aneurysm formation and they have inherent thrombogenicity [27].

The synthetic scaffolds have the advantages of industrial-scale replication and biochemical and mechanical qualities determined. The disadvantage is the lack of the cell attachment factors present in natural scaffolds.

2.2. Natural scaffolds

The use of enzymatically modified bovine arteries as acellular natural scaffold to enhance graft incorporation was first proposed by Rosenberg and colleagues, only 47% of grafts were patent after 28 months [28]. Lantz et al. developed a biological vascular graft material made from small intestinal submucosa and tested it in dog. This material was shown to be usable as an autograft or as an allograft, demonstrating biocompatibility and high patency rates (75%) in the aorta [29]. Decellularized natural scaffold have been proposed in many recent works [30–34]. Schaner et al. demonstrated a well preserved extracellular matrix, basement membrane structure and strength sufficient for grafting of decellularized vein using sodium dodecyl sulphate (SDS) detergent. *In vivo* canine experiments revealed that decellularized vein grafts had operative handling and remained patent after 2 weeks [34]. Furthermore, Martin et al. demonstrated a satisfactory *in vivo* behaviour of decellularized vein allograft compared to fresh allografts [35]. Bader and colleagues used porcine aorta, decellularized by using trypsin, the xenografts were then re-

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

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

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

populated with human ECs from saphenous vein biopsies. Unfortunately, a strong rejection infiltration of CD18 positive leukocytes, of ED2 positive monocytes and T-lymphocytes were observed [36]. Conklin and colleagues covalently linked heparin to the luminal surface of decellularized porcine carotid arteries to reduce thrombogenicity. However, the chemical cross-linking of heparin decreased the compliance of vessels (by 60% as compared to fresh vessels) leading to an important wall colonization by vascular smooth muscle cells after 2 months of *in vivo* implantation [33]. Recently we developed a novel decellularized scaffold using a cryopreserved human umbilical artery [37], with the luminal surface coated by polyelectrolyte multilayer film ended by negative charge providing an anti-thrombogenic surface.

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

3. Surface coating

In order to enhance antithrombogenicity of the natural and synthetic scaffolds, their surfaces need to be modifying by a matrix for enhancing EC attachment. These surface modifications include the

immobilization of molecules such as collagen [38–40], gelatin [41], albumin and albumin–heparin conjugates [42], fibrin glue [43], fibronectin [44], laminin [45–47], the immobilization peptides such as RGD and REDV [48,49] or coating of the scaffold with serum [50,51] or plasma [52]. Moreover, the surface can be modified by non-ligand based techniques such as carbon deposition, photochemical modification [53], chemical vapour deposition [54] and plasma discharge technology [55,56] in order to deposit reactive groups onto polymer surfaces. An other alternative is the deposition of VEGF gene plasmid on the graft [57] which can transfect endothelial cells and promote their growth. For natural scaffold only fibrin glue, fibronectin and serum coating were used [26,50,58].

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

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

4. Source of autologous endothelial cells

The first step towards endothelial cells seeding of the artificial vascular prostheses was made in 1975 [64]. Later, Herring introduced the concept of single-stage technique for seeding prosthetic materials with ECs derived from canine veins [65]. Seeding endothelial cells onto the vascular prostheses has been shown to enhance small vascular graft patency, reducing implant-associated thrombosis, inflammation, and restenosis [66]. However, these seeded cells can be lost after the implantation due to the blood flow exposure [67]. Following the single-stage technique, the alternative two-stage technique was proposed with quite satisfactory results [68]. The endothelium provides structural integrity to the blood vessel by forming a continuous, selectively permeable, thromboresistant barrier between circulating blood and the arterial wall. It also controls blood flow and vessel tone, platelet activation, adhesion and aggregation, leukocyte adhesion, and smooth muscle cells migration and proliferation. This is the key rationale behind utilizing autologous endothelial cells to make a hemocompatible grafts that will perform the major functions of an intact healthy endothelium that would normally be found in the blood vessel. This will then provide an anticoagulant and thrombogenic surface to the circulating blood constituents [69].

Autologous adult ECs can be obtained from a wide range of sources such as autologous vessels [50,70] and subcutaneous fat [71]. Despite interesting clinical results reported by the Austrian group [72] the *in*

vitro endothelialization of synthetic small-diameter vascular grafts before implantation, the procedure has limits: the collection of these cells is associated with an invasive procedure. Furthermore, early experiments employed primary autologous venous cells and reported limited cell yields, as little as 3×10^4 CE per harvested vein segment, and low levels of cell seeding efficiency onto the synthetic grafts. Additionally, this procedure cannot be used in emergency situations because of the cell culture time (2–4 weeks), the ever-increasing probability of the infection within cell culture medium and the inability of the cells to proliferate effectively with time [73,74].

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

Asahara et al. (1997) reported the presence of EPCs in human peripheral blood [75]. Recent *in vitro* studies using seeded EPCs on vascular grafts have been shown to promote rapid and complete formation of neointima [80]. Kaushal et al. isolated them from peripheral blood of sheep and seeded them on decellularized native porcine iliac vessels. Endothelial progenitor cells seeded grafts remained patent for 130 days in autologous ovine hosts [81]. Gri  se et al. evaluated the ability of EPCs to endothelialize vascular prostheses (ePTFE) and observed 70% of luminal coverage of the seeded grafts [82]. EPCs are currently harvested from bone marrow, peripheral blood and cord blood [83] discriminated with CD34 or CD133 markers [84]. Bone marrow cells (BMC) were induced to differentiate into ECs and SMCs and were seeded onto decellularized tissue scaffolds and implanted in the inferior vena cava of dogs to generate vascular tissue and improve patency in tissue engineered small diameter vascular grafts. Three weeks after implantation, the tissue-engineered vascular graft showed vascular regeneration [85]. BMC has also been used by [86] to develop an experimental model of small-diameter expanded polytetrafluoroethylene vascular prosthesis, in which the luminal surface is covered with BMC genetically modified, which produce beta-galactosidase (a product of lacZ transgene) recombinant proteins. The recombinant bioactive protein is produced in this model, other genes that have therapeutic potential can be subsequently applied. This may be a preliminary model to autocrine functioning vascular prostheses. Matsumura et al. has shown that the use of BMCs onto a biodegradable scaffold enable the construct of tissue-engineered vascular autograft [87]. The seeded BMCs differentiate in the scaffold to construct components of a new vessel wall.

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

5. Conclusion

Prosthetic materials have been used for many years as alternative to natural vessels in bypass surgery. However, clinical applications of small diameter (internal diameter below 6 mm) synthetic prostheses and cryopreserved allografts have limited success due to thrombus formation in the short term

and intimal hyperplasia in the long term. The challenge of tissue engineering vessels is to build-up blood/substitute interface near native vessels. In order to improve endothelial cells monolayer, it is necessary to pre-coat the intra-luminal grafts. However, the search for the ideal matrix favouring a good cell adhesion and retention remained unachievable.

Acknowledgements

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

References

- [1] P.L. Faries, F.W. Lo Gerfo, S. Arora, S. Hook, M.C. Pulling, C.M. Akbari, D.R. Campbell and F.B. Pomposelli, A comparative study of alternative conduits for lower extremity revascularization: all-autogenous conduit versus prosthetic grafts, *J. Vasc. Surg.* **32** (2000), 1080–1090.
- [2] C.O. Esquivel and F.W. Blaisdell, Why small caliber vascular grafts fail: a review of clinical and experimental experience and the significance of the interaction of blood at the interface, *J. Surg. Res.* **41** (1986), 1–15.
- [3] W.M. Abbott, J. Megerman, J.E. Hasson, G. L'Italien and D.F. Wamock, Effect of compliance mismatch on vascular graft patency, *J. Vasc. Surg.* **5** (1987), 376–382.
- [4] N.R. Tai, H.J. Salacinski, A. Edwards, G. Hamilton and A.M. Seifalian, Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction, *Br. J. Surg.* **87** (2000), 1516–1524.
- [5] M.C. Wusteman, D.E. Pegg and R.M. Warwick, The banking of arterial allografts in the United Kingdom. A technical and clinical review, *Cell Tissue Bank* **1** (2000), 295–301.
- [6] Y.C. Song, B.S. Khirabadi, F. Lightfoot, K.G. Brockbank and M.J. Taylor, Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts, *Nat. Biotechnol.* **18** (2000), 296–299.
- [7] P. Lamm, G. Juchem, P. Weyrich, S. Nees and B. Reichart, New alternative coronary bypass graft: first clinical experience with an autologous endothelialized cryopreserved allograft, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **117** (1999), 1217–1219.
- [8] Y. Marois, E. Wagner, E. Pâris, R. Roy, Y. Douville and R. Guidoin, Comparison of healing in fresh and preserved arterial allografts in the dog, *Ann. Vasc. Surg.* **13** (1999), 130–140.
- [9] M. Adham, J.P. Gournier, J.P. Favre, E. De La Roche, C. Ducerf, J. Baulieux, X. Barral and M. Pouyet, Mechanical characteristics of fresh and frozen human descending thoracic aorta, *J. Surg. Res.* **64** (1996), 32–34.
- [10] F. Stanke, D. Riebel, S. Carmine, J.L. Cracowski, F. Caron, J.L. Magne, H. Egelhoffer, G. Bessard and P. Devillier, Functional assessment of human femoral arteries after cryopreservation, *J. Vasc. Surg.* **28** (1998), 273–283.
- [11] R.T. Venkatasubramanian, E.D. Grassl, V.H. Baroca, D. Lafontaine and J.C. Bischof, Effects of freezing and cryopreservation on the mechanical properties of arteries, *Ann. Biomed. Eng.* **34** (2006), 823–832.
- [12] A.C. Thomas, G.R. Campbell and J.H. Campbell, Advances in vascular tissue engineering, *Cardiovasc. Pathol.* **12** (2003), 271–276.
- [13] E. Rabkin and F.J. Schoen, Cardiovascular tissue engineering, *Cardiovasc. Pathol.* **11** (2002), 305–317.
- [14] K.H. Yow, J. Ingram, S.A. Korossis, E. Ingham and S. Homer-Vanniasinkam, Tissue engineering of vascular conduits, *Br. J. Surg.* **93** (2006), 652–661.
- [15] D.S. Vara, H.J. Salacinski, R.Y. Kannan, L. Bordenave, G. Hamilton and A.M. Seifalian, Cardiovascular tissue engineering: state of the art, *Pathol. Biol. (Paris)* **53** (2005), 599–612.
- [16] G. Naughton, J. Mansbridge and G. Gentzkow, A metabolically active human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers, *Artif. Organs* **21** (1997), 1203–1210.
- [17] F.M. Wood, M.L. Kolybaba and P. Allen, The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major bum injuries: a critical review of the literature, *Burns* **32** (2006), 395–401.
- [18] R.E. Schreiber, B.M. Ilten-Kirby, N.S. Dunkelman, K.T. Symons, L.M. Reketve, J. Willoughby and A. Ratcliffe, Repair of osteochondral defects with allogeneic tissue engineered cartilage implants, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **367** (1999), 382–395.
- [19] N. L'Heureux, S. Paquet, R. Labbe, L. Germain and F.A. Auger, A completely biological tissue-engineered human blood vessel, *FASEB J.* **12** (1998), 47–56.
- [20] N. L'Heureux, N. Dusserre, G. Konig, B. Victor, P. Keire, T.N. Wight, N.A.F. Chronos, A.E. Kyles, C.R. Gregory, G. Hoyt, R.C. Robbins and T.N. McAllister, Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization, *Nat. Med.* **12** (2006), 361–365.
- [21] L. Xue and H.P. Greisler, Biomaterials in the development and future of vascular grafts, *J. Vasc. Surg.* **37** (2003), 472–480.

- [22] M.P. Lutolf and J.A. Hubbell, Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, *Nat. Biotechnol.* **23** (2005), 47–55.
- [23] L.E. Niklason, Techview: medical technology. Replacement arteries made to order, *Science* **286** (1999), 1493–1494.
- [24] A.W. Clowes, T.R. Kirkman and M.A. Reidy, Mechanisms of arterial graft healing. Rapid transmural capillary ingrowth provides a source of intimal endothelium and smooth muscle in porous PTFE prostheses, *Am. J. Pathol.* **123** (1986), 220–230.
- [25] H.J. Salacinski, G. Punshon, B. Krijgsman, G. Hamilton and A.M. Seifalian, A hybrid compliant vascular graft seeded with microvascular endothelial cells extracted from human omentum, *Artif. Organs* **25** (2001), 974–982.
- [26] A. Tiwari, H.J. Salacinski, G. Punshon, G. Hamilton and A.M. Seifalian, Development of a hybrid cardiovascular graft using a tissue engineering approach, *FASEB J.* **16** (2002), 791–796.
- [27] M. Szycher, V. Poirier, C. Franzblau, B. Faris, R. Snider, P. Toselli, C.C. Haudenschild and W.F. Bernhard, Biochemical, histological, and ultrastructural assessments of pseudointimal linings derived from fibroblast-seeded integrally textured polymeric surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* **15** (1981), 247–265.
- [28] N. Rosenberg, A. Martinez, P.N. Sawyer, S.A. Wesolowski, R.W. Postlethwait and M.L. Dillon Jr., Tanned collagen arterial prosthesis of bovine carotid origin in man. Preliminary studies of enzyme-treated heterograft, *Ann. Surg.* **164** (1996), 247–256.
- [29] G.C. Lantz, S.F. Badyalak, M.C. Hiles, A.C. Coffrey, L.A. Geddes, K. Kokini, G.E. Sandusky and R.J. Morff, Small intestinal submucosa as a vascular grafts: a review, *J. Invest. Surg.* **6** (1993), 297–310.
- [30] G.J. Wilson, D.W. Courtman, P. Klement, J.M. Lee and H. Yeger, Acellular matrix: A biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement, *Ann. Thorac. Surg.* **60** (1995), S353–S358.
- [31] A. Bader, G. Steinhoff, K. Strobl, T. Schilling, G. Brandes, H. Mertsching, D. Tsikas, J. Froelich and A. Haverich, Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix, *Transplantation* **70** (2000), 7–14.
- [32] E. Uchimura, Y. Sawa, S. Taketani, Y. Yamanaka, M. Hara, H. Matsuda and J. Miyake, Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with poly(ethylene glycol), *J. Biomed. Mater. Res. A* **67** (2003), 834–837.
- [33] B.S. Conklin, E.R. Richter, K.L. Kreutziger, D.S. Zhong and C. Chen, Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft, *Med. Eng. Phys.* **24** (2002), 173–183.
- [34] P.J. Schaner, N.D. Martin, T.N. Tulenko, I.M. Shapiro, N.A. Tarola, R.F. Leichter, A. Carabasi and P.J. DiMuzio, Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering, *J. Vasc. Surg.* **40** (2004), 146–153.
- [35] N.D. Martin, P.J. Schaner, T.N. Tulenko, I.M. Shapiro, C.A. DiMatteo, T.K. Wilimas, E.S. Hager and P.J. DiMuzio, *In vivo* behaviour of decellularized vein allograft, *J. Surg. Res.* **129** (2005), 17–23.
- [36] A. Bader, G. Steinhoff, K. Strobl, T. Schilling, G. Brandes, H. Mertsching, D. Tsikas, J. Froelich and A. Haverich, Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix, *Transplantation* **70** (2000), 7–14.
- [37] H. Kerdjoudj, C. Boura, L. Marchal, D. Dumas, P. Schaff, J.C. Voegel, J.F. Stoltz and P. Menu, Decellularized umbilical artery treated with thin polyelectrolyte multilayer films: potential use in vascular engineering, *Biomed. Mater. Eng.* **16** (2006), S123–129.
- [38] R. Vohra, G.J. Thomson, H.M. Carr, H. Sharma and M.G. Walker, Comparison of different vascular prostheses and matrices in relation to endothelial seeding, *Br. J. Surg.* **78** (1991), 417–420.
- [39] I. Bisson, M. Kosinski, S. Ruault, B. Gupta, J. Hilbom, F. Wurm and P. Frey, Acrylic acid grafting and collagen immobilization on poly(ethylene terephthalate) surface for adherence and growth of human bladder smooth muscle cells, *Biomaterials* **23** (2002), 3149–3158.
- [40] P. Feugier, R.A. Black, J.A. Hunt and T.V. How, Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress, *Biomaterials* **26** (2005), 1457–1466.
- [41] Y. Marois, M.F. Sigot-Luizard and R. Guidoin, Endothelial cell behaviour on vascular prosthetic grafts: effect of polymer chemistry, surface structure, and surface treatment, *ASAIO J.* **45** (1999), 272–280.
- [42] G.W. Bos, N.M. Scharenborg, A.A. Poot, G.H. Engbers, T. Beugeling, W.G. Van Aken and J. Feijen, Endothelialization of crosslinked albumin–heparin gels, *Thromb. Haemost.* **82** (1999), 1757–1763.
- [43] P. Fernandez, A. Dequette, L. Pothaud, G. Belleannee and P. Coste, Quality control assessment of ePTFE precoating procedure for *in vitro* cell seeding, *Biomaterials* **26** (2005), 5042–5047.
- [44] T. Shimada, T. Nishibe, H. Miura, K. Hamaza, H. Kato, F. Kudo, T. Murashita and Y. Okuda, Improved healing of small-caliber. Long-fibril expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts by covalent bonding of fibronectin, *Surg. Today* **34** (2004), 1025–1030.
- [45] A. Sank, K. Rostami, F. Weaver, D. Ertl, A. Yellin, M. Nimni and T.L. Tuan, New evidence and new hope concerning endothelial seeding of vascular grafts, *Am. J. Surg.* **164** (1992), 199–204.
- [46] R. McMillan, B. Meeks, F. Bensebaa, Y. Deslandes and H. Sheardown, Cell adhesion peptide modification of gold-coated polyurethanes for vascular endothelial cell adhesion, *J. Biomed. Mater. Res.* **54** (2001), 272–283.
- [47] K.R. Kidd, D. Dal Ponte, A.L. Stone, J.B. Hoying, R.B. Nagle and S.K. Williams, Stimulated endothelial cell adhesion and angiogenesis with laminin-5 modification of expanded polytetrafluoroethylene, *Tissue Eng.* **11** (2005), 1379–1391.

- [48] S.P. Massia and J.A. Hubbell, Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials, *J. Biomed. Mater. Res.* **25** (1991), 223–242.
- [49] C.C. Larsen, F. Kligman, K. Kottke-Marchant and R.E. Marchant, The effect of RGD fluorosurfactant polymer modification of ePTFE on endothelial cell adhesion, growth, and function, *Biomaterials* **28** (2006), 4846–4855.
- [50] P. Lamm, G. Juchem, S. Milz, M. Schuffenhauer and B. Reichart, Autologous endothelialized vein allograft: a solution in the search for small-caliber grafts in coronary artery bypass graft operations, *Circulation* **104** (2001), 1108–1114.
- [51] L. Bengtsson, K. Radegran and A. Haegerstrand, A new and simple technique to achieve a confluent and flow resistant endothelium on vascular ePTFE-grafts using human serum, *Eur. J. Vasc. Surg.* **8** (1994), 182–187.
- [52] E. Vinard, G. Leseche, B. Andreassian and D. Costagliola, *In vitro* endothelialization of PTFE vascular grafts: A comparison of various substrates, cell densities, and incubation times, *Ann. Vasc. Surg.* **13** (1999), 141–150.
- [53] T. Gumpenberger, J. Heitz, D. Bauerle, H. Kahr, I. Graz, C. Romanin, V. Svorcik and F. Leisch, Adhesion and proliferation of human endothelial cells on photochemically modified polytetrafluoroethylene, *Biomaterials* **24** (2003), 5139–5144.
- [54] K. Lehle, J. Buttstaedt and D.E. Birnbaum, Expression of adhesion molecules and cytokines *in vitro* by endothelial cells seeded on various polymer surfaces coated with titanium carboxonitride, *J. Biomed. Mater. Res. A* **65** (2003), 393–401.
- [55] T. Chandy, G.S. Das, R.F. Wilson and G.H. Rao, Use of plasma glow for surface-engineering biomolecules to enhance blood compatibility of Dacron® and PTFE vascular prosthesis, *Biomaterials* **21** (2000), 699–712.
- [56] R. Sipehia, G. Martucci and J. Lipscombe, Transplantation of human endothelial cell monolayer on artificial vascular prosthesis: the effect of growth-support surface chemistry, cell seeding density, ECM protein coating, and growth factors, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **24** (1996), 51–63.
- [57] S.F. Tao, L. Chen, Y.X. Zheng, Y. Xu, J. Chen and H. Yu, Proliferation of endothelial cell on polytetrafluoroethylene vascular graft materials carried VEGF gene plasmid, *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **7** (2006), 421–428.
- [58] N. Kipshidze, J.J. Ferguson, M.H. Keelan, H. Sahota, R. Komorowski, L.R. Shankar, P.S. Chawla, C.C. Haudenschild, V. Nikolavchik and J.W. Moses, Endoluminal reconstruction of the arterial wall with endothelial cell/glue matrix reduces restenosis in an atherosclerotic rabbit, *J. Am. Coll. Cardiol.* **36** (2000), 1396–1403.
- [59] R.O. Hynes and K.M. Yamada, Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins, *J. Cell Biol.* **95** (1982), 369–377.
- [60] L. Bacakova, V. Mares, V. Lisa, M.G. Bottone, C. Pellicciari and V. Svorcik, Fluorine ion-implanted polystyrene improves growth and viability of vascular smooth muscle cells in culture, *J. Biomed. Mater. Res.* **49** (2000), 369–379.
- [61] P. Lavalle, C. Gergely, F.J.G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J.C. Voegel and C. Picart, Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: an *in situ* atomic force microscopy study, *Macromolecules* **33** (2002), 4458–4465.
- [62] C. Boura, P. Menu, E. Payan, C. Picart, J.C. Voegel, S. Muller and J.F. Stoltz, Endothelial cells growth on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification, *Biomaterials* **24** (2003), 3521–3530.
- [63] C. Boura, S. Muller, D. Dumas, D. Vautier, P. Schaaf, J.C. Voegel, J.F. Stoltz and P. Menu, Endothelial cell-interactions with polyelectrolyte multilayer films, *Biomaterials* **26** (2005), 4568–4575.
- [64] P.B. Mansfield, A.R. Wechezak and L.R. Sauvage, Preventing thrombus on artificial vascular surfaces: true endothelial cell linings, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **21** (1975), 264–272.
- [65] M. Herring, A. Gardner and J. Glover, A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium, *Surgery* **84** (1978), 498–504.
- [66] O.E. Teebken, A.M. Pichlmaier and A. Haverich, Cell seeded decellularized allogenic matrix grafts and biodegradable polydioxanone-prostheses compared with arterial autografts in a porcine model, *Eur. J. Endovasc. Surg.* **22** (2001), 139–145.
- [67] J.C. Park, Y.S. Hwang and H. Suh, Viability evaluation of engineered tissues, *Yonsei Med. J.* **41** (2000), 836–844.
- [68] L. Bordenave, M. Remy-Zolghadri, P. Fernandez, R. Bareille and D. Midy, Clinical performance of vascular grafts lined with endothelial cells, *Endothelium* **6** (1999), 267–275.
- [69] H.M. Nugent and E.R. Edelman, Endothelial implants provide long-term control of vascular repair in a porcine model of arterial injury, *J. Surg. Res.* **99** (2001), 228–234.
- [70] B.E. Jarrell, S.K. Williams, L. Solomon, L. Speicher, E. Koolpe, J. Radomski, R.A. Carabasi, D. Greener and F.E. Rosato, Use of an endothelial monolayer on a vascular graft prior to implantation. Temporal dynamics and compatibility with the operating room, *Ann. Surg.* **203** (1986), 671–678.
- [71] S.K. Williams, T.F. Wang, R. Castrillo and B.E. Jarrell, Liposuction-derived human fat used for vascular graft sodding contains endothelial cells and not mesothelial cells as the major cell type, *J. Vasc. Surg.* **19** (1994), 916–923.
- [72] J.G. Meinhart, M. Deutsch, T. Fischlein, N. Howanietz, A. Froschl and P. Zilla, Clinical autologous *in vitro* endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts, *Ann. Thorac. Surg.* **71** (2001), S327–S331.
- [73] M. Herring, A. Gardner, P. Peigh, D. Madison, S. Baughman, J. Brown and J. Glover, Patency in canine inferior vena cava grafting: effects of graft material, size, and endothelial cell seeding, *J. Vasc. Surg.* **1** (1984), 877–887.
- [74] P. Zilla, R. Fasol, M. Deutsch, T. Fischlein, E. Minar, A. Hammerle, O. Krupicka and M. Kadletz, Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report, *J. Vasc. Surg.* **6** (1987), 535–541.

- [75] T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman and J.M. Isner, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis, *Science* **275** (1997), 964–967.
- [76] A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhjan and K.S. Lalykina, The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells, *Cell Tissue Kinet.* **3** (1970), 393–403.
- [77] S. Levenberg, Engineering blood vessels from stem cells: recent advances and applications, *Curr. Opin. Biotechnol.* **16** (2005), 516–523.
- [78] K.M. Sales, H.J. Salacinski, N. Alobaid, M. Mikhail, V. Balakrishnan and A.M. Seifalian, Advancing vascular tissue engineering: the role of stem cell technology, *Trends Biotechnol.* **23** (2005), 461–467.
- [79] G.M. Riha, P.H. Lin, A.B. Lumsden, Q. Yao and C. Chen, Review: application of stem cells for vascular tissue engineering, *Tissue Eng.* **11** (2005), 1535–1552.
- [80] V. Bhattacharya, P.A. McSweeney, Q. Shi, B. Bruno, A. Ishida, R. Nash, R.F. Storb, L. R. Sauvage, W.P. Hammond and M.H. Wu, Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34(+) bone marrow cells, *Blood* **95** (2000), 581–585.
- [81] S. Kaushal, G.E. Amiel, K.J. Guleserian, O.M. Shapira, T. Perry, F.W. Sutherland, E. Rabkin, A.M. Moran, F.J. Schoen, A. Atala, S. Soker, J. Bischoff and J.E. Mayer Jr., Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded *ex vivo*, *Nat. Med.* **7** (2001), 1035–1040.
- [82] D.P. Griese, A. Ehsan, L.G. Melo, D. Kong, L. Zhang, M.J. Mann, R.E. Pratt, R.C. Mulligan and V.J. Dzau, Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy, *Circulation* **108** (2003), 2710–2715.
- [83] A. Kawamoto, T. Asahara and D.W. Losordo, Transplantation of endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization, *Cardiovasc. Radiat. Med.* **3** (2002), 221–225.
- [84] N. Quirici, D. Soligo, L. Caneva, F. Servida, P. Bossolasco and G.L. Delilieri, Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133 (+) cells, *Br. J. Haematol.* **115** (2001), 186–194.
- [85] S.W. Cho, S.H. Lim, I.K. Kim, Y.S. Hong, S.S. Kim, K.J. Yoo, H.Y. Park, Y. Jang, B.C. Chang, C.Y. Choi, K.C. Hwang and B.S. Kim, Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells, *Ann. Surg.* **241** (2005), 506–515.
- [86] S. Kanki-Horimoto, H. Horimoto, S. Mieno, K. Kishida, F. Watanabe, E. Furuya and T. Katsumata, Synthetic vascular prosthesis impregnated with genetically modified bone marrow cells produced recombinant proteins, *Artif. Organs* **29** (2005), 815–819.
- [87] G. Matsumura, S. Miyagawa-Tomita, T. Shin'oka, Y. Ikada and H. Kurosawa, First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts *in vivo*, *Circulation* **108** (2003), 1729–1734.
- [88] S.S. Khan, M.A. Solomon and J.P. McCoy Jr., Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry, *Cytometry B Clin. Cytom.* **64** (2005), 1–8.
- [89] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig and D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* **284** (1999), 143–147.

Polyelectrolyte multilayer films: Effect of the initial anchoring layer on the growth of mesenchymal stem cells

V Moby*, A Kadi*, N de Isla*, JF Stoltz*,^δ, P Menu*.

* Groupe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, CNRS 7563, Faculté de Médecine, Nancy Université-UHP, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

^δ Centre Hospitalier Universitaire Nancy, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, allée du Morvan, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Corresponding author:

V. Moby, Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré Nancy 1, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Tel: +33 3 83 68 34 74; Fax: + 33 3 83 68 34 59;

E-mail address: vanessa.moby@medecine.uhp-nancy.fr

Abstract

In tissue engineering, surface characteristics of a biomaterial are one of most important factors determining the compatibility with the environment. They influence attachment and growth of cells onto the material. In many cases, the surface should to be modified and engineered in the desired direction. The modification of non-adhesive surfaces with polyelectrolyte multilayer films (PMF) was recently depicted as a powerful technique to promote the growth of different cell lines. In this study, we evaluated the possible use of two different PMF as surface modification for the culture of mesenchymal stem cells (MSC). We used two types of PMF which differed by the nature of the initial anchoring layer which was poly(ethylenimine) (PEI) or poly(allylamine hydrochloride) (PAH). This initial polyelectrolytes adsorption was followed by the alternated deposition of poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) and (PAH) in order to obtain a PEI-(PSS-PAH)₃ film or a PAH-(PSS-PAH)₃ film. In order to control the behaviour of MSC, the cell viability was evaluated by Alamar Blue assay and the actin cytoskeleton was labelled and visualised in a confocal microscope. The behaviour of cells on the two PMF was compared to cells cultivated on surfaces treated with fibronectin. The results showed that PAH-(PSS-PAH)₃ PMF improve the growth of cells, inducing a higher cell viability compared to PEI-(PSS-PAH)₃ PMF and fibronectin at 2, 3 and 7 days of culture. Moreover, those cells showed a well-organized actin cytoskeleton. In conclusion, PAH-(PSS-PAH)₃ polyelectrolyte multilayer film seems to constitute an excellent material for MSC seeding.

1. Introduction

PMF, build-up by the alternate adsorption of polycations and polyanions, have recently been introduced as a simple and powerful method for surface modification [1-4]. This technique has proved its efficiency to improve adhesion of endothelial cells (EC) on slightly adhesive surfaces [5, 6]. However, the harvest of EC is difficult and often needs the use of intact vessels [7]. With their versatile growth and differentiation potential, MSC constitute ideal candidates to be used in tissue engineering [8]. The use of MSC offers several advantages: the relative easiness of isolation, high in vitro expansion rate, and demonstrated multipotency [9, 10].

The aim of our investigation was to evaluate two kinds of PMF which can be used as biologically compatible substrates for MSC: PEI-(PSS-PAH)₃ and PAH-(PSS-PAH)₃ films. These multilayer architectures were compared to fibronectin. Fibronectin is currently used to seed MSC and is involved in cell-substrate adhesion in tissue and organs [11].

In order to gain informations about cellular behaviour, the viability of MSC and the visualization of the actin cytoskeleton were performed.

2. Material and methods

2.1 Polyelectrolyte multilayers

Poly(ethyleneimine) (PEI, MW=750 000), poly(allylamine hydrochloride) (PAH, MW=70 000), and poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS, MW=70 000) were purchased from Sigma (France). PMF were built up from polyelectrolyte solutions at concentrations of 10g/L (PEI) and 5g/L (PSS and PAH) in 1M NaCl solution. Glass slides used as the initial substrate were first cleaned as previously described by Boura et al (2005) [12]. Then, cover glasses (Polylabo, France) were placed in 6 well-plates and were incubated in the PEI or PAH solution for 10 minutes. After this period, cover glasses were extensively rinsed with distilled water. This procedure was followed by three alternate depositions of polyanions (PSS) and polycations (PAH) (contact time: 10 minutes) to obtain the required multilayers: PEI-(PSS-PAH)₃ and PAH-(PSS-PAH)₃.

2.2 Culture and seeding of MSC

Bone marrow was aspirated from the posterior iliac crest of normal adult volunteers, following informed consent, collected by the Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus (UTCT,

Vandoeuvre-lès-Nancy, France), and cultured in alpha minimal essential medium (α -MEM; Lonza, USA), containing 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, France), and 100U/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin (GIBCO). The nucleated cells were plated at the concentration of 5×10^4 cellules/cm² in 75-cm² culture flasks and incubated at 37°C with 5% CO₂. After 72 hours, the non adherent cells were discarded and medium was changed twice a week. After 4 weeks, adherent cells were harvested with trypsin/EDTA and replated at 5×10^3 cells/cm². By the third passage, no haematopoietic cells could be detected. The MSC phenotype was confirmed by flow cytometry at this passage (data not shown): the cells are negative for the haematopoietic surface markers, CD34, CD45 and positive for CD73, CD90 and CD105 [10]. A total of 2×10^4 cells/cm² were seeded on cover glasses modified with PEI-(PSS-PAH)₃, PAH-(PSS-PAH)₃ PMF, or fibronectin (Sigma, France).

2.3 Viability of MSC

The measured index of cell viability was the Alamar Blue redox assay (Serotec Ltd., Kidlington, Oxford, England). The system incorporates an oxydation-reduction (REDOX) indicator that both fluoresces and changes of colour in response to chemical reduction of growth medium resulting from cell metabolism. MSC were seeded on the three surfaces for 2, 3, or 7 days. At the set time, the medium was removed and MSC were washed with DMEM (Dulbecco's medium without red phenol, Gibco BRL, France). Then, Alamar Blue reagent dissolved in DMEM at 10% was added to each well. After 3h incubation at 37°C allowing the blue dye to be transformed into red by mitochondrial activity, the absorbance was monitored by a spectrophotometer (Beckman DU640) at wavelengths of 570 and 630 nm. The optical density difference $OD = OD_{570 \text{ nm}} - OD_{630 \text{ nm}}$ was calculated to estimate the metabolic activity of cells. Wells without cells were used as a reference.

2.4 Observation of MSC actin cytoskeleton

After 7 days of culture on cover glasses modified with two types of PMF and with fibronectin, the F-actin filaments were observed. MSC were fixed with 4% paraformaldehyde (PAF), permeabilized with 0.5% Triton X-100 and incubated 45 min at room temperature with Alexa Fluor® 488 phalloidin (Molecular Probes, Oregon) for F-actin filaments labelling. Then, MSC were washed third with Dulbecco's medium without red phenol (DMEM, Gibco BRL, France) and observed using a confocal laser scanning microscope using a 40x objective and an Ar laser for 488 nm excitation.

2.5 Statistical analysis

These results were expressed as a mean $\pm$ SEM for each surface (n=9). One-factor ANOVA with PLSD Fisher correction (Statview IV®, Abacus Concepts Inc, Berkley, CA USA) was used to analyse the data. P values smaller than 0.05 were considered as significant.

3. Results

3.1 Viability of MSC

Results for viability of MSC on the tested surfaces by Alamar Blue redox assay are shown in Fig.1. On fibronectin, viability values increased between the second and the third day of culture and remained stable after seven days of culture. The values of viability on PAH-(PSS-PAH)₃ PMF presented an opposite evolution. In spite of an increase at 3 days of culture, the viability values on PEI-(PSS-PAH)₃ PMF remained stable at the different times points. At the initial time of growth (2 days), the viability values were significantly higher on PAH-(PSS-PAH)₃ PMF (0.20 $\pm$ 0.07, $p < 0.05$) as compared to PEI-(PSS-PAH)₃ PMF (0.01 $\pm$ 0.01, $p < 0.001$) and fibronectin (0.10 $\pm$ 0.03). After 3 days of culture, a significant increase of cell viability values was measured only on fibronectin (0.24 $\pm$ 0.06, $p < 0.01$). On PAH-(PSS-PAH)₃ PMF, the viability values remained equal to the value of day 2 and similar to those obtained on fibronectin. After seven days of culture on PEI-(PSS-PAH)₃ PMF, no real detectable viability was observed and the values of the cell viability observed on PAH-(PSS-PAH)₃ PMF (0.40 $\pm$ 0.07, $p < 0.01$) were increased. On the contrary, for a same culture time, values of cell viability on fibronectin remained stable and were significantly smaller than those obtained on PAH-(PSS-PAH)₃ PMF.

3.2 Visualization of the actin cytoskeleton

The organisation of the actin cytoskeleton is shown in Fig.2. The analysis of the cytoskeleton through the labelling of F-actin after 7 days of culture showed the formation of actin fibres through the cytoplasm of MSC seeded on the three culture supports. The cytoskeleton was well formed on PAH-(PSS-PAH)₃ PMF and fibronectin. The actin fibres on these two types of surfaces presented an homogenous and longitudinal organization. This fact was particularly marked on PAH-(PSS-PAH)₃ PMF and could predispose adherent cells to remain anchored under physiological shear stress values. However, on PEI-(PSSPAH)₃ PMF, the actin fibres seemed to be disrupted in some places, notably at the center of cells.

Discussion

In this work, we investigated the behaviour of MSC in two types of multilayered films and on fibronectin (protein of extracellular matrix). We showed by viability test that the PAH-(PSS-PAH)₃ PMF did not induce any cytotoxic effects and favour the growth of MSC on its surface type. As previously depicted by Tang et al (2007) [13] on TCPS (Tissue Culture Polystyrene Surface), the cell growth on PAH-(PSS-PAH)₃ PMF started at 3 days of culture. Conversely, MSC, which were seeded on PEI-(PSS-PAH)₃ PMF, present a weak growth. The cell viability was low at the initial culture times and the cells did not develop during the week of culture. These low values of viability could result from a lack of initial cell adhesion on this type of polyelectrolytes. This result is different to our previous works, which demonstrated that this kind of film improved the EC adhesion and viability, when this type of PMF was previously built-up in a vascular graft or on glass surfaces. This film allowed the formation of a confluent cell monolayer within 7 days of culture [6,14].

Kolasinska et al 2005 [15] showed that the type of polyelectrolytes used for deposition of the first layer played an important role when stability of multilayer was concerned and then interact with the properties of polyelectrolyte multilayer films. These authors suggested that multilayers built up on a PEI layer were more homogenous than those containing only PAH/PSS. For this reason, the properties of the film seem to be affected by the nature of the initial layer. Moreover, Kolasinska et al 2007 [16] showed that the absence of PEI anchoring layer enhanced the roughness of the multilayer. Then, the differences of MSC growth, we observed between the two types of films, could be due to surface characteristics of the film such as the roughness. A rough surface seemed to promote MSC culture. In the same way, Lampin et al (1997) [17] showed that the increase of the roughness promotes the EC adhesion.

The MSC actin cytoskeleton on PAH-(PSS-PAH)₃ PMF was well-defined and the actin fibres showed an homogenous orientation as depicted by Curran et al (2005) on surfaces modified with amino (-NH₂) functional groups [18]. The presence of important electrostatic interactions could explain this orientation when the cells were cultured on PAH-(PSS-PAH)₃ PMF.

In this study, we used a fibronectin coated glass as a control surface, which is used currently in MSC culture and we showed that MSC growth on fibronectin was much less important than on PAH-(PSS-PAH)₃ PMF. This suggests that this kind of PMF is more biocompatible than the classical culture system.

In conclusion, PAH-(PSS-PAH)₃ PMF seems to promote the growth of MSC and could be used in tissue engineering to potentialize mesenchymal stem cell culture on biomaterials.

References

1. Decher G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* 1997;277:1232-1237
2. Zhu H, Ji J, Shen J. Biomacromolecules Electrostatic Self-Assembly on 3-Dimensional Tissue Engineering Scaffold. *Biomacromolecules* 2004;5:1933-1939
3. Donath E, Walther D, Shilov VN, Knippel E, Budde A, Lowack K, Helm CA, Möhwald H. Nonlinear Hairy Layer Theory of Electrophoretic Fingerprinting Applied to Consecutive Layer by Layer Polyelectrolyte Adsorption onto Charged Polystyrene Latex Particles. *Langmuir* 1997;13:5294-5305
4. Dubas ST, Schlenoff JB. Factors Controlling the Growth of Polyelectrolyte Multilayers *Macromolecules* 1999;32:8153-8160
5. Boura C, Menu P, Payan E, Picart C, Voegel JC, Muller S, Stoltz JF. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials* 2003;24:3521-3530
6. Moby V, Boura C, Kerdjoudj H, Voegel JC, Marchal L, Dumas D, Schaaf P, Stoltz JF, Menu P. Poly(styrenesulfonate)/poly(allylamine) multilayers: a route to favor endothelial cell growth on expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular grafts. *Biomacromolecules* 2007;8:2156-2160
7. Kadner A, Hoerstrup SP, Zund G, Eid K, Maurus C, Melnitchouk S, Grunenfelder J, Turina MI. A new source for cardiovascular tissue engineering: human bone marrow stromal cells. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;21:1055-1060
8. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004;95:209-214
9. Ho M, Yu D, Davidsion MC, Silva GA. Comparison of standard surface chemistries for culturing mesenchymal stem cells prior to neural differentiation. *Biomaterials* 2006;27:4333-4339
10. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147
11. Yamamoto A, Mishima S, Maruyama N, Sumita M. Quantitative evaluation of cell attachment to glass, polystyrene, and fibronectin- or collagen-coated polystyrene by measurement of cell adhesive shear force and cell detachment energy. *J Biomed Mater Res* 2000;50:114-124
12. Boura C, Muller S, Vautier D, Dumas D, Schaaf P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Endothelial cell-interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* 2005;26:4568-4575
13. Tang J, Xie Q, Pan G, Wang J, Wang M. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;30:353-361
14. Boura C, Kerdjoudj H, Moby V, Vautier D, Dumas D, Schaaf P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Initial adhesion of endothelial cells on polyelectrolyte multilayer films. *Biomed Mater Eng* 2006;16:115-121
15. Kolasinska M, Warszynski P. The effect of support material and conditioning on wettability of PAH/PSS multilayer films. *Bioelectrochemistry* 2005;66:65-70
16. Kolasinska M, Krastev R, Warszynski P. Characteristics of polyelectrolyte multilayers: effect of PEI anchoring layer and posttreatment after deposition. *J Colloid Interface Sci* 2007;305:46-56

17. Lampin M, Warocquier-Clérout , Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J Biomed Mater Res* 1997;36:99-108
18. Curran JM, Chen R, Hunt JA. Controlling the phenotype and function of mesenchymal stem cells in vitro by adhesion to silane-modified clean glass surfaces. *Biomaterials* 2005;26:7057-7067

Legends:

Figure1: Viability of MSC seeded on cover glasses modified with PAH-(PSS-PAH)₃ PMF, PEI-(PSSPAH)₃ PMF, and fibronectin after 2, 3, and 7 days of culture, tested by Alamar Blue assay (incubation time 3 h). An asterisk indicates $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ versus fibronectin, $n = 9$.

Figure 2: Visualization of F-actin filaments of MSC seeded on PAH-(PSS-PAH)₃ (A), PEI-(PSS-PAH)₃ (B) and fibronectin (C) after 7 days of growth. (Objective x40/NA 1.32; Leica Germany).

Bar =75 μ m.

Figure 1

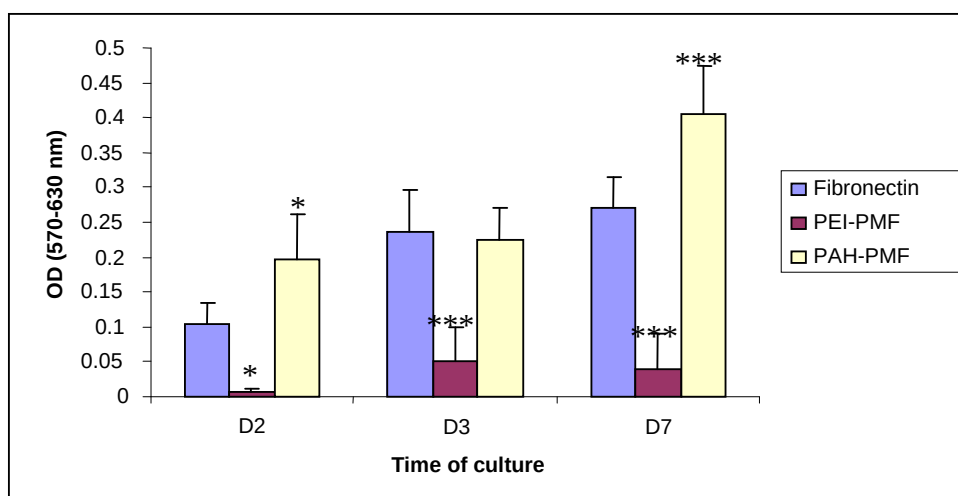
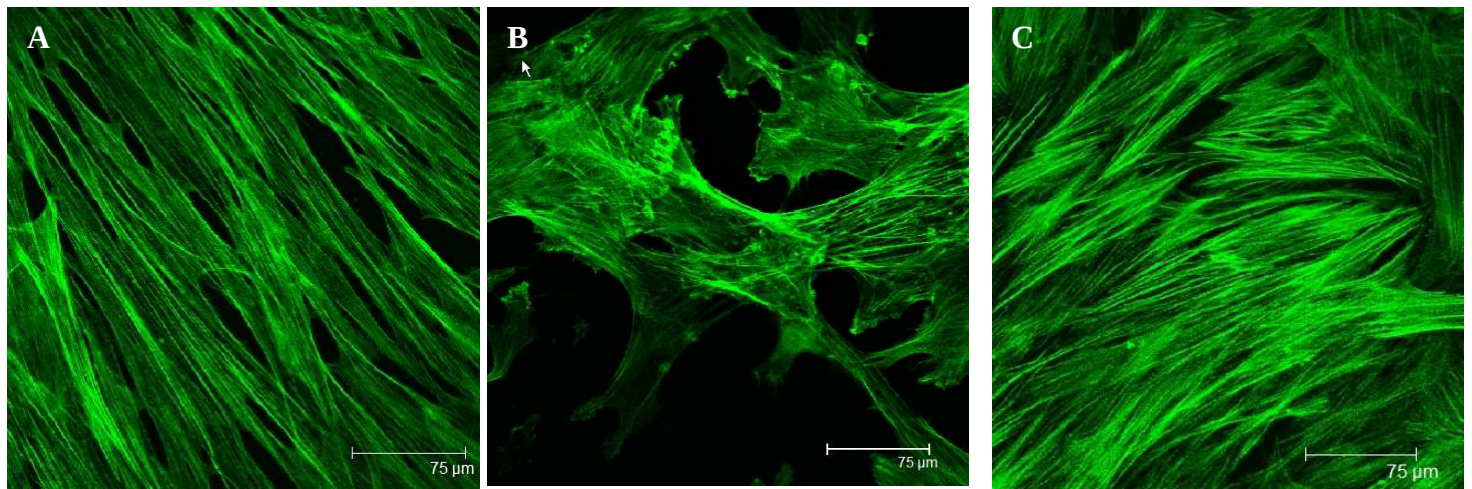


Figure 2



Résumé :

Multicouche de polyelectrolytes et CSM : deux acteurs complémentaires nécessaires à l'endothélialisation autologue de prothèses vasculaires synthétiques en PTFEe

Le remplacement des artères de faible diamètre par des prothèses synthétiques est souvent marqué par un échec, notamment à cause de leur thrombogénicité. Pour améliorer leur longévité, leur endothélialisation a été proposée. Notre projet vise à concevoir une prothèse vasculaire originale, issue de l'ingénierie tissulaire, composée d'une matrice synthétique (polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe) modifié par un film multicouche de polyelectrolytes (FMP)), de cellules autologues (cellules endothéliales (CE) ou cellules souches mésenchymateuses (CSM) humaines), soumises à l'action de facteurs biochimiques (VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ou mécaniques (contraintes de cisaillement)). Dans un premier temps, nous avons montré que le FMP permettait de rendre biocompatible un matériau initialement peu favorable à l'adhésion cellulaire. Etant donné que la récupération des CE autologues est empreinte de difficultés majeures, nous avons élaboré un protocole d'endothélialisation de substituts fonctionnalisés à partir de CSM. Nous avons mis en évidence que le FMP favorisait l'adhérence des CSM au substitut et l'apparition de cellules ayant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de CE en présence de VEGF, et une organisation du cytosquelette propice à leur rétention sous contraintes mécaniques. Toutefois, les contraintes mécaniques seules, bien qu'elles favorisent la prolifération cellulaire, n'ont pas permis d'observer l'expression phénotypique spécifique des CE. Ces résultats encourageants soulignent la faisabilité d'une construction, grâce au FMP, d'un substitut synthétique cellularisé avec des CSM humaines autologues différenciées en CE matures.

Mots clés : Prothèses vasculaires, polytétrafluoroéthylène, film multicouche de polyelectrolytes, endothélialisation, cellules souches mésenchymateuses, différenciation, ingénierie tissulaire, contraintes de cisaillement.

Abstract:

Layer-by-layer film of polyelectrolytes and MSC: two complementary actors necessary to the autologous endothelialization of ePTFE synthetic vascular prostheses

The replacement of arteries with small-diameter synthetic grafts often leads to the failure of such grafts mainly due to the thrombogenicity of their luminal surface. In order to improve long-term patency of these grafts, the concept of endothelial cell seeding has been suggested. Our project aims at designing an original tissue-engineered construct containing a synthetic scaffold (expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) modified by a polyelectrolyte multilayer film (PMF)), autologous cells (endothelial (EC) or human mesenchymal stem cells (MSC)), under mechanical (shear stress) or biochemical (VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)) stimulation. Initially, we studied the effect of the PMF on the scaffold biocompatibility. Our results showed that the PMF allows cell attachment (ePTFE is a non-adhesive substrate otherwise). The EC availability being the greatest obstacle to their use in clinical practice, we worked out a protocol of endothelialization with MSC. We highlighted that PMF promoted MSC graft biocompatibility and the development of cells having on the one hand, in the presence of VEGF, EC phenotype and function and on the other hand, in the presence of mechanical stress, a cytoskeleton organization which supports their shear stability. Unfortunately, this mechanical stress did not permit to obtain expression of EC specific markers but increased cell proliferation. These encouraging results confirm the interest to endothelialize synthetic vascular grafts with EC derived from MSC.

Keywords: Vascular prostheses, polytetrafluoroethylene, polyelectrolyte multilayer film, endothelialization, mesenchymal stem cells, differentiation, tissue engineering, shear stress.

Spécialité : Ingénierie Cellulaire et Tissulaire
Mécanique et Ingénierie cellulaire et tissulaire
Equipe LEMTA-UMR-CNRS 7563
Faculté de Médecine de Nancy, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex

Nom : Madame **MOBY-STUTZMANN**

Prénom : **Vanessa**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

En BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

Spécialité : ***INGÉNIERIE CELLULAIRE ET TISSULAIRE***

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°

Nancy, le 31/3/08

Le Président de l'Université



Jean-Pierre FINANCE

