



HAL
open science

Multifonctionnalisation de surface polymère pour le recrutement, l'adhésion et la différenciation des progéniteurs endothéliaux

Caroline Royer

► **To cite this version:**

Caroline Royer. Multifonctionnalisation de surface polymère pour le recrutement, l'adhésion et la différenciation des progéniteurs endothéliaux. Polymères. Université de Bordeaux; Université Laval (Québec, Canada), 2018. Français. NNT: 2018BORD0169 . tel-01960020

HAL Id: tel-01960020

<https://theses.hal.science/tel-01960020v1>

Submitted on 19 Dec 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE EN COTUTELLE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ET DE L'UNIVERSITÉ LAVAL**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

PROGRAMME DE DOCTORAT EN GENIE DES MATÉRIAUX ET DE LA
MÉTALLURGIE

Par Caroline Royer

**Multifonctionnalisation de surface polymère pour le
recrutement, l'adhésion et la différenciation des progéniteurs
endothéliaux**

Sous la direction de Dr. Marie-Christine DURRIEU et Pr. Gaétan LAROCHE

Soutenue le : Lundi 1^{er} octobre 2018

Membres du jury :

Mme. MIGONNEY Véronique	Professeure de l'Université Paris 13, France	Rapporteur
M. SMADJA David	Professeur de l'Université Paris Descartes, France	Rapporteur
Mme CERRUTI Marta	Professeure de l'Université McGill, Canada	Examineur
Mme BORDENAVE Laurence	Professeure de l'université de Bordeaux, France	Invité

Multifonctionnalisation de surface polymère pour le recrutement, l'adhésion et la différenciation des progéniteurs endothéliaux

Thèse en cotutelle

Doctorat en génie des matériaux et de la métallurgie

Caroline ROYER

Université Laval
Québec, Canada
Philosophiae Doctor (Ph.D.)

et

Université de Bordeaux
Bordeaux, France
Docteur (Dr.)

© Caroline Royer, 2018

Résumé

Les maladies cardiovasculaires sont l'une des principales causes de mortalité dans le monde, engendrant le décès de plus de 17 millions de personnes par an. Ce chiffre éloquent augmentera jusqu'à atteindre selon l'OMS 23,4 millions de décès en 2030. Ces maladies sont associées à un rétrécissement de la lumière des vaisseaux sanguins qui peut entraîner une occlusion partielle ou complète du vaisseau. Le traitement le plus souvent utilisé est un traitement chirurgical visant à créer un pont qui va contourner la section obstruée, ou une section lésée.

Actuellement, les conduits les plus utilisés pour les greffes sont les vaisseaux autologues, à savoir la veine saphène ou l'artère thoracique interne. Seulement, ces substituts ne peuvent être utilisés en remplacement que s'ils sont sains. L'alternative aux vaisseaux autologues est l'utilisation de substituts synthétiques. Compte tenu du manque de biocompatibilité de ces greffons synthétiques, après quelques années seulement, une thrombose peut apparaître. Une des causes est l'absence de cellules endothéliales (CEs) dans la lumière du substitut.

Le point clé réside ici dans la fabrication d'un matériau capable de fournir au CEs un environnement favorable à leur adhésion et leur prolifération pour permettre la génération d'un endothélium dans la lumière du substitut synthétique. *In vivo*, les cellules capables de coloniser de tels matériaux sont les cellules progénitrices endothéliales, ces cellules sont capables de se différencier en cellules endothéliales matures et possèdent une capacité de prolifération supérieure aux cellules matures. Elles sont capables de réparer les vaisseaux et pourront donc être ciblées afin d'être recrutées *in situ* et ainsi endothélialiser le biomatériau.

C'est dans ce contexte que nous avons choisi de modifier de façon chimique la surface d'un matériau modèle, un film de polyéthylène téréphtalate avec quatre principes actifs innovants sélectionnés pour leur capacité à induire l'adhésion des cellules ou leur différenciation pour permettre la régénération d'un endothélium à la surface du matériau.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à concevoir et élaborer une méthode de fonctionnalisation homogène de ce polymère (par un lien covalent principe actif/matériau) par différents principes actifs avec une densité contrôlée et reproductible. Puis, ces principes actifs ont été disposés sous la forme de micro-patrons en surface du polymère par le biais de la technique de photolithographie. Ici, les peptides GRGDS et GHM ont été greffés pour améliorer l'adhésion des cellules, le dernier étant spécifique aux cellules endothéliales progénitrices. Le peptide SFLLRN et la sitagliptine ont été greffés pour induire ou accélérer la différenciation des EPCs en CEs

matures. Toutes les surfaces ont été caractérisées pour valider le greffage covalent et connaître la densité de molécules bioactives greffée.

D'autre part avec une caractérisation approfondie des EPCs issues du sang de cordon ombilical, certains gènes et leur expression caractéristique des cellules souches et endothéliales ont été suivis par immunofluorescence et RT-qPCR pour déterminer leur état de différenciation. Ce travail n'aura été possible qu'après avoir déterminé quels gènes de références nous pouvions utiliser pour étudier le phénotype de trois types cellulaires à savoir, les cellules mononucléées CD34+, les EPCs et des CEs matures (extraites de la veine saphène).

Finalement, ce projet de recherche a permis de mettre en évidence que certaines molécules bioactives permettent d'améliorer l'adhésion de cellules mais peuvent aussi avoir un rôle pour accélérer ou retarder la différenciation des cellules. Aussi, la taille des micromotifs (micropatrons) a un impact sur l'expression de certains gènes spécifiques de la lignée endothéliale.

En conclusion générale, ce projet prouve que la modification de surfaces des substituts avec des molécules bioactives est indispensable pour rendre le matériau attractif et pour régénérer un endothélium à la surface de celui-ci. Ce travail nous a aidés à souligner l'importance de comprendre le comportement des EPCs et leur cinétique de différenciation pour leur utilisation en ingénierie vasculaire.

Mots clés : Biomatériaux, fonctionnalisation, peptides, micropatterning, progéniteurs endothéliaux, endothélialisation

ABSTRACT

Cardiovascular disease is one of the leading causes of death in the world, killing more than 17 million people a year. This eloquent figure will increase to 23.4 million deaths in 2030, according to the WHO. These diseases are associated with a narrowing of the lumen of the blood vessels that may cause partial or complete occlusion of the vessel. The treatment most often used is a surgical treatment designed to create a bridge that will bypass the obstructed section or an injured section.

Currently, the most used conduits for transplants are autologous vessels, namely the saphenous vein or the internal thoracic artery. Only these substitutes can only be used as a replacement if they are healthy. The alternative to autologous vessels is the use of synthetic substitutes. Due to a certain lack of biocompatibility of these synthetic grafts, after only a few years, a phenomenon of thrombosis sets in; the absence of endothelial cells (ECs) that cover the interior of the substitute.

The key point here lies in the manufacture of a material capable of providing the ECs with a favorable environment for their adhesion and proliferation to allow the generation of an endothelium within a synthetic substitute. *In vivo*, cells capable of colonizing such materials are endothelial progenitor cells, these cells are capable of differentiating into mature endothelial cells and possess a higher proliferation capacity than mature cells. They are able to repair the vessels and can, therefore, be targeted to be recruited *in situ* and thus endothelialize the biomaterial.

It is in this context that we have chosen to chemically modify the surface of a model material, a PET film with four innovative active ingredients selected for their ability to induce cell adhesion or differentiation to allow regeneration. an endothelium on the surface of the material.

This project has initially made it possible to develop a protocol for grafting active ingredients covalently with a reproducible density and in a microstructured manner using photolithography. Here, the GRGDS and GHM peptides were grafted to enhance cell adhesion, the latter being specific to endothelial progenitor cells. The SFLLRN peptide and sitagliptin have been grafted to induce or accelerate the differentiation of EPCs into mature ECs. All surfaces have been characterized to validate covalent grafting and to know the density of grafted bioactive molecules.

On the other hand, with a thorough characterization of EPCs from umbilical cord blood, some characteristic genes and proteins expression of stem and endothelial cells were followed by

immunofluorescence and RT-qPCR to determine their state of differentiation. This work will have been possible only after determining which reference genes we could use to study the phenotype of three cell types namely, CD34 + mononuclear cells, EPCs and mature ECs (saphenous vein extract).

Finally, this research project has shown that some bioactive molecules can improve cell adhesion but can also have a role to accelerate or delay cell differentiation. Also, the size of the micropatterns has an impact on the expression of certain genes specific to the endothelial lineage.

As a general conclusion, this project proves that surface modification of substitutes with bioactive molecules is essential to make the material attractive and to regenerate an endothelium on the surface of it. This work has helped us emphasize the importance of understanding the behavior of EPCs and their kinetics of differentiation for their use in vascular engineering.

Keywords: Biomaterials, functionalization, peptides, micropatterning, endothelial progenitors, endothelialization

Unité de recherche

3 BIO's TEAM: BIOactive surfaces, BIOMaterials and BIOMimetic tissue-engineered products, Institute of Chemistry & Biology of Membranes & Nanoobjects (UMR5248CBMN), 2 Rue Escarpit, 33607 Pessac, France

Table des matières

RESUME	II
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIERES	VI
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTES DES ABREVIATIONS ET SIGLES	XV
REMERCIEMENTS	XIX
AVANT-PROPOS	XXI
REVUE DE LITTERATURE	1
1. <i>Introduction : La médecine régénératrice, l'ingénierie tissulaire et les biomatériaux</i>	1
1.1 La médecine régénératrice	1
1.2 L'ingénierie tissulaire.....	2
1.3 Les biomatériaux.....	4
1.3.1 Les classes de biomatériaux.....	4
1.3.2 La réponse à l'implantation	8
2. <i>Contexte et problématique : Les maladies cardiovasculaires</i>	10
2.1. Les pathologies vasculaires	10
2.1.1 L'athérosclérose	11
2.1.2. L'artériosclérose et la calcification.....	12
2.1.3. La thrombose.....	13
2.1.4. Les anévrismes.....	13
3. <i>Le système cardiovasculaire</i>	14
3.1 Le cœur.....	14
3.2 Le sang	14
3.3 Les vaisseaux	15
3.3.1 Structure de la paroi vasculaire saine.....	15
3.3.2 Mécanique des vaisseaux sanguins.....	17
4. <i>Rôles et fonctions de l'endothélium</i>	18
4.1 Origine embryonnaire.....	18
4.1.1. Angiogenèse	18
4.1.2. Vasculogenèse	19
4.2 Les cellules endothéliales (CE).....	19
4.3 Les cellules progénitrices endothéliales (EPCs).....	21
4.3.1 Rôles des EPCs	23
4.3.2 Origines	24
4.3.3 Stratégies d'obtention des EPCs.....	25
4.4 Pathologies de l'endothélium	26
5. <i>Les substituts vasculaires</i>	28
5.1 Les prothèses vasculaires biologiques	29
5.2 Les prothèses vasculaires synthétiques.....	30
5.3 Les prothèses hybrides ou issues de l'ingénierie tissulaire	31
6. <i>Les causes d'échecs à l'implantation</i>	33
7. <i>Les stratégies d'amélioration des substituts vasculaires</i>	35
7.1 Caractéristiques idéales d'un substitut vasculaire	35

7.2 Modification du matériau avec des protéines ou des facteurs de croissance.....	35
7.3 Modification du matériau avec des peptides.....	36
7.4 Modification du matériau avec des anticorps.....	37
7.5 Les différents modes de fonctionnalisation de surface du PET.....	38
7.5.1 Les traitements chimiques.....	39
7.5.2 La dégradation enzymatique.....	39
7.5.3 Les traitements plasma.....	39
7.5.4 Les traitements aux UV.....	40
CHAPITRE 1 : PROJET DOCTORAL.....	41
1. Objectifs.....	41
2. Choix des principes actifs.....	43
La sitagliptine.....	44
Le peptide SFLLRN.....	46
Le peptide RGD.....	47
Le peptide GHM.....	48
3. La micro-structuration.....	50
4. Les techniques de microstructuration.....	52
4.1 La photolithographie.....	52
4.2 La soft-lithographie par microcontact.....	54
4.3 Fusion par faisceau d'électrons.....	55
4.6 La nanoimpression.....	56
CHAPITRE 2 : CARACTERISATION DES ECFCS.....	58
CHAPITRE 3 : VALIDATION DES GENES DE REFERENCES POUR LA RT-QPCR DES CELLULES MONONUCLEES DU SANG DE CORDON, LES CELLULES ENDOTHELIALES EN ETAT DE DIFFERENCIATION ET LES CELLULES ENDOTHELIALES MATURES.....	62
<i>Résumé</i>	63
<i>Abstract</i>	64
1. Introduction.....	65
2. Materials and methods.....	68
2.1 Experimental design.....	68
2.2 Isolation of mononuclear CD34+ cells and expansion of EPCs.....	69
2.3 Human saphenous vein cells extraction and culture.....	70
2.4 RNA isolation and cDNA synthesis.....	70
2.5 Quantitative real-time procedure.....	70
2.6 PCR product assessment.....	71
2.7 PCR efficiency.....	72
2.8 Data analysis.....	73
2.9 Final ranking.....	74
3. Results.....	74
3.1 Annealing temperature, amplification efficiency.....	74
3.2 Cq values.....	76
3.3 Analysis of candidate housekeeping gene stability.....	77
4. Discussion.....	87
5. Conclusion.....	91
CHAPITRE 4 : MICROSTRUCTURATION BIOACTIVE DE BIOMATERIAUX POUR L'INDUCTION DE LA DIFFERENCIATION DES ECFCS.....	93
<i>Résumé</i>	94

<i>Abstract</i>	95
1. Introduction.....	96
2. Materials and methods.....	99
2.1 Materials.....	99
2.2 Covalent immobilization of biomolecules onto PET surfaces.....	99
2.3 Preparation of micropatterned surface.....	99
2.4 Surface Characterization.....	100
2.5 Cell culture.....	102
3. Results.....	104
Surface characterization of immobilized biomolecules on PET surfaces.....	104
3.1 XPS.....	104
3.2 Evaluation of surface topography by AFM.....	107
3.3 Peptide density.....	108
3.4 Toluidine Blue-O assay.....	108
3.5 Inhibition assay of DPP4 by sitagliptin grafted surfaces.....	109
3.6 Micropatterning of surfaces, validation of the method and patterns.....	111
In vitro evaluation.....	111
3.7 Differentiation of ECFCs on bioactive surfaces.....	111
4. Discussion.....	119
5. Conclusion.....	123
Supporting Information.....	124
Content.....	124
CHAPITRE 5 : ÉTUDE COMPLEMENTAIRE.....	127
Vers une adhésion sélective des ECFCs et leur différenciation.....	127
CHAPITRE 6 : DISCUSSION GENERALE.....	136
Caractérisation des cellules.....	137
Greffage, caractérisation de surface et de l'activité des principes actifs.....	138
Différenciation des ECFCs.....	140
CHAPITRE 7 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	143
REFERENCES.....	146
ANNEXES.....	169
1. <i>Détermination de la concentration de greffage</i>	169
2. <i>Protocole d'obtention des ECFCs</i>	170
3. <i>Images AFM des matériaux modifiés</i>	171
COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES.....	172

Liste des figures

Figure 1 : Graphique du nombre de publications obtenues dans scopus en utilisant comme mots-clés "regenerative medicine" et "vascular healing".	xxi
Figure 2 : Représentation schématique des surfaces homogènes et patternées utilisées dans ce projet de thèse. En rouge les peptides qui vont améliorer l'adhésion des cellules progénitrices et en gris les peptides ou molécules qui vont induire la différenciation des cellules endothéliales progénitrices.	xxiii
Figure 3 : Stratégies utilisées pour la médecine régénératrice (3). Des cellules primaires directement prélevées chez le patient peuvent être utilisées pour générer un type cellulaire désiré par reprogrammation (gauche). Des cellules souches embryonnaires (ESCs) et des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) issues du patient ou non peuvent être différenciées <i>in vitro</i> par différenciation dirigée (droite).	2
Figure 4 : Principe de l'ingénierie tissulaire. Des cellules prélevées du patient sont mises en cultures pour expansion puisensemencées sur un matériau qui servira d'échafaudage. Cet échafaudage sera ensuite mûri dans un réacteur puis greffé chez le patient. Adapté de (8).	3
Figure 5 : Illustration de biomatériaux utilisés pour remplacer, améliorer les fonctions d'un tissu ou d'un organe malade. Adapté de Patel <i>et al.</i> (11).	5
Figure 6 : Cinétique de la réponse innée à l'implantation (22) à gauche. Intensité de la Variation temporelle de la réponse inflammatoire en fonction du temps à droite, l'intensité et la cinétique dépendent des caractéristiques des matériaux (taille, topographie, chimie et physique de surface) (24).	9
Figure 7 : Évolution de la plaque d'athérome dans le temps adapté de (28).	11
Figure 8 : Schéma de l'incidence du flux sur les cellules endothéliales adapté de (30) Images en contraste de phase de la migration des cellules après 21h de culture statique, sous flux laminaire ou sous flux oscillatoire (29).	12
Figure 9 : Image par microscopie électronique à balayage des cellules constituant le sang, un globule rouge, un globule blanc et une plaquette (Wikimedia Commons).	15
Figure 10 : Structure d'une artère et d'une veine saine, d'après (40).	17
Figure 11 : Cascade de différenciation du précurseur commun aux EPCs et aux cellules souches hématopoïétiques (+, positif ; -, négatif) (74).	24
Figure 12: Différentes méthodes d'obtention des EPCs (80)	25
Figure 13 : Représentation schématique de la comparaison entre une artère saine et une artère athérosclérotique (Frédérique Koulikoff, Inserm 2012).	26
Figure 14 : Les différentes étapes de progression des pathologies vasculaires provoquées par un dépôt de plaque d'athérome (82).	27
Figure 15: Structure hiérarchique du système vasculaire à l'échelle moléculaire, organe et corps. L'ingénierie vasculaire est un système qui ne peut être compris qu'en utilisant une approche multi-échelle et multidisciplinaire. D'après Tanishita et Yamamoto.	28
Figure 16 : Structure du PET.	39

Figure 17: Objectif du projet de doctorat. Ici le but est de recréer l'intima à la surface d'un film de PET.....	41
Figure 18 : Structure chimique de la sitagliptine.....	44
Figure 19 : Mode d'action du DPP4 (à gauche) et inhibition par la sitagliptine (à droite).	45
Figure 20 : Formule développée du peptide SFLLRN.....	46
Figure 21 : Schéma d'activation de PAR-1 par le clivage de la séquence en N-terminal, d'après (168).....	46
Figure 22 : Formule développée du peptide GRGDS.....	47
Figure 23 : Interaction en la fibronectine contenant la séquence RGD et des intégrines de la membrane cellulaire, d'après (172).	48
Figure 24 : Formule développée du peptide GHM.	48
Figure 25 : Différenciation des cellules souches mésenchymateuses en fonction de la forme du motif (178).....	51
Figure 26 : Image de contraste de phase de cellules endothéliales en culture statique et en culture dynamique 15dyn/cm ² (Barre d'échelle 100µm) (180).....	51
Figure 27 : Schéma de la photolithographie sur les films de PET.....	52
Figure 28 : Motifs choisis pour la micro-structuration de surfaces.	53
Figure 29 : Illustration de la procédure de soft lithographie pour des tampons de PDMS (186).	55
Figure 30: Représentation schématique de la fusion par faisceau d'électrons (190).	56
Figure 31: Les deux procédés de la NIL. La nanoimpression thermique (a) et par UV (b) (193).....	56
Figure 32 : Population CD34 ⁺ des cellules mononucléées. La population positive est identifiée dans la section R2 de la figure. La population identifiée sur le gauche de la figure correspond aux débris cellulaires et aux érythrocytes résiduels.....	58
Figure 33 : Images de microscopie optique du début d'une colonie d'ECFC issue du sang de cordon ombilical (à gauche) après 12 jours de culture sur collagène et des ECFC à confluence à 19 jours de culture sur collagène (à droite).	59
Figure 34 : Images de microscopie optique des cellules mononucléées CD34 ⁺ (à gauche) et des ECFCs (à droite).....	60
Figure 35 : Expressions géniques des marqueurs souches et endothéliaux par RT-qPCR, comparaison des valeurs de cycle de quantification (Cq) aussi appelés Ct, résultats obtenus pour 3 répliques biologiques.....	61
Fig. 36: PCR-amplified products, 25 ng of total amplified cDNA of each target were loaded per lane. Each primer gave rise to a single band of the expected length.....	76
Figure 37: Distribution of the Cq values for the seven candidate reference genes. The black horizontal line within the box plot represents the median Cq value. The box indicates the first quartile Q1 and the third quartile Q3.....	77

Fig. 38: Expression stability value M of seven RG candidates as calculated by geNorm (qbase+). The lowest M value indicates the most stable expression.	81
Fig. 39: Pairwise variation to determine the optimal number of RGs for RT-qPCR by geNorm. V3/4 exhibited value below 0.15, thus indicating that 3 reference genes were necessary for the experiment.	82
Fig. 40: Reference gene evaluation stability by the ΔCq approach.	83
Fig. 41: Reference gene stability of the three best candidates, as determined by ΔCq	84
Figure 42: High resolution spectra of C1s, of all the steps of the modification of PET films.....	106
Figure 43: Fluorescent peptide density on PET surfaces, estimated by fluorescence microscopy. Fluorescent images of surface grafted with fluorescent peptides: a GRGDSK– TAMRA in red, 10^{-5} M in solution, 10^{-5} M in solution. (Scale bar 100 μ m).....	108
Figure 44: Evaluation of COOH density onto modified surfaces. Differences are significant between native PET and the rest of the modified surfaces. In the same way value of COOH densities of oxidized surfaces is significantly higher compared to all others surfaces. p value ≤ 0.0001	109
Figure 45: Standard curve of DPP4 inhibition with sitagliptin in solution (A) Inhibition of DPP4 by sitagliptin immobilized on PET film (B) p value ≤ 0.0001 . DPP4 cleaves a substrate to release a quenched fluorescent group (Excitation/Emission wavelengths = 360/460 nm). In presence of a DPP4 inhibitor, the cleavage is inhibited. A lower fluorescence corresponds to the inhibition of DPP4.	110
Figure 46: (A) Schematic representation of peptide micropatterning onto polymer surfaces using photolithography. (B) Fluorescence microscopy images of the four patterns used in this work; Lines of 50 μ m (1) or 10 μ m (2) and rectangles of 50 μ m (3), and rectangles of 10 μ m width (4). Here GRGDSK-TAMRA (in red) and sitagliptin (1,2,3, and 4, sitagliptin is not conjugated with a fluorophore) were co-grafted to prove that we are able to graft two peptides on the same surfaces with controlled design (3).....	111
Figure 47: CD34 gene expression measured by RT-qPCR (A) and CD34 protein expression evaluated by fluorescence microscopy (B) on the surfaces grafted with GRGDS and sitagliptin. For a practical approach the statistical analysis is presented on a table. The statistical analysis was done by a One-way ANOVA followed by a Tuckey analysis. P values are represented as following * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001 , **** ≤ 0.0001	113
Figure 48: Expression of KDR (A and B) and vWF (C and D) on the surfaces grafted with GRGDS and sitagliptin. RT-qPCR results are expressed in fold change (A and C), immunofluorescence quantifications are represented on the graphs B and D. For a practical approach the statistical analysis is presented on a table. The statistical analysis was done by a One-way ANOVA followed by a Tuckey analysis. p values are represented as following * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001 , **** ≤ 0.0001	115
Figure 49 : Séquence de modification du PET-GHM. (1) Préparation des surfaces de PET pour obtenir des groupements carboxyles (–COOH), (2) Réaction avec le 1-(2-amino-ethyl) - pyrrole-2,5-dione hydrochloride (pyrrole), (3) immobilisation du peptide GHM.	128
Figure 50 : Spectre de haute résolution du PET-GHM et du PET-RSFLLRN.....	129
Figure 51 : Image de microscopie à fluorescence du PET modifié avec le peptide GHMK-TAMRA (en rouge) et le RSFLLRNK-FITC (en vert). Barre d'échelle 100 μ m.	130

Figure 52 : Expression de CD34 (A et B) sur les surfaces greffées avec GRGDS et/ou SFLLRN. Les résultats de RT-qPCR sont exprimés en Fold change (A), les quantifications d'immunofluorescence sont représentées sur l'histogramme B. Pour une approche pratique, l'analyse statistique est présentée dans un tableau. L'analyse statistique a été réalisée par un One-way ANOVA suivi d'une analyse de Tuckey. Les valeurs p sont représentées comme suit * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$, **** $\leq 0,0001$ 131

Figure 53 : Expression de KDR (A et B) et de vWF (C et D) sur les surfaces greffées avec GRGDS et/ou SFLLRN. Les résultats de RT-qPCR sont exprimés en facteur de variation (A et C), les quantifications d'immunofluorescence sont représentées sur les graphiques B et D. Pour une approche pratique, l'analyse statistique est présentée dans un tableau. L'analyse statistique a été réalisée par un One-way ANOVA suivi d'une analyse de Tuckey. Les valeurs p sont représentées comme suit * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$, **** $\leq 0,0001$ 132

Figure 54 : Intensité de fluorescence mesurée par microscopie à fluorescence du GRGDSK-TAMRA après plusieurs durées de rinçage ou des rinçages sous ultrasons..... 169

Figure 55 : Schéma de la séparation des cellules mononucléées issues du sang total..... 170

Liste des tableaux

Table 1 : Les différentes classes de biomatériaux utilisés en médecine.....	7
Table 2 : Comparaison entre les EPCs précoces, tardifs et les cellules endothéliales matures, d'après (21,22).....	22
Table 3 : Type de prothèse à utiliser pour la chirurgie en fonction du diamètre de l'artère à remplacer.....	31
Table 4: Evaluated References Genes.....	68
Table 5: Candidate Reference Genes for Validation	71
Table 6: Thermal Cycling Profile	72
Table 7: RT-qPCR Amplification Efficiency	73
Table 8: Reference Gene Stability Evaluations by NormFinder.	80
Table 9: Reference Gene Evaluation Stability by the ΔCq Method.	85
Table 10: TaqMan probes for RT-qPCR.	103
Table 11: Experimental atomic composition (%) obtained by XPS analysis for native and modified PET surfaces.....	105
Table 12: Surface roughness (Ra, nm) of different surfaces by AFM analysis.....	107
Table 13: Quantification of CD34-positives after 2 days of culture onto various bioactive surfaces. The expression of CD34 by HSVECs was used as the background. The average fluorescence value of HSVECs and other conditions was compared on immunofluorescences images. A cell is positive when the fluorescent intensity value of the region of interest (the entire cell) is higher than the average fluorescent intensity value of HSVECs (the standard deviation was included in the value). At least 30 cells were measured for each condition.....	117
Table 14: Quantification of vWF-positives cells after 2 days of culture onto various bioactive surfaces. The expression of vWF by CD34+ cells was used as the background. The average fluorescence value of CD34+ cells and other conditions was compared on immunofluorescences images. A cell is considered as positive when the fluorescence intensity value of the region of interest (the entire cell) is higher than the average fluorescent intensity value of CD34+ (the standard deviation was included in the value). At least 30 cells were measured for each condition.....	118
Table 15 : Composition de surface des matériaux obtenus par XPS, % atomique.....	129
Table 16: Quantification des CD34 ⁺ après 2 jours de culture sur diverses surfaces bioactives. L'expression de CD34 par les HSVECs a été utilisée comme contrôle négatif. La valeur moyenne de fluorescence des HSVECs et d'autres conditions a été comparée sur des images d'immunofluorescence. Une cellule est considérée positive lorsque la valeur de l'intensité de fluorescence de la région d'intérêt (la cellule entière) est supérieure à la valeur de l'intensité de fluorescence moyenne des HSVECs (l'écart type était inclus dans la valeur). Au moins 30 cellules ont été mesurées pour chaque condition.....	134

Table 17 : Quantification des cellules vWF⁺ après 2 jours de culture sur diverses surfaces bioactives. L'expression de vWF par les CD34⁺ a été utilisée comme contrôle négatif. La valeur moyenne de fluorescence des CD34⁺ et d'autres conditions a été comparée sur des images d'immunofluorescence. Une cellule est considérée positive lorsque la valeur de l'intensité de fluorescence de la région d'intérêt (la cellule entière) est supérieure à la valeur de l'intensité de fluorescence moyenne des CD34⁺ (l'écart type était inclus dans la valeur). Au moins 30 cellules ont été mesurées pour chaque condition..... 135

Listes des abréviations et sigles

2D :	2 dimensions
3D :	3 dimensions
AFM :	microscope à force atomique
AVC :	accident vasculaire cérébrale
BAEC :	bovine aortic endothelial cells
BOEC :	blood outgrowth endothelial cells
BSA :	bovine serum albumin
cDNA :	complementary deoxyribonucleic acid
CE :	cellule endothéliale
CEC :	cellule endothéliale circulante
CFU-EC :	colony forming unit endothelial cells
CHU :	centre hospitalier universitaire
CML :	cellules musculaire lisses
SDF-1 α (ou CXCL12) :	stromal cell-derived factor 1
DAPI :	4',6-diamidino-2-phénylindole
DNA :	deoxyribonucleic acid
DPP4 :	dipeptidyl peptidase 4
EBM2 :	endothelial basal medium
ECFC :	endothelial cell forming colony
ECM :	extracellular matrix
EDC :	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide
EDRF :	endothelium-derived relaxing factor
EGM2-MV :	endothelialgrowth media 2 microvascular
ELISA :	enzyme linked immunosorbent assay
eNOS :	endothelial nitric oxide synthase
EPC :	endothelial progenitor cell
ePTFE :	polytétrafluoroéthylène expansé
ESC :	embryonic stem cell
FA :	focal adhesion
FBS :	fetal bovine serum
FDA :	food and drug administration
FGF :	fibroblast growth factor
FITC :	fluorescein isothiocyanate
GDP :	guanosine diphosphate
GTP :	guanosine triphosphate
HOTMEC :	human omental tissue microvascular endothelial cells
HSC :	hematopietique stem cell
HSVEC :	human saphenous vein endothelial cells
HUVEC :	human umbilical vein endothelial cells
iPSC :	induced pluripotent stem cells

KDR= VEGFR2 :	kinase insert domain receptor ou vascular endothelial growth factor receptor 2
LDL :	low-density lipoprotein
MCV :	maladie cardiovasculaire
MEC :	matrice extracellulaire
MES :	4-morpholinoethanesulfonic acid
MNC :	mononuclear cells
mRNA :	acide ribonucléique messenger
NHS :	N-hydroxysuccinimide
NIL :	nanoimprint lithography
NO :	nitri oxide
OEC :	outgrowth endothelial cell
OMS :	organisation mondiale de la santé
PBS :	phosphate buffer saline
PCR :	polymerase chain reaction
PDEC :	progenitor derived endothelial cell
PDMS :	polydiméthylsiloxane
PET :	poly(téréphtalate d'éthylène)
RNA :	ribonucleic acid
RT-qPCR :	quantitative reverse transcription PCR
SD :	standard deviation
SMC :	smooth muscular cells
TAMRA :	5-Carboxytetramethylrhodamine
TBO :	toluidin-O blue
tPA :	plasminogen activator
UEA-1 :	ulex europaeus agglutinin I
UV :	ultra violet
VEGF :	vascular endothelial growth factor
vWF :	von Willebrand Factor
WHO :	world health organization
XPS :	X-ray photoelectron spectroscopy

À papy Jean,

Ce que nous devons apprendre à faire, nous l'apprenons en le faisant.
Aristote

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mes directeurs de thèse, Marie-Christine Durrieu et Gaétan Laroche. La confiance qu'ils m'ont accordée et leurs encouragements m'ont beaucoup aidé à mener à terme ce travail. Leur grande disponibilité a permis un suivi permanent du déroulement des travaux par Skype ou en personne. Je tiens aussi à les remercier pour leur gentillesse et leur bienveillance à mon égard pendant ces quatre années. Merci aussi pour leur bonne humeur, leur joie de vivre, les rires de Gaétan qui résonnent dans tous le labo. Merci de m'avoir envoyé un peu partout en congrès pour présenter mes travaux, c'était une vraie chance.

Madame Véronique MIGONNEY, professeur à l'université Paris 13 et Monsieur David SMADJA, professeur des université et praticien hospitalier à la faculté de Paris Descartes ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, je les remercie vivement. Je souhaite également remercier Marta CERRUTI et Laurence BORDENAVE, leurs commentaires et leurs remarques ont constitué une précieuse aide dans la rédaction finale du manuscrit.

Au cours de cette thèse, j'ai eu le plaisir de travailler avec différents laboratoires ou industriels. Je tiens à remercier le laboratoire Biotis, Laurence Bordenave, Noélie Thébaud, Reine Bareille et Audrey Aussel pour leurs conseils sur l'extraction et la culture des ECFCs. Je remercie aussi Cédric Ayela de l'IMS pour le temps passé en salle blanche en photolithographie. Je remercie également Corinne Hoesli et Mohamed Elkhodiry pour leurs précieux conseils sur les EPCs et le partage de connaissances, et aussi le partage de milieu de culture en fin de parcours qui m'aura valu un petit stress. Je remercie Rescoll et plus particulièrement Marie-Pierre Foulc et Jeanne-Marie Granger pour leur aide pour la caractérisation des surfaces.

Mes travaux ont été effectués à l'Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets à Bordeaux (France) et au Laboratoire d'Ingénierie de Surface de Québec (Canada). Je tiens à exprimer ma gratitude Sophie Lecomte directrice du CBMN pour son accueil au sein du laboratoire.

Merci à Reiko Oda du CBMN, qui nous a accueilli au début dans la ODA's Team (dans l'IECB) merci pour ton accueil dans ton équipe et pour ta gentillesse au labo comme en dehors pour nos soirées euro 2016 et coupe du monde 2018. J'en profite pour remercier les autres membres permanents de l'équipe Émilie Pouget et Sylvain Nlate et les anciens de l'équipe, Loïc, Hélène, Alla, Guillaume, Jiaji, Gregor présents quand j'ai commencé ma thèse. Et un grand merci aux presque nouveaux de la ODA's team, Antoine et Antoine, Jié, Shaheen, Mariam.

Puis en 2016, nous avons traversé la route pour nous installer au CBMN, pour former l'équipe 3Bio's. Ici, je souhaite remercier Christel Chanseau, merci pour ton aide précieuse dans la fabrication des quelques milliers de surfaces mais aussi pour les papotages et les rigolades au labo. Laurent Plawinski (laitue), merci de m'avoir appris les rudiments de la culture cellulaire et me faire progresser un peu plus chaque jour et merci aussi pour ta bonne humeur.

Merci à la dream team composée de Laurence, Catarina et Bruno, it's your turn now, collègues mais avant tout amis, on a partagé beaucoup pendant ces 3 ou 4 ans alors merci pour, la danse, les rires, le vin, les gâteaux, les pizzas, l'entrecôte, le cardio, le yoga, la plage et j'en passe.

Thank you also to Jian Qiao, it's a pleasure to work with you. Merci à Pierre-Henri, Julie, Irfan et Luce. Merci à Émilie, c'est toi qui reprends le flambeau, tu vas bénéficier du bureau près du radiateur, des plantes (Laurence et Caroline) et du reste.

Je pense aussi aux anciens membres de l'équipe MCO, ma copine de danse, de sport, de BU, de course à pied et maintenant amie, bon on va se voir plus souvent maintenant qu'on est plus si loin. Marion, d'abord copine de culture cellulaire puis collègue et amie avec une mission, testeuse de restau, viens me voir dans l'est.

Je voudrai remercier maintenant les personnes qui ont contribués à ce travail directement ou indirectement de l'autre côté de l'atlantique.

Dans un premier temps je souhaite remercier mes collègues du LIS, les professionnels de recherche, Pascal Chevallier, toujours là pour répondre à une question, corriger un abstract mais aussi et surtout remonter le moral des troupes. Ibrahim, merci d'avoir ouvert la voie de la cotutelle, pour tes remarques et questions toujours pertinentes et pour ta bonne humeur.

Je voudrai adresser un merci spécial à Andrée-Anne Guay Bégin, pour sa grande aide au cours de ces années. Je la remercie plus spécialement pour les nombreuses discussions et suggestions précieuses et pour ses encouragements quand j'en avais besoin.

Morgane, ma copine de danse, coloc et surtout amie merci de m'avoir fait la surprise de venir à ma soutenance (j'y pensais un peu quand même) et merci d'être arrivée suffisamment en avance à ladite soutenance pour que je puisse me remettre de mes émotions.

Et merci aux étudiants aussi...

Ivàn (une belle découverte et une amitié qui dure, merci de m'avoir attendu si souvent pour ne pas que je rentre seule après des heures passées en culture cellulaire, nos discussions sur l'avenir, le doctorat, tes conseils avisés pendant mes répétitions). Merci aussi à Émilie (encore ?), Natalia, Nawel, Souhaila, Saeideh, Amna, Simon, Alex. Merci aux anciens de l'équipe, Marie, Gad, Julien, Stephanie, Stephane,

Et puis les membres des autres équipes aussi, le LBB avec Vanessa, Sergio (pollo), Francesco, Linda, Dimitria, Sergio, Dani, Lucie, Ludivine, Caro, Juliana, Mathieu, Carolina, Jad, Samira, Gabriel, Carlo, Max, Sébastien. L'équipe de Sébastien Fortin, Mathieu, Corinne, Mitra, Marie-France, Chahrazed.

Merci à mes colocs (et presque colocs) de rêves (the best human/cat in Québec), Sébastien, Émilie, Audrey, Jacopo, et Jacob. Merci à mes colocs de rêves en France, Marie et Patricia.

Faire une cotutelle dans deux pays si éloignés ça veut dire deux fois plus de déménagements (avec une moyenne de 2 fois par an), deux fois plus de démarches administratives, deux fois plus de colocs et deux fois plus de rencontres.

Merci à mes amis d'ici et d'ailleurs, Sonia, Élise, Livia, Léna, Guillaume, Olivier, Marine, Blandine, Jennifer, Flo, Marina, Ciaran, Tamille.

Last but not least, un GRAND merci à ma famille, mes parents pour leur soutien sans faille, leur confiance, merci pour vos visites ou que j'aïlle, merci à mon frère et ma belle-sœur de me montrer qu'il y a une vie en dehors de la thèse, merci à ma nièce parce qu'elle est beaucoup trop mignonne et pour sa maîtrise du concept de Skype à seulement 17 mois. Laurie et Arnaud, merci de venir me voir ou que j'aïlle et pour tout le reste. Merci à mes oncles et tantes, cousins et cousines pour leurs encouragements.

La thèse de doctorat est souvent jugée comme un travail solitaire, puis quand je vois la liste que je viens de dresser je me dis que j'ai eu de la chance.

Avant-propos

Actuellement, les matériaux utilisés pour fabriquer des prothèses et des endoprothèses vasculaires ne permettent pas la régénération de l'endothélium vasculaire (la couche de cellules qui tapisse la surface interne des vaisseaux sanguins). Cette couche de cellules possède la capacité d'inhiber l'inflammation et la formation de thrombus (ou caillot de sang). Le risque de thrombus après une intervention chirurgicale ayant nécessité la pose d'une endoprothèse est élevé. Le risque de ré-occlusion dans les 5 ans est de 50 % dans le cas des prothèses de faible diamètre (inférieur à 6mm) (1 et 2).

Pour répondre à cette problématique, un matériau polymère, le Polyéthylène Téréphtalate (PET ou Dacron®) sera fonctionnalisé par des principes actifs innovants. Ces principes actifs, seront immobilisés sous forme de micromotifs, pour étudier leur impact sur le recrutement, l'adhésion et la différenciation des cellules endothéliales progénitrices (EPCs) en cellules endothéliales matures. Ce matériau fonctionnalisé à visée biologique pourra donc être catégorisé comme un biomatériau.

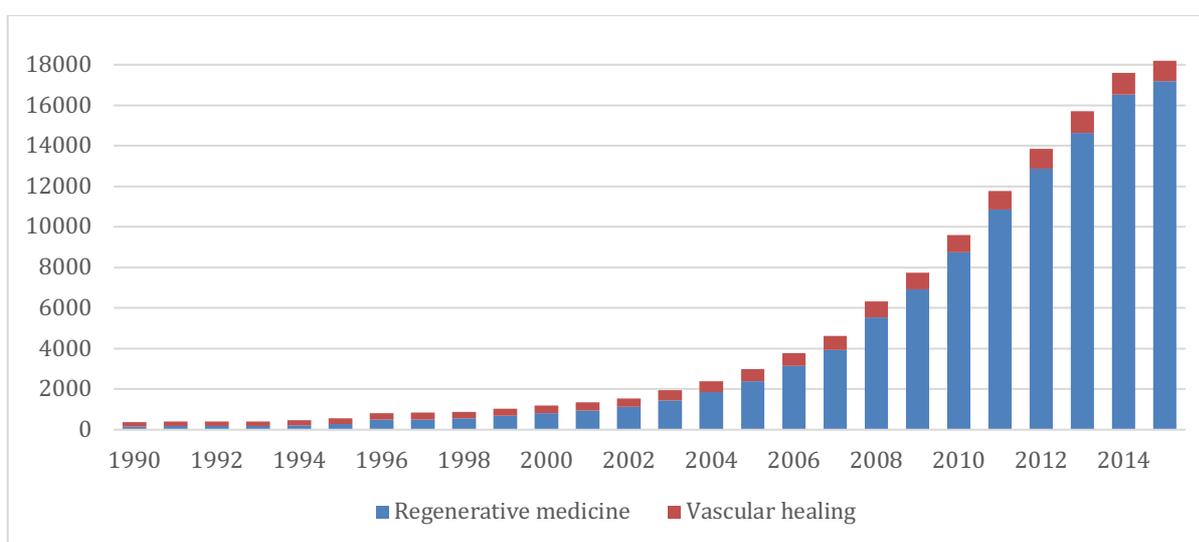


Figure 1 : Graphique du nombre de publications obtenues dans scopus en utilisant comme mots-clés "regenerative medicine" et "vascular healing".

Le nombre de travaux ayant pour thématique la médecine régénératrice augmente considérablement depuis le début des années 2000. Il en va de même pour les travaux concernant la réparation vasculaire. Ces deux domaines connexes ont connu un essor au début des années 2000. Le développement de nouveaux dispositifs médicaux tire parti des récentes avancées réalisées par des spécialistes de la biologie du développement, de biologie cellulaire mais aussi des spécialistes des matériaux et de génie des procédés. L'augmentation du nombre de patients ayant

besoin de greffes est due au vieillissement constant de la population et à l'augmentation de la prévalence du diabète et des maladies cardiovasculaires. Les maladies cardiovasculaires sont par définitions les pathologies qui touchent le cœur et les vaisseaux. Dans la plupart des cas, un dépôt lipidique est responsable d'une diminution de la lumière artérielle et empêche le sang de circuler normalement. Dans les cas les plus simples, un traitement médicamenteux et de la prévention concernant les bons comportements à adopter peuvent suffire à enrayer ou stabiliser le problème.

L'hypothèse ici est la suivante : La fonctionnalisation de surface par des principes actifs pourrait permettre non seulement le recrutement des cellules endothéliales progénitrices mais pourrait induire leur adhésion et leur différenciation en cellules matures. Les cellules ainsi recrutées sur la surface vont pouvoir coloniser l'intérieur des prothèses synthétiques et donc recréer la monocouche de cellules endothéliales qui tapisse l'intérieur des vaisseaux sanguins. Cette couche de cellules appelée endothélium ou intima est la surface hémocompatible de référence.

La stratégie privilégiée consiste à améliorer le recrutement et favoriser l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales progénitrices en contact avec des cellules endothéliales matures, pour reformer la couche de cellules endothéliales qui est le tissu hémocompatible de référence. Ainsi, la fonctionnalisation du matériau, le polyéthylène téréphtalate (PET), de façon homogène et microstructurée permettra de cibler les cellules endothéliales progénitrices. La microstructuration permettra de mimer l'environnement des cellules (la matrice extracellulaire) et d'induire l'alignement des cellules dans la direction du motif. En effet les cellules endothéliales sont naturellement alignées à l'intérieur des vaisseaux dans le sens du flux sanguin. En forçant les cellules endothéliales à s'aligner en direction d'un motif nous allons pouvoir évaluer l'influence de cet alignement sur leur différenciation.

Deux principes actifs seront immobilisés en surface, le premier permettra le recrutement et l'adhésion des cellules et le second sera choisi pour induire la différenciation des EPCs en cellules endothéliales matures (Figure 2).

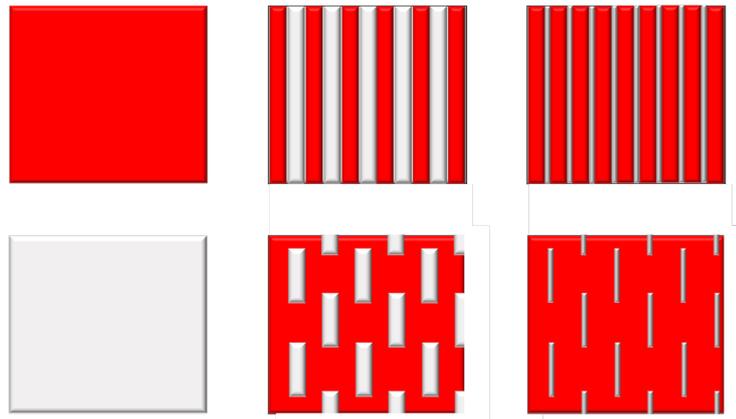


Figure 2 : Représentation schématique des surfaces homogènes et patternées utilisées dans ce projet de thèse. En rouge les peptides qui vont améliorer l’adhésion des cellules progénitrices et en gris les peptides ou molécules qui vont induire la différenciation des cellules endothéliales progénitrices.

La méthode qui permettra de greffer deux principes actifs différents et de façon organisée sur une même surface est la photolithographie. Cette méthode de modification de surface a déjà été utilisée dans des travaux antérieurs de l’équipe de Marie-Christine Durrieu et celle de Gaétan Laroche. Ainsi, le CBMN (biologie des membranes et des nano-objets) a su apporter son expertise en modification de surface et microstructuration, les tests préliminaires de biologie ont aussi été réalisés au CBMN. La caractérisation des surfaces a été réalisée au Laboratoire d’Ingénierie de Surfaces (LIS). La proximité de ce laboratoire avec le l’hôpital Saint-François d’Assise du CHU de Québec a permis de recevoir des prélèvements de sang de cordons pour en extraire les cellules progénitrices endothéliales. Ces travaux s’inscrivent dans la continuité des travaux de Marie-Christine Durrieu qui montre que la microstructuration a un impact sur la réponse cellulaire en termes de différenciation et d’alignement.

Cette méthode de structuration permettra d’obtenir des matériaux avec des principes actifs greffés de façon contrôlée. Par ailleurs, ces matériaux microstructurés seront comparés à des matériaux fonctionnalisés de façon homogène. Ces deux types de matériaux pourront ensuite être comparés *in vitro*.

Pour mener à bien ce projet, plusieurs méthodes de caractérisation de surface seront utilisées, pour déterminer si les principes actifs sont bien greffés sur le PET mais également pour en évaluer la densité. La spectroscopie photoélectronique induite par rayons X (ou XPS), sera utilisée pour prouver le greffage covalent des principes actifs. Le microscope à force atomique (AFM) servira à analyser les surfaces après le greffage pour évaluer la rugosité. Des techniques colorimétriques serviront à doser des groupements chimiques caractéristiques en surface des matériaux modifiés. L’énergie de surface sera étudiée également par mesure de l’angle de contact

entre le matériau et plusieurs liquides avec des polarités différentes. Enfin la densité de peptides greffés sera évaluée par microscopie à fluorescence avec des peptides marqués. Dans le cas de la sitagliptine la densité sera mesurée grâce à la capacité inhibitrice des surfaces sur le dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4).

Les effets des principes actifs sur le comportement des cellules seront évalués par qRT-PCR afin de quantifier l'expression génique de certains marqueurs caractéristiques des cellules souches et des cellules endothéliales. Des marquages d'immunofluorescence seront réalisés pour estimer leur prolifération et étudier leur morphologie (adhésion focales et filaments d'actines), mais aussi pour étudier la différenciation de ces cellules.

Finalement, si les principes actifs choisis et greffés sur le PET permettent de recruter les cellules endothéliales progénitrices et les cellules matures, ceci pourrait faciliter la régénération d'une monocouche de cellules sur les prothèses vasculaires déjà disponibles commercialement, et offrir à celles-ci une activité anti-thrombogénique et une durée de vie plus longue.

Dans un premier temps la sélection des principes actifs innovants à greffer en surface a fait l'objet d'une étude bibliographique, ces principes actifs une fois choisis doivent être greffés de façon covalente sur les surfaces. Une stratégie de greffage par oxydation puis activation des groupement carboxyles disponibles en surfaces a été choisie. Après l'activation les groupements carboxyles réactifs peuvent réagir avec des groupements amines primaires disponibles à l'extrémité N-term des séquences peptidiques ou des groupements amines disponible dans la structure chimique d'une molécule. Pour étudier l'effet des matériaux sur des progéniteurs endothéliaux il a fallu dans un premier temps s'assurer de l'identité des cellules que nous utilisons, De la même manière pour utiliser la technique de RT-qPCR et pouvoir normaliser nos résultats nous avons dû déterminer des gènes de référence avec lesquels normaliser les résultats. Ces gènes ont été testés avec toutes les conditions dans lesquelles les cellules ont été utilisées, de leur extraction, par l'ensemencement sur les matériaux et jusqu'à leur récolte.

La partie revue de littérature de ce travail abordera le contexte de ce projet avec une revue de la littérature. La problématique du projet sera explicitée, il s'inscrit dans la thématique des maladies cardiovasculaires. Des bases théoriques sur la biologie des vaisseaux sanguins ainsi que l'histoire des biomatériaux utilisés pour traiter les pathologies cardiovasculaires seront évoquées. Les objectifs de ce projet seront détaillés et les bases conceptuelles seront définies dans le Chapitre 1.

Le Chapitre 2 sera constitué de résultats préliminaires nécessaires à la suite du projet, l'extraction de cellules à partir du sang de cordon permet d'obtenir des ECFCs mais la

différenciation amène parfois des contaminations par d'autres types cellulaires, il est donc nécessaire de s'assurer que nous travaillons avec le bon type cellulaire avant de poursuivre nos expériences.

Le Chapitre 3 sera constitué d'un premier article intitulé "Validation of Reference Genes for Real-Time PCR of Cord Blood Mononuclear Cells, Differentiating Endothelial Progenitor Cells, and Mature Endothelial Cells" publié en 2018 dans le journal *Experimental Cell Research* par Caroline Royer, Andrée-Anne Guay Bégin, Laurent Plawinski, Lucie Levesque, Marie-Christine Durrieu et Gaétan Laroche. Cet article permet d'établir le meilleur trio de gènes de référence à utiliser pour comparer l'expression génique des cellules mononucléées CD34+, des ECFCs et des cellules de veines saphène. Dans ce travail, j'ai réalisé toutes les expériences. J'ai analysé les données à l'aide des différents logiciels utilisés et j'ai conçu les figures de ce manuscrit et finalement rédigé la grande majorité de ce manuscrit. Andrée-Anne Guay Bégin et Lucie Levesque ont participé au design expérimental. Andrée-Anne Guay Bégin a participé à l'analyse des données, à l'interprétation des résultats ainsi qu'à la discussion de ceux-ci. Laurent Plawinski, Marie-Christine Durrieu et Gaétan Laroche, ont participé à la discussion des résultats et ont commenté le manuscrit tout au long du processus d'écriture.

Le Chapitre 4 présente un second article intitulé Bioactive « Micropatterning of Biomaterials for Induction of ECFCs Differentiation » par Caroline Royer, Andrée-Anne Guay-Bégin, Christel Chanseau, Pascale Chevallier, Laurence Bordenave, Gaétan Laroche, et Marie-Christine Durrieu soumis dans *Biomaterials* en novembre 2018. Dans ce travail, j'ai réalisé la fonctionnalisation de surface et la microstructuration avec l'aide de Christel Chanseau. Pascale Chevallier et Andrée-Anne Guay Bégin ont effectué la caractérisation de surfaces par XPS et AFM. J'ai réalisé le reste de la caractérisation de surface à savoir le TBO, l'évaluation de la densité de peptide greffés, DPP4. Andrée-Anne Guay Bégin a participé au design des expériences. J'ai réalisé toutes les expériences *in vitro* avec l'aide d'Andrée-Anne Guay Bégin pour la partie RT-qPCR. J'ai analysé et interprété les résultats de caractérisation chimique et biologique. J'ai conçu les figures de ce manuscrit et finalement rédigé la grande majorité de ce manuscrit. Marie-Christine Durrieu et Gaétan Laroche, ont participé à la discussion des résultats et ont commenté le manuscrit pendant tout le processus d'écriture.

Le Chapitre 5 présente des études complémentaires sur l'utilisation de deux autres peptides ciblant uniquement les cellules endothéliales progénitrices. Le Chapitre 6, discute des travaux dans leur globalité en les remettant dans le contexte de la fonctionnalisation de surface pour l'endothélialisation des prothèses vasculaires. Le dernier chapitre (Chapitre 7) viendra conclure ce travail et propose des perspectives.

Dans son ensemble ce projet a permis de déterminer et d'étudier le comportement des cellules endothéliales progénitrices mises en cultures sur des biomatériaux fonctionnalisés. Nous avons été capables grâce aux matériaux patternés de modifier la signature phénotypique des ECFCs

Revue de littérature

1. Introduction : La médecine régénératrice, l'ingénierie tissulaire et les biomatériaux

La médecine régénératrice vise à traiter les maladies chez les humains en remplaçant le tissu endommagé par des cellules souches ou des tissus créés à partir de cellules souches ou matériaux bioactifs. À l'heure actuelle, bon nombre de maladies peuvent seulement être traitées par greffes d'organes. Puisqu'il y a une pénurie d'organes de donneurs le domaine médical a un besoin accru et pressant de trouver une source renouvelable de tissus et de cellules pour les thérapies par greffe. Les biomatériaux, de la médecine régénératrice et de l'ingénierie tissulaire sont des domaines très porteurs. En effet, ces axes de recherches permettent d'offrir de nouvelles solutions et des alternatives aux greffes d'organes, de tissus et des améliorations aux biomatériaux utilisés pour les prothèses. En remplaçant un tissu endommagé par des cellules ou un tissu reconstruit *in vitro*, à l'aide de cellules souches ou encore par des biomatériaux modifiés, il sera possible dans un futur proche de mettre au point des solutions biocompatibles et faites sur mesure avec des cellules autologues c'est à dire appartenant au patient. Ce défi requiert la combinaison de plusieurs disciplines à savoir, les matériaux, la physique, la chimie, la biologie et la biochimie. C'est en combinant des biomatériaux avec des cellules souches et des facteurs de croissances qu'il est possible de mettre au point des biomatériaux, des échafaudages biocompatibles ou des produits d'ingénierie tissulaire innovants.

1.1 LA MEDECINE REGENERATRICE

La médecine régénératrice plus spécifiquement est définie par l'utilisation de cellules souches embryonnaires, de cellules progénitrices qui vont pouvoir se différencier grâce à la présence de facteurs de croissances dans leur environnement, elles pourront ensuite prendre la place du tissu manquant ou lésé. Chez l'humain adulte, la capacité de régénération des tissus étant limitée, la médecine régénératrice offre une bonne alternative à la réparation ou au remplacement de tissus (ex : greffe de peau, greffe de cornée) (3). Le matériel biologique peut être associé à une matrice biodégradable ou non en contact avec des facteurs de croissances, des molécules pharmaceutiques, des protéines ou des peptides, pour recréer un tissu ou une monocouche de cellules.

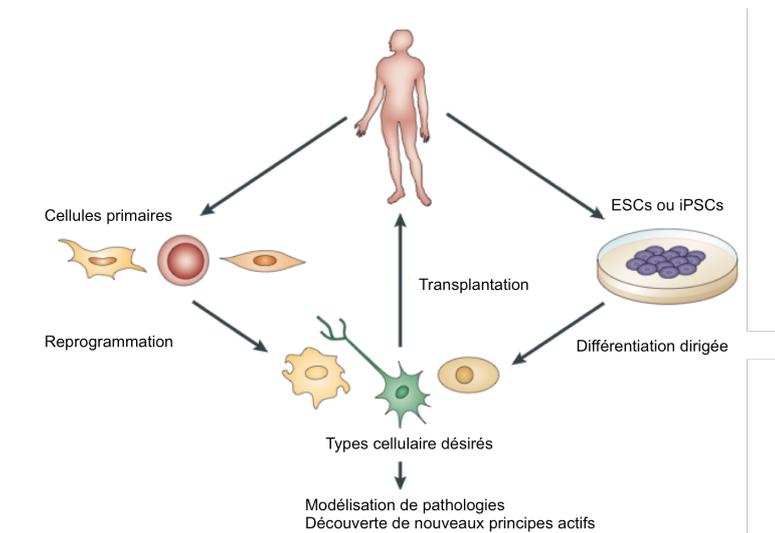


Figure 3 : Stratégies utilisées pour la médecine régénératrice (3). Des cellules primaires directement prélevées chez le patient peuvent être utilisées pour générer un type cellulaire désiré par reprogrammation (gauche). Des cellules souches embryonnaires (ESCs) et des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) issues du patient ou non peuvent être différenciées *in vitro* par différenciation dirigée (droite).

Une troisième source de cellules peut être utilisée en médecine régénératrice. Il s'agit des cellules souches pluripotentes induites ou iPSCs (Figure 3). Ce sont des cellules différenciées qui pourront par manipulations génétiques être reprogrammées dans un état proche de l'état embryonnaire (4). La découverte en 2006, de ce type cellulaire est basée sur l'hypothèse que l'introduction de gènes associés à la caractéristique de la pluripotence dans des cellules déjà différenciées pourrait permettre la répression des gènes de spécialisation. Il s'agit de pluripotence induite. Cette méthode permet d'obtenir des cellules souches avec une capacité de prolifération proche des cellules embryonnaires et pourrait donc constituer une alternative à l'utilisation de celles-ci qui pose des problèmes d'éthiques évidents. D'abord montré chez des cellules de souris par Takahashi *et al.* (4), la pluripotence induite a été démontrée avec des fibroblastes humains par Yu *et al.* en 2007 (5).

1.2 L'INGENIERIE TISSULAIRE

L'ingénierie tissulaire, quant à elle, peut être définie par deux aspects, soient la bioimpression 3D et la biofabrication, qui consistent à reproduire au plus proche une structure biologique, un tissu ou un organe. Selon Langer et Vacanti, l'ingénierie tissulaire est une discipline qui applique les principes d'ingénierie et des sciences de la vie pour mettre au point des substituts biologiques dans le but de restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions d'un tissu (6). Il existe trois éléments importants en ingénierie tissulaire, à savoir l'échafaudage qui va servir de structure et de support, les cellules elles-mêmes et enfin, des facteurs ou des signaux cellulaires qui vont permettre la régénération du tissu ou de l'organe. La première étape du procédé (Figure 4), est souvent une biopsie, pour prélever des cellules autologues. Les cellules ainsi prélevées seront

étudiées pour assurer le phénotype et certifier leur pureté. Elles seront ensuite mises en culture dans un milieu favorable à leur prolifération. Une fois le nombre de cellules voulu obtenu, elles serontensemencées dans une matrice poreuse qui sera mise en culture afin d'assurer l'adhésion des cellules à l'échafaudage et permettre leur colonisation à l'intérieur de celui-ci. Finalement, l'échafaudage sera implanté chez le patient. Ce processus peut prendre plusieurs semaines en fonctions de la vitesse de prolifération des cellules. C'est en 1998, que la Food and Drug Administration (FDA) a autorisé pour la première fois un substitut de peau généré par ingénierie tissulaire (7).

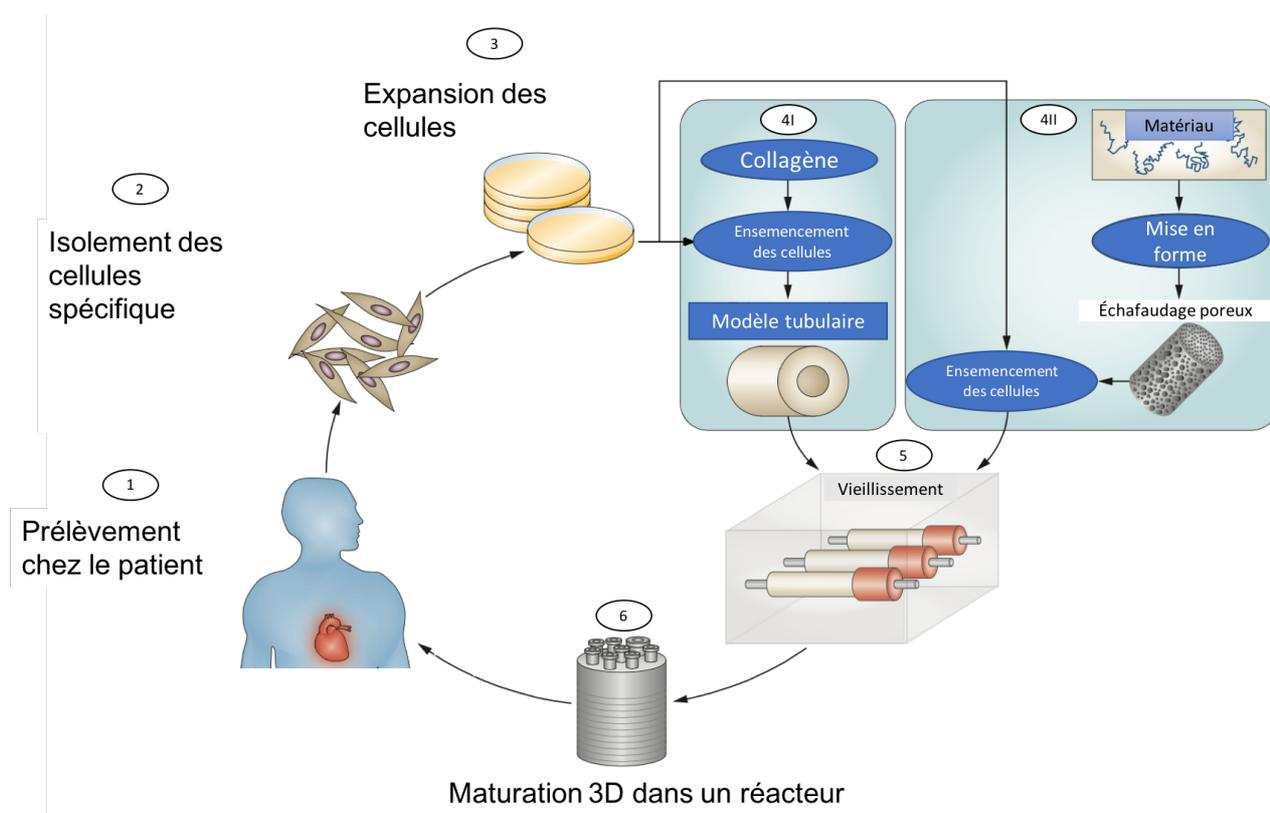


Figure 4 : Principe de l'ingénierie tissulaire. Des cellules prélevées du patient sont mises en cultures pour expansion puisensemencées sur un matériau qui servira d'échafaudage. Cet échafaudage sera ensuite mûré dans un réacteur puis greffe chez le patient. Adapté de (8).

1.3 LES BIOMATERIAUX

1.3.1 LES CLASSES DE BIOMATERIAUX

Ce projet de doctorat est à classer dans le domaine des biomatériaux puisque la finalité est d'améliorer un dispositif existant en modifiant sa surface pour renforcer son intégration et induire une réponse biologique. La réponse attendue est le recouvrement interne de la prothèse ou du biomatériaux *in situ* par des cellules autologues situées dans la circulation sanguine du patient. Selon la Société Européenne des Biomateriaux, un biomatériau est défini comme « un matériau conçu pour interagir avec les systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle » (Conférences de Chester (Royaume-Uni) en 1986 et 1991) (9). Peu après D.F. Williams a donné à son tour une définition des biomatériaux qu'il considère comme « des matériaux conçus pour se connecter avec des systèmes biologiques, pour évaluer, traiter, augmenter ou remplacer n'importe quels tissu, organe ou fonction du corps » (10). Il pourrait aussi se définir comme un matériau synthétique utilisé pour remplacer une partie d'un système ou d'un organe, et fonctionner en collaboration intime avec les tissus vivants environnants. Il existe de nombreuses variétés de biomatériaux utilisés pour traiter, remplacer ou améliorer les fonctions d'un organe ou d'un tissu (Figure 5). Selon leur localisation et les tissus avec lequel ils vont être en contact, le matériau utilisé pour leur fabrication sera différent.

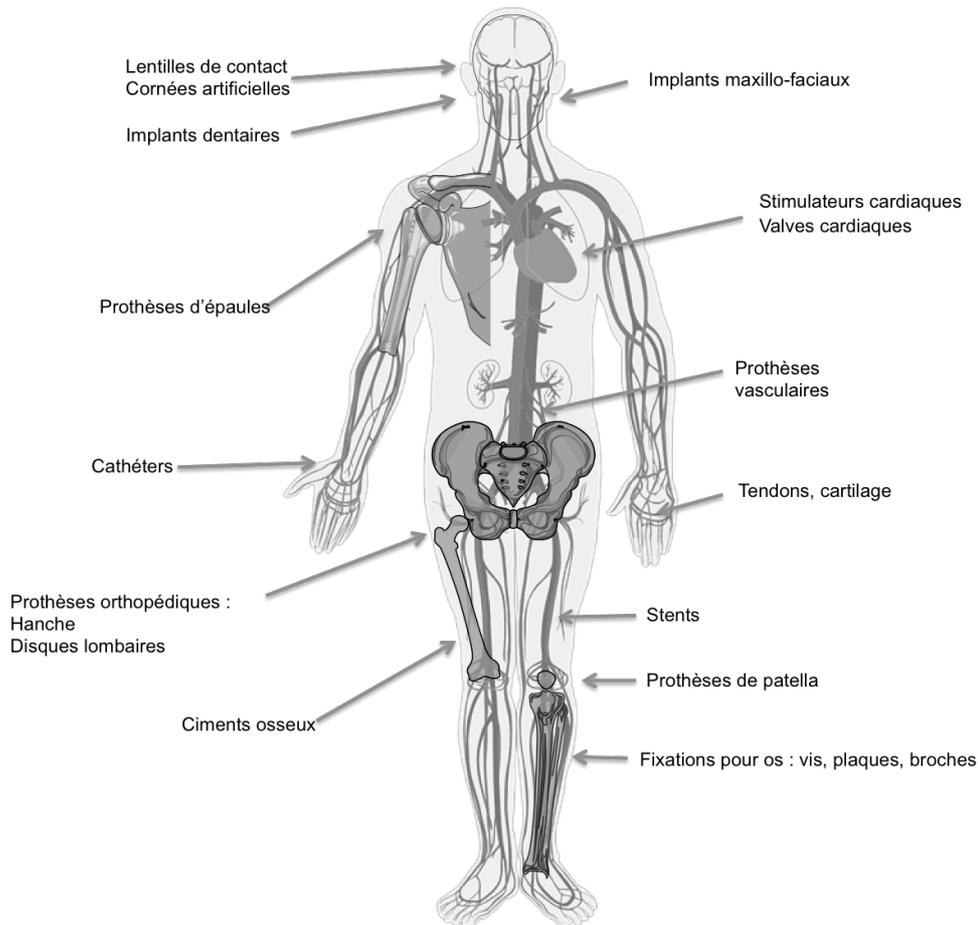


Figure 5 : Illustration de biomatériaux utilisés pour remplacer, améliorer les fonctions d'un tissu ou d'un organe malade. Adapté de Patel *et al.* (11).

En effet, les matériaux devront respecter un cahier des charges strict pour qu'ils s'intègrent au mieux dans l'organe ou les tissus du corps. La réponse biologique de l'environnement va être influencée par la composition, la microstructure et la nanostructure du matériau. Dans le même sens le matériau va lui aussi être influencé par l'environnement biologique avec lequel il va être en contact et interagir (pH, adsorption de protéines, micro et nanostructure du tissu par exemple).

Il n'existe pas un matériau unique qui va pouvoir être utilisé pour toutes les applications existantes dans le domaine des biomatériaux. Chaque type de matériaux va provoquer une réponse différente des tissus qui l'entourent, de plus, en fonction du tissu ou organe à remplacer les contraintes seront différentes. Il faudra choisir un matériau en fonction de l'environnement dans lequel il sera greffé. Il existe, plusieurs classes de biomatériaux utilisées en médecine actuellement (voir Table 1).

Les polymères sont un matériau de choix, utilisés pour les sutures, mais aussi lorsqu'il s'agit de prothèses de tissus mous, le plus souvent dans les dispositifs cardiovasculaires. Il s'agit

de la classe de matériaux la plus représentée actuellement en médecine. Ils ont la capacité de se déformer sous la contrainte et de revenir à leur forme de départ en absence de contrainte dans le cas d'une déformation élastique (12). Ils ont un module élastique qui leur permet une rigidité dans certains cas, mais aussi une souplesse comme par exemple dans leur utilisation pour le remplacement vasculaire. Bien que matériau de base soit le même, le design et la forme de celui-ci sera adapté en fonction de l'application, ce qui pourra lui conférer des propriétés différentes (13).

Les métaux utilisés dans le domaine des biomatériaux peuvent être utilisés pour les valves cardiaques, les implants orthopédiques, mais aussi pour les prothèses endovasculaires (stents) et pour les implants dentaires. L'acier inoxydable, le titane et ses alliages (Nitinol, Ti-6Al-4V par exemple) et les alliages chrome-cobalt sont les métaux les plus utilisés. Ils sont employés pour leur solidité, leur résistance à la corrosion et leurs bonnes propriétés mécaniques. Toutefois, ils peuvent provoquer des réactions immunitaires, puisqu'ils peuvent réagir avec les protéines des tissus environnants. Dans le cas d'un remplacement osseux, on utilisera plutôt des métaux ou des céramiques (14).

Les céramiques et les verres sont utilisés depuis plusieurs décennies pour les lunettes de vue, certaines lentilles de contact, certains instruments à visée diagnostique, la verrerie ou encore les flasques de culture cellulaire. Plus récemment, l'hydroxyapatite qui est la principale composante de l'émail, de la dentine et des os (15) a été utilisée dans le cas de la régénération osseuse, elle montre une très bonne biocompatibilité avec les tissus durs (16).

Pour un comblement osseux ou dentaire, on utilisera des biomatériaux composites. Les composites, sont composés de deux ou plusieurs phases avec une interface distincte qui les sépare. La phase discontinue qui est plus résistante va servir de renfort et la phase continue servira de matrice assure la cohésion du matériau. Au niveau biologique, il existe plusieurs composites connus, tels que la matrice extracellulaire, les tendons, les ligaments, les os ou encore la peau.

Finalement, la dernière classe de biomatériaux correspond aux matériaux naturels, qui peuvent être trouvés à partir d'algues (comme l'alginate), d'insectes (soie) ou de crustacés (chitosan). Ils ont la capacité de pouvoir être métabolisés par le biais de dégradation enzymatique ou de réaction d'hydrolyse. Seulement, ils peuvent être immunogènes, et il existe une variabilité de composition dans les lots ce qui rend difficile la standardisation et la normalisation lors de la fabrication (17).

Table 1 : Les différentes classes de biomatériaux utilisés en médecine.

Matériaux	Avantages	Inconvénients	Exemples
<p>Polymères (nylon, silicone, polyesters, polytetrafluoroéthylène, etc.) (12)</p>	<p>Faciles à fabriquer</p> <p>Résilient</p>	<p>Peu résistants</p> <p>Se déforment avec le temps</p> <p>Possibilité de dégradation</p>	<p>Sutures, prothèses de vaisseaux et autres tissus mous, coques acétabulaires</p> <p>Oreille, nez</p>
<p>Métaux (le titane et ses alliages, alliages chrome-cobalts, Or, Argent, acier, etc.) (14)</p>	<p>Résistants, dures, ductiles</p>	<p>Peuvent corroder</p> <p>Denses</p> <p>Difficiles à fabriquer et designer</p>	<p>Prothèses d'articulations,</p> <p>Implants dentaires, vis, plaques osseuses</p>
<p>Céramiques (hydroxyapatite, carbone, etc.) et verre (16)</p>	<p>Biocompatibles</p>	<p>Faible résistance en tension</p> <p>Cassants</p> <p>Non résilients</p>	<p>Implants dentaires et orthopédiques</p>
<p>Composites (carbone-carbone, ciment osseux renforcés) (18,19)</p>	<p>Résistants</p>	<p>Difficiles à fabriquer et designer</p>	<p>Ciments osseux</p> <p>Résines dentaires</p>
<p>Matériaux naturels (chitosan, soie, collagène, alginates, etc.) (20)</p>	<p>Souvent biodégradables ou résorbables</p>	<p>Variabilité entre les lots</p> <p>Immunogènes</p> <p>Propriétés mécaniques parfois inadéquates</p>	<p>Sutures, revêtements de stents ou de cathéters, maillages chirurgicaux, pansements</p>

1.3.2 LA REPONSE A L'IMPLANTATION

La biocompatibilité est définie comme la capacité d'un biomatériau à être en contact avec un tissu vivant tout en produisant une réponse immunitaire appropriée et pour une application spécifique (10). Il existe ainsi plusieurs types de réponses que peut provoquer un biomatériau après son implantation. Si le matériau est toxique, les tissus environnants vont mourir. S'il n'est pas toxique et qu'il est inerte, une encapsulation fibreuse va se produire. Si le matériau est non toxique mais possède une activité biologique, des liaisons électrostatiques, hydrophobes entre celui-ci et les protéines membranaires vont pouvoir se former (21). Enfin, si le matériau est non toxique et dégradable alors les tissus environnants vont le remplacer au fur et à mesure du temps.

Tout matériau une fois implanté engendrera une réponse de l'hôte qui correspond aux premières étapes de la réparation tissulaire. La première étape est l'adsorption non spécifique, de protéines. En effet, seulement quelques secondes après l'implantation, les protéines qui vont s'adsorber peuvent être l'albumine, le fibrinogène, ou encore des facteurs de coagulation. Une heure après le greffage, ce sont les cellules telles que les monocytes ou plaquettes qui vont s'infiltrer et adhérer aux biomatériaux. Les monocytes vont se différencier en macrophages qui vont essayer de phagocyter le matériau et ils vont relarguer des enzymes. Au bout de 1 jour à 5 jours, les cellules qui ont adhéré vont commencer à sécréter des cytokines et des chemokines qui vont stimuler l'inflammation ou la fibrose (22). À l'étape suivante, et au bout de 5 jours à 15 jours, des cellules capables de réparer les tissus sont recrutés sur le site de la lésion par le biais de cytokines et chemokines sécrétées. Les fibroblastes, des monocytes non différenciés, des lymphocytes ou des cellules endothéliales viennent coloniser le matériau. Toutefois, ce sont les macrophages qui colonisent majoritairement la surface. Ces macrophages sécrètent des cytokines et chemokines qui vont induire la migration et la prolifération de cellules fibroblastiques. On parle aussi de cellules géantes lorsque les macrophages n'ont pas pu phagocyter le matériau. Ils se mettent alors à fusionner pour former des cellules polynucléées. Ces cellules géantes vont à leur tour sécréter des cytokines pour recruter d'autres macrophages et ainsi devenir plus grosses encore. Finalement, après trois semaines à 1 mois, une encapsulation fibreuse se formera autour de l'implant. Cette encapsulation fibreuse est composée de collagène et d'autres constituants de la matrice extracellulaire et isolera les cellules géantes (Figure 6) (23).

La taille, la micro ou nanostructure et la topographie ainsi que la chimie et la physique de surface vont avoir un impact sur l'inflammation.

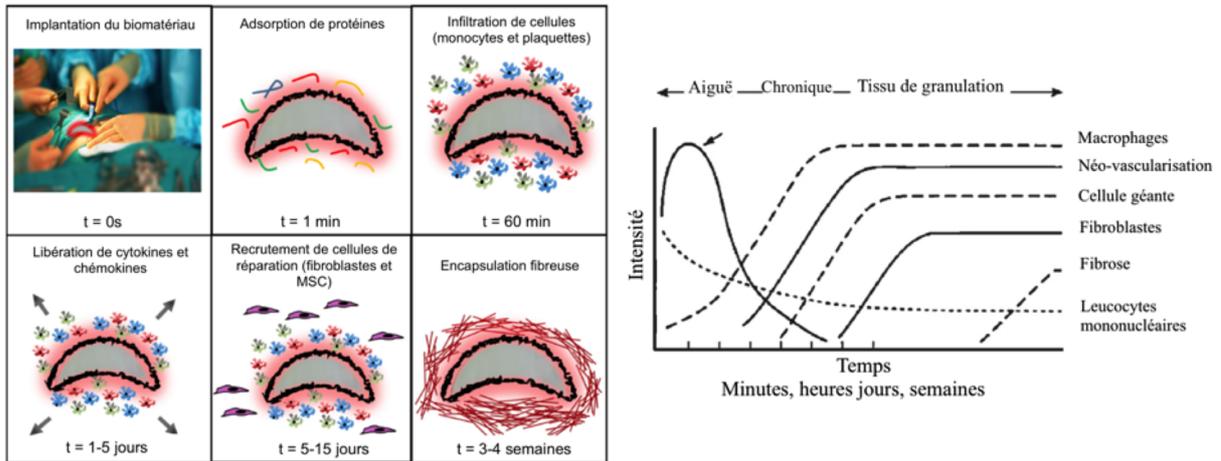


Figure 6 : Cinétique de la réponse innée à l'implantation (22) à gauche. Intensité de la Variation temporelle de la réponse inflammatoire en fonction du temps à droite, l'intensité et la cinétique dépendent des caractéristiques des matériaux (taille, topographie, chimie et physique de surface) (24).

Le projet présenté ici s'inscrit dans le domaine des biomatériaux appliqués à l'ingénierie vasculaire. Le système vasculaire étant régi par plusieurs phénomènes, il est important de l'étudier avec plusieurs approches. La fabrication de biomatériaux pour le domaine vasculaire implique une recherche des phénomènes à l'échelle micro et macroscopique. Le but ici étant de rendre le matériau hémocompatible pour permettre une colonisation autologue *in vivo* et *in situ* des cellules endothéliales, afin d'améliorer la compatibilité des prothèses vasculaires. Avant de développer le sujet des biomatériaux utilisés dans le cas des prothèses vasculaires, une introduction au contexte et aux problématiques liées à cette application est nécessaire.

2. Contexte et problématique : Les maladies cardiovasculaires.

Les maladies cardiovasculaires (MCV), terme qui regroupe les maladies touchant le cœur et les vaisseaux, représentent la seconde cause de mortalité au Canada (derrière le cancer), la seconde également, en France pour les hommes et la première cause pour les femmes. On estime à 17,7 millions par an le nombre de décès imputables à ces maladies dans le monde (dont 4 millions en Europe). Plus de 25 000 chirurgies de pontage coronarien sont effectuées chaque année au Canada (25). Dans la communauté européenne, les maladies cardiovasculaires sont la cause de deux millions de décès annuellement et constituent de ce fait 42% de toutes les mortalités. Environ 20000 pontages sont réalisés en France chaque année. Au Canada, le coût total des MCV représente 12 milliards de dollars (26). Le coût total étant défini par l'addition des coûts, d'hospitalisation, de chirurgie, de matériel, de traitements médicamenteux et d'arrêts maladies.

Les maladies cardiovasculaires regroupent plusieurs pathologies (qui seront définies plus tard) et peuvent toucher différents organes. La grande majorité de ces pathologies surviennent lorsqu'un vaisseau est obstrué et que le sang ne peut atteindre le cœur, le cerveau, ou un membre inférieur. Cette obstruction est la conséquence d'une accumulation de lipides, de résidus fibreux et de cellules inflammatoires sur la paroi interne des vaisseaux, formant ainsi une plaque d'athérome. C'est l'athérosclérose. Pour pallier ce manque de sang oxygéné (ou ischémie) et dans les cas les plus simples un traitement médicamenteux peut suffire. En revanche, certains patients nécessitent une intervention chirurgicale, la pose d'un ou plusieurs stents ou un pontage de l'artère lésée. L'artère peut être remplacée par un vaisseau autologue, la veine saphène par exemple, ou par une prothèse synthétique quand la greffe autologue n'est pas possible car la veine saphène est trop endommagée ou déjà utilisée. Certains facteurs comme l'hypertension, le diabète, l'obésité, l'usage du tabac, la sédentarité ou encore le cholestérol et les mauvaises habitudes alimentaires augmentent le risque de présenter un jour ces pathologies (27).

2.1. LES PATHOLOGIES VASCULAIRES

De manière générale, les maladies cardiovasculaires ont pour origine l'accumulation de lipides à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Cette accumulation de lipides est appelée artériosclérose. Lorsque cette dernière est accompagnée d'une accumulation de cellules (épaississement de la paroi) et dans le cas d'une obturation, la pathologie est appelée athérosclérose. Le dépôt de lipides sur l'artère peut entraîner des lésions appelées scléroses. L'épaississement d'une plaque d'athérome va obstruer la lumière et empêcher le sang de circuler correctement, le plus souvent au niveau des artères coronaires, des carotides ou des artères de

membres inférieurs. Les plaques d'athéromes sont pour la plupart stables, mais elles peuvent se fissurer, entraînant des complications très graves telles qu'un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral (AVC) (27).

2.1.1 L'ATHEROSCLEROSE

L'athérosclérose est une maladie progressive qui se caractérise par l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux à l'intérieur d'une artère. Les lésions qui arrivent de façon précoce consistent en une accumulation de macrophages gorgés de cholestérol qui vont s'intégrer dans la couche de cellules endothéliales et envoyer des signaux inflammatoires. Elle est d'ailleurs définie comme une maladie inflammatoire chronique, dans laquelle les anomalies de l'endothélium engendrent l'initiation de la maladie (28). Cette pathologie se développe sur plusieurs décennies voir la Figure 7 (27). Dans un premier temps, une accumulation de particules lipidiques est observée. Dans les jours ou semaines qui suivent, les monocytes vont adhérer à la surface de l'endothélium et migrer à travers la couche de cellules endothéliales et se différencier en macrophages. À cette étape une lésion commence à se former, puis les cellules musculaires lisses vont migrer dans la lumière du vaisseau, générer des éléments fibreux qui vont créer la plaque d'athérome qui, à son tour va bloquer le passage du sang. La lésion et l'athérome vont s'accroître au fil du temps en réduisant de plus en plus la lumière de l'artère.

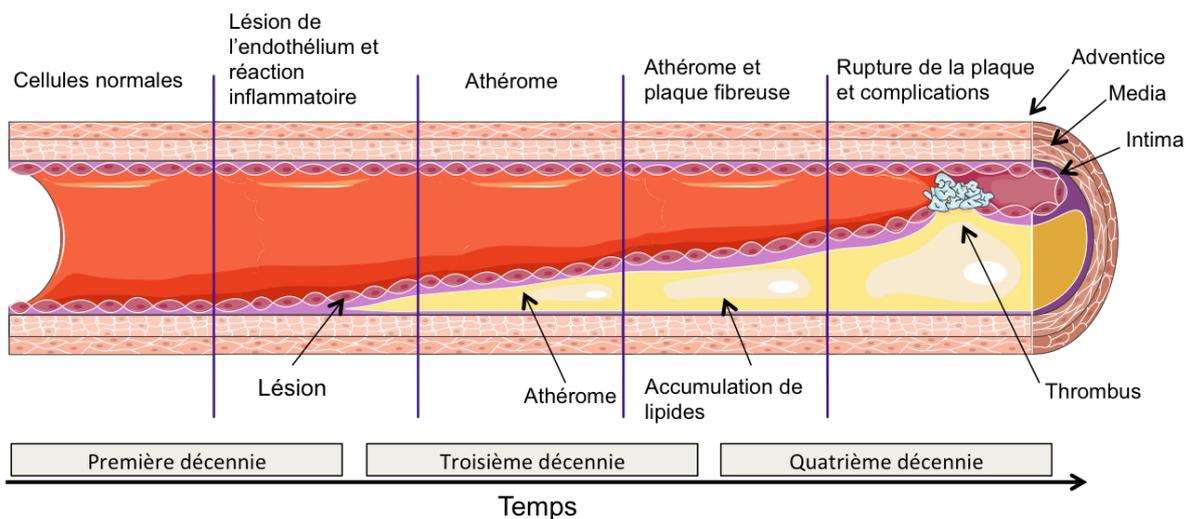


Figure 7 : Évolution de la plaque d'athérome dans le temps adapté de (28).

Il a été montré que l'apparition des plaques se fait préférentiellement aux endroits où le flux est turbulent, mais également là où la contrainte de cisaillement est faible (29). Ce sont souvent des zones au voisinage de bifurcations ou des courbures des vaisseaux sanguins qui sont propices à l'accumulation des lipides. Sur la Figure 8, on voit nettement que les cellules ayant subi un flux oscillatoire ne s'alignent pas contrairement aux cellules sous flux laminaire, elles adoptent une morphologie différente en suivant le mouvement du flux (30).

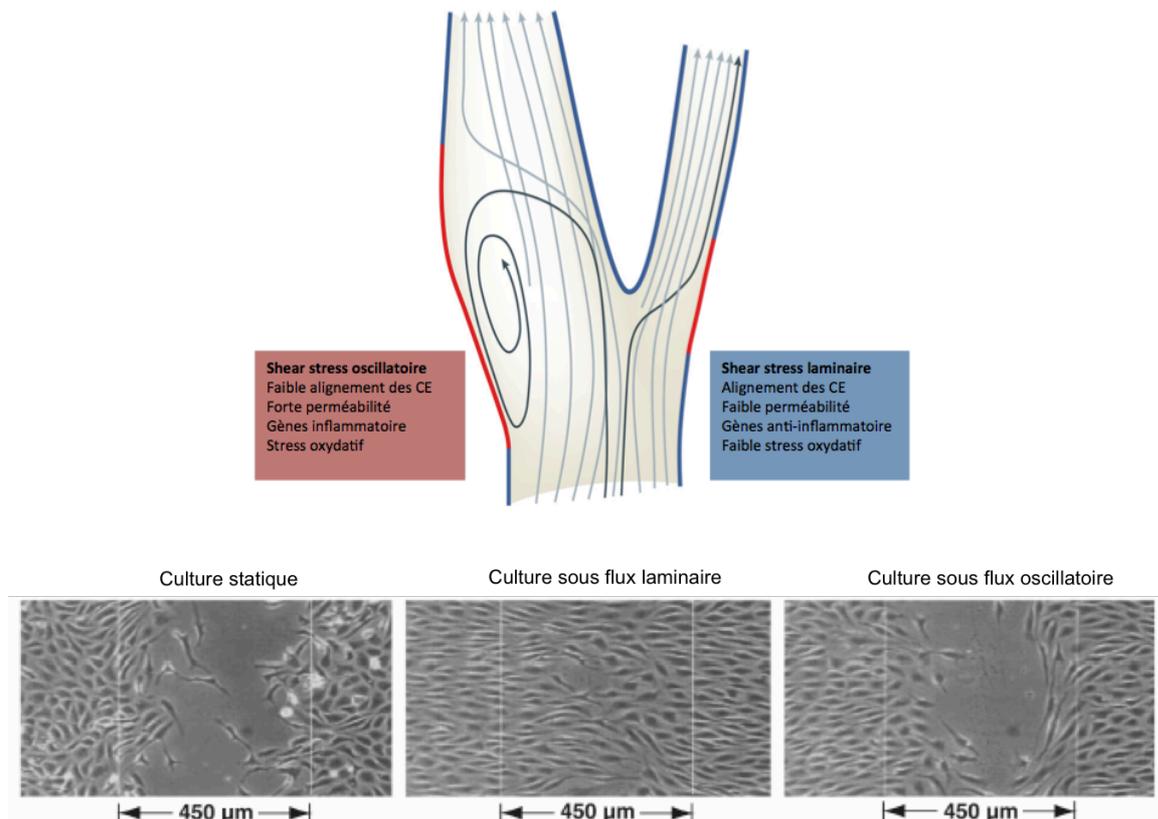


Figure 8 : Schéma de l'incidence du flux sur les cellules endothéliales adapté de (30) Images en contraste de phase de la migration des cellules après 21h de culture statique, sous flux laminaire ou sous flux oscillatoire (29).

Dans ces régions de la paroi vasculaire, les phénomènes de production de synthèse d'oxyde nitrique (eNOS), la vasodilatation et la réparation des cellules sont amoindris. La production d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que la perméabilité aux lipoprotéines, la prolifération des cellules musculaires lisses et la déposition de collagène augmentent (31). Par ailleurs, les vaisseaux de petits diamètres sont composés des mêmes couches de cellules que les vaisseaux de plus gros diamètres. Cependant du fait de leur petite taille, le flux sanguin est modifié, le débit n'est pas le même et le fluide devient moins turbulent. Il est plus probable que la formation de la plaque d'athérome ou un caillot occlura un vaisseau de faible diamètre.

2.1.2. L'ARTÉRIOSCLÉROSE ET LA CALCIFICATION

À ne pas confondre avec l'athérosclérose, l'artériosclérose est surtout due au vieillissement des vaisseaux sanguins. Avec l'âge la capacité de régénération des tissus diminue. Ce vieillissement entraîne l'apoptose des cellules musculaires lisses qui vont libérer des ions calcium et donc entraîner un phénomène de calcification (32). Pendant le processus inflammatoire observé lors d'une pathologie vasculaire, les macrophages produisent des cytokines qui, associées au

calcium, favorisent la différenciation des fibroblastes présents dans la couche externe des vaisseaux sanguins en cellules ostéogéniques. Ce processus entraîne une rigidité artérielle et affaiblit la structure du vaisseau.

2.1.3. LA THROMBOSE

La thrombose est définie par la présence d'un caillot de sang aussi appelé thrombus qui bouche la lumière du vaisseau et empêche le sang de circuler normalement. La thrombose est souvent une conséquence directe de l'athérosclérose, mais elle peut aussi être une conséquence d'une perte de l'intégrité vasculaire ou de dérèglement des facteurs de coagulation. Ce thrombus, empêchent non seulement le sang de circuler en perturbant le flux, mais il va aussi entraîner une accumulation de plaquettes et de globules rouges dans son environnement. Le caillot peut ensuite migrer vers une artère de plus petit diamètre et provoquer une occlusion quasi-complète provoquant une embolie (souvent pulmonaire) ou un accident vasculaire cérébral.

2.1.4. LES ANEVRISMES

L'anévrisme désigne une dilatation localisée d'une artère, souvent due à une faiblesse ou des lésions des tissus vasculaires. Bien souvent, aux abords d'un anévrisme, l'intégrité du vaisseau est menacée. Comme dans le cas de l'athérosclérose les anévrismes se forment plutôt au niveau d'une bifurcation. Chez l'homme, les anévrismes se situent en général dans l'aorte abdominale thoracique et les artères cérébrales. Le danger ici est l'amincissement de la paroi vasculaire qui, s'il n'est pas traité à temps, va se rompre sous la pression, entraînant une légère fuite ou une rupture brutale. La rupture d'anévrisme provoque une hémorragie qui peut être fatale.

3. Le système cardiovasculaire

3.1 LE CŒUR

Le cœur est un organe situé entre les poumons. Il assure la circulation du sang à travers tout le corps. Il est constitué de quatre parties, deux ventricules (droit et gauche) et deux oreillettes (droite et gauche). Pendant la systole auriculaire, les oreillettes se contractent et éjectent le sang vers les ventricules et les valves entre les oreillettes et les ventricules se referment pour éviter un reflux du sang. Ensuite, la systole ventriculaire est le phénomène qui décrit la contraction des ventricules qui va expulser le sang vers le système circulatoire. Le sang est alors pompé par le cœur par le biais d'un réseau interne de veines, de capillaires et d'artères qui fournissent l'oxygène (et d'autres substances) aux autres organes. Il passe par l'aorte puis est distribué dans les artères. Le sang (riche en O₂) circule des artères partant du cœur et va jusqu'aux organes. Ensuite le sang passe par les veines (riche en CO₂) et retourne jusqu'au cœur, puis passe par le ventricule droit et va vers les poumons où il pourra être rechargé en oxygène.

3.2 LE SANG

Le sang est considéré comme un tissu à part entière. C'est le seul tissu liquide du corps. Il est composé de plasma dans lequel baignent des cellules circulantes, les érythrocytes (ou globules rouges), les leucocytes (ou globules blancs) et les thrombocytes (ou plaquettes) (voir Figure 9). Il est également composé d'autres types cellulaires en moins grande quantité comme les monocytes, les cellules endothéliales circulantes. Dans le sang, la quantité de globules rouges est estimée en moyenne à 5 millions par microlitres. Dans le cas des globules blancs on en dénombre 7000 par microlitre, et les plaquettes sont un peu plus nombreuses à raison de 150000 à 300000 cellules par microlitre.

La fonction des globules rouges est le transport de l'oxygène, du dioxyde de carbone et la régulation du pH. Les globules blancs participent au système immunitaire. Il existe trois formes de globules blancs, les lymphocytes B et T, les monocytes et les polynucléaires. Les lymphocytes B et T sont les cellules de l'immunité adaptative, et les macrophages (dérivés des monocytes) et les polynucléaires sont les composants de l'immunité innée (33). Enfin, les plaquettes d'une taille plus petite que les autres cellules du sang, interviennent dans la croissance des cellules musculaires lisses et l'hémostase.

Le plasma est composé d'eau et de protéines comme l'albumine, les immunoglobulines, le fibrinogène, des lipoprotéines, l'alpha-1-antitrypsine, l'alpha-2-macroglobuline et les transferrines. La couleur jaune du plasma vient du produit de dégradation de l'hème aussi appelé bilirubine qui est un pigment transporté lié à l'albumine. En pratique, cette dégradation peut être

observée après qu'un coup ait été reçu sur une partie du corps créant ainsi une ecchymose bleue qui deviendra jaune. L'hémoglobine est alors dégradée en biliverdine (pigment vert) qui donne une couleur verte, puis en bilirubine, (pigment rouge) qui donne la couleur jaune aux ecchymoses légères (34).

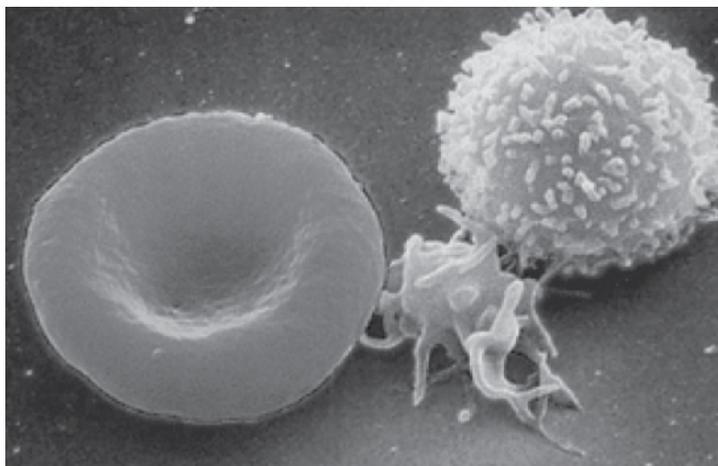


Figure 9 : Image par microscopie électronique à balayage des cellules constituant le sang, un globule rouge, un globule blanc et une plaquette (Wikimedia Commons).

Le sang est considéré comme un liquide non newtonien, et rhéofluidifiant, c'est un liquide visqueux assimilé à un fluide idéal. La viscosité du sang chute avec l'augmentation du taux de cisaillement, jusqu'à récemment ce phénomène était expliqué par le fait que les globules rouges s'alignaient et s'étiraient dans la direction de l'écoulement. Les travaux de Luca Lanotte en 2016 démontrent finalement, que dans les conditions physiologiques les globules rouges adoptent une morphologie polylobée (35).

3.3 LES VAISSEAUX

Le système sanguin est formé par une hiérarchie de vaisseaux sanguins qui permettent de faire circuler le sang vers les différents tissus qui composent le corps humain. La taille des vaisseaux sanguins peut varier de quelques micromètres à presque 3 centimètres.

3.3.1 STRUCTURE DE LA PAROI VASCULAIRE SAIN

Les vaisseaux sanguins (artères et veines) sont constitués de trois couches (ou tuniques) distinctes. La couche la plus externe est appelée l'adventice, qui est constituée de tissu conjonctif, de fibroblastes, de cellules adipeuses, de fibres et de collagène mais aussi de nerfs. Sa fonction est de protéger le vaisseau, mais elle sert aussi de « gaine ». Elle a la capacité de résister à la pression du flux sanguin. On trouve également dans les artères plus larges un réseau de microvaisseaux appelé le vasa vasorum qui sert à alimenter l'adventice ainsi qu'une partie de la media (36).

La couche intermédiaire est appelée média ; il s'agit de la couche la plus épaisse de l'artère. Elle est composée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses assurant la fonction de vasomotricités artérielles (vasodilatation et vasoconstriction). On retrouve également des fibres élastiques telle l'élastine et du collagène.

L'endothélium (ou intima) est la couche la plus interne des vaisseaux sanguins, c'est le seul tissu en contact avec le sang. Il est composé d'une monocouche de cellules endothéliales qui participent à de nombreux processus physiologiques (37). Cette couche de cellules repose sur une lame basale composée principalement de collagène et de laminine qui ont pour fonction l'adhésion et l'organisation des cellules qui la composent.

Les propriétés mécaniques de chaque couche dépendent de leur quantité d'élastine et de collagène, qui varie en fonction du diamètre du vaisseau et de leur localisation. Les artères, veines et capillaires sont conçus de façon différente afin de pouvoir supporter la pression du flux sanguin en se déformant en conséquence. En effet, la pression du flux au sein d'un capillaire sanguin d'un muscle de la jambe sera différente de celle de l'aorte située à proximité du cœur.

Avec le passage du sang, la paroi des vaisseaux sanguins est exposée à différentes contraintes, elle subit 3 forces différentes. La première force que subit la paroi vasculaire est la pression hydrostatique exercée par le passage du sang. La seconde force est l'étirement cyclique, il s'agit d'une distension de la paroi et elle est fonction de l'épaisseur du vaisseau. Enfin, la dernière force est la contrainte de cisaillement (aussi appelée « shear stress »). Cette dernière décrit la force de friction du fluide (le sang) contre la paroi vasculaire et elle est fonction du débit sanguin, de la viscosité du sang et du diamètre du vaisseau (38). Dans la majorité des artères, la contrainte de cisaillement peut atteindre des valeurs entre 10 et 40 dyn/cm² (39).

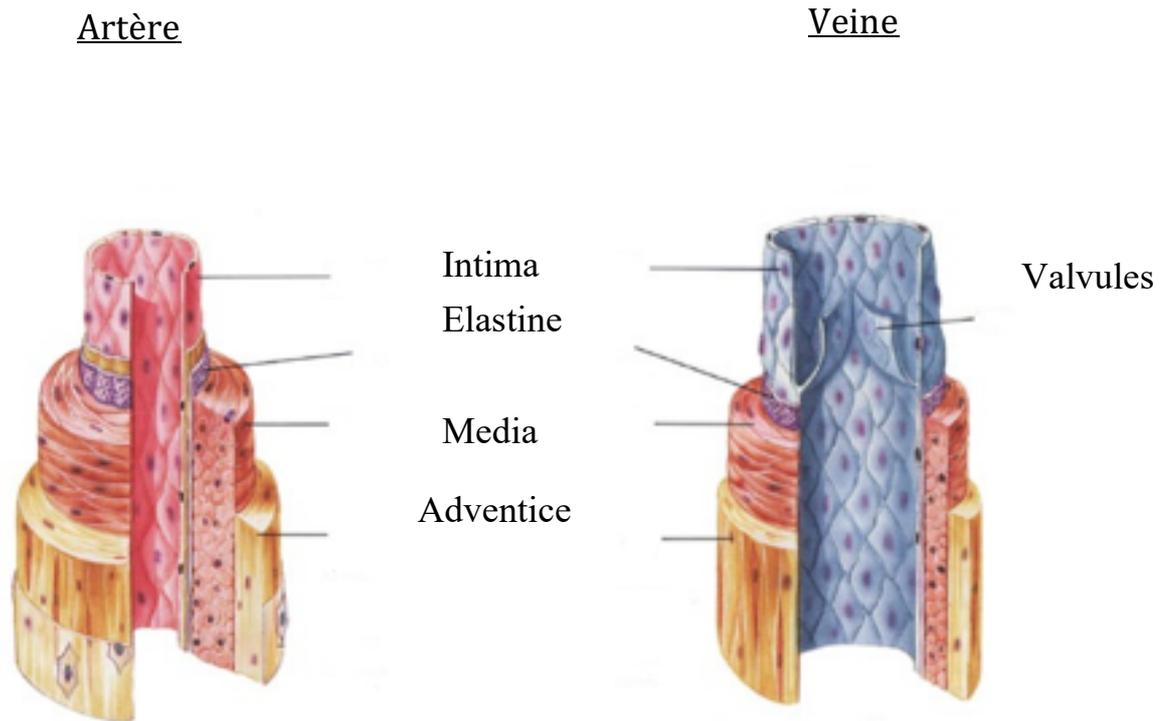


Figure 10 : Structure d'une artère et d'une veine saine, d'après (40).

3.3.2 MECANIQUE DES VAISSEAUX SANGUINS

La structure des vaisseaux sanguins diffère selon la position dans la circulation sanguine. Dans les vaisseaux aortiques, la paroi est constituée majoritairement de fibres d'élastine, alors que dans les artérioles, la paroi est d'avantage constituée de fibres musculaires lisses. De ce fait on considère qu'il existe deux types d'artères, les artères musculaires, qui représentent essentiellement les artères de petits et moyens diamètres et les artères élastiques que sont les artères de gros diamètres. Les artères musculaires possèdent une grande concentration de collagène repartit en majorité suivant l'axe longitudinale et pourront donc être qualifiées d'artères résistives. Pour faire diminuer la vitesse et la pression artérielle, elles vont donc travailler en traction/compression. Les artères élastiques quant à elle possèdent naturellement une grande élasticité transversale grâce à une grande concentration d'élastine, ces artères ont la particularité d'être très complientes.

Dans le cas d'une modification du flux, les artères sont tout à fait capables de s'adapter aux changements et peuvent compenser en réponse à certaines pathologies.

Toutefois, ces adaptations sont limitées et ne se substituent pas à un traitement. Le flux sanguin gère le transport de substances de plus ou moins grande taille pour maintenir l'équilibre du système, l'homéostasie.

4. Rôles et fonctions de l'endothélium

L'endothélium est considéré comme un organe à part entière, puisqu'il est impliqué dans le processus essentiel à la vie qui est la circulation sanguine. Sa surface est d'environ 350 m² pour une masse de 110 g environ (37). Une des principales fonctions des cellules de l'endothélium est de former une barrière semi-perméable entre le sang et les tissus sous-jacents, pour permettre les échanges (gazeux, ioniques, molécules et protéines). Les cellules endothéliales Figure 10 sont en forme de losange et forment une monocouche ; elles sont alignées dans le sens du flux sanguin. L'endothélium permet la régulation de la coagulation, de la réponse à l'inflammation, l'hémostase, également la vasculogénèse et l'angiogénèse, mais aussi la pression sanguine.

L'endothélium est une surface antiadhésive qui permet la conservation des propriétés physiques du sang comme la viscosité et la coagulation. La régulation de la coagulation et le maintien d'une activité anti-thrombogénique est possible grâce à la synthèse de facteurs vasodilatateurs tels que l'oxyde nitrique (NO) (41), l'expression d'enzyme activatrice du plasminogène (tPA) ou encore la prostacycline. Selon l'organe où il se trouve, l'endothélium assure des fonctions différentes. En effet, l'endothélium pulmonaire montre une expression plus haute pour les molécules d'adhésion. De la même manière, les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique montrent un phénotype avec des jonctions serrées plus solides, rendant l'endothélium à cet endroit plus imperméable (permettant une meilleure régulation des échanges de molécules d'eau) (37).

4.1 ORIGINE EMBRYONNAIRE

Pendant le développement embryonnaire, les cellules endothéliales embryonnaires sont générées par deux mécanismes, l'angiogénèse et la vasculogénèse (42). Les cellules endothéliales embryonnaires les cellules hématopoïétiques sont les premières cellules à se différencier à partir du mésoderme. Ceci a été démontré d'après Era *et al.* qui ont démontré que ces cellules exprimaient le VEGFR-2 qui est un marqueur endothélial (43). L'angiogénèse et la vasculogénèse sont deux processus différents qui impliquent des types cellulaires différents lors du développement embryonnaire mais aussi lors de la régénération de tissus chez l'adulte.

4.1.1. ANGIOGENESE

L'angiogénèse est par définition la formation de nouveaux vaisseaux à partir de structures déjà existantes. Chez l'adulte l'angiogénèse se produit lors de la réparation tissulaire, dans le cas des cancers pendant le phénomène de vascularisation des tumeurs malignes. Les cellules vasculaires endothéliales sont stimulées par des facteurs angiogéniques (VEGF, FGF, engiopoetin-1, etc...), l'activateur du plasminogène, la collagénase. Ensuite la lame basale à proximité de ces

stimuli angiogénique va être dégradée. Un bourgeonnement de la structure existante va se créer puis croître. Une cellule endothéliale appelée cellule de front dirige la migration des autres cellules endothéliales via des filopodes, vers la source de facteurs angiogénique. Des cellules de soutien vont proliférer pour ensuite permettre l'allongement du vaisseau. La lumière du capillaire va ainsi pouvoir se former, les cellules synthétisent une nouvelle lame basale. Enfin la dernière étape est le recrutement des pericytes qui ont la capacité de maintenir et de stabiliser le vaisseau en formation (43–45). L'angiogenèse est donc le processus par lequel les vaisseaux sanguins se développent chez l'embryon et chez l'adulte. Chez l'adulte il existe une balance entre les signaux pro-angiogénique et anti-angiogénique, dans le cas des tumeurs malignes cette balance est déséquilibrée en faveur des mécanismes pro-angiogénique qui conduiront à la vascularisation de la tumeur (47).

4.1.2. VASCULOGENESE

A la différence de l'angiogenèse, la vasculogenèse intervient dans le cas où aucune structure vasculaire n'existe. Longtemps considéré comme un mécanisme restreint à la période embryonnaire (42), la découverte de cellules progénitrices endothéliales (EPCs) issues de la moelle osseuse a permis de déterminer que l'angiogenèse n'était pas le seul mécanisme de formation des vaisseaux sanguins chez l'adulte (48). La première étape de la vasculogenèse est la différenciation de cellules du mésoderme en angioblaste, ces précurseurs se différencient ensuite en progéniteurs endothéliaux deviennent matures, ces cellules endothéliales s'agrègent pour former une structure tubulaire, puis des pericytes sont recrutés pour stabiliser le vaisseau en formation (49). Chez l'adulte, les cellules responsables de cette vasculogenèse post-natale sont recrutées localement au site d'une lésion, par les phénomènes d'ischémie mais aussi par chimiotactisme (50).

4.2 LES CELLULES ENDOTHELIALES (CE)

L'endothélium des veines et des artères est composé d'une monocouche de cellules endothéliales. Ces dernières ont une morphologie pavimenteuse elles sont aplaties et leur taille peut varier entre 10-20 μm de largeur et 25-50 μm de long avec une épaisseur mesurant entre 0.3-1 μm (51). Ces cellules sont orientées dans la direction du flux sanguin, et sont chargées négativement. De plus, dans les artères, les jonctions sont très serrées, ce qui permet d'assurer l'étanchéité et de former tout de même une barrière perméable, leur permettant ainsi d'assurer une fonction de filtration sélective des éléments contenus dans le sang. Dans les veines, les cellules endothéliales sont plus petites et ne sont pas nécessairement alignées dans le sens du flux, mais elles possèdent des valvules qui permettent le retour du sang vers le haut du corps (Figure 3).

Les cellules endothéliales dérivent des cellules souches mésenchymateuses de l'embryon, elles ont un précurseur commun avec les cellules souches hématopoïétique pluripotentes appelé hémangioblaste qui vient du mésoderme (42).

Les cellules endothéliales en général possèdent une particularité par rapport à d'autres types cellulaires puisqu'elles contiennent une organelle spécifique à savoir le corps de Weibel-Palade. Cet organite permet le stockage d'un marqueur important des cellules endothéliales, le Facteur de Von Willebrand (vWF) (52).

Le phénotype des cellules endothéliales est défini par de nombreux marqueurs qui peuvent être communs avec d'autres types cellulaires. Or, selon leur localisation, les CE ont un phénotype différent (de quelques marqueurs seulement). Elles ont également la capacité de s'adapter aux conditions qui les environnent, puisque lors d'un pontage, quand une veine autologue est utilisée, les cellules vont pouvoir acquérir des propriétés artérielles notamment à cause des contraintes de cisaillement qu'elles vont subir, elles vont s'épaissir et s'orienter en direction du flux, et les jonctions entre les cellules deviendront plus serrées (53). Les cellules endothéliales forment une barrière semi-imperméable et sélective, qui autorise l'échange de molécules entre le sang et les tissus environnants. Ces cellules sécrètent également des substances qui permettent de réguler la prolifération des cellules musculaires lisses (CML), des plaquettes et des globules blancs.

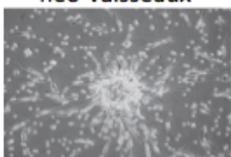
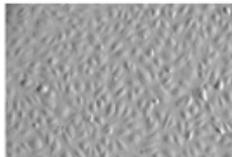
Il existe de nombreuses sources de cellules endothéliales, les cellules endothéliales bovines qui sont appelées BAECs, (*Bovine Aortic Endothelial cells*) sont les plus utilisées en recherche pour étudier la biologie de l'endothélium. Il y a également plusieurs sources de cellules endothéliales matures chez l'Homme pouvant être utilisées à des fins de recherche. Les cellules peuvent être extraites par exemple à partir de la veine ombilicale, cette source va permettre d'isoler un grand nombre de cellules appelées, HUVECs pour Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Une autre source est la veine saphène appelée HSEVCs pour Human Saphenous Endothelial Vein Cells ; ce type de cellules est utilisé pour une application en régénération vasculaire. Les cellules provenant de l'omentum (ou épiploon) sont des cellules de microvaisseaux aussi dénommées HOTMEC (*Human omental tissue microvascular endothelial cells*) et elles sont également utilisées en recherche (54). Il existe aussi un dernier type de cellule endothéliale, qui est étudié, mais pour d'autres applications, il s'agit des cellules endothéliales circulantes (CECs). Ces cellules se détachent des vaisseaux suite à des stimuli naturels ou non comme des lésions. Elles se retrouvent donc dans la circulation, mais le nombre de cellules est rare dans le sang périphérique (55). Elles seront donc étudiées pour détecter précocement une lésion vasculaire ou une autre pathologie ou encore dans approche plus fondamentale visant à comprendre et étudier les mécanismes et les marqueurs des lésions vasculaires chez différents patients. Dans le cadre de ce projet, une source

de cellules souches sera utilisée afin d'évaluer l'effet des principes actifs sur le recrutement et la différenciation de ces cellules progénitrices.

4.3 LES CELLULES PROGENITRICES ENDOTHELIALES (EPCs)

Les EPCs sont des cellules progénitrices endothéliales qui peuvent être retrouvées dans la circulation sanguine (56) (48) (57) chez l'homme. Elles proviennent de trois sources, soit de la moelle osseuse (et donc du sang périphérique), le sang de cordon ombilical (58), ou encore le foie fœtal (59). Ces cellules sont déjà engagées dans une lignée endothéliale et sont fonctionnelles physiologiquement (60). Les EPC ont été mises en évidence pour la première fois par l'équipe de Asahara *et al.* en 1997 à partir du sang périphérique chez l'adulte. Ces cellules ont été isolées avec une technique de sélection par des billes magnétiques basées sur la réaction anticorps antigènes de surface (anticorps anti-CD34 et anti-KDR). Ces cellules montrent une différenciation en cellules endothéliales matures ; elles pourront donc être utilisées dans de futurs travaux en thérapie cellulaire pour l'angiogenèse et la réparation vasculaire. Il n'existe pas de définition consensuelle pour ce type cellulaire, toutefois certains marqueurs semblent être privilégiés pour les caractériser. Les EPCs sont aussi appelés dans la littérature ECFC (Endothelial Cells Forming Colony), PDEC (Progéniteurs Dérivés de Cellules Endothéliales), late EPCs, CE-EPC , CFU-EC (Colony Forming Unit- Endothelial Cells), OECs (Outgrowth Endothelial Cells) et BOECs (Blood Outgrowth Endothelial Cells) (60). Il en existe deux types différents, les EPCs précoces et les EPCs tardifs, qui possèdent des caractéristiques phénotypiques et morphologiques différentes (Table 2).

Table 2 : Comparaison entre les EPCs précoces, tardifs et les cellules endothéliales matures, d’après (21,22).

	EPCs précoces	EPCs tardifs	Cellules endothéliales matures
Morphologie et caractéristiques en culture	Cellules rondes Apparition précoce (<10 jours) Prolifération lente Adhérentes	Cellules allongées Apparition retardée (<14 jours) Prolifération rapide Adhérentes	Cellules en forme d'épingles Prolifération rapide Adhérentes
Marqueurs de surfaces	vWF ^{+/+} , CD34, CD14, CD133, CD31 ^{+/+} , CD45 ^{+/+} , VEGFR2	vWF, CD34, CD133, CD144, CD31, CD45 ^{+/+} , CD146, VEGFR2, Tie-2, E-sélectine	vWF, CD34 ^{+/+} , CD31, CD144, CD146, VEGFR2, Tie-2, E-sélectine
Caractéristiques fonctionnelles :			
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Formation de tube en matrigel ▪ Migration ▪ Ac-LDL incorporation ▪ Formation de néo-vaisseaux 	<p>Oui</p> <p>Oui</p> <p>Oui</p> <p>Peu de formation de néo-vaisseaux</p> 	<p>Oui (fortement)</p> <p>Oui</p> <p>Oui</p> <p>Oui</p> 	<p>Oui</p> <p>Oui</p> <p>Oui</p> <p>Non</p> 

Les EPC sont plus faciles à obtenir en grand nombre à partir du sang de cordon (1 cellule sur 100 000) et les colonies apparaissent plus tôt (56,61). De plus, le prélèvement de sang de cordon comporte moins de risques et d’inconvénients pour la patiente. Aussi, il a été démontré que les cellules endothéliales progénitrices se trouvent dans la fraction CD34 positive des cellules mononucléées isolées du sang de cordon (62). Tel qu’indiqué dans la Table 2, les EPCs tardifs possèdent des caractéristiques phénotypiques des cellules endothéliales. Ils expriment certains marqueurs comme le VEGFR2 (aussi appelé KDR ou flk-1), le CD34 (souvent utilisé pour leur sélection), mais aussi vWF, Tie-2, CD31, la lectine (UEA-1), la E-sélectine (CD62) et elles incorporent les LDL acétylés marqués au 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine, de plus elles expriment le marqueur CD133 qui n’est pas présent chez les cellules matures (56,59,63). Leur identité propre n’est pas encore définie ; il n’existe donc pas à ce jour de marqueur

unique qui permettent de différencier clairement une population de cellules progénitrices d'une population de cellules matures, excepté les marqueurs d'immaturation tels que CD34 et CD133. En revanche, ces marqueurs diminuent rapidement une fois les cellules mises en culture, le marqueur CD45 (marqueur de cellules souches hématopoïétiques) peut être présent dans certains cas mais disparaît aussi rapidement (64). De plus, on constate dans plusieurs travaux que les cellules matures peuvent exprimer le marqueur CD34 à leur surface, ce qui peut rendre l'étude de leur différence d'autant plus difficile (65–67). Toutefois, l'expression de ce marqueur par les cellules matures doit être plus faible que l'expression chez les EPCs à passage faible si l'on veut pouvoir suivre la différenciation des cellules progénitrices en cellules matures. Il est à savoir aussi que l'expression de certains marqueurs comme le vWF et le VEGFR2 dépend du nombre de passage auxquels ont été soumis les cellules (60). Les cellules endothéliales matures et progénitrices produisent également de l'oxyde nitrique qui va avoir un rôle dans la néovascularisation et la vasodilatation des vaisseaux, c'est l'une des particularités de l'endothélium (68). Bien que, les cellules progénitrices endothéliales et les cellules matures expriment les mêmes marqueurs elles ont des caractéristiques fonctionnelles différentes. En effet les cellules progénitrices prolifèrent plus rapidement et elles sont plus résistantes au stress oxydatif que les cellules matures (67).

4.3.1 ROLES DES EPCS

Ces cellules progénitrices sont recrutées aux sites des lésions vasculaires en plus ou moins grand nombre selon la pathologie du patient. En culture *in vitro*, la génération d'EPCs humains en culture est difficile, et ne peut pas être efficacement obtenues à partir de tous les donneurs, puisque la variabilité du nombre de cellules est trop importante. Aussi elle reste limitée en quantité de cellules puisqu'une extrapolation à partir du modèle murin a permis de faire une estimation de 19 litres de sang nécessaire l'homme pour obtenir une dose utilisable en thérapie clinique chez l'homme. En effet, dans le sang périphérique d'un individu sain la proportion de cellules endothéliales progénitrices représente 0,01% à 0,0001% des cellules mononucléées (69). Comme expliqué dans la partie 4.1.2, les EPCs ont un rôle dans la vasculogenèse embryonnaire et post-natale. Chez l'embryon ce sont ces cellules dérivées de l'hémangioblaste qui se différencient en cellules endothéliales pour produire les premières structures vasculaires (70). Chez l'adulte ce sont des stimuli qui vont mobiliser ces cellules progénitrices au site d'une lésion pour permettre la régénération de l'endothélium par la différenciation des EPCs en cellules matures (49). Leur recrutement au niveau des sites de dommages vasculaires dépend en partie des taux de VEGF (vascular endothelial growth factor). Ce facteur est régulé positivement dans les phénomènes d'ischémie (71). Un signal de stress comme une inflammation conduit à une élévation du SDF1 α dans la circulation, ce qui va induire une mobilisation des EPCs (72). CXCR4 son récepteur est

présent à la surface des EPCs, c'est cette interaction qui va diriger la mobilisation des EPCs vers le site de la lésion (73).

4.3.2 ORIGINES

Les progéniteurs endothéliaux précoces, tardifs, les cellules endothéliales matures et les cellules souches hématopoïétiques (HSC) proviennent toutes du même précurseur commun qui est l'hémangioblaste, la présence de facteurs de croissance spécifiques va permettre la différenciation en l'un ou l'autre type cellulaire (Figure 11).

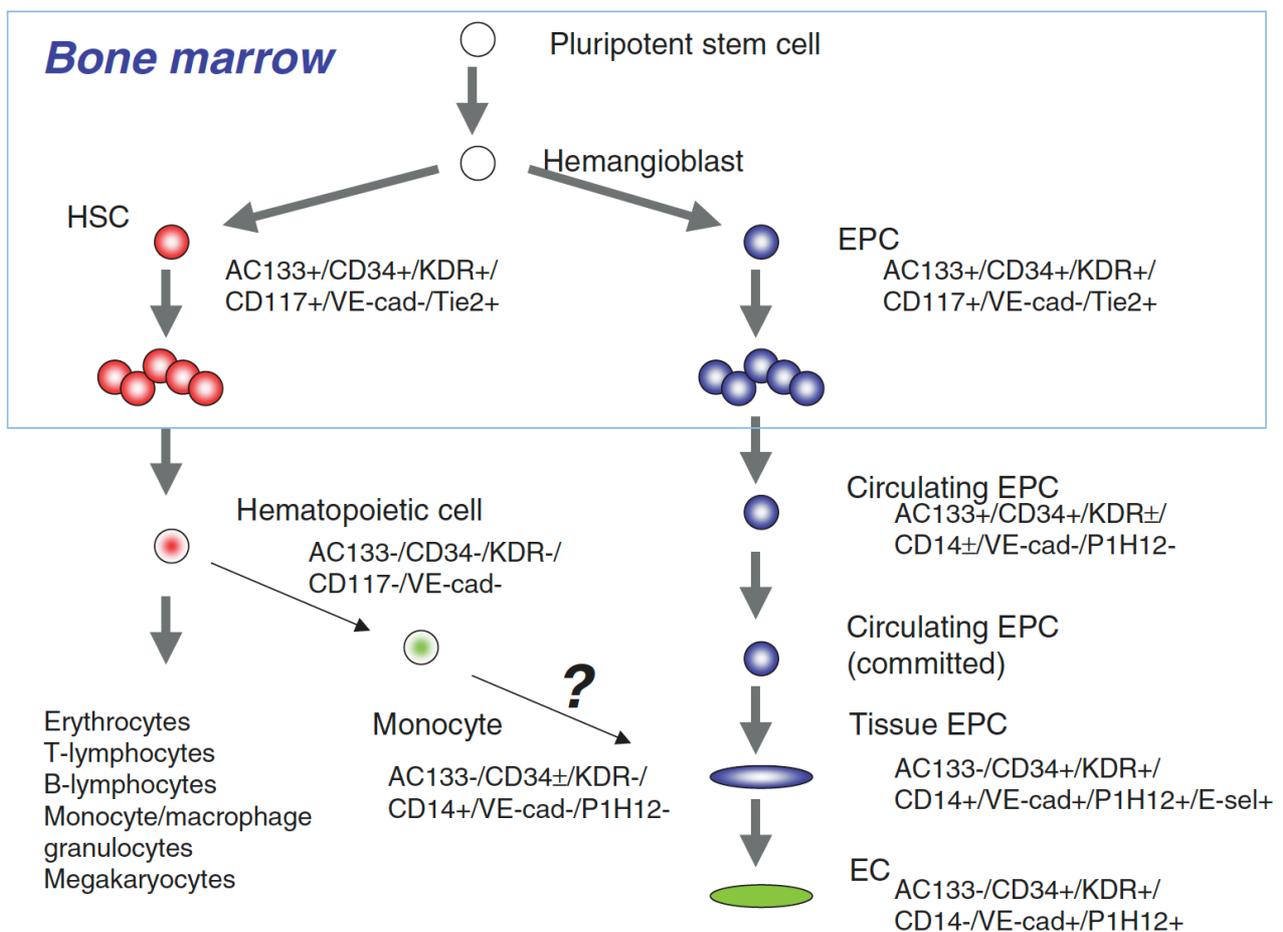


Figure 11 : Cascade de différenciation du précurseur commun aux EPCs et aux cellules souches hématopoïétiques (+, positif ; -, négatif) (74).

Ici les HSC et les EPCs partagent quelques marqueurs communs lorsqu'elles sont encore dans la moelle osseuse. À ce stade il est impossible de la discriminer. Une fois dans la circulation les marqueurs exprimés disparaissent chez les HSC mais subsistent chez les EPCs. Il apparaît désormais clair qu'il s'agit de deux types cellulaires différents, les EPCs circulantes sont déjà engagées dans la lignée endothéliale et vont continuer à se différencier au cours du temps (74,75).

4.3.3 STRATEGIES D'OBTECTION DES EPCs

Les progéniteurs endothéliaux sont isolés à partir du sang total par un gradient de concentration. Brièvement, le sang total est mis en présence de Ficoll (mélange de polysucrose et diatrizoate avec une densité ajustée à 1,077 g/mL) puis centrifugé, la différence de densité entre les composants du sang donnera plusieurs couches de liquides ou cellules (48,76). Dans le cas de l'isolement des progéniteurs endothéliaux, les cellules mononucléées seront récupérées et mise en culture sur une flasque revêtue de collagène de type I et les progéniteurs tardifs vont apparaître après 14 à 21 jours de culture. Les cellules obtenues de cette manière seront nommées ECFCs, pour endothelial cell forming colony, puisqu'une cellule unique sera capable de former une colonie de cellules (77,78). Ce sont ces cellules qui ont une morphologie similaire aux cellules endothéliales matures. Les cellules obtenues avec les deux autres méthodes à savoir une culture sur de la fibronectine et la méthode B (Figure 12), ne donneront pas de cellules qui pourront former de colonies (61,79).

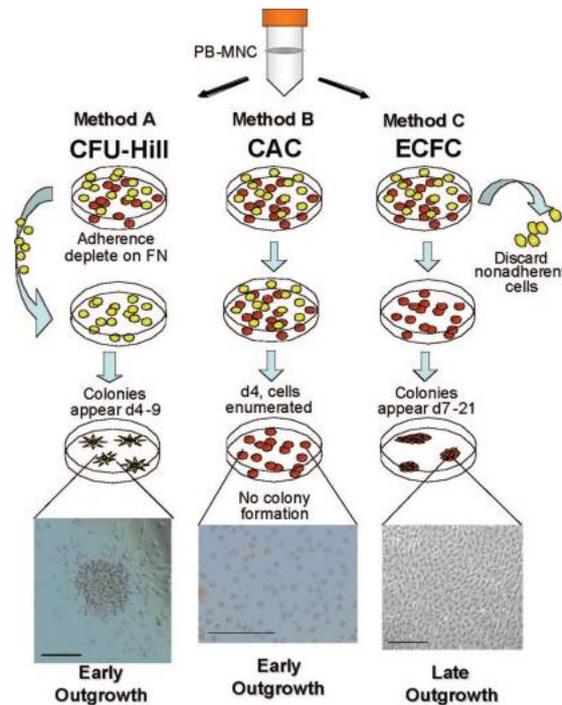


Figure 12: Différentes méthodes d'obtention des EPCs (80) .

4.4 PATHOLOGIES DE L'ENDOTHELIUM

L'endothélium joue un rôle essentiel dans le maintien du tonus et de l'intégrité vasculaire notamment par la sécrétion de médiateurs ayant de propriétés vasodilatatrices et vasoconstrictrices. Dans la majorité des pathologies cet équilibre va être rompu par l'atténuation de la fonction vasodilatatrice de l'endothélium du fait de la diminution de la production de l'oxyde nitrique ou de sa faible disponibilité. Une dysfonction de l'endothélium est impliquée dans les mécanismes de l'athérosclérose. Comme dysfonctionnement on notera, une régulation positive des molécules d'adhésion qui va engendrer l'adhésion de leucocytes et de monocytes (Figure 13), une augmentation de la perméabilité cellulaire, une oxydation des lipoprotéines, une activation des plaquettes et enfin une prolifération des cellules musculaires lisses (81).

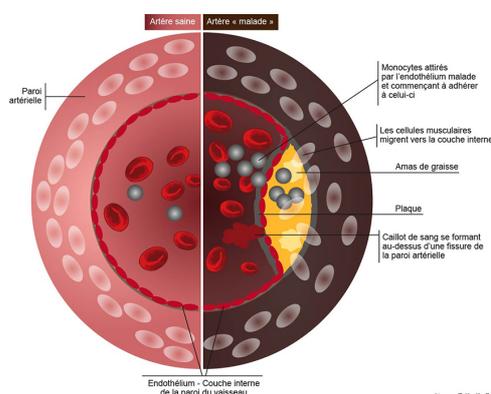


Figure 13 : Représentation schématique de la comparaison entre une artère saine et une artère athérosclérotique (Frédérique Koulikoff, Inserm 2012).

L'évolution de cette pathologie peut être lente et asymptomatique, mais peut parfois s'avérer très grave. La première étape est l'accumulation de lipides de faible densité (les LDL). Subséquemment les monocytes vont adhérer sur l'endothélium et vont être capable de le traverser et se différencier en macrophage, créant ainsi une inflammation. Les cellules musculaires lisses de la média vont migrer vers l'intima avec des protéines de la matrice extracellulaire. Cette accumulation de cellules et de protéines peut former un thrombus (ou caillot) et le sang ne circulera plus de manière adéquate puisque la lumière (diamètre interne des vaisseaux) va diminuer. La plaque peut évoluer lentement et rester stable de nombreuses années mais elle peut aussi se rompre et remonter jusqu'au cœur provoquant un infarctus dans ce premier cas ou alors elle peut remonter au cerveau et provoquer ainsi un AVC.

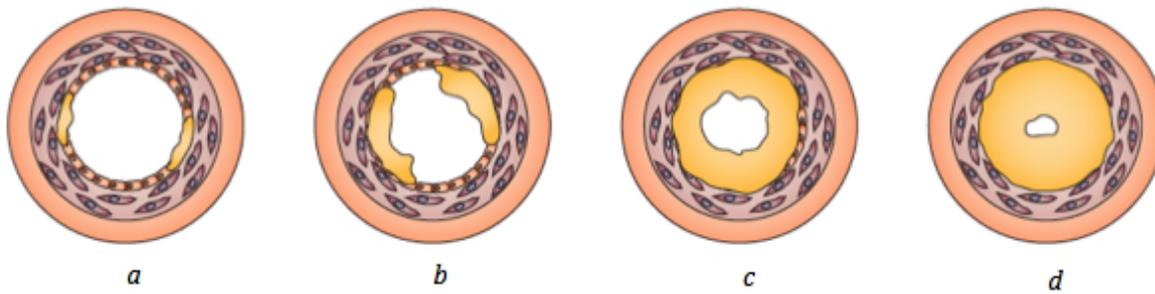


Figure 14 : Les différentes étapes de progression des pathologies vasculaires provoquées par un dépôt de plaque d'athérome (82).

Sur la Figure 14 a il s'agit d'une étape précoce de la maladie ici, un traitement médicamenteux (statines, hypocholestérolémiants) et un régime alimentaire sain (anti-cholestérol) suffit pour résorber ce problème. Quand le traitement médicamenteux ne suffit plus, la lésion évolue alors de façon plus critique et une intervention chirurgicale devient nécessaire. Dans le cas de la Figure 14 b, une angioplastie, qui consiste en la réouverture de la lumière du vaisseau à l'aide d'un ballonnet, est réalisée au stade précoce de la formation de la plaque. Si la progression de la plaque provoque des complications, alors un stent pourra être déployé à l'endroit où se trouve la plaque d'athérome. Dans les cas plus sévères (Figure 14 c et d), lorsque la plaque bouche les vaisseaux, l'implantation d'un greffon (pontage) synthétique ou non est réalisée.

Outre l'athérosclérose, il existe d'autres pathologies que peut subir l'endothélium parmi elles la thrombose. Dans ce cas, le sang coagule et un bouchon de fibrine, de cellules et de globules rouges obstrue le vaisseau, empêchant le sang de passer correctement. Si la paroi du vaisseau se déforme, alors il y aura la formation d'anévrisme. Le vaisseau peut alors se dilater jusqu'à un diamètre de plusieurs fois son diamètre initial. Cet anévrisme peut se rompre, entraînant ensuite une hémorragie. Dans le cas d'une dissection les différentes couches d'un vaisseau sanguin se désolidarisent et du sang peut entrer entre les feuillets qui composent les vaisseaux, créant ainsi un anévrisme qui peut progresser rapidement en provoquant une hémorragie ou un infarctus du myocarde ou encore une insuffisance cardiaque grave selon le vaisseau touché par la dissection. Cette pathologie dans tous les cas nécessite une intervention chirurgicale rapide.

5. Les substituts vasculaires

La prise en charge des patients par le corps médical afin de traiter une maladie vasculaire doit s'effectuer au cas par cas et selon la gravité de la maladie. Comme abordé précédemment, quand un vaisseau est trop endommagé on aura recours à un substitut vasculaire qui va créer un pont entre deux parties saines pour permettre au sang de passer. Bien que beaucoup de nouvelles techniques soient explorées, la prothèse en PET reste, de nos jours, le meilleur substitut artériel pour les artères de moyen et gros calibre. Pour le substitut de petit calibre, la veine saphène interne demeure une solution très utilisée (83). Le ePTFE (Teflon) est également utilisé fréquemment pour les petits diamètres et notamment pour la chirurgie de revascularisation sous-inguinale (84,85). Le développement de nouveaux substituts nécessite une approche globale, de l'échelle nanoscopique à macroscopique, de la molécule de base qui compose le matériau à son intégration dans le corps humain. Ainsi, cette approche ne peut se faire sans la fusion de plusieurs domaines scientifiques conventionnels, comme la médecine, la biologie mais aussi l'ingénierie et la physique (Figure 15).

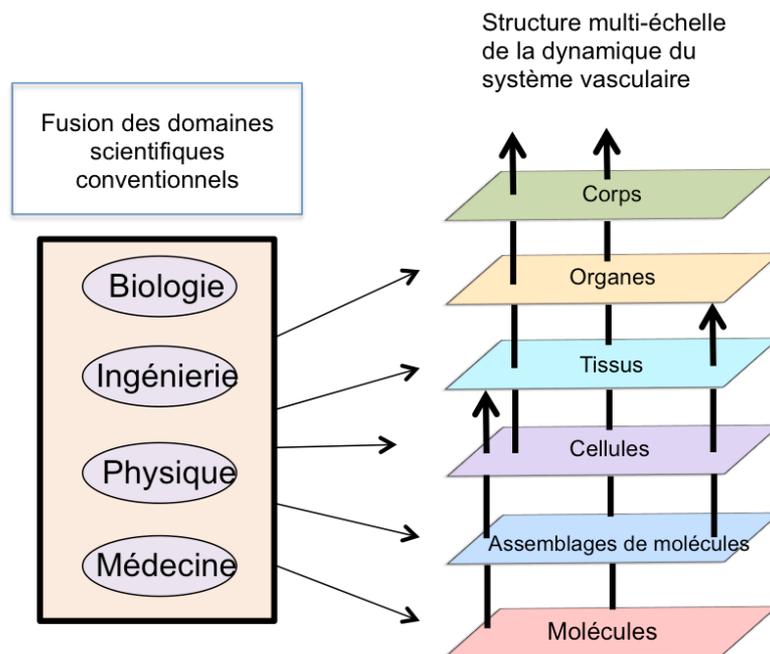


Figure 15: Structure hiérarchique du système vasculaire à l'échelle moléculaire, organe et corps. L'ingénierie vasculaire est un système qui ne peut être compris qu'en utilisant une approche multi-échelle et multidisciplinaire. D'après Tanishita et Yamamoto.

5.1 LES PROTHESES VASCULAIRES BIOLOGIQUES

Les substituts biologiques de remplacement vasculaire restent la solution de choix pour les chirurgies de pontage. L'autogreffe est la solution la plus utilisée. Dès le début des années cinquante Kunlin (86), a réalisé une greffe de veine saphène autologue. La veine saphène est une veine superficielle qui se trouve dans la jambe et la cuisse. Il en existe deux, la veine saphène externe (visible sur l'arrière de la jambe) et la veine saphène interne (plus large). Pour être greffée en remplacement d'une artère, celle-ci devra être retournée pour annuler le jeu des valvules sur sa couche la plus interne et les valvules pourront être enlevées avec un valvulotome. Cette veine pourra ensuite être utilisée dans le cas de remplacement pour des pontages fémoropoplité, fémorojambiers ou aorto-rénaux. Cette technique offre bien des avantages puisque la veine est déjà endothélialisée. Toutefois, les endothéliums veineux et d'artères possèdent des propriétés différentes. En effet, ces deux couches de cellules ne sont pas du tout confrontées aux mêmes forces. L'endothélium veineux peut être affecté par la pression du sang plus haute. Le greffon veineux était auparavant soumis à un flux assez lent et non pulsatile. Après l'implantation dans la circulation artérielle, celui-ci va subir une pression plus grande, un flux pulsatile et des forces de cisaillement. Ces changements sont responsables d'une hyperprolifération des cellules musculaires lisses et du changement vers un phénotype athéromateux, qui vont contribuer à une thrombose du greffon à moyen terme (87).

Une autre solution qui peut être envisagée est l'autogreffe artérielle avec l'artère thoracique interne (ou artère mammaire interne). Son comportement mécanique et biologique est identique et la cicatrisation lors de ce type de chirurgie est meilleure. Les homogreffes artérielles ou veineuses sont impossibles si les artères ou veines du patient ont déjà été utilisées par ailleurs ou si elles sont elles-mêmes endommagées. Ces veines ou artères seront prélevées lors de varisectomie ou alors sur des cadavres. Souvent ces greffons sont déjà un peu endommagés et donc des anévrismes ainsi que des difficultés de cicatrisation peuvent survenir. Enfin, le dernier type de prothèses vasculaires biologiques sont les substituts biologiques traités, comme les hétérogreffes bovines ou encore les veines ombilicales traitées, ces greffons sont réticulés avec du glutaraldéhyde pour améliorer leurs propriétés mécaniques (88).

5.2 LES PROTHESES VASCULAIRES SYNTHETIQUES

Le marché des implants vasculaires synthétiques est en développement constant et cela est principalement dû au nombre croissant de patients ayant besoin de ce type de prothèses et également du nombre restreint d'options biologiques de remplacement (autogreffes et allogreffes). Les premiers essais de greffe de matériaux non biologiques pour le remplacement d'artères datent de 1912, il s'agit des travaux d'Alexis Carrel (Prix Nobel de physiologie et médecine). Les matériaux testés ont été le verre, l'aluminium et l'aluminium recouvert d'or. Ces trois matériaux étaient également enduits de paraffine. Les deux matériaux d'aluminium entraînèrent la mort de l'animal par corrosion de la canule. Les tubes en verre donnaient des résultats variables : l'un des chiens est mort puisque le verre s'est brisé pendant l'opération alors que deux autres ont succombé à une hémorragie par déchirure de l'artère au niveau des anastomoses. Dans les cas restants, une thrombose fut observée entre 5 jours et 9 jours post-opératoires. Ces différents résultats confirment à Carrel que ce type de tube non biologique peut être utilisé et ouvre la voie à de nouveaux matériaux (89).

Après la seconde guerre mondiale, on assiste à l'avènement des matériaux plastiques, qui paraissent une bonne solution, car ils sont stables (les risques de corrosion sont nuls), inertes, compatibles avec les tissus et résistants à la thrombose. Un peu avant les années cinquante, Hufnagel fait des essais avec des tubes de poly (méthyle méthacrylate), aussi appelé plexiglass, en remplacement de l'aorte thoracique sur 15 chiens. Les résultats sont encourageants puisque ce type de substituts présente une certaine résistance à la thrombose dans la majorité des cas (entre 6 heures et 6 mois post-opératoire) (90).

Dans les années cinquante, l'équipe de Voorhees a mis au point des tubes à base de Vinyon « N », ceux-ci présentaient des caractéristiques intéressantes, mais ne résistaient pas à la dégradation *in vivo* (91). D'autres équipes ont travaillé sur des matériaux similaires et qui montraient la même incapacité à résister à la dégradation une fois implantés. Les prothèses en Nylon® créées peu de temps après en 1954 par Creech *et al.* montraient une résistance à la rupture faible. Elles perdaient leur propriété de résistance d'environ 80%, ce qui créait des dilatations et des ruptures de prothèses chez les animaux dans lesquels elles étaient implantées (92).

En 1955, un nouveau matériau est mis sur le marché, il s'agit du Dacron® (PET), qui a été mis au point par DuPont de Nemours & Co. Inc. Il est caractérisé comme biocompatible, flexible, suffisamment inerte et peut être stérilisé. A partir de ce polymère, des prothèses textiles ont été développées. Dans les décennies suivantes, le but était d'améliorer les propriétés mécaniques et biologiques de prothèses en PET afin qu'elles se rapprochent de la morphologie et de la biologie des artères humaines. Les designs utilisés de nos jours sont sous forme de tube tissé qui favorisent

la cicatrisation en augmentant la porosité. Ensuite, différentes équipes ont cherché à améliorer l'endothélialisation des prothèses en jouant sur la texture des fibres ou en recouvrant la surface avec des biomolécules (héparine, collagène, gélatine ou d'autres protéines).

Actuellement, il est possible d'utiliser principalement deux matériaux : le Dacron® (ou PET), le poly(tétrafluoroéthylène) expansé (ePTFE ou Gore Tex®) en fonction du diamètre du vaisseau lésé (Table 3). Ceux-ci peuvent être modifiés ou non, selon les pays et en accord avec la Food and Drug Administration (FDA). Le matériau sera choisi en fonction du diamètre de l'artère à remplacer (voir la Table 3). Bien qu'il existe d'autres matériaux comme les polyuréthanes et les polypropylènes, ce sont le PET et ePTFE qui sont les plus utilisés pour les applications cliniques et en recherche (93).

Table 3 : Type de prothèse à utiliser pour la chirurgie en fonction du diamètre de l'artère à remplacer.

Diamètre	Artère de référence	Type de prothèses (le plus souvent utilisé)
Gros diamètre, 12-38 mm	Aorte	PET (Dacron®)
Moyens diamètres 6-12 mm	Artère fémorale	PET ou ePTFE (Gore Tex®)
Petits diamètres <6mm	Artère cérébrale ou coronaire	Autogreffe

5.3 LES PROTHESES HYBRIDES OU ISSUES DE L'INGENIERIE TISSULAIRE

Ce type de prothèse consiste en un échafaudage synthétique ou non,ensemencé préalablement avec des cellules endothéliales autologues ou non. Le substitut pourra êtreensemencé avant la chirurgie pour obtenir un produit sur mesure ou alors les cellules pourront être transplantées chez le patient. Le but de l'échafaudage sera également d'attirer les cellules d'intérêt sur sa surface pour qu'il soit colonisé. Dans une étude de Hongbing *et al.*, des progéniteurs endothéliaux autologues canins ont d'abord étéensemencés sur un gel de collagène, puis ce gel a été implanté chez des chiens. Les résultats montrent que les cellules ont proliféré et colonisé le substitut en quelques semaines (94). Toutefois, ces matrices souvent à base d'hydrogel montrent des faiblesses en termes de propriétés mécaniques elles seront donc réticulées ou renforcées par des structures synthétiques (95) comme par exemple avec l'association de nanofibres de polycaprolactone et de collagène (96) ou encore chitosan/collagène (97) obtenues par électrofilage peuvent recrées un réseau de fibres. Ce réseau va imiter la matrice extracellulaire et ainsi servir d'échafaudage aux 3 types cellulaires qui composent les vaisseaux sanguins. Les cellules des vaisseaux sanguins sont facilement disponibles. Elles peuvent être prélevées à partir de donneurs humains ou d'animaux. Parmi les sources existantes, les cellules peuvent provenir de l'aorte d'un bovin de la veine saphène, mais ces cellules déjà matures ont des capacités de prolifération et de synthèse de la matrice extracellulaire limitées (98). Les cellules souches multipotentes peuvent

représenter une source de cellules intéressante. En effet, ces cellules sont présentes dans la moelle osseuse, les tissus adipeux, le cordon ombilical, les muscles et le sang, elles ont capacité de prolifération supérieures aux cellules matures, elles peuvent subir plusieurs passages en cultures *in vitro* (61). Ces cellules sont déjà engagées dans une lignée mais pourront adopter un phénotype endothélial, fibroblastique ou musculaire lisse (99).

6. Les causes d'échecs à l'implantation

Les dispositifs médicaux comme les biomatériaux doivent pouvoir être en contact avec un tissu vivant en produisant une réponse immunitaire appropriée dans le cadre d'une application spécifique ; c'est la définition de la biocompatibilité de David Williams (10,100). Parmi les applications, on peut citer, le remplacement d'un organe ou d'un tissu (prothèse de hanche), d'une fonction d'un organe (pacemaker), ou l'amélioration des fonctions d'un organe (stent). Le succès de l'implantation dépend de plusieurs facteurs à savoir les propriétés du matériau, de la prise en charge des patients et de leur suivi (101).

Quelle que soit la nature du substitut, l'implantation de matériaux destinés à soutenir ou remplacer les vaisseaux sanguins n'atteint jamais un taux de réussite de 100 %. Le taux de réussite après implantation pour les vaisseaux sanguins de petits diamètres inférieur à 6 mm et d'environ 50 % après 10 ans. Il n'existe actuellement pas de solution idéale pour le remplacement des vaisseaux sanguins. Immédiatement après l'implantation, le biomatériau sera recouvert de protéines non spécifiques, comme l'albumine, le fibrinogène ou des facteurs de coagulation. Cette couche de protéines va favoriser l'adhésion de cellules comme les neutrophiles et les macrophages. Par la suite les fibroblastes et les cellules endothéliales, les plaquettes les globules rouges vont adhérer à leur tour. Tous ces facteurs vont engendrer l'activation de la cascade de coagulation et la formation d'un thrombus qui viendra obstruer la lumière de la prothèse. Ce thrombus aux abords de l'anastomose va engendrer des changements hémodynamiques qui, à leur tour, vont créer des zones d'irrégularité du flux sanguins pouvant être à l'origine de la coagulation (102) ou du phénotype pro-inflammatoire des cellules endothéliales avoisinantes (103).

La restenose par thrombose n'est pas le seul phénomène responsable. L'hyperplasie néointimale anastomotique est l'une cause principale de l'échec des substituts synthétiques. Dans ce cas précis, les cellules de la couche média du vaisseau prolifèrent de façon anarchique. Il en résulte une surproduction de matrice extracellulaire et donc un épaissement de la tunique (104). Dans la zone anastomotique, les différences de propriétés mécaniques entre le substitut et l'artère native (105) se traduisent par une différence de compliance, une contrainte traction-compression cyclique non physiologique et une contrainte de cisaillement faible provoquant une zone de ralentissement du flux (106). Ces changements engendrent un changement de phénotype des cellules musculaires lisses qui va induire une surproduction de matrice extracellulaire, une migration et une hyperprolifération (104).

Une dernière cause d'échec à prendre en compte est la dégradation physico-chimique des prothèses vasculaires en PET. Après l'implantation le substitut est soumis à des contraintes de fatigue qui peuvent engendrer des complications. Au cours du temps, la prothèse va perdre sa compliance radiale et longitudinale, souvent due à une perte du cosselage. Les filaments qui forment le substitut peuvent se rompre précocement (107). À plus long terme, c'est la dégradation chimique qui peut se déclarer, *in vivo*, la réaction inflammatoire par le biais des macrophages qui vont produire des protéases va diminuer le pH localement autour de la prothèse et ainsi provoquer une rupture des chaînes de PET (108).

7. Les stratégies d'amélioration des substituts vasculaires

Un cahier des charges du substitut idéal peut être établi avec les observations et les recherches faites sur les prothèses ces dernières années. Il apparaît clair que les substituts synthétiques tels qu'ils sont employés aujourd'hui nécessitent des améliorations pour augmenter leur durée de vie.

7.1 CARACTERISTIQUES IDEALES D'UN SUBSTITUT VASCULAIRE

Il semble évident que la prothèse optimale doit présenter un comportement aussi proche que possible à celui d'une artère humaine saine. Le cahier des charges est donc très complexe. En effet, un substitut vasculaire doit être imperméable au sang, biocompatible, il doit permettre l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales et ne doit pas induire de réactions inflammatoires ni avoir des propriétés thrombogènes. De plus, il doit avoir une compliance similaire à celle d'un vaisseau natif (pour diminuer le risque de ruptures aux sites d'anastomoses) et une durée de vie supérieure à celle du patient. Ces différents paramètres sont influencés par le matériau, la méthode de production et le design de la prothèse. D'un point de vue pratique, les substituts idéaux devront être disponibles rapidement sous différentes formes et diamètres, et évidemment faciles à suturer. A ce jour, il n'existe aucun substitut regroupant toutes ces qualifications.

Actuellement, les équipes de recherche s'attardent sur la problématique suivante :

Comment recréer la couche de cellules endothéliales à la surface des matériaux pour permettre une meilleure hémocompatibilité ?

7.2 MODIFICATION DU MATERIAU AVEC DES PROTEINES OU DES FACTEURS DE CROISSANCE

Les propriétés de surface des biomatériaux sont capitales à la bonne intégration du dispositif dans le corps humain. Le but de la modification de surface ici est d'améliorer la réponse après l'implantation. Actuellement, les prothèses vasculaires en PET sont revêtues de gélatine (109), collagène ou d'albumine (13) pour les rendre imperméables au sang. Ces revêtements de protéines sont biodégradables et sont dégradés après quelques semaines. Par ailleurs, les protéines peuvent être greffées de façon covalente sur les biomatériaux pour améliorer leur biocompatibilité. Cette approche non spécifique, ne permet pas un contrôle de l'adsorption et de l'orientation des protéines résultant une interaction avec les cellules relativement faible. De plus les protéines entières peuvent perdre leur activité à cause d'une dégradation protéolytique ou d'un changement de conformation après le greffage (110–112). Le collagène présent dans la matrice extracellulaire permet de fournir

aux cellules un support. Dans les travaux de Sgarioto *et al.* le collagène et la fibronectine sont utilisés pour améliorer l'adhésion d'HUVECs et ainsi permettre un endothélialisation. Ils observent qu'un double revêtement (collagène associé à de la fibronectine) permet un meilleur taux de prolifération des HUVECs après 48 heures qu'avec la fibronectine seule (113). Les protéines issues de la matrice extracellulaire permettent un ancrage des cellules qui peut améliorer la surface du biomatériau. Dans le cadre d'une amélioration des prothèses vasculaires, il est important que le matériau soit capable de recruter les cellules en nombres pour pouvoir coloniser la surface. Les facteurs de croissances jouent un rôle dans le recrutement, la prolifération et aussi le devenir des cellules. Ils pourraient donc être de bons candidats pour ces applications (114). Le VEGF (115–120), le SDF-1 (121,122) et le facteur de croissance granulocytaire ou G-CSF (123) permettent d'augmenter la mobilisation des EPCs provenant de la moelle osseuse. Le facteur de croissance nerveux NGF a été greffé sur un vaisseau sanguin décellularisé et a permis de promouvoir la migration des EPCs *in vitro* sur la surface et leur mobilisation *in vivo* chez la souris (124).

Ces molécules bien que présentes *in vivo* peuvent engendrer une réponse immunitaire. Elles sont aussi soumises à la dégradation enzymatique. De plus, la structure secondaire de ces macromolécules peut parfois poser problème puisqu'une fois greffées la structure et la conformation des protéines change et cela peut empêcher le ligand de reconnaître les récepteurs présents à la surface des cellules (125).

7.3 MODIFICATION DU MATERIAU AVEC DES PEPTIDES

Les protéines de la MEC sont très populaires pour le développement des substituts vasculaires. Des preuves significatives existent qui soutiennent que la MEC régule la fonction des ECs et EPCs par les interactions des intégrines avec l'environnement (126,127). L'utilisation de structures de plus petites tailles comme les peptides permet un meilleur contrôle du greffage. Le tripeptide RGD est la séquence la plus utilisée qui permet d'améliorer l'adhésion des cellules (128,129). Pour une application sur les cellules endothéliales, le peptide REDV est également utilisé car spécifique aux cellules endothéliales et reconnu par les intégrines $\alpha 4\beta 1$. Or, les résultats d'une étude précédente dans notre laboratoire (thèse de doctorat de M^{elle} Yifeng Lei CBMN, Bordeaux) montrent que le peptide RGD favorise davantage l'adhésion cellulaire des HUVECs que le peptide REDV et cela de façon significative (130). Par ailleurs, ces deux peptides ont été comparés également à la séquence YIGSR qui permet elle aussi l'adhésion des cellules endothéliales et minimisent l'adhésion des plaquettes (131). Même si le peptide RGD permet une meilleure adhésion des cellules sur la surface (avec des contact focaux plus grands), le nombre de cellules qui adhèrent sur une surface modifiée avec le REDV ou le YIGSR est sensiblement le même (131). En revanche le peptide SVVYGLR (peptide angiogénique issu de l'ostéopontine)

permet une meilleure migration des cellules que les trois autres peptides (117,131). Les séquences citées précédemment sont linéaires mais des peptides cycliques peuvent être utilisés (110). Les séquences linéaires du peptide RGD se lient préférentiellement à $\alpha 5\beta 1$ alors que les séquences cycliques se lient préférentiellement à $\nu\beta 3$. De plus, les RGD cycliques sont plus stables *in vivo* en présence d'enzymes (110,132). Le peptide RGD n'étant pas spécifique, il permet également l'adhésion des plaquettes. Des travaux actuels mettent en évidence le développement de nouveaux peptides RGD susceptibles de se lier à des intégrines spécifiques (133) pour éviter l'adhésion des plaquettes et monocytes notamment (134,135). Le peptide CAG (issu du collagène) possède une affinité élevée pour les cellules endothéliales mais aussi une affinité plus faible pour les cellules musculaires lisses comparé au peptide RGD. Ce peptide CAG permet l'adhésion de presque deux fois plus de CEs que de CMLs. De plus, l'étalement des CEs est plus important. Les CMLs adoptent une morphologie plus ronde (136).

De nombreuses études de fonctionnalisation de surface par des peptides montrent l'importance de la densité peptidique qu'il est possible d'immobiliser en surface d'un matériau. En effet, il s'agit d'un paramètre critique qui va déterminer si les surfaces modifiées vont avoir une action positive sur les cellules ou non. Dans le cas de l'adhésion cellulaire, la quantité de cellules attachées en surface est reliée à la densité des peptides d'intérêt en surface. Massia et Hubbel en 1991 ont travaillé sur la densité de peptide RGD nécessaire pour l'attachement des fibroblastes. Le peptide RGD est bien connu depuis les années 80 comme une molécule permettant l'adhésion de tout type de cellules en surface d'un matériau. Une densité de 1 fmol/cm^2 est la quantité minimale indispensable pour l'adhésion de ces cellules, mais l'étalement et la formation de contacts focaux n'intervient qu'à partir d'une densité de 10 fmol/cm^2 . De plus, ils montrent qu'un espacement de 440 nm ($5,2 \cdot 10^6$ molécules RGD/mm²) est suffisant pour un étalement des fibroblastes et un espacement de 140 nm ($5,1 \cdot 10^7$ molécules RGD/mm²) est nécessaire pour l'apparition de contacts focaux et la formation de fibres de stress. Dans le cas des cellules endothéliales, une densité minimale de $6 \cdot 10^5$ molécules RGD/mm² est nécessaire pour l'adhésion des cellules et $6 \cdot 10^8$ molécules RGD/mm² sont nécessaires pour un meilleur étalement des cellules endothéliales (137). Chollet *et al.* en 2009 montrent qu'une densité supérieure à 1 pmol/mm^2 permet l'adhésion d'un plus grand nombre de cellules de veines comparées au PET natif. Toutefois une trop grande densité semble avoir l'effet inverse puisqu'avec une densité de $2,4 \text{ pmol/mm}^2$ la quantité de cellules adhérentes a tendance à diminuer alors qu'elle arrive à un plateau avec une densité de $1,7 \text{ pmol/mm}^2$. Les contacts focaux présentent la plus grande taille et sont présents en plus grand nombre sur les surfaces les plus denses en peptides RGD ($2,4 \text{ pmol/mm}^2$) (138).

7.4 MODIFICATION DU MATERIAU AVEC DES ANTICORPS

Il est possible de greffer sur des surfaces des anticorps spécifiques à un type cellulaire pour permettre la reconnaissance entre un récepteur membranaire et la surface. Ainsi le greffage de l'anticorps anti-CD34 sur des stents (139) ou des greffons en ePTFE (140) permet le recrutement de cellules endothéliales progénitrices et ainsi la réendothélialisation du matériau. Les résultats sur la prothèse en ePTFE montrent qu'au bout de 72h entre 85% et 95% des prothèses étaient recouvertes de cellules endothéliales alors qu'aucune cellule n'avait colonisé les substituts non modifiés (140). De la même manière l'anticorps anti-CD133 a été greffé sur des stents pour promouvoir le recrutement des EPCs. Les stents modifiés ont pu être colonisé par des EPCs dont le phénotype a été validé par un marquage avec les Dil-ac-LDL (141).

Toutefois cette modification de surface induit une hyperplasie néointimale, il faudra donc veiller à limiter la prolifération des cellules musculaires lisses pour palier à ce problème. Ces dernières études ont été faites *in vivo*, le phénotype des cellules qui recouvrent les prothèses n'est donc pas clairement identifié, toutefois, les EPCs et les ECs circulantes expriment le marqueur de surface CD34 il est possible qu'un mélange de ces deux types cellulaires ait pu coloniser le substitut pour recréer une monocouche de cellules. Les anticorps anti-KDR (142) et anti-CD31 (143) ont été utilisés pour cibler les CEs matures. Ces marqueurs sont présents sur les EPCs et pourront donc être utilisés pour le recrutement de ce dernier type cellulaire.

7.5 LES DIFFERENTS MODES DE FONCTIONNALISATION DE SURFACE DU PET

Le PET est déjà utilisé sous une forme appelée Dacron® pour la fabrication de prothèse synthétiques il s'agit de fibres de PET tricotées, parfois texturées comme du velours. Ce matériau ne permet pas ou peu la régénération de l'intima ou endothélium à l'intérieur du substitut. Aux abords des sites d'anastomoses la réendothélialisation se fait seulement sur 1 à 2 cm chez l'homme. Pour que les cellules endothéliales prolifèrent à l'intérieur des prothèses, il devra donc être modifié avec diverses techniques pour améliorer son hémocompatibilité. Il possède des fonctions hydroxyles et acide carboxyliques en fin de chaînes. Ces groupements doivent être modifiés pour créer en bout de chaînes groupements fonctionnels pour pouvoir greffer des molécules d'intérêt de façon stable par la suite. Les traitements les plus utilisés dans la littérature sont les traitements dits physiques ou chimiques.

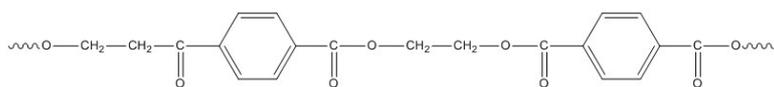


Figure 16 : Structure du PET.

7.5.1 LES TRAITEMENTS CHIMIQUES

Le but premier des traitements chimiques est de multiplier les bouts de chaînes pour augmenter la densité de groupements hydroxyles ou carboxyles en surface du matériau. Pour cela, une hydrolyse peut être réalisée et la réaction aura lieu à l'interface solide-liquide (144,145). Ensuite, les groupements formés pourront être oxydés avec du permanganate de potassium pour obtenir des groupements carboxyles. Ces derniers pourront alors être réduits avec du borohydrure de sodium pour obtenir des fonctions hydroxyles (146). Pour modifier le PET, il existe d'autres méthodes telles que l'aminolyse et l'alcoololyse, qui permettent de créer respectivement des fonctions amines et alcools.

La modification chimique du PET nécessite souvent l'utilisation de solvants forts et de produits parfois corrosifs, mais il s'agit d'une chimie relativement simple et qui ne demande pas d'équipement particulier. Les temps de réaction peuvent parfois être longs. Par exemple, la méthode par l'hydrolyse et l'oxydation peut prendre jusqu'à une quinzaine de jours pour obtenir des surfaces modifiées avec des peptides greffés de façon homogène en surface à l'étape finale.

7.5.2 LA DEGRADATION ENZYMATIQUE

Dans le cas du PET, qui est un polyester, l'utilisation de la polyestérase ou de l'estérase, semble tout indiquée. Ces enzymes ont la capacité d'hydrolyser les chaînes du polymère pour créer des groupements hydroxyles et carboxyles. Cette procédure permet d'obtenir un matériau similaire à celui obtenu suite à une hydrolyse chimique (147).

7.5.3 LES TRAITEMENTS PLASMA

Le plasma ou quatrième état de la matière est utilisé au sein du LIS (Québec) pour greffer des groupements chimiques ou des molécules à la surface de différents matériaux afin de leur conférer des propriétés spécifiques. Le PET peut être modifié par plasma pour des applications vasculaires ; il existe d'ailleurs de nombreuses études à ce sujet le principe est le suivant : des espèces réactives et énergétiques sont créées au sein du plasma, elles seront ensuite bombardées sur la surface, ce qui conduira à la rupture des liaisons covalentes et à la formation de radicaux libres qui vont pouvoir réagir ensuite avec un principe actif (148). Selon le gaz utilisé dans le réacteur, les radicaux créés seront différents il est possible d'utiliser l'argon le N₂, l'O₂, le NH₃,

l'hélium l'hydrogène ou encore le CF₄ (149). Le traitement plasma permet également de modifier la surface du PET pour créer en surface des groupements -NH₂ ou -COOH qui vont permettre ensuite le greffage de molécules cible comme des peptides ou des protéines. Une équipe a modifié la surface de prothèses en Dacron[®] par plasma pour créer en surface des groupements fonctionnels -COOH (avec un plasma à oxygène). Cette modification n'altère pas les propriétés mécaniques des prothèses vasculaires et permettra le greffage subséquent de protéines comme la gélatine et l'albumine. Les surfaces modifiées avec la gélatine améliorent l'adhésion et la prolifération de cellules endothéliales (ici les HUVECs), mais ne permet d'inhiber la coagulation, le greffage concomitant d'albumine et de gélatine diminue les phénomènes de coagulation et d'adhésion plaquettaire, ce travail reste donc encore à approfondir (150). La modification par plasma du PET dans le cas suivant a permis le greffage de polyéthylène glycol pour inhiber l'adsorption de protéines à la surface du matériau (problème récurrent dans le cas des prothèses vasculaires). En utilisant un plasma de NH₃ et d'éthylène pour créer des groupements amines primaires à la surface du PET. Ces amines primaires vont ensuite pouvoir réagir avec les groupements terminaux N-hydroxyle succinimide (NHS) du polyéthylène glycol (modifié au préalable). Cette modification de surface permet de greffer différentes concentrations de polyéthylène glycol à la surface. La quantité de protéines (ici le fibrinogène) adsorbées est plus faible dans le cas d'une concentration plus élevée en polyéthylène glycol. Un test d'adhésion de plaquette montrent des résultats avec la même tendance (151).

7.5.4 LES TRAITEMENTS AUX UV

Le traitement aux UV a été expérimenté dans notre laboratoire à Bordeaux. Ce traitement peut toutefois dégrader le matériau et générer des produits de réactions secondaires. De plus, le traitement n'étant pas homogène sur la surface, la profondeur de modification peut être différente. Ce traitement a été testé et comparé à un traitement chimique par Chollet *et al.* en 2007. Dans ces travaux, les auteurs ont modifié un film de PET pour augmenter la densité d'acides carboxyliques en surface afin de pouvoir y greffer des peptides par la suite. Un traitement UV a été associé avec une oxydation chimique (KMnO₄ et H₂SO₄), puis comparée à une oxydation simple puis comparée à une hydrolyse suivie d'une oxydation. Cette étude démontre que la méthode d'hydrolyse puis d'oxydation chimique du PET permet d'obtenir la plus grande densité d'acide carboxylique en surface du matériau (152).

La densité de groupements carboxyles sera naturellement corrélée à la densité de peptides ou biomolécules qui seront greffées par la suite. C'est donc un paramètre important dans le contrôle et l'étude du comportement cellulaire.

Chapitre 1 : Projet doctoral

Ce projet de recherche consiste en la modification de la surface d'un polymère, ici le PET, pour pouvoir y greffer des principes actifs innovants, ayant pour but d'avoir une activité à l'égard de deux types cellulaires, soit les cellules endothéliales progénitrices soit les cellules endothéliales matures. Ce greffage devrait permettre le recrutement, l'adhésion, puis la différenciation de cellules progénitrices endothéliales, mais également d'améliorer l'adhésion des cellules matures.

1. Objectifs

L'objectif de ce travail est d'améliorer l'hémocompatibilité des prothèses vasculaires déjà utilisées en chirurgie. Nous travaillerons sur un matériau modèle, à savoir des films de PET (Figure 17). Pour mener à bien ce projet, trois étapes seront nécessaires afin de tester les matériaux synthétisés dans des conditions qui se rapprochent au maximum des conditions physiologiques.

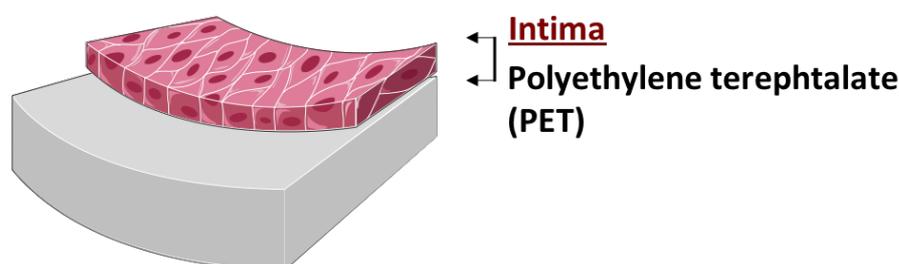


Figure 17: Objectif du projet de doctorat. Ici le but est de recréer l'intima à la surface d'un film de PET.

Objectif 1 : Recrutement et adhésion des EPCs sur les surfaces homogènes : Choix des principes actifs

La première étape est la recherche de principes actifs innovants, leur greffage homogène, leur caractérisation physico-chimique et les études biologiques. À la fin de cette étape, nous serons en mesure de choisir deux principes actifs qui présentent les meilleurs résultats pour le recrutement et l'adhésion des cellules endothéliales progénitrices. Il a été démontré que la modification de surface par des séquences peptidiques issues de molécules contenues dans la matrice extracellulaire peut avoir un effet sur l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules (153,154). De plus, l'utilisation de peptides issus de protéines membranaires pourrait activer certains mécanismes (155).

Objectif 2 : Effet des matériaux et des principes actifs sur la différenciation des EPCs

Dans le second objectif, la différenciation des EPCs en cellules matures en réponse aux matériaux sera étudiée par des méthodes d'immunofluorescence, de qRT-PCR et sera validée par des tests fonctionnels. Ici les matériaux seront comparés à une surface de référence revêtue de collagène. A la fin de cet objectif, nous serons en mesure d'identifier deux principes actifs qui seront utilisés pour les matériaux structurés.

Objectif 3 : Choix des motifs, fabrication des matériaux, caractérisation physico-chimique et culture statique

La dernière partie concernera l'étude des matériaux microstructurés. Pour cet objectif il a fallu mettre en évidence la meilleure géométrie à utiliser pour notre application. La structuration de surface a permis de démontrer dans de précédentes études qu'un environnement structuré permet non seulement de mimer la matrice extracellulaire, mais aussi de diriger les cellules dans une direction et de pouvoir greffer deux principes actifs ayant un impact différent sur les cellules et ce, sur un même matériau. Ces résultats seront comparés aux résultats obtenus avec les surfaces homogènes.

Dans ce contexte, notre stratégie consiste à recréer la monocouche de cellules endothéliales (qui constitue l'intima de l'artère représentée à la Figure 10) sur notre matériau, le PET. L'endothélialisation spontanée reste limitée chez l'homme, seulement 1 à 2 cm de tapis cellulaire recouvre la surface interne du substitut aux abords des sites d'anastomoses. Chez l'animal les résultats sont différents sans que l'on comprenne bien les raisons de cette différence (156). Finalement le but sera de déterminer quel principe actif ou quelle combinaison de peptides montre le meilleur potentiel pour recruter les cellules sur nos matériaux.

2. Choix des principes actifs

Le succès clinique d'une prothèse est fortement tributaire de la qualité de l'adhérence des cellules à la surface du matériau, processus de base influençant directement la croissance, la différenciation et la migration des cellules. Un moyen de rendre une surface synthétique apte à favoriser l'adhésion cellulaire est de fixer sur cette surface des constituants de la matrice extracellulaire. Il est aujourd'hui accepté qu'une monocouche de cellules endothéliales matures en surface d'un matériau puisse fournir une anti-thrombogénicité et interrompre l'activation des cytokines des cellules musculaires lisses (SMCs), ce qui contribue au maintien d'une hémostasie vasculaire. Plusieurs études ont également démontré qu'un manque d'endothélialisation de la prothèse est la raison principale de la formation d'un thrombus obturant cette prothèse. Par conséquent, non seulement une rapide endothélialisation de la prothèse est indispensable, mais aussi une maturation *in situ* des cellules endothéliales (expression des facteurs procoagulants, anticoagulants et fibrinolytiques) doit être possible. Ainsi, l'amélioration de l'attachement, de l'adhésion et de la prolifération des cellules endothéliales est un défi à relever dans le but de réaliser *in situ* une rapide et parfaite endothélialisation des prothèses vasculaires.

Depuis leur découverte en 1997, les EPCs circulantes ont été reconnues comme une source de cellules idéale pour obtenir une ré-endothélialisation grâce leur capacité proliférative beaucoup plus importante que les cellules endothéliales matures (157). La capture des EPCs directement à partir du flux sanguin a été expérimentée en utilisant différents ligands comme des anticorps (anti-CD34) (158) ou des peptides comme la GHMDMSPHAVIDGGGSC (GHM) (159) et le TPSLEQRTVYAK-GGGSC (TPS) (160,161). L'endothélialisation de la surface des prothèses peut être obtenue par l'adhésion et la migration de cellules endothéliales matures environnantes en synergie avec les cellules progénitrices endothéliales circulantes sur la région lésée qui, par ailleurs, se différencieraient en cellules endothéliales matures (48,162). De plus, Kutryk *et al.* ont mis en évidence sous flux que, dès l'adhésion des cellules endothéliales matures ou des EPCs en surface d'un matériau modifié avec des anticorps anti-CD34, les cellules capturées prolifèrent et se différencient en cellules endothéliales matures (139,158). Les résultats obtenus montrent un attachement beaucoup plus important des EPCs en surface de ces matériaux modifiés. Malheureusement, cette affinité d'adhésion des EPCs est considérablement réduite en présence des protéines du plasma compte tenu de leur adsorption non spécifique en surface, masquant ainsi la bioactivité de la surface.

La stratégie qui sera mise au point dans ce projet sera de fonctionnaliser la surface d'un polymère, le PET par une combinaison de principes actifs susceptibles de favoriser l'adhésion et

la prolifération de cellules endothéliales matures. On peut citer par exemple les peptides RGD, YIGSR, REDV ou WQPPRARI (131). Un autre défi sera de favoriser le recrutement, l'adhésion et la différenciation des EPCs par le biais d'anticorps (anti-CD34) ou de peptides (SYQTLKQHLPYG-GGGSC, GHMDMSPHAVID-GGGSC ou TPSLEQRTVYAK-GGGSC), permettant une endothélialisation optimale du matériau. Une autre piste serait de regarder l'influence d'un peptide permettant l'activation du récepteur à la thrombine (PAR-1) impliqué dans toutes les étapes de l'angiogenèse (155,163). Une étude bibliographique nous a permis de choisir quatre biomolécules ayant les propriétés recherchées.

LA SITAGLIPTINE

Un principe actif innovant que nous étudierons est la sitagliptine. Il s'agit d'une molécule pharmaceutique utilisée dans le traitement du diabète de type 2. Son mode d'action est basé sur l'interaction SDF-1 α /CXCR4 (164,165). Cette interaction est considérée comme le mécanisme pivot responsable du recrutement des EPCs à un site spécifique. Tel que mentionné précédemment, ces cellules sont recrutées sur le site d'un dommage vasculaire. Lors d'une lésion, la couche de cellules endothéliales qui est endommagée ainsi que les cellules musculaires lisses environnantes sécrètent la protéine SDF-1 α (aussi appelée CXCL12). Cette dernière va se lier aux récepteurs CXCR4 présents sur la membrane des EPCs, ce qui va faciliter leur recrutement sur le site de la lésion (166). Ces cellules progénitrices vont ensuite pouvoir stimuler la prolifération des cellules matures par libération de facteurs protéiques (167).

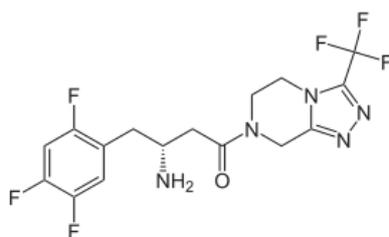


Figure 18 : Structure chimique de la sitagliptine.

L'interaction entre SDF-1 α et CXCR4 est régulée par une enzyme, la dipeptidyl-peptidase-4 (DPP4). Cette enzyme a la capacité d'inactiver la SDF-1 α par le clivage des deux derniers acides aminés de sa structure (N-Term), ce qui l'empêchera de se lier à son récepteur. Elle ne permettra donc pas le recrutement des cellules progénitrices (figure 8A). Pour pallier ce clivage, nous proposons d'utiliser la sitagliptine. Il s'agit d'une molécule pharmaceutique qui pourrait être considérée comme un inhibiteur d'inhibiteur puisqu'elle va empêcher l'action de la peptidase DPP4, empêchant ainsi le clivage de la SDF-1 α et permettant sa liaison sur le récepteur membranaire (Figure 19) (164).

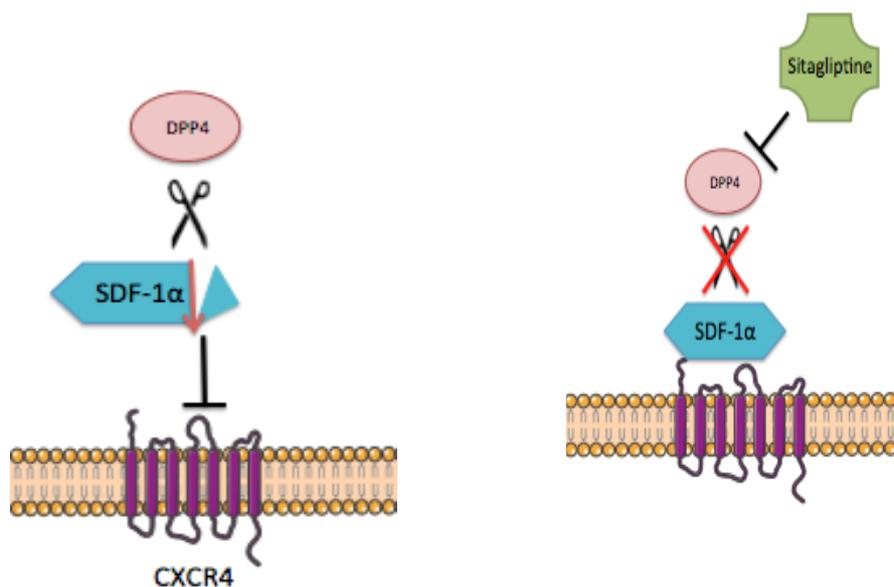


Figure 19 : Mode d'action du DPP4 (à gauche) et inhibition par la sitagliptine (à droite).

In vitro, par cytométrie en flux et Western blot, les auteurs (Brenner *et al.*) ont montré que la sitagliptine permet d'augmenter l'expression de certains biomarqueurs cellulaires caractéristiques des cellules endothéliales et responsables du recrutement des EPCs, soit le CXCR4 et SDF-1 α . Ces travaux concernent uniquement des études *in vivo*. De façon plus précise, des souris ont subi une lésion sur l'endothélium de leur artère carotide afin de recréer une ischémie. Ces souris ont ensuite été traitées avec un placebo, de la sitagliptine et de la sitagliptine + AMD3100 (antagoniste inhibiteur de CXCR4). Après ces différents traitements, les conclusions globales de l'étude prouvent que chez les souris traitées par la sitagliptine uniquement, l'activité de DPP4 et le clivage de la SDF-1 α ont été inhibés. De plus, un tel traitement, après un dommage artériel, permet d'augmenter le recrutement des cellules CXCR4⁺ (qui expriment cette protéine) provenant de la moelle osseuse et des cellules progénitrices circulantes sur le site de la lésion de l'endothélium (164). Cette molécule sera donc utilisée dans le but de recruter les progéniteurs endothéliaux pour leur permettre d'adhérer sur nos surfaces modifiées afin de recréer une monocouche de cellules endothéliales matures.

LE PEPTIDE SFLLRN

Le second principe actif envisagé est un hexapeptide, le SFLLRN, (Figure 20) issu d'un récepteur protéique appelé PAR-1 (155). Ce peptide est situé à l'extrémité N-terminale du récepteur, à la position 41.

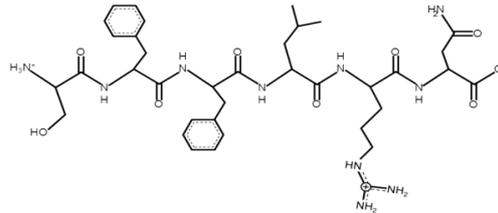


Figure 20 : Formule développée du peptide SFLLRN.

Le récepteur à la thrombine PAR-1 est couplé aux protéines-G intracellulaires responsables de nombreuses cascades de signalisation. Ce récepteur est clivé spécifiquement par la thrombine à l'extrémité $-NH_2$, rendant ainsi les acides aminés terminaux de l'hexapeptide visibles pour la protéine. Ce site va alors se lier sur la protéine et cela va provoquer un changement de conformation de PAR-1 et activer les protéines-G couplées (phosphorylation et transformation du GDP en GTP) (Figure 21). L'activation des protéines-G va ensuite induire la transduction du signal dans la cellule. Le peptide que nous allons utiliser va donc pouvoir agir comme agoniste de PAR-1 et activer la cascade de signalisation cellulaire qui découle de son activation (168).

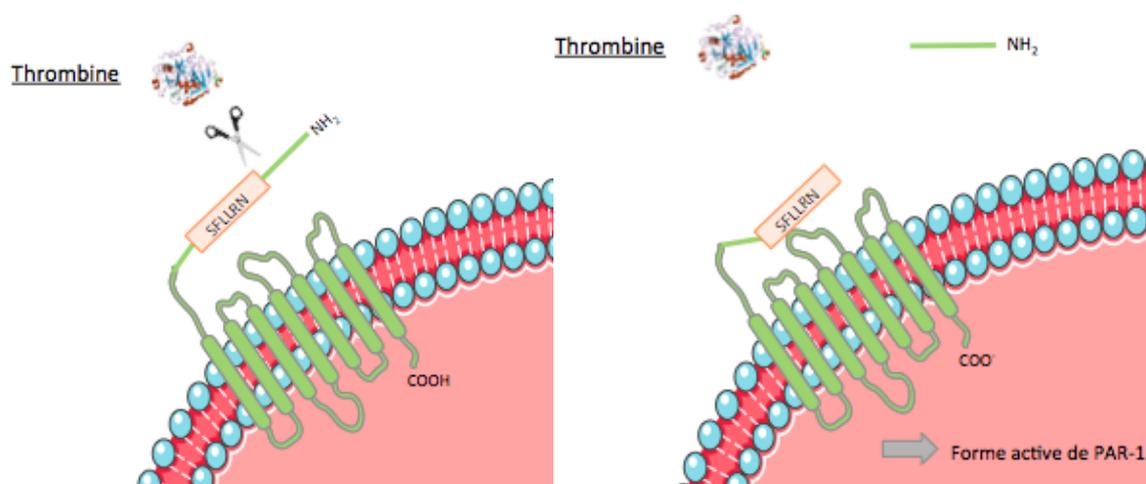


Figure 21 : Schéma d'activation de PAR-1 par le clivage de la séquence en N-terminal, d'après (168).

Les travaux de l'équipe de Smadja et Gaussem montrent des résultats encourageants quant

à l'utilisation de ce peptide sur les cellules endothéliales progénitrices. Leurs études portent sur les effets de l'activation du récepteur PAR-1 sur l'angiogenèse. Dans cette première étude, des EPCs provenant du cordon ombilical et exprimant le CD34 ont été stimulées à l'aide du peptide SFLLRN. La stimulation de ces cellules montre une augmentation de la prolifération. Ces résultats ont été comparés avec des HUVECs, qui montrent une capacité de prolifération moindre par rapport aux cellules progénitrices. Des expériences de RT-qPCR montrent que la stimulation des EPCs par ce peptide permet l'augmentation de l'expression de l'ARN messager de CXCR4 et SDF-1 α . Cette activation de PAR-1 augmente également l'excrétion de la protéine SDF-1 α (déterminée par un test ELISA commercial de dosage de SDF-1 α). Également une stimulation du récepteur à la thrombine par son agoniste permet d'augmenter la formation de structure de type capillaire dans du matrigel (155,163).

LE PEPTIDE RGD

Pour améliorer l'adhésion des cellules sur nos matériaux, nous choisissons d'utiliser le peptide GRGDS (figure 12).

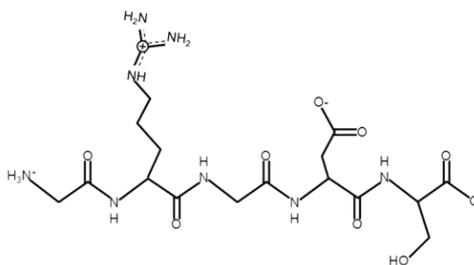


Figure 22 : Formule développée du peptide GRGDS.

Celui-ci est bien connu depuis quelques décennies pour cette application. Il a été découvert en 1984 par Pierschbacher (128). Finalement un peu plus tard, il a été prouvé que la séquence minimale pour avoir une activité améliorant l'adhésion des cellules est le tripeptide RGD (129). Pour favoriser l'adhésion des cellules sur un matériau, il est essentiel que, ces dernières se trouvent dans un environnement aussi proche que possible des conditions *in situ*. Pour s'approcher au maximum de cela, nous utilisons des peptides issus de séquences de protéines de matrices extracellulaires, le peptide RGD en fait partie. Il est présent dans plusieurs protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la vitronectine, la laminine, le collagène, le fibrinogène et l'ostéopontine (169). Il est reconnu par les familles de récepteurs intégriniques qui jouent un rôle essentiel dans l'attachement des cellules, mais aussi au cours de la différenciation cellulaire ou de la réponse immunitaire (figure 13). Ces récepteurs sont formés de deux sous-unités α et β . Il existe de nombreuses sous-unités et couples de sous-unités différents, mais seulement 24 intégrines sont connues à ce jour (170). Dans le cas du peptide RGD, ce sont les sous-unités $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ qui sont concernées par les mécanismes d'adhésion (171).

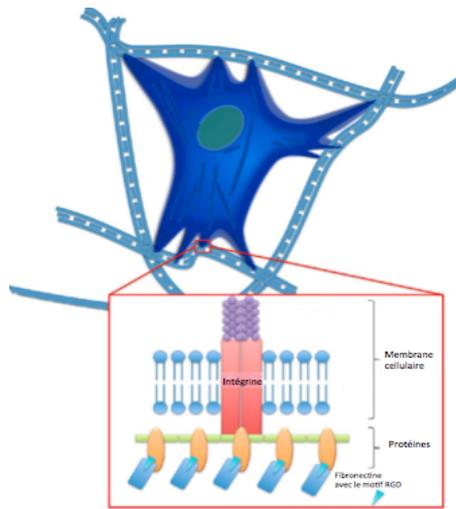


Figure 23 : Interaction en la fibronectine contenant la séquence RGD et des intégrines de la membrane cellulaire, d'après (172).

Dans les travaux de Chollet *et al.* différentes densités de peptides RGD ont pu être greffées en surface d'un matériau commun à ce projet, le PET. Les résultats montrent qu'une densité de RGD de 1 pmol/mm^2 permet une réponse cellulaire des EC sur le PET modifié. Cette densité de peptide a permis la création de plaques d'adhésion focale et l'arrangement des filaments d'actine (138). En effet, l'adhésion des cellules, quel que soit le type, comprend quatre phases : la première phase est l'attachement cellulaire, la seconde phase est l'étalement des cellules, la troisième est l'organisation du cytosquelette (filaments d'actine) et enfin la quatrième et dernière phase correspond à la formation des contacts focaux (153).

LE PEPTIDE GHM

Le dernier principe actif que nous avons choisi d'utiliser est un peptide composé de 23 acides aminés, c'est le GHMDMSPHAVID-GGGSC (Figure 24) (159).

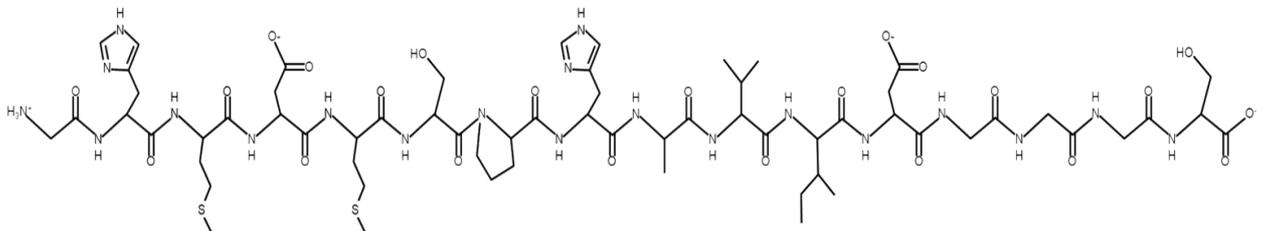


Figure 24 : Formule développée du peptide GHM.

Il a été identifié par criblage en même temps que deux autres acides aminés, (SYQTLKQHLPYGGGGSC ou SYQ) et TPSLEQRTVYAK-GGGSC ou TPS) (161). Le GHM montre des propriétés intéressantes en termes d'adhésion, notamment avec les cellules HBOECs (Cellules endothéliales humaines dérivées du sang périphérique). L'hypothèse est que ce peptide

aura la même action sur les cellules progénitrices issues du sang de cordon, soit celles utilisées dans le cadre de ce projet. Les résultats de Xin Wang en 2012 montrent également qu'un film de polymère modifié avec cette séquence peptidique permet des filaments d'actines plus étendus et de ce fait, un plus grand nombre d'adhésions focales. Les informations obtenues avec les HBOECs ont été comparées avec des résultats avec les HUVECs. Pour ces dernières, le GHM n'est pas le meilleur choix puisque ces cellules ont été beaucoup plus nombreuses à adhérer sur une surface modifiée avec du RGD qu'avec du GHM. Le mécanisme par lequel ce peptide interagit avec les protéines de surfaces est encore inconnu. Les seules informations que nous avons pu trouver montrent que ce peptide active les récepteurs intégriniques, mais les sous-unités n'ont pas été identifiées (159).

3. La micro-structuration

Les propriétés de surface des matériaux (rugosité, porosité, composition chimique, hydrophilicité, etc.) jouent un rôle essentiel dans la réponse cellulaire. Pour modifier ces propriétés, il existe différentes techniques nous permettant de fabriquer des matériaux avec des surfaces homogènes ou présentant des motifs de tailles différentes, allant du nanomètre au micromètre. Ces motifs peuvent être utilisés afin de contrôler les interactions entre les cellules et le matériau. L'idée de micro-structurer / organiser la surface des matériaux prend origine dans les travaux de G. Whitesides et D. Ingberg dans les années 1990 (173). Ce groupe de recherche a démontré qu'il était possible de contrôler le devenir des cellules en termes de prolifération et du déclenchement des mécanismes d'apoptose en contrôlant la dimension d'îlots recouverts de fibronectine et l'espace entre ces îlots. Il a été clairement mis en évidence le fait que la majorité des processus de signalisation cellulaire s'effectue par le recrutement et la séquestration de récepteurs transmembranaires (174). Aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, cette séquestration est observée via une fibrillogénèse des protéines de la matrice extracellulaire. En culture, les cellules endothéliales réorganisent la fibronectine en fibrilles de 10 μm (175) de longueur avec une distance moyenne entre ces fibrilles de 71 μm (176). Pour des cellules souches mésenchymateuses en culture, la micro-structuration d'îlots de fibronectine en forme de cercles conduit à une différenciation en adipocytes alors que des formes rectangulaires ou carrées mènent à la formation d'ostéoblastes (177). De la même manière, il est possible de contrôler le devenir des cellules souches mésenchymateuses en fonction du substrat sur lequel elles sont cultivées. Ces travaux montrent que la forme adoptée par les cellules a une très forte influence sur leur différenciation (Figure 25). Quand les cellules adoptent une forme rectangulaire les cellules se différencient majoritairement en ostéoblastes alors que les cellules avec une forme plus arrondie deviennent majoritairement des adipocytes (178).

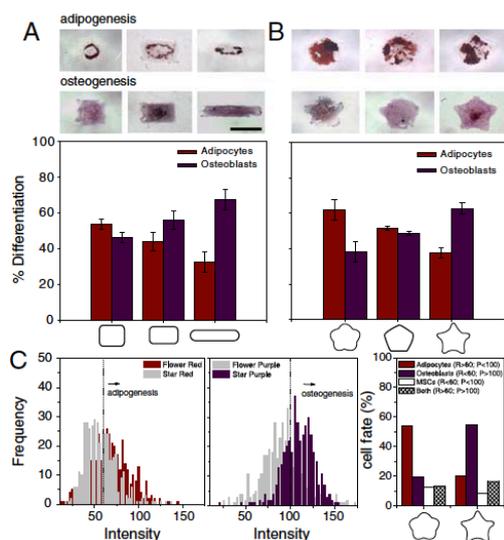


Figure 25 : Différenciation des cellules souches mésenchymateuses en fonction de la forme du motif (178).

Ces observations portent donc à croire que la micro-structuration de principes actifs sur la surface de biomatériaux pourrait permettre de contrôler le devenir des cellules quant à leur potentiel d'adhésion, de prolifération et de différenciation. Il a été démontré que des cellules endothéliales alignées (figure 15) préviennent l'inflammation vasculaire contrairement à des cellules non organisées, qui peuvent exprimer des marqueurs pro-inflammatoires (179).

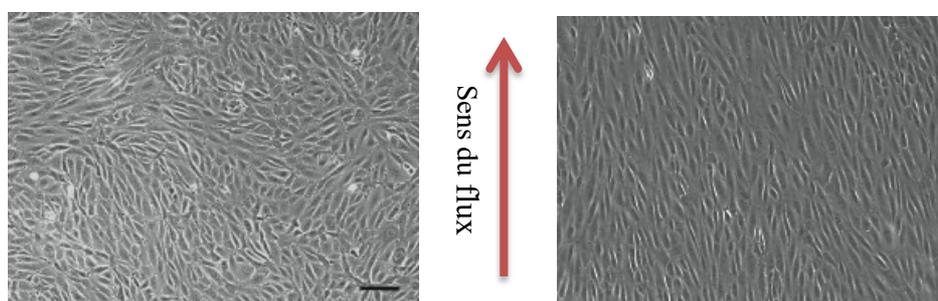


Figure 26 : Image de contraste de phase de cellules endothéliales en culture statique et en culture dynamique 15dyn/cm² (Barre d'échelle 100µm) (180).

Dans ce projet, nous avons fait le choix d'induire l'alignement des cellules grâce à une microstructuration en deux dimensions et ainsi évaluer l'impact de telles structures sur la différenciation des cellules progénitrices endothéliales.

4. Les techniques de microstructuration

4.1 LA PHOTOLITHOGRAPHIE

Pour obtenir des « motifs de biomolécules », nous allons micro-structurer nos surfaces. Pour cela, nous utiliserons la photolithographie (Figure 16). La première étape est le dépôt d'une résine positive de façon uniforme sur la surface du matériau. Ensuite, nous appliquons un masque avec le motif désiré sur cette surface. La surface et le masque sont ensuite exposés aux UV. La résine qui a été exposée aux UV pourra être enlevée à l'aide d'une solution de révélation. La résine qui n'a pas été exposée aux UV reste intacte, laissant apparaître un micro-motif. Un premier principe actif pourra alors être greffé sur la partie libre (sans résine). Enfin, la résine restante pourra être enlevée à l'acétone et le second principe actif pourra être greffé.

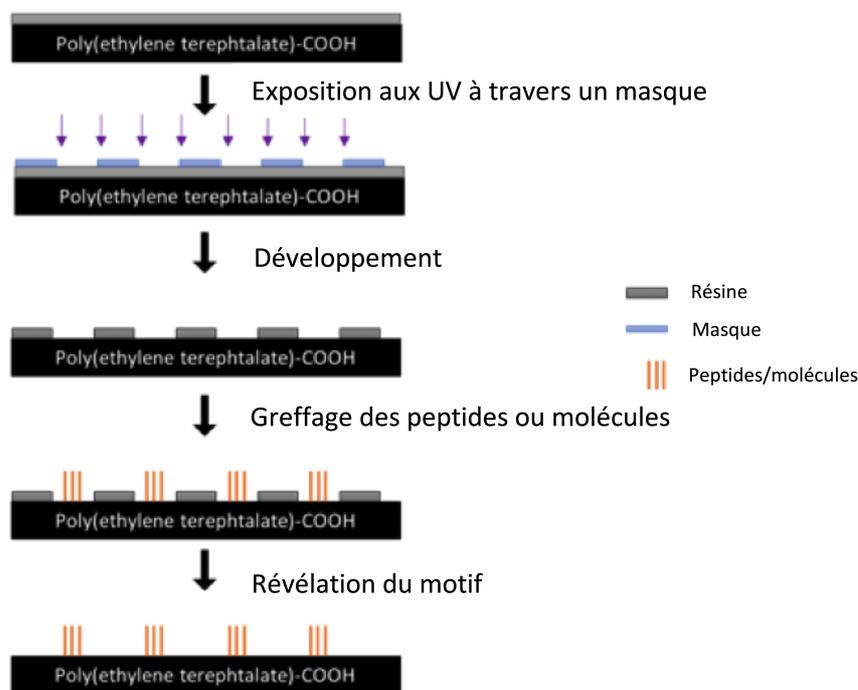


Figure 27 : Schéma de la photolithographie sur les films de PET.

Ici, nous avons choisi d'utiliser cette technique de micro-structuration, car elle nous permet un bon contrôle sur les motifs obtenus et de greffer deux principes actifs différents sur notre polymère. Pour ce projet, une étude bibliographique a été nécessaire pour déterminer la forme et la taille des motifs que nous allons utiliser. Étant donné que le but final de ce projet est de recréer une couche de cellules endothéliales à la surface de nos matériaux pour des applications vasculaires, il nous est apparu préférable de sélectionner des motifs alignés ou linéaires pour que les cellules s'alignent à leur tour. L'autre paramètre à prendre en compte est le ratio des deux molécules que nous allons greffer. En effet, la géométrie des motifs peu impacter sur ce ratio.

Parmi les paramètres qui peuvent définir nos motifs, il y a la forme (la hauteur, la largeur et l'espace) et la taille de ces motifs. Nous avons choisi d'utiliser en premier lieu des lignes déjà étudiées précédemment dans la littérature puisque celles-ci vont permettre l'alignement des cellules endothéliales. Comme second motif, nous utiliserons des lignes entrecoupées, d'une part pour voir si cela influence le comportement des cellules et d'autre part pour avoir un ratio de principes actifs différent (181).

Il a été démontré que $9,2 \mu\text{m}$ est la largeur minimale sur laquelle des cellules endothéliales artérielles peuvent s'aligner. En effet, ceci correspond à la largeur moyenne du noyau d'une cellule (ref). Sur cette ligne, il devrait n'y avoir qu'une seule cellule en largeur. De plus, cette taille de motif va induire une élongation des cellules (182). Une autre équipe a démontré que le comportement migratoire et l'orientation des cellules endothéliales sont mieux régulés sur des motifs de petites tailles (moins de $60 \mu\text{m}$ de large) (183). Un des objectifs de notre travail est de bi-fonctionnaliser nos surfaces avec deux principes actifs différents susceptibles d'impacter différemment sur les cellules endothéliales progénitrices (à préciser : adhésion et diff). Nous avons donc fixé deux largeurs différentes pour nos motifs, à savoir $10 \mu\text{m}$ et $50 \mu\text{m}$ (Figure 28) afin d'évaluer l'impact de cette largeur sur le comportement cellulaire. L'espace entre les différents motifs a été déterminé selon les mêmes indications, les lignes sont espacées de $50 \mu\text{m}$. La micro-structuration va nous permettre de réguler l'alignement, l'élongation, l'étalement, mais aussi la différenciation des cellules. Ces matériaux structurés seront comparés aux matériaux homogènes, puis le meilleur candidat sera ensuite évalué en culture sous flux.

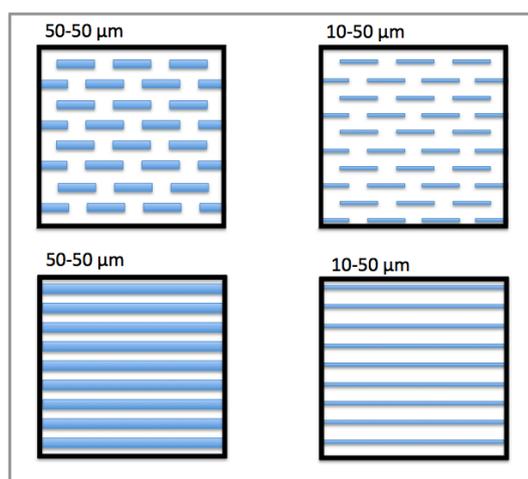


Figure 28 : Motifs choisis pour la micro-structuration de surfaces.

Ces matériaux seront caractérisés par plusieurs techniques d'analyse de surface. La profilométrie va nous permettre de valider le procédé de photolithographie pour avoir une épaisseur

de résine constante en fonction des paramètres de dépôt, de plus cela va nous permettre aussi de mesurer la taille et la géométrie des motifs pour s'assurer que ceux-ci ont été développés correctement (ici on aura les motifs en 3D). Ensuite, la microscopie à fluorescence nous permettra d'obtenir des images des motifs en 2D avec les peptides fluorescents greffés de façon structurés. Leur effet sur les cellules sera étudié à l'aide de plusieurs techniques (microscopie à fluorescence, RT-qPCR et cytométrie en flux). Nous chercherons à savoir quel couple de principes actifs donne les meilleurs résultats en termes d'adhésion, de recrutement et de différenciation, dans le cas des progéniteurs endothéliaux. Nous continuerons ainsi les expériences avec les matériaux microstructurés avec le meilleur couple de principes actifs, à savoir une molécule favorisant l'adhésion et une molécule favorisant la différenciation.

4.2 LA SOFT-LITHOGRAPHIE PAR MICROCONTACT

Dans le cas de la soft-lithographie, un élastomère, le polydiméthylsiloxane (PDMS), est utilisé pour former un moule ou un tampon. Ce moule ou tampon sera ensuite utilisé pour reproduire le motif micrométrique ou nanométrique à l'aide d'une résine déposée à la surface d'un matériau (voir la Figure 29). Cette technique permet de contourner les limitations de la photolithographie concernant la taille et la résolution des motifs (184). Mis au point à l'origine pour créer des motifs pour une application microélectronique, l'impression par microcontact a rapidement été adaptée pour produire des substrats pour la structuration de matériaux pour la culture cellulaire. L'impression par microcontact est basée sur le transfert du matériau d'intérêt avec un tampon PDMS. Après la fabrication des tampons, celui-ci est immergé dans une solution et est mis en contact avec le substrat. En retirant le tampon de la surface, un motif est laissé sur la surface. La dernière étape consiste généralement à compléter les zones qui n'ont pas été tamponnées avec une seconde molécule. L'impression par microcontact est une méthode polyvalente de micropatterning, car divers substrats et molécules sont compatibles avec cette technique (185). Comme la photolithographie, cette technique permet le greffage de molécules sur des matériaux pour améliorer l'adhésion, contrôler le devenir des cellules ou encore pour améliorer les interactions entre les cellules et un substrat.

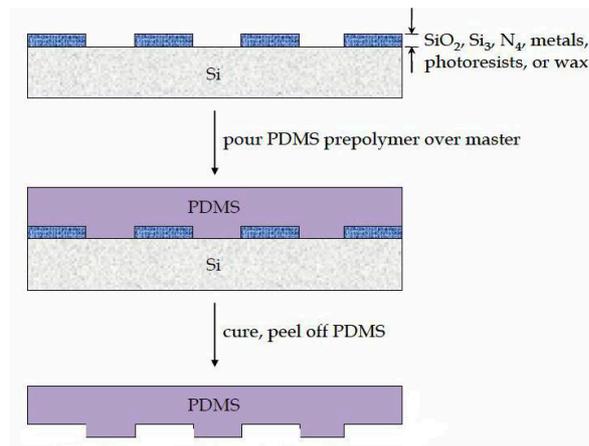


Figure 29 : Illustration de la procédure de soft lithographie pour des tampons de PDMS (186).

La technique de soft lithographie a été utilisée par Seob Choi *et al.* pour générer des micro-canaux circulaires qui vont permettre la création de structures 3D (187,188). Ces structures 3D sont recouvertes de cellules musculaires lisses issues de vaisseaux sanguins et peuvent donc servir de modèle d'étude pour la biologie des fonctions vasculaires (188). Dans le cas des applications vasculaires, la technique de soft lithographie est surtout utilisée pour produire des systèmes de microfluidique pour générer des réseaux de microvaisseaux, capillaires sanguins ou de vaisseaux de plus gros diamètres afin de modéliser les processus de transport ou l'organisation complexe de ces structures *in vivo* (187). Une longue liste de différentes protéines et peptides a été imprimée avec succès. Cette technique est souvent associée à la fabrication de chambres de microfluidique, ici Ye *et al.* ont pu réaliser des chambres de culture par microcontact pour améliorer les procédés la culture de cellule unique (189).

4.3 FUSION PAR FAISCEAU D'ÉLECTRONS

Cette technique utilise un faisceau d'électrons qui vient frapper une matière première en poudre pour la souder. La pièce est donc produite couche après couche de la même façon qu'avec une imprimante 3D. Le faisceau d'électrons est capable de générer assez de chaleur pour provoquer la fonte de la poudre et souder la zone ciblée. Ainsi, la poudre restante non soudée est réutilisable pour une autre impression. Un avantage significatif de la fusion par faisceaux d'électrons sur la photolithographie est sa résolution, qui dépend de la diffusion des électrons sur la résine et le substrat et peut atteindre 3-5 nm, permettant d'atteindre des nanostructures en 3 dimensions. Les inconvénients de cette méthode de structuration sont un coût élevé, un procédé de mise en forme fastidieux et la difficulté de produire de grandes surfaces pour la microstructuration.

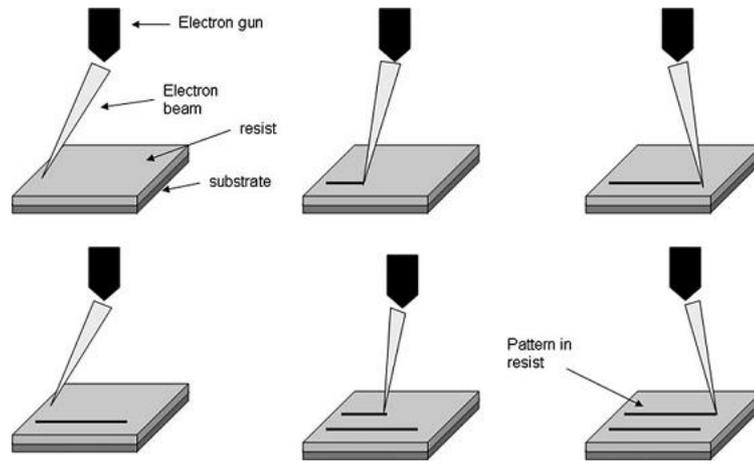


Figure 30: Représentation schématique de la fusion par faisceau d'électrons (190).

La fusion par faisceau d'électrons peut aussi être utilisée pour le traitement de surfaces, notamment dans le cas des applications en régénération osseuse. Murr *et al.*, ont utilisé cette méthode pour créer des mousses à base d'alliage de titane Ti6-Al-4V et Co-29Cr-6Mo pour des applications en chirurgie orthopédique (191).

4.6 LA NANOIMPRESSION

La lithographie par nanoimpression (NIL pour nanoimprint lithography) a été développée pour la première fois par Stephen Y. Chou en 1996 en tant que technique à haut débit de fabrication de motifs de surface avec des tailles allant jusqu'à 25 nm. En bref, une résine, de préférence un thermoplastique, est d'abord déposée sur la surface du substrat. Un moule solide avec des motifs nanométriques prédéfinis est ensuite pressé sur la résine alors que le système est chauffé au-dessus de la température de transition vitreuse du polymère. Dans cet état, le polymère se comporte comme un liquide et peut donc se conformer à la forme du moule. Une fois le moule retiré après le processus d'impression, une étape de gravure ionique réactive est effectuée pour retirer la résine restante sur les zones avec motifs, et ainsi exposer le substrat sous-jacent pour terminer le processus de transfert de motif. C'est une technique polyvalente moins onéreuse que la fusion par électrons (192).

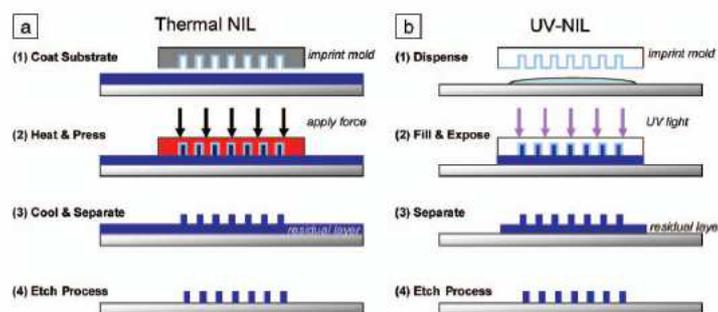


Figure 31: Les deux procédés de la NIL. La nanoimpression thermique (a) et par UV (b) (193).

Engel *et al.* ont utilisé la NIL comme méthode de modification physique du polyméthacrylate de méthyle qui ont été utilisés pour étudier la morphologie, la prolifération et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (194).

Franco *et al.* ont créé des réseaux de largeurs et de profondeurs variables sur des feuilles de copolymères d'oléfiniques cycliques en utilisant la NIL pour évaluer l'étalement des cellules endothéliales et la signalisation des intégrines (195). Ces études montrent le potentiel de la nanoimpression pour des applications étendues à l'ingénierie tissulaire.

En conclusion générale, les sections ci-dessus ont trait aux progrès technologiques dans la régulation de l'environnement des cellules par le micropatterning. Les méthodes de micropatterning décrites ci-dessus ont révélé d'importantes informations sur l'impact de la géométrie du microenvironnement sur la physiologie cellulaire, de l'organisation intracellulaire à la morphogenèse de multiple type cellulaire. Les surfaces micropatternées 2D bien définies peuvent fournir des outils utiles pour contrôler l'interface cellule-matériau, réguler l'alignement, la différenciation ou encore la migration ; alors que les techniques de microfabrication 3D sont plus complexes mais peuvent construire un environnement cellulaire physiologique 3D, et offrent de nouvelles opportunités pour construire des microstructures vascularisées. Ces techniques améliorent notre capacité à contrôler l'environnement cellulaire et nous aideraient à mieux comprendre la biologie cellulaire fondamentale. Dans ce projet, nous souhaitons développer un matériau bi-fonctionnel en deux dimensions, avec des structures de tailles micrométrique et bien résolues. La photolithographie semble être le meilleur choix pour parvenir à modifier un grand nombre de surfaces en peu de temps mais aussi pouvoir modifier des matériaux de grande taille pouvant correspondre à la taille des prothèses vasculaires.

CHAPITRE 2 : Caractérisation des ECFCs

Avant de commencer la caractérisation biologique des cellules cultivées sur les matériaux bioactifs il est indispensable de s'assurer de leur identité. Comme décrit dans la section revue de littérature (Chapitre 1), les cellules mononucléées issues du sang de cordon sont les précurseurs des cellules souches hématopoïétiques et des cellules endothéliales progénitrices. Pour obtenir des ECFCs (de la famille des EPCs) les cellules mononucléées doivent être cultivées sur une flasque ou un puits revêtu de collagène de type-I (collagène de rat). Par ailleurs, un milieu de culture avec des facteurs de croissances endothéliaux doit être utilisé. Toutefois ce protocole (voir en annexe) ne garantit pas la pureté des cellules obtenues. En effet, des fibroblastes ou des cellules souche mésenchymateuses peuvent aussi apparaître. Les ECFCs sont issues de la fraction CD34+ des cellules mononucléées. Après l'extraction des cellules mononucléées, celles-ci sont triées de façon magnétique pour ne garder que les cellules CD34 positives. La pureté de ces cellules est étudiée par cytométrie en flux. Ces cellules sont incubées avec un anticorps fluorescent anti-CD34 et la cytométrie est capable de discriminer les cellules sur lesquelles cet anticorps a réagi avec la protéine CD34 de surface. Le tri magnétique des cellules permet d'obtenir une population pure à plus de 92 % (voir la Figure 32).

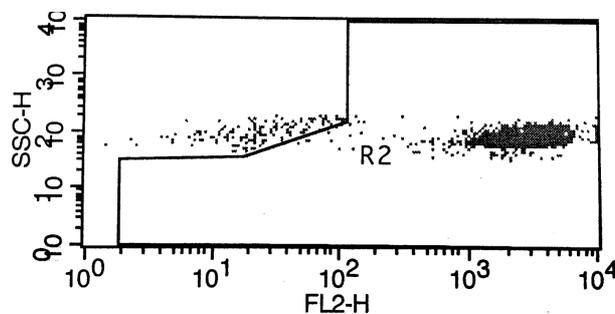


Figure 32 : Population CD34+ des cellules mononucléées. La population positive est identifiée dans la section R2 de la figure. La population identifiée sur le gauche de la figure correspond aux débris cellulaires et aux érythrocytes résiduels.

Ces cellules une fois triées sontensemencées sur une plaque 6 puits revêtu de collagène. L'apparition des colonies d'ECFC est surveillée à chaque changement de milieu. La densité minimale d'ensemencement est d'un minimum de 800 000 cellules dans un puits de 6 puits (pour 10cm²). Les prélèvements qui ne permettaient pas d'obtenir ce nombre de cellules mononucléées CD34 positives ont été éliminés de l'étude. Pour pouvoir être en mesure d'ensemencer les matériaux et les contrôles en triplicatas, l'expérience nous a prouvé qu'un nombre d'au moins 800 000 cellules mononucléées CD34 positives était requis pour pouvoir obtenir suffisamment

d'ECFCs pour effectuer les tests *in vitro* sur les surfaces bioactives. Typiquement, les EPCs tardives ou ECFCs apparaissent entre 11 et 20 jours après l'ensemencement. Ces cellules ont une morphologie et des caractéristiques fonctionnelles particulières.

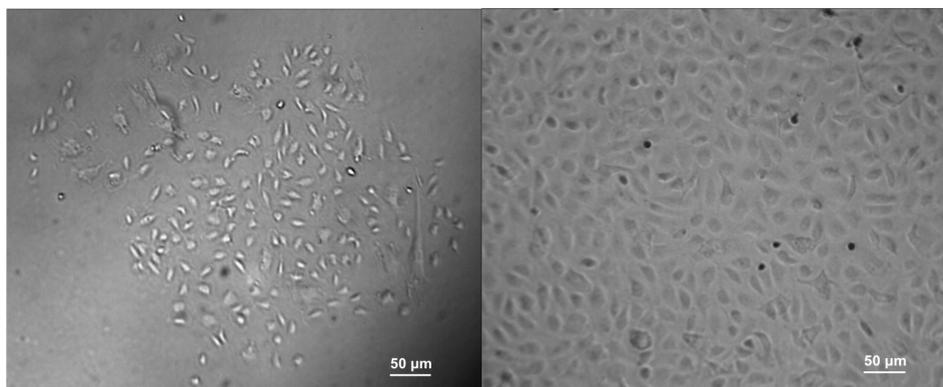


Figure 33 : Images de microscopie optique du début d'une colonie d'ECFC issue du sang de cordon ombilical (à gauche) après 12 jours de culture sur collagène et des ECFC à confluence à 19 jours de culture sur collagène (à droite).

Sur la Figure 33, il est possible d'observer une colonie d'ECFCs, le temps de doublement de ce type de cellules est d'environ 1,6 jours. Il est impossible de déterminer quelle cellule va être capable de former une colonie. Les cellules sont cultivées jusqu'à 17 jours après le premier ensemencement, elles sont ensuite repiquées à une densité d'environ 8 000 cellules/cm². Les prélèvements qui n'ont pas permis l'obtention de colonies après 17 jours sont écartés du projet de façon systématique puisqu'ils ne permettront pas de récolter suffisamment de cellules à ensemercer sur les surfaces modifiées. Une fois arrivée à confluence, la prolifération des cellules est fortement ralentie. Un autre aspect important pour s'assurer de l'identité des cellules est leur capacité à former des structures appelées « tube-like ». En effet, ces cellules EPCs sont les cellules responsables de la vasculogénèse. Il s'agit de la formation de structure vasculaire. Pour démontrer le potentiel des ECFCs obtenues à partir des cellules CD34+, celles-ci ont été mises en culture dans une matrice de Matrigel et du milieu de culture EGM2-MV. Au bout de 4 heures ces cellules commençaient déjà à former des structures tubulaires et après 8 heures de culture, elles forment un réseau de petits tubes. Les cellules mononucléées CD34+, quant à elles, ne sont pas capables de former ce type de structures (voir la Figure 34).

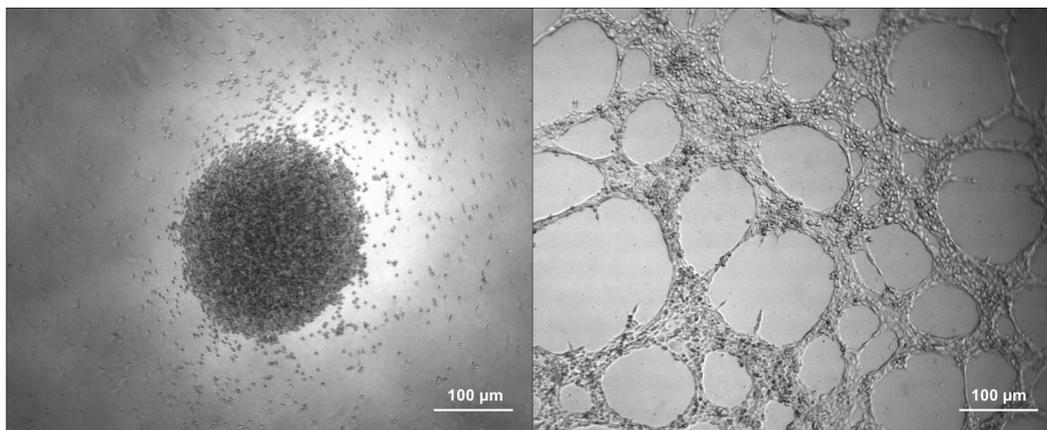


Figure 34 : Images de microscopie optique des cellules mononucléées CD34+ (à gauche) et des ECFCs (à droite).

Après avoir caractérisé ces cellules, celles-ci ont été mises en culture sur les matériaux bioactifs. Pour évaluer l'impact des matériaux sur la différenciation des cellules nous avons choisi d'évaluer l'expression génique ainsi que l'expression protéique de quatre marqueurs à savoir CD133, CD34, KDR et vWV. Pour évaluer l'expression génique nous avons choisi ici d'utiliser la RT-qPCR. C'est une technique qui permet de faire une réaction en chaîne par polymérase (PCR) à partir d'un extrait d'ARN. L'ARN extrait des cellules est dans un premier rétro-transcrit grâce à une enzyme appelée la transcriptase inverse, ce qui permet ensuite la synthèse d'UN ADN complémentaire (ADNc) qui sera utilisé pour la PCR quantitative. Dans la littérature les résultats sont exprimés en Ct (threshold cycle) mais les bonnes pratiques de PCR recommandent l'utilisation de Cq pour cycle de quantification (196–198). Le Ct ou Cq correspond au nombre de cycle nécessaire pour arriver à un point pour lequel le signal de fluorescence est significativement supérieur au bruit de fond. Autrement dit, un nombre de Ct ou Cq élevé correspond à une quantité faible de matériel génétique de départ, puisqu'il aura fallu un nombre important de cycle pour détecter une fluorescence.

Les expressions géniques de marqueurs souches (CD34 et CD133) et de la lignée endothéliale (KDR et vWF) ont été utilisées pour comparer les cellules mononucléées CD34+, les ECFCs à passage 1, les ECFCs à passage 5 et les cellules endothéliales de veines saphènes.

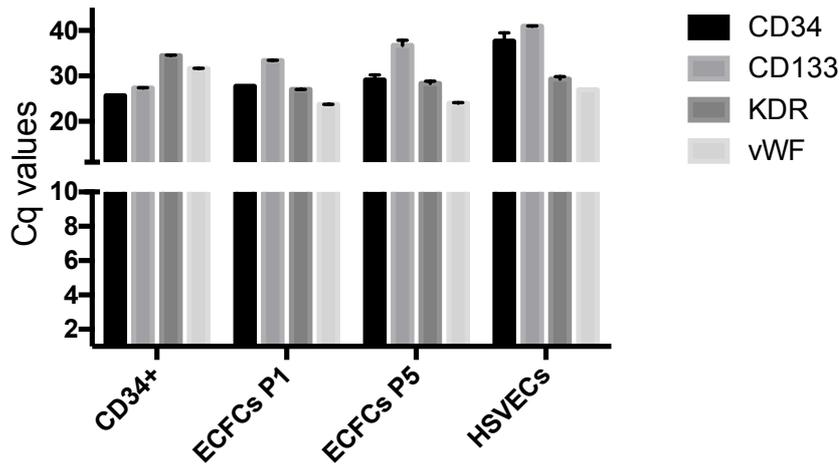


Figure 35 : Expressions géniques des marqueurs souches et endothéliaux par RT-qPCR, comparaison des valeurs de cycle de quantification (Cq) aussi appelés Ct, résultats obtenus pour 3 réplicas biologiques.

Sur la Figure 35, les cellules CD34+ expriment naturellement plus le CD34 que les autres types cellulaires. Il en va de même pour le CD133. Dans le cas des ECFCs (P1 et P5) et des cellules de veines saphènes, les valeurs de Cq (cycle de quantification) sont supérieures à 35, ce qui signifie que le gène est très peu exprimé, car le nombre de cycle (Cq) nécessaire pour obtenir une fluorescence détectable émise par l'ADN amplifié est important, la quantité de transcrits (cDNA) de départ est donc faible. Les ECFCs à passage 1 expriment plus le CD34 que les ECFCs à passage 5 et les HSVECs. Dans le cas du KDR, ce sont les cellules ECFCs à passage 1 et les ECFCs à passage 5 qui l'expriment le plus. Nous pouvons conclure de façon identique concernant le marqueur vWF. Les cellules de veines saphènes n'expriment que très peu les marqueurs de cellules souches, mais elles expriment les marqueurs de la lignée endothéliale.

Pour étudier l'expression génique, la RT-qPCR est la méthode de choix pour obtenir des résultats quantitatifs et l'immunofluorescence permet de détecter la présence ou l'absence de protéines par marquages avec des anticorps.

Chapitre 3 : Validation des gènes de références pour la RT-qPCR des cellules mononucléées du sang de cordon, les cellules endothéliales en état de différenciation et les cellules endothéliales matures

Validation of Reference Genes for Real-Time PCR of Cord Blood Mononuclear Cells, Differentiating Endothelial Progenitor Cells, and Mature Endothelial Cells

Caroline Royer¹⁻²⁻³⁻⁴⁻⁵, Andrée-Anne Guay Bégin⁴, Laurent Plawinski¹⁻²⁻³, Lucie Levesque⁴, Marie-Christine Durrieu¹⁻²⁻³ and Gaétan Laroche⁴⁻⁵

¹Univ. Bordeaux, Chimie et Biologie des Membranes et Nano-Objets (UMR5248 CBMN), Pessac (France)

²CNRS, CBMN UMR5248, Pessac (France)

³Bordeaux INP, CBMN UMR5248, Pessac (France)

⁴Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Centre de recherche du CHU de Québec - Université Laval, Hôpital Saint-François d'Assise, Québec (Canada)

⁵Département de Génie des Mines, de la Métallurgie et des Matériaux, Centre de Recherche sur les Matériaux Avancés, Université Laval, Québec (Canada)

Corresponding author: Gaetan.Laroche@gmn.ulaval.ca

Keywords: Vascular application, endothelial progenitor cells, RT-qPCR, reference genes

Publiée dans Experimental Cell Research

Juillet 2018

C. Royer, A.-A.G. Bégin, L. Plawinski, L. Lévesque, M.-C. Durrieu, G. Laroche, Validation of reference genes for real-time PCR of cord blood mononuclear cells, differentiating endothelial progenitor cells, and mature endothelial cells, *Exp. Cell Res.* (2018). [doi:10.1016/j.yexcr.2018.07.001](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.07.001).

Résumé

Au cours des dix dernières années, les cellules progénitrices endothéliales (EPC) ont suscité un intérêt en tant que population cellulaire attractive en médecine régénérative pour des applications vasculaires. Cette population cellulaire est définie comme le précurseur des cellules matures endothéliales (CE). À notre connaissance, aucun marqueur unique ne peut être utilisé pour les distinguer des CE matures. Pour étudier efficacement leur cinétique de différenciation, l'expression des gènes doit être évaluée. La PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) est largement utilisée pour analyser l'expression des gènes. Pour minimiser l'impact de la variabilité des résultats obtenus avec la RT-qPCR, une sélection rigoureuse des gènes de référence doit être effectuée avant toute expérience en fonction des différentes conditions expérimentales. Dans cette étude, les cellules mononucléées CD34 + ont été extraites du sang de cordon humain et différenciées en EPC après ensemencement pendant une période maximale de 21 jours. Pour choisir les meilleures combinaisons de gènes de référence à utiliser, nous avons comparé les résultats des EPC, des cellules mononucléées CD34 + et des cellules endothéliales matures pour garantir que la cinétique de différenciation n'affecte pas l'expression des gènes de référence sélectionnés. Les niveaux d'expression de sept gènes, à savoir YWHAZ, GAPDH, HPRT1, RPLP0, UBC, B2M et TBP ont été comparés. Les algorithmes geNorm, NormFinder, BestKeeper et la méthode comparative ΔCt ont été utilisés pour évaluer l'expression de chaque candidat. Les résultats globaux révèlent que la stabilité de l'expression des gènes de référence peut varier en fonction du programme statistique utilisé. YWHAZ, GAPDH et UBC composent finalement l'ensemble optimal de gènes de référence pour les études d'expression génique réalisées par RT-qPCR dans nos conditions expérimentales. Ce travail peut donc servir de point de départ à la sélection de gènes de référence candidats pour normaliser les niveaux d'expression génique dans les populations de cellules progénitrices endothéliales.

Abstract

In the last ten years, endothelial progenitor cells (EPCs) have gained interest as an attractive cell population in regenerative medicine for vascular applications. This population is defined as the precursor of endothelial mature cells (ECs) through a process of differentiation. To our knowledge, no single marker can be used to discriminate them from mature ECs. To effectively study their differentiation kinetics, gene expression must be assessed. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) is widely used to analyze gene expression. To minimize the impact of variances from RT-qPCR, a rigorous selection of reference genes must be performed prior to any experiments due to variations in experimental conditions. In this study, CD34⁺ mononuclear cells were extracted from human cord blood and differentiated into EPCs after seeding for a maximum period of 21 days. To choose the best combinations of reference genes, we compared the results of EPCs, CD34⁺ mononuclear cells, and mature endothelial cells to ensure that the differentiation kinetics did not affect the expression of our selected reference genes. The expression levels of seven genes, namely, YWHAZ, GAPDH, HPRT1, RPLP0, UBC, B2M, and TBP were thus compared. The algorithms geNorm, NormFinder, BestKeeper, and the Comparative Δ Ct method were employed to assess the expression of each candidate gene. Overall results reveal that the expression stability of reference genes may differ depending on the statistical program used. YWHAZ, GAPDH, and UBC composed the optimal set of reference genes for the gene expression studies performed by RT-qPCR in our experimental conditions. This work can thus serve as a starting point for the selection of candidate reference genes to normalize the levels of gene expression in endothelial progenitor cell populations.

1. INTRODUCTION

Within the last decade, endothelial progenitor cells (EPCs) have become a promising source of primary cells for vascular tissue engineering (199). These cells can be isolated from peripheral blood, cord blood, bone marrow, or fetal liver (200). In adults, EPCs are responsible for postnatal vasculogenesis phenomena and vessel repairs (75). Initially, the differentiation of mesodermal cells to angioblasts then to endothelial cells (ECs) was thought to be restricted during embryonic development (201). It is only in 1997 that Asahara and colleagues contradicted this concept by isolating a new type of primitive circulating cell in peripheral blood, referred to in this state as endothelial progenitor cells (EPCs). This specific cell type is responsible for the processes of vasculogenesis in embryos (75,202). Postnatal neovascularization, also called angiogenesis, is known as the mechanism by which endothelial mature cells can sprout from a pre-existing structure (44,45), while vasculogenesis describes a new vessel formed with no existing structure, due to a primitive and circulating cell type (70). In the embryo, vasculogenesis occurs to form to the heart, the first primitive plexus and its network (203), while angiogenesis refers to the remodeling and expansion of this network (204). In adult bone marrow and peripheral blood, the discovery of circulating endothelial progenitors implied that the vasculogenesis process could occur either to repair vessel damage or to regenerate endothelium following injury or synthetic vessel grafting. Before the discovery of EPCs, the re-endothelialization process was thought to occur only in the anastomosis area of the graft from the ingrowth of pre-existing vessels. Shi *et al.* (205) observed isolated endothelial cells lining the lumen of a grafted prosthesis but at the center of the graft, away from the anastomosis. This event has been referred to as “fallout endothelialization” and is described as a distinct re-endothelialization process of a vascular prosthesis. However, the complete endothelialization of a graft in humans has never been reported, even after decades of implantation.–The emergence of endothelial progenitor cells (EPCs) may provide a promising approach to solve this problem (206). This type of progenitor arises from a heterogeneous population of stem cells called hemangioblasts, which can lead to the differentiation of hematopoietic stem cells (HSCs) or endothelial cells, depending on the environment. *In vitro*, the common precursors between hematopoietic stem cells or endothelial cells are mononuclear cells extracted from peripheral blood or cord blood. Depending on the cell culture media, mononuclear cells can proceed toward one or the other type of cells. Following their initial step toward endothelial lineage, EPCs appear to differentiate rapidly, and their phenotype and morphology can be difficult to distinguish from those of endothelial mature cells. Nowadays, no single marker

exists to discriminate EPCs from endothelial mature cells, yet with several markers and functional testing, they can be distinguished from mature cells. In the early stage of differentiation, EPCs and hematopoietic stem cells (HSCs) share some antigenic determinants, such as CD34, CD133, Tie-2, c-Kit, Sca-1, and CD45 (75,207). When differentiating to mature endothelial cells, they lose stem cell markers while gaining the expression of endothelial markers, including CD31, KDR (VEGFR-2), and vWF. They are also positive for ac-LDL and have the potential to produce nitric oxide (208). It was then discovered that EPCs define two subsets of cell types, namely, early and late EPCs (63). Early EPCs appear before 10 days and display a spindle-shaped morphology, with a low rate of proliferation and an inability to form new vessels. Early EPCs were shown to lose the expression of endothelial characteristic markers after three weeks of culture (209). In contrast, the expression of endothelial markers of late EPCs tends to become stronger after passages, leading to a fully mature endothelial cell phenotype (209,210). However, there remains no clear definition of the EPC phenotype, and even the term EPCs is used incorrectly. In 2004, Ingram *et al.* proposed a new way to identify and designate late EPCs, as they display high proliferative potential. Cord blood-derived EPCs can achieve at least 100 populations doubling (61). These cells are called HPP-ECFCs, meaning high proliferative potential endothelial cell-forming colonies due to their ability to form a colony with only one cell (211). Their high proliferative potential can be explained by their remaining high telomerase activity with successive passages in culture (212). In cord blood-extracted cells, the length of the telomeres is longer compared to that of telomeres in healthy adults (213). Moreover, peripheral blood EPCs show high proliferative activity but lower than that by cord blood cells (61). In an attempt to define EPCs, Yoder *et al.* worked on redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis by comparing the function of Colony Forming Unit Endothelial cells (CFU-ECs) and ECFCs. From these two cell populations, only ECFCs are able to form secondary colonies and are the vessels forming EPCs (214).

EPCs able to form secondary colonies and repair damaged vessels are found in the circulation in relatively low numbers. Cells expressing CD34, VEGFR-2, and CD133 represent 0.002% of the total number of mononuclear cells in peripheral blood and 0.01% in cord blood (59).-Although the process of recruitment at the vascular damaged site is well described in the literature, the differentiation of CD34+ cells into EPCs and then into mature

endothelial cells is not well characterized. Furthermore, to our knowledge, there is no clear definition of what exactly are EPCs.

To assess and follow the differentiation of EPCs in different chemical and physical environments, we chose to examine gene expression using quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). This powerful method, which can quickly and reliably measure mRNA levels, can detect low-expression genes, as it can detect a very small number of mRNA copies (215). However, when RT-qPCR is used incorrectly, this can lead to misinterpretation and misleading conclusions. In this study, we chose to follow the minimum information for publication of Quantitative Real-Time PCR experiments, also referred to as the MIQE guidelines (196). Many studies have reported experiments performed with only one gene for normalization, such as GAPDH, β -actin, or 18S, which represent the three most used genes in RT-qPCR; however, their expression can be unstable, depending on the treatment, tissue, cell type, or differentiation state of the cells involved (216,217). Moreover, employing a single reference gene without validation can lead to unreliable gene expression data. Thus, many experimental results cannot be reproduced, sometimes because of insufficient data normalization and quality. Normalization can overcome issues with mRNA sample extraction and handling as well as limit the effect of having different amounts of starting materials from one sample to another (196). We therefore tested the stability of seven candidate reference genes with three types of cells: mononuclear CD34⁺ cells (extracted from cord blood), EPCs (treated or untreated), and HSVECs (human saphenous vein endothelial cells). In our study, treated ECs refers to cells that were seeded on functionalized biomaterials while the untreated ones were seeded on collagen. The reference genes in this study were chosen among several genes displaying minimal variability in their level of expression under different experimental conditions. The critical point here is that we used cells in their differentiation state, meaning that the expression of several genes could change during this process (218). To ensure that the expression of the candidate reference genes remained stable during the process, mononuclear cells enriched CD34⁺ population were used as undifferentiated cells and human saphenous vein endothelial cells were deployed as mature cells. EPCs emerging from the mononuclear cells and cultured on collagen were likely to possess clonal endothelial colony-forming cell (ECFC) ability and were thus named ECFCs following their appearance under these conditions (214). The obtained ECFCs were seeded onto modified biomaterials used for vascular applications (219). To obtain reliable results, every condition

had to be tested to ensure that both the cells and consequently their gene expression undergo all of the environmental changes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Experimental design

Seven potential candidate reference genes (see Table 4) were evaluated in mononuclear cells enriched CD34+, endothelial cell-forming colonies (ECFCs) and human saphenous vein endothelial cells. HSVECs served as the control for the endothelial mature cells in our experiments. ECFCs were cultured onto collagen-coated wells or modified biomaterials for vascular applications. Three biological replicates were used for each condition since we have limited numbers of blood donations. cDNA from three independent samples of treated and untreated ECFCs, mononuclear cells enriched CD34+ population cells, and human saphenous vein endothelial cells (HSVECs) were then pooled to provide the most stable reference gene. Using the pooled sample approach to determine temperature annealing and efficiency made it possible to cover the entire sample spectrum.

Table 4: Evaluated References Genes

Symbol	Gene name	Function
YWHAZ	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Regulates the signal transduction pathway by binding to phosphoserine protein on a variety of signaling molecules
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Responsible for carbohydrate metabolism
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Crucial to the generation of purine through the purine salvage model
RPLP0	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0	Encodes a ribosomal protein that is a component of the 60S subunit
UBC	Ubiquitin C	Essential in maintaining the ubiquitin level under stress conditions
B2M	β -2-microglobulin	Component of major histocompatibility complex class I molecules
TBP	Tata box binding protein	Transcription initiation from RNA polymerase II promoter

2.2 Isolation of mononuclear CD34+ cells and expansion of EPCs

As there are more mononuclear cells in cord blood compared to peripheral blood, and furthermore, cord blood derived colonies appeared larger than peripheral blood colonies, we decided to isolate EPCs from cord blood to have sufficient amount of cells at low passage (less differentiated state) (61,220). EPCs (or ECFCs, as referred to here) were obtained from cord blood donations and each procedure was approved by the CHU de Québec - Université Laval Ethics Committee following the informed consent of donors at the Saint-François d'Assise Hospital, Quebec City, Canada. In agreement with the CHU de Québec - Université Laval Ethics Committee, all sample donations were carried out anonymously and limited in number.

The samples were collected in cord blood collection bags (Pall, USA). Mononuclear cells were first isolated from total cord blood by density gradient centrifugation with Histopaque[®]-1077 (Sigma-Aldrich, Canada). The cells were then rinsed out twice with 2 mM of PBS EDTA and once with EBM-2 (Lonza, Switzerland). The cells were enriched thereafter with CD34+ cells by magnetically activated cell sorting (CD34 Microbead Kit Ultrapure, Miltenyi Biotec, Germany) onto MS MACS columns, following the manufacturer's instructions. The cells were finally plated on collagen-coated (collagen type I solution, rat tail from Sigma, USA) 6-well plates (Corning, NY, USA). The medium, namely, EGM2-MV from Lonza supplemented with 10% FBS (5% from the Lonza kit and 5% from Fetal Bovine Serum, HyClone[™], USA), was changed 4 days after plating and every 2 days thereafter. Colonies normally appear between 7 and 21 days after plating. After 17 days, colonies were harvested and seeded onto collagen-coated 6-well plates for 2 days of expansion. Prior the seeding of cells on functionalized biomaterials, the surfaces were sterilized overnight with 70% ethanol and subsequently rinsed 3 times with PBS. The cells were then seeded at a density of 30,000 cells per cm². After 2 days on the surfaces, the cells were lysed in TRIzol[™] for subsequent RT-qPCR. The cells were lysed directly in the plate and all of the samples were frozen and stored at -80°C prior to RNA purification. Untreated ECFCs refers to ECFCs seeded on collagen type-1 well plate and treated ECFCs refers to cells seeded on functionalized biomaterials.

2.3 Human saphenous vein cells extraction and culture

HSVECs were isolated from healthy human saphenous vein segments removed during varicose vein stripping surgeries, as previously described (221). All of the procedures were approved by the CHU de Québec - Université Laval Ethics Committee following the informed consent of donors at the Saint-François d'Assise Hospital in Quebec City. Following isolation, the cells were frozen in 90% fetal bovine serum (FBS) and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, Canada). In each experiment, HSVECs were thawed at passage 4 and maintained in 6-well tissue culture plates in complete EGM2-MV culture medium. Cell harvesting was performed using TRIzol™ for RT-qPCR two days after seeding. The cells were lysed directly in the plate and all of the samples were frozen and stored at -80°C prior to RNA purification.

2.4 RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA isolated in TriZol reagent was purified by means of the Aurum total mini kit (BioRad, USA), following the manufacturer's protocol. To ensure reproducibility, all the samples were treated identically. For each sample, three biological replicates were processed. Following isolation, RNA purity was assessed by measuring absorbance ratios A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop 2000, ThermoScientific, USA), while RNA integrity was determined by means of the RNA6000 Pico Kit (Agilent Technologies, USA). Briefly, 1 μL of each sample RNA solution at a concentration of 5 ng/ μL was charged into a chip. Each RNA sample was tested. Once the RNA integrity was ascertained, genomic DNA (gDNA) was removed, as gDNA can shift the Cq values, particularly for low-expression genes. The Cq value is defined by the cycle at which the fluorescence of a sample first increases and crosses the threshold line and when the curvature of the amplification curve is at its maximum. Finally, RNA was reversed into cDNA by means of the Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Germany).

2.5 Quantitative real-time procedure

Real-time PCR was performed using a 96-well plate (96 fast PCR plates, Starstedt, Germany) and the TaqMan® gene expression assay (X20) (FAM™ dye-labeled MGB probes, Table 1) and TaqMan® Fast Advanced Master Mix (X2) (Applied Biosystems, USA). PCR reactions were achieved, and the data were acquired with the 7500 Fast Real-

Time PCR System (Applied Biosystems, USA). The PCR conditions were then established (Table 6), see the mean Cq values of three technical triplicates were used for data analysis).

2.6 PCR product assessment

The size of the seven amplicons was assessed by electrophoresis on agarose gel. 25 ng of each PCR product were charged onto 3% agarose gel (Low Electroendosmosis (EEO) Ultrapure Bioreagent, J. T. Baker, USA). The PCR products were then mixed with a loading buffer (30% glycerol, 0.25% bromophenol blue, and 0.25% xylene cyanol, Sigma and Fisher, Canada). The running buffer used for the electrophoresis was Tris-acetate-EDTA buffer (TAE). To analyze the size of our PCR product, we used a ladder (Quick-Load[®] Purple 50 bp DNA Ladder, New England BioLabs, USA). Band detection was performed using a SYBR[™] Safe DNA Gel Stain (Life Technologies, USA). The gels were run using the wide mini-sub[®] Cell GT Horizontal Electrophoresis System with a PowerPac[™] Basic Power Supply (BioRad, USA), and images of the gels were acquired by means of G:BOX F3 (Syngene, USA).

Table 5: Candidate Reference Genes for Validation

Symbol	Cat No.	Amplicon size (bp)	UniGene No.	GeneBankAccession No.
YWHAZ	Hs03044281_g1	106	Hs.492407	NM_003406.3
GAPDH	Hs02786624_g1	157	Hs.544577	NM_002046.4
HPRT1	Hs02800695_m1	82	Hs.412707	NM_000194.2
RPLP0	Hs00420895_gH	76	Hs.546285	NM_001002.3
UBC	Hs00824723_m1	71	Hs.520348	NM_021009.5
B2M	Hs99999907_m1	75	Hs.534255	NM_004048.2
TBP	Hs00427620_m1	91	Hs.590872	NM_003194.4

Table 6: Thermal Cycling Profile

Parameters	UNG incubation	Polymerase activation	PCR (50 cycles)	
	Hold	Hold	Denature	Anneal/extend
Temp. (°C)	50	95	95	60
Time (mm:ss)	02:00	00 :20	00 :03	00 :30

2.7 PCR efficiency

To calculate the reference genes, two-fold dilutions were prepared from pooled cDNA samples, with each sample composed of an equal cDNA quantity for each experimental condition. The dilution factor was determined following verification of the annealing temperature. When the C_q is too low, it is better to use two-fold dilutions to dilute the cDNA and acquire a good signal after the amplification. The PCR reactions were achieved as previously described. PCR efficiency (E) and the correlation coefficient (R²) were determined with the calibration curve of each probe using the following formula:

$$E (\%) = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100 \quad (222)$$

With the slopes determined from a standard curve obtained by converting, into a logarithm, the initial cDNA template concentration on the x axis and the C_q on the y axis.

Table 7: RT-qPCR Amplification Efficiency

Symbol	Efficiency (%)
YWHAZ	99.2
GAPDH	101.4
HPRT1	112.7
RPLP0	113.1
UBC	106.2
B2M	111.5
TBP	106.4

2.8 Data analysis

The stability of the standard gene expression analysis is necessary to standardize the gene of interest. It is now recognized that the standardization of a gene with a constant expression is the key to obtaining accurate results. In this study, in order to choose the ideal housekeeping genes or reference genes, several candidates were tested to identify the two or three most stable genes for the proposed experimental conditions. In this regard, three software platforms are used to determine the stability of reference genes for RT-qPCR experiments.

BestKeeper analysis. BestKeeper, an Excel-based application, determines the optimal housekeeping gene to use for a specific experiment. This program computes the Cq values of each candidate based on the standard deviation (SD), which represents the stability of the gene, the coefficient of correlation (R^2), and the percentage covariance. The lower the SD value, the better the stability. If the $SD > 1$, the gene is deemed unreliable (223).

NormFinder analysis. NormFinder, another Excel-based algorithm, computes expression stability values to identify the most stable genes from a series of candidates.

Normfinder provides a stability value for each gene, with a high stability value representing a high gene expression variance. Therefore, in NormFinder analysis, the best gene presents the lowest stability value (224). This program enabled us to study the variation between sample subgroups of the sample set (treated/untreated).

GeNorm analysis. GeNorm is used to determine the most stable reference (housekeeping) genes from a set of tested candidate reference genes in a given set of samples. The genes are ranked based on the parameter M, which is the gene expression normalization factor calculated for each sample based on the geometric mean of a user-defined number of reference genes. This program makes it possible to identify an adequate number of reference genes from the Cq values of the set of samples and housekeeping gene candidates. Reference genes with low M values are considered to be reliably stable, contrary to genes with $M > 1.5$, which cannot be used as reliable and stable references (225).

ΔCq method. The ΔCq program compares the relative expression of pairs of genes among all of the candidates within each tested sample. If the relative expression between the pairs of genes remains constant for each sample, it means that the pairs of genes can be used as reference genes. In the same way, if the Cq is variable, it means that the combination of these two genes is not reliable enough to normalize the gene expression in a given experimental condition. In this study, the ΔCq program compared pair-to-pair variations, allowing for the identification of two reference genes to normalize our data (226).

2.9 Final ranking

All of the candidate genes were ranked by the four methods. As the ranking could be slightly different among these programs, the means of the three ranking numbers for BestKeeper, NormFinder, and geNorm were calculated.

3. RESULTS

3.1 Annealing temperature, amplification efficiency

When employed correctly, RT-qPCR can be a powerful method to study gene expression. One of the first things to confirm is the annealing temperature. There is no exact temperature for each primer. An annealing temperature that is too low can lead to non-specific amplification, while a too high temperature can lead to poor yield and purity due to the poor annealing of primers (197). In this study, three temperatures were tested: 58, 60 and 62°C. The ΔRn were plotted against PCR cycle number (see graphs in supplementary

data). At 60°C, the ΔR_n values are lower than the two other temperatures, which means that the number of cycles to reach a plateau value is lower and thereby the efficiency is higher. Moreover, the quantity of fluorescent signal emits by the probe hybridized to the target sequence is maximized, so, we choose this temperature to proceed to the PCR and study the PCR products obtained at the end of the procedure. At 60°C, the amplification efficiency was determined for each of the 7 selected candidate reference genes based on the slope of the standard curve. On the lists the obtained efficiencies established at between 99.2 and 113.1%. Each primer allowed for the identification of cDNA amplification products and each candidate showed one specific band at the expected length (see Fig. 36). To study the PCR product after the reaction on the agarose gel, we used the complete PCR product obtained with the commercial mix of the primers and the TaqMan fluorescent probe (FAM) instead of PCR product obtained with only primers (without fluorescent probe). As the absorption and emission wavelengths of the FAM TaqMan probe (495 and 520 nm) is very close to the SYBR safe (502 and 530 nm), it is possible that the FAM released from the TaqMan probe following the PCR hung on the proteins and/or on the DNA, which would have caused these fluorescent traces at higher molecular weights. Despite these traces, no clear band was observed for all the probes at smaller or higher molecular weights, which means that there is no degradation product and no contaminant in our samples.

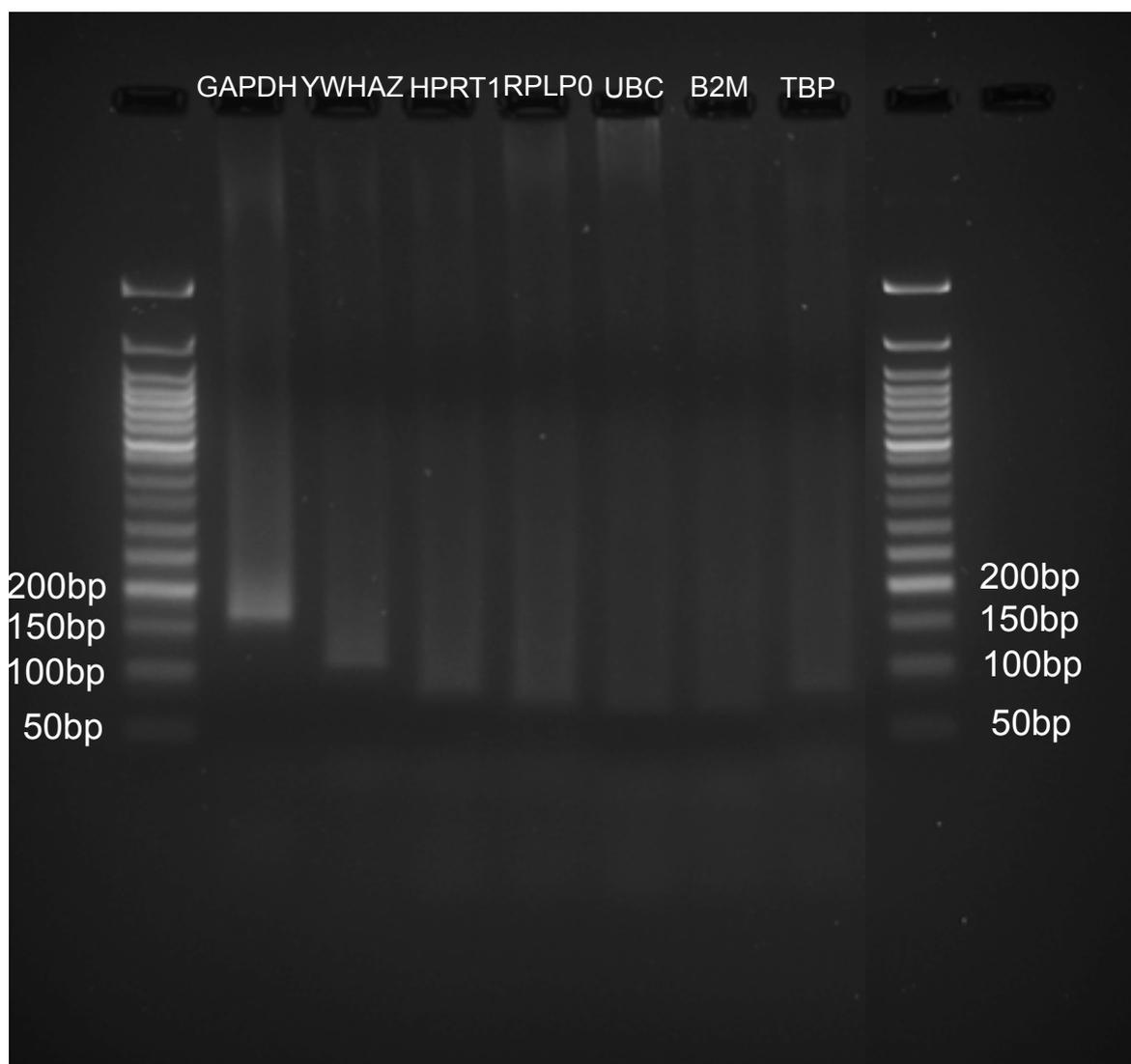


Fig. 36: PCR-amplified products, 25 ng of total amplified cDNA of each target were loaded per lane. Each primer gave rise to a single band of the expected length.

3.2 Cq values

The expression level of each candidate was evaluated as quantification cycle (Cq) values, with three biological and three technical replicates for each type of sample (mononuclear cells enriched CD34+ population, ECFC-treated or untreated and HSVECs). The box plot showed differences in Cq values for all seven candidates (see Fig.2). The levels of the candidates varied slightly from 23.21 to 32.75 Cq. As shown in Figure 2, RPLP0 was the most abundant gene, with a mean Cq of 24.35, while TBP showed the lowest expression level of all of our samples with a Cq mean value of 31,91. Among all of the candidates analyzed, RPLP0 showed the largest variation in terms of standard deviation, with a

recorded expression variate of 2,72 Cq between EPCs at passage 0 and HSVECs, while UBC and HPRT1 showed the lowest standard deviations with a Cq variation below 0.5. The ideal reference gene should have a low standard deviation among samples and replicates and a high gene expression, defined by low Cq value. A Grubb's test, also called the extreme studentized deviate, was performed to determine whether the extreme values obtained were significant outliers (significant level set at $P < 0.01$). No outliers were detected in our results; consequently, as the Cq values were in the same range, no sample was excluded from the remainder of the analysis (227,228).

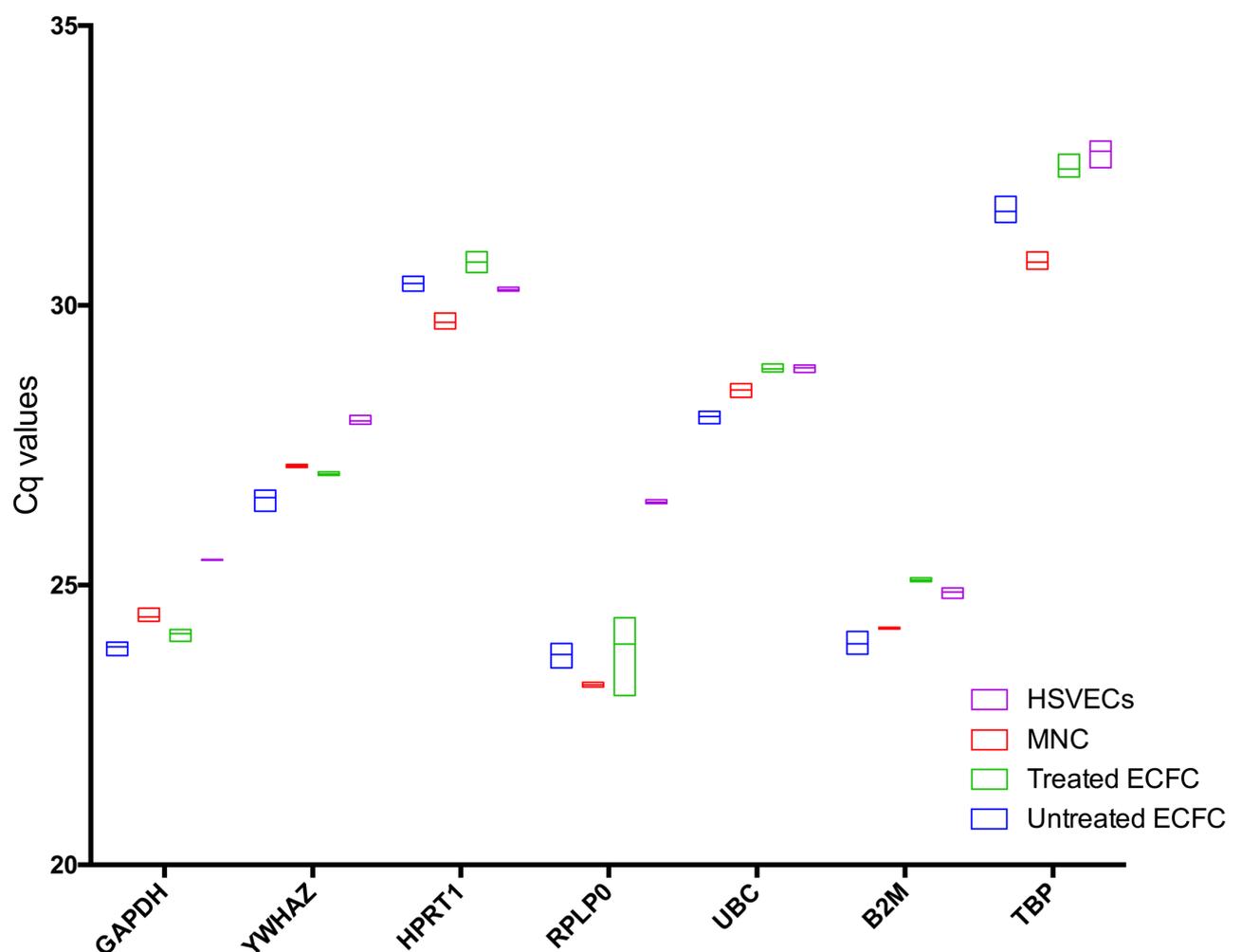


Figure 37: Distribution of the Cq values for the seven candidate reference genes. The black horizontal line within the box plot represents the median Cq value. The box indicates the first quartile Q1 and the third quartile Q3.

3.3 Analysis of candidate housekeeping gene stability

BestKeeper produces different statistical values describing the geometric and arithmetic mean of the crossing point value (CP), also called Cq, which also describes the

minimal and maximal Cq values for each candidate. The standard deviation is calculated, providing information on the variability of the expression. To consider a gene reliable, the SD value should be below 1; any gene with a SD higher than 1 must be excluded from the candidate reference genes (223). In this study, RPLP0 had a standard deviation of 1.07 and was thus considered unsuitable for our experiment. The second important value computed by this program is the Pearson correlation coefficient, which can be between +1 and -1. A value of +1 defines a total positive linear correlation, signifying that the higher the value, the higher the stability will be. In this experiment, the least stable gene was HPRT1 with a value of 0.344, rendering this gene ineligible as a housekeeping gene. TBP, GAPDH, and YWHAZ produced the highest values, followed by UBC and B2M. Considering the three important values obtained by BestKeeper, the best candidates among the seven genes tested were therefore YWHAZ, TBP, and GAPDH, followed by UBC (see Table 6).

Table 6: Expression Stability Evaluated by BestKeeper

	YWHAZ	GAPDH	HPRT1	RPLP0	B2M	TBP	UBC
n	12	12	12	12	12	12	12
Geo Mean [CP]	27.15	24.47	30.28	24.32	24.54	31.90	28.56
Ar Mean [CP]	27.15	24.48	30.29	24.35	24.54	31.91	28.56
min [CP]	26.56	23.90	29.70	23.22	23.95	30.77	28.01
max [CP]	27.93	25.45	30.77	26.48	25.09	32.76	28.88
std dev [± CP]	0.39	0.49	0.30	1.07	0.45	0.69	0.31
CV [% CP]	1.44	1.99	0.98	4.37	1.82	2.15	1.09
coeff. of corr. [r]	0.834	0.86	0.344	0.94	0.771	0.864	0.78

Normfinder is an Excel-based visual tool that can compute the Cq value to estimate a stability value for a set of candidate genes. This program can calculate gene stability through quantitative methods, by either PCR or microarrays, from a sample set containing any number of samples organized in groups. It therefore ranks genes by their stability values; the lowest stability value is given to the most stable candidate reference gene, which in our case was YWHAZ. As shown with BestKeeper, RPLP0 was determined as the least stable gene. Compared to BestKeeper, however, Normfinder determined that the second most stable gene was GAPDH, which is frequently used as a reference for RT-qPCR normalization as shown in Table 8.

Table 8: Reference Gene Stability Evaluations by NormFinder.

Gene	Stability value	Standard error	Ranking
GAPDH	0.264	0.271	2
YWHAZ	0.184	0.303	1
HPRT1	0.725	0.355	6
RPLP0	1.832	0.755	7
UBC	0.409	0.275	3
B2M	0.410	0.275	4
TBP	0.415	0.276	5

With the geNorm algorithm, the average stability (M) is measured and provides a more stable expression across a panel of different samples. This program calculates the pairwise variation to determine the optimal number of reference genes to be used in a given experiment. In this study, the analyzed genes were ranked according to their stability value M, from the least stable to the most stable (see Fig. 38). RPLP0 was ranked as the least stable gene and YWHAZ as the most stable gene. For the normalization of RT-qPCR data, it is recommended to use at least two reference genes for accurate gene expression results. As seen in Figure 3, GAPDH was identified as the second most stable gene. The calculated pairwise variation indicates the optimal number of reference genes to use. A value below the threshold of 0.15 means that this is the optimal number of genes to use. In our experiment, when two genes versus three genes were used, the pairwise variation was higher than 0.15, whereas the value obtained when we compared three genes with four genes was below 0.15. To confirm previous results, when all of the genes were used to calculate the pairwise variation, the value increased, meaning that at least one of our candidates had a negative effect on this value, which in this case was RPLP0. The threshold value was attained for V3/4, signifying that the inclusion of an additional reference gene was required for this study (see Fig. 39). The geNorm program thus recommended using the three most stable genes (YWHAZ, GAPDH, and UBC) so as to normalize our data with low expression variations.

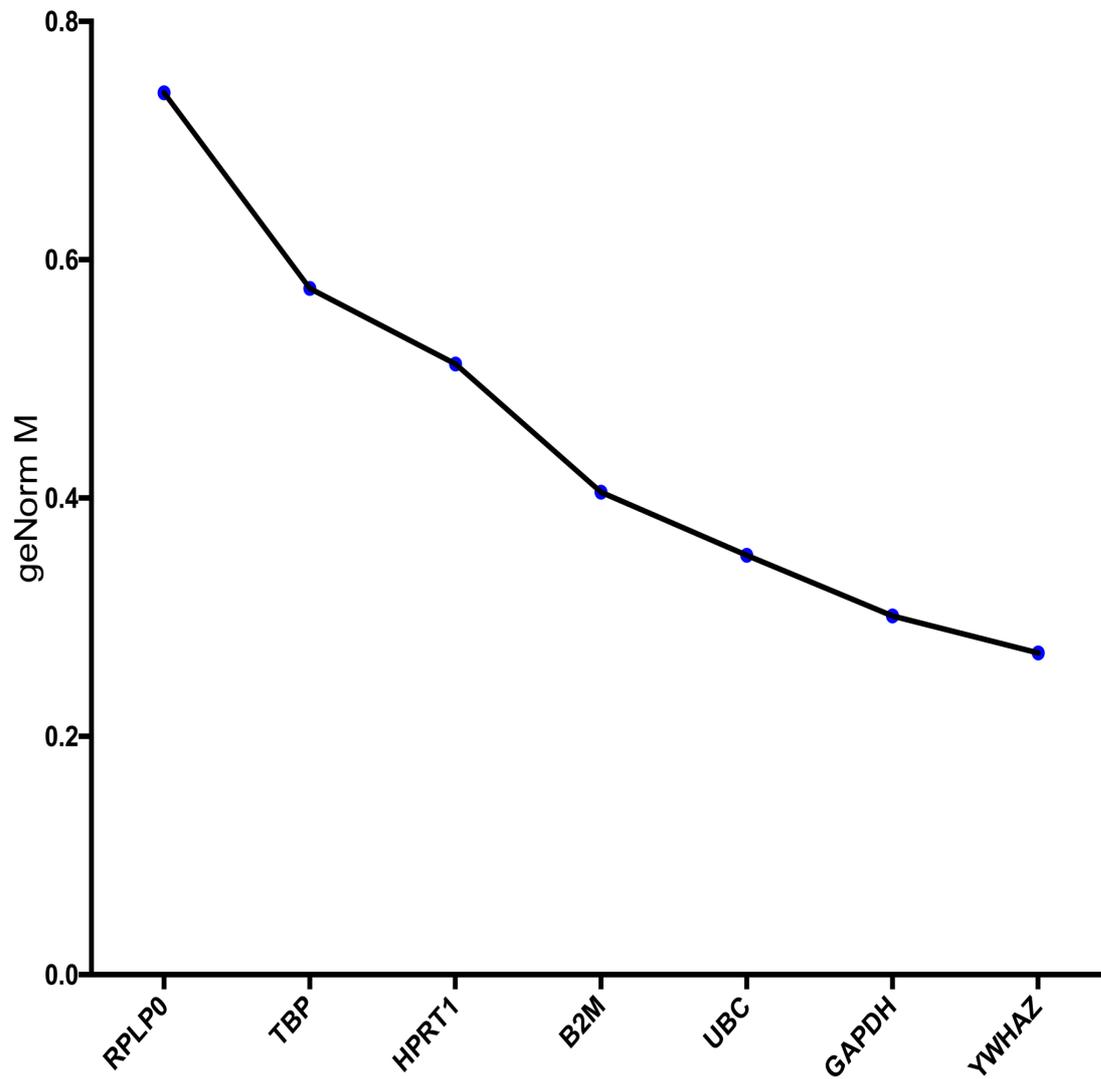


Fig. 38: Expression stability value M of seven RG candidates as calculated by geNorm (qbase+). The lowest M value indicates the most stable expression.

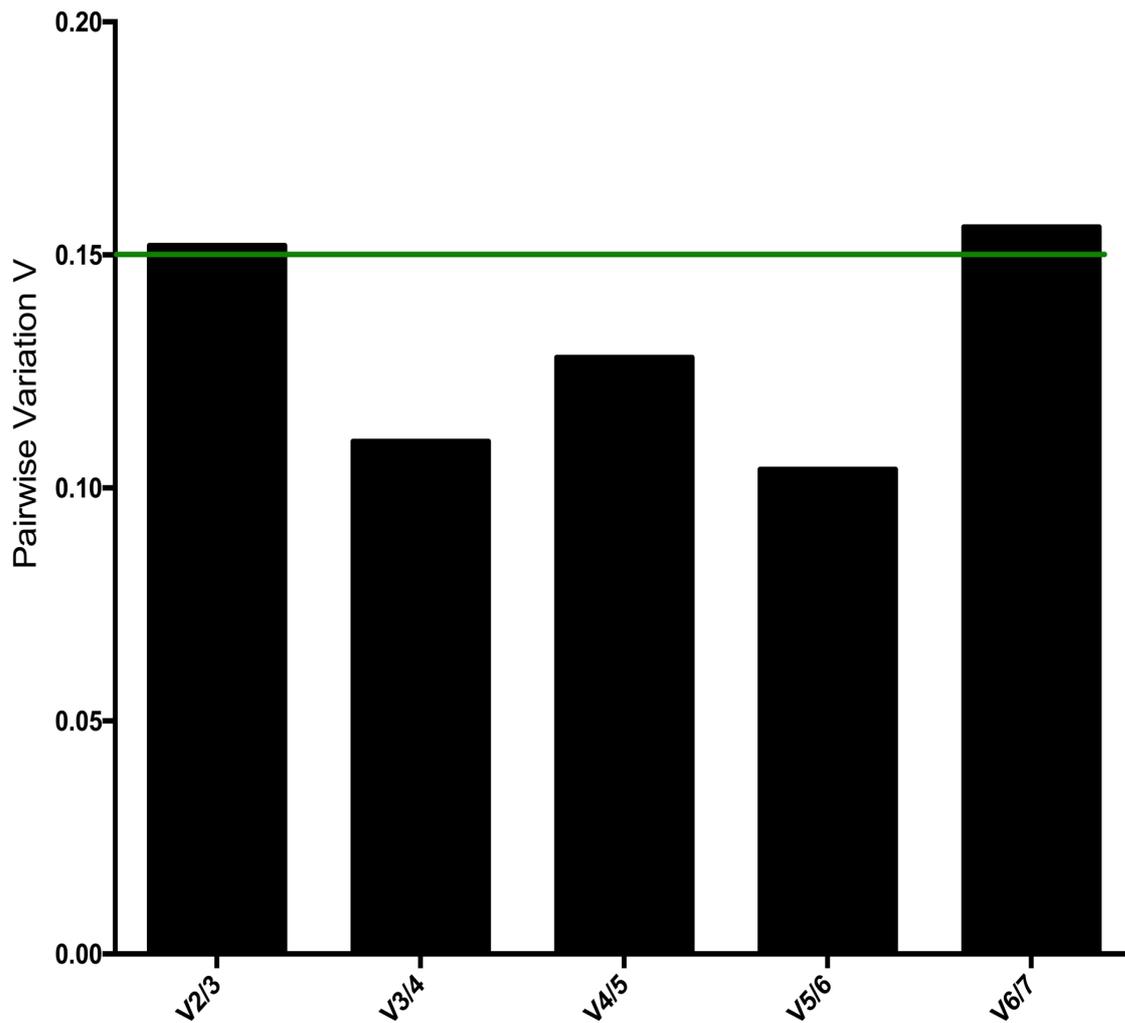


Fig. 39: Pairwise variation to determine the optimal number of RGs for RT-qPCR by geNorm. V3/4 exhibited value below 0.15, thus indicating that 3 reference genes were necessary for the experiment.

The ΔCq method determines the most stable candidates by comparing the relative expression of pairs of genes for each sample and treatment. In this study, all of the combinations of gene pairs were tested. The conclusion was that tendencies exist when certain genes are associated with a second one and that this can be detected by the standard deviation of the ΔCq following the variability in gene expression. The ΔCq value is calculated, and if the value between pairs of genes remains constant in the sample being tested, it means that these two reference genes are accurate for use in the experiment. If the ΔCq value fluctuates, it means that one or two of the genes is variably expressed. As shown in Fig. 40, the lowest observed variation between two genes was for YWHAZ and GAPDH. Therefore, as the geNorm program suggested, the addition of a third reference gene was

recommended for our type of study, which is UBC as geNorm and NormFinder ranked this gene in the third position. With the ΔCq method, the variation between YWHAZ and GAPDH was 0.153, which was in the same range as the variation determined by NormFinder. In addition, the variation between YWHAZ and UBC was 0.381, which was close to the value of 0.408 given by NormFinder.

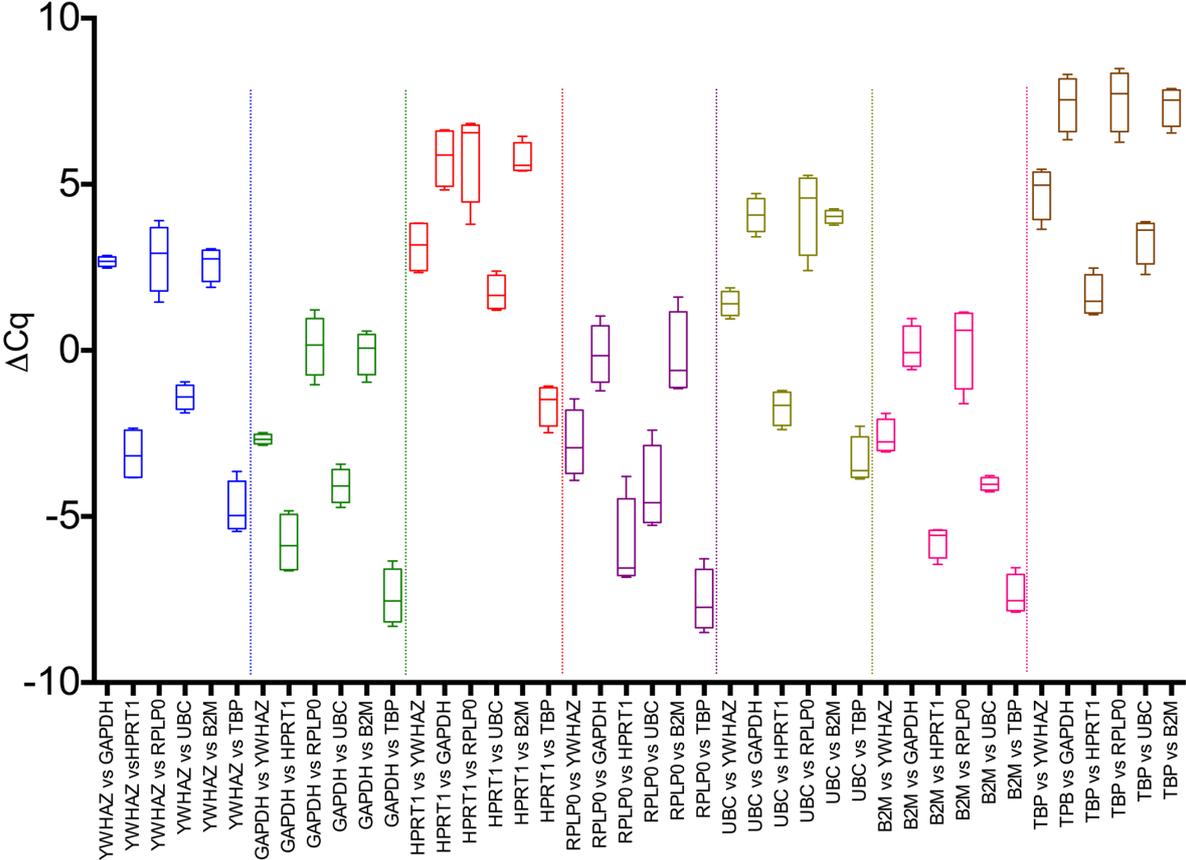


Fig. 40: Reference gene evaluation stability by the ΔCq approach.

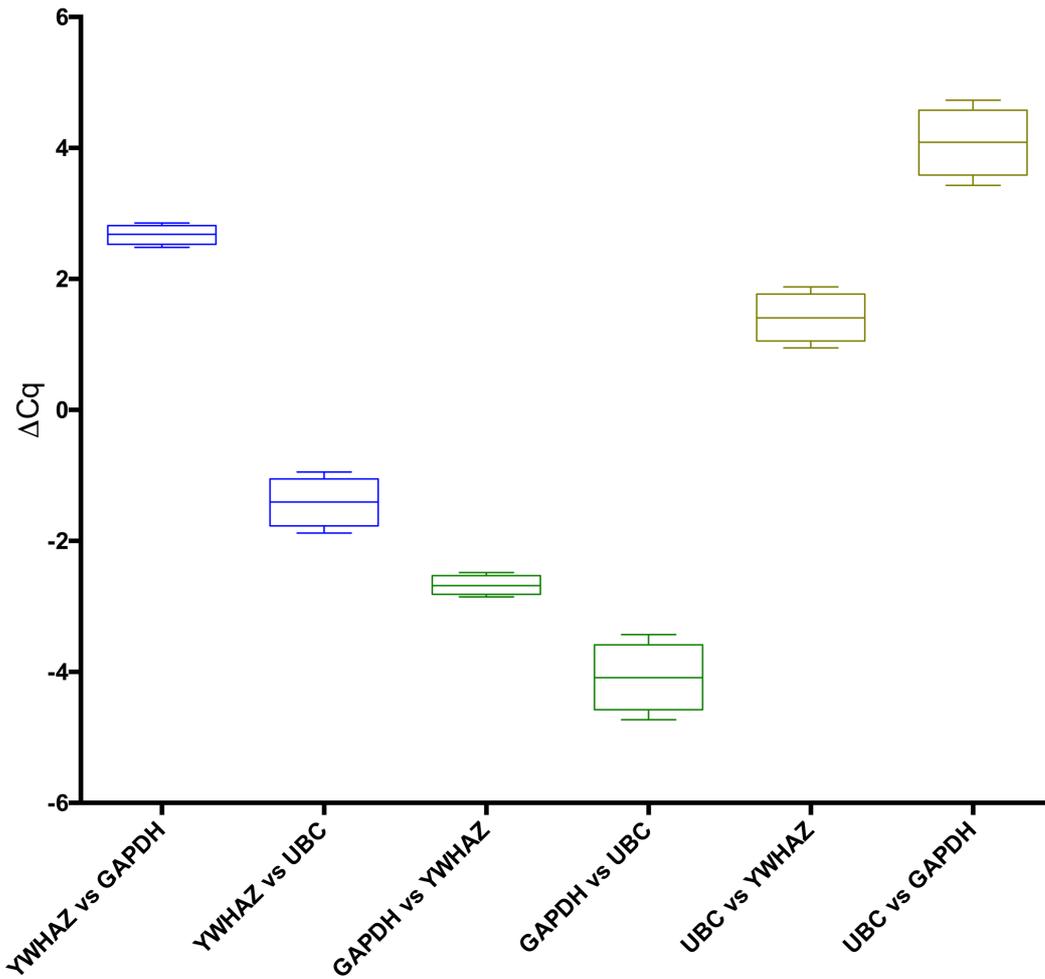


Fig. 41: Reference gene stability of the three best candidates, as determined by ΔCq .

As shown in

Fig. 41, the recorded variation between GAPDH and UBC was slightly higher, yet lower than the variation in the other pair of genes, showing a value of 0.531, which is a magnification of that presented in Figure 5, with the best three candidates designated by geNorm. When YWHAZ was compared to the six other genes, this candidate showed the lowest average standard deviation at 0.606. Similar findings were recorded for GAPDH, with an average standard deviation of 0.664, while UBC recorded a standard deviation of 0.607, meaning that these three genes were associated with the least amount of variability (see Table 9).

To confirm the results obtained with BestKeeper, NormFinder, and geNorm, RPLP0 was compared to the other six genes, revealing a higher deviation in this gene, with a value of 1.142. This was also the case for TBP and HPRT1; hence, these three genes were

considered as being variable and therefore not adequately reliable for normalization in our proposed experimental conditions. Interestingly, the standard deviation obtained for B2M was 0.618, which was lower than that recorded for GAPDH; however, B2M was ranked fourth with NormFinder and geNorm and in fifth position with BestKeeper. For our study, it was clear that YWHAZ was the first candidate to use, followed by GAPDH and UBC (see Table 9).

Table 9: Reference Gene Evaluation Stability by the ΔCq Method.

Sample	SD*	Mean SD
YWHAZ vs GAPDH	0.152	
YWHAZ vs HPRT1	0.785	
YWHAZ vs RPLP0	1.018	0.606
YWHAZ vs UBC	0.381	
YWHAZ vs B2M	0.514	
YWHAZ vs TBP	0.785	
GAPDH vs YWHAZ	0.152	
GAPDH vs HPRT1	0.899	
GAPDH vs RPLP0	0.918	0.665
GAPDH vs UBC	0.532	
GAPDH vs B2M	0.653	
GAPDH vs TBP	0.835	
HPRT1 vs YWHAZ	0.785	
HPRT1 vs GAPDH	0.899	
HPRT1 vs HPRT1	1.432	0.790
HPRT1 vs RPLP0	0.529	
HPRT1 vs B2M	0.477	
HPRT1 vs TBP	0.617	
RPLP0 vs YWHAZ	1.018	
RPLP0 vs GAPDH	0.918	1.143
RPLP0 vs HPRT1	1.432	

RPLP0 vs UBC	1.279	
RPLP0 vs B2M	1.268	
RPLP0 vs TBP	0.941	
<hr/>		
UBC vs YWHAZ	0.381	
UBC vs GAPDH	0.532	
UBC vs HPRT1	0.529	
UBC vs RPLP0	1.279	0.607
UBC vs B2M	0.199	
UBC vs TBP	0.721	
<hr/>		
B2M vs YWHAZ	0.514	
B2M vs GAPDH	0.653	
B2M vs HPRT1	0.477	
B2M vs RPLP0	1.268	0.618
B2M vs UBC	0.199	
B2M vs TBP	0.599	
<hr/>		
TBP vs YWHAZ	0.785	
TPB vs GAPDH	0.835	
TBP vs HPRT1	0.617	
TBP vs RPLP0	0.941	0.750
TBP vs UBC	0.721	
TBP vs B2M	0.599	
<hr/>		

* Standard deviation (SD) is given for the variation in Cq values over the 12 samples.

3.4. Final ranking

Table 8: Ranking of Reference Gene Stability with the Three Software Programs

Ranking	BestKeeper	NormFinder	geNorm	Final Ranking
1	YWHAZ	YWHAZ	YWHAZ	YWHAZ
2	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH
3	TBP	UBC	UBC	UBC
4	UBC	B2M	B2M	B2M
5	B2M	TBP	HPRT1	TBP
6	HPRT1	HPRT1	TBP	HPRT1
7	RPLP0	RPLP0	RPLP0	RPLP0

4. DISCUSSION

Recruiting endothelial progenitor cells (EPCs) that can differentiate into endothelial mature cells appears to be a promising strategy to overcome the lack of spontaneous *in situ* endothelialization in vascular substitutes. The endothelial cell monolayer is necessary to render the inner surface of a graft compatible with blood, as the endothelium is the ultimate hemocompatible surface (229). EPCs arise from the CD34⁺ cell population (202). (50). In the case of vessel damage (ischemia) or the grafting of substitutes, endothelial progenitor cells are mobilized from bone marrow through cytokine signalization, such as SDF-1 (230), VEGF (162), or G-SCF (79,229). Although the process of EPC recruitment has been widely studied, the differentiation of CD34⁺ cells into EPCs and EPCs into mature endothelial cells continues to elude researchers.

Mononuclear cells extracted from cord blood were enriched with CD34⁺ and then seeded onto a collagen-coated surface to produce endothelial progenitor cells colonies. Both of these distinct types of cells express common immaturity markers such as CD34 and CD133 (prominin), but in the case of EPCs, the expression of these two markers decreases as they differentiate into a more mature phenotype. During this process, mature markers such as CD31, vWF, and eNOS are upregulated over time under *in vitro* culture (208); a

sensitive method of detection is thus required to detect these subtle changes. In this regard, RT-qPCR gene expression analysis is a powerful and sensitive tool to obtain optimal quantitative results.

Numerous studies have demonstrated that using reliable and non-variable genes is key to normalize data and obtain accurate results. The expression of endogenous genes can vary depending on the treatment, the growth factor, or even the environmental conditions involved. In the study of biomaterials, the chemical composition but also the stiffness (231) and the roughness (232,233) of the materials on which the cells are seeded have an influence on gene expression. The ideal reference gene must be expressed at the same level in every sample and under all of the experimental conditions tested.

As we are led to work with EPCs at different stages of differentiation, employing housekeeping genes that can remain stable under these conditions is of the utmost importance. Despite the fact that EPCs were discovered in 1997 and have been used extensively since then in research, their differentiation process in mature cells is not yet fully understood. Generally, the literature regarding this cell type describes them as being part stem cells and part mature cells.

We evaluated the potential of seven housekeeping genes to use with mononuclear cells enriched CD34+ population, endothelial progenitors, and human saphenous vein cells to study the differentiation of CD34+ cells from cord blood into endothelial cell-forming colonies. These three types of cells are totally different. Mononuclear cells represent a non-adherent heterogeneous population of cells composed of primary vascular and hematopoietic stem cells, monocytes, lymphocytes, platelets, and granulocytes, whereas endothelial progenitors and human saphenous vein cells are adhesive cells that form a monolayer. However, following magnetic sorting, the subset of CD34+ mononuclear cells was led toward primary vascular cells with endothelial differentiation media, and other types of cells were removed to obtain a homogenous cell population. No other studies have validated reference genes to use with an endothelial progenitor cell subset. Furthermore, very few works relate the validation of housekeeping genes for mononuclear cells, as existing studies exclusively concern cells extracted from peripheral blood.

First and foremost, the validation procedure of RT-qPCR to determine gene efficiency, primer length, and housekeeping genes was performed prior to initiating RT-qPCR experiments. We thus compared the relative expression of seven candidate reference

genes with three types of cells, namely mononuclear cells enriched CD34+ population, treated and untreated endothelial progenitor cells, and human saphenous vein endothelial cells. The amplification efficiency of all of the studied candidates was found to be between 99.2 and 113.1% at the optimized annealing temperature of 60°C, meaning that all of the primers were correctly amplified with our experimental conditions. Following the amplification reaction, the PCR products were analyzed to assess the length of the primers used for our study. Only one band on agarose gel was observed for each of the seven candidates, thus concluding that there was no contamination of our samples with gDNA, which thereby confirms that the gDNA wipeout step was successful.

Four methods were used to determine the best combination of housekeeping genes to use for the three cell populations. All four programs ranked YWHAZ and GAPDH as the two most stable genes for our experimental conditions. Of interest is that geNorm provided an indication of how many housekeeping genes could be used to achieve reliable data normalization. Here, as the cut-off value was attained for V3/4, geNorm indicated that three rather than two reference genes should be used (see Fig. 4).

The ΔCq method compares the relative expression of two genes to assess the level of variation between two housekeeping genes. We observed that the combination of YWHAZ and GAPDH produced the lowest standard variation value; in comparison, for YWHAZ and UBC, this value increased slightly, but remained lower than in other combinations. For GAPDH and UBC, the value increased, but remained acceptable. Thus, UBC was ranked third by two out of the three programs (BestKeeper, NormFinder, and geNorm) for our experiments. Three software programs are commonly used to identify the best housekeeping gene or the best combination to use for a given experiment, yet only a few studies compare the results of more than one program. Because comparisons between programs can produce variable results, the use of more than one type of algorithm in the validation of reference genes is highly recommended.

For each cell or tissue type and under specific experimental conditions, a validation step is required to ensure that no significant change in gene expression occurs (223). The relative expression of the seven candidate genes varied between the samples. In analyzing three cell sources, the most significant variability occurred in mature cells, proving that differentiating blood stem cells possess a unique gene signature. Mononuclear cells are composed of a subset of several types of cells; this subset is a heterogeneous mix of stem

cells and mature cells that can form vascular structure, blood cells, and immune cells. Considering the overall diversity of cells contained in mononuclear cells, identifying a reliable reference gene is an obvious prerequisite.

Oturai and colleagues compared the stability of eight reference genes to select the best combination to use with mononuclear cells (from peripheral blood) and the different subset of cells contained in these mononuclear cells. The cells were then compared with cells isolated from patients suffering from multiple sclerosis and patients treated with interferon- β . In general, these authors observed that GAPDH was not a suitable candidate for all experimental conditions. However, the combination of UBC and YWHAZ showed the best stability when used with all of the cell sources (mononuclear cells, patient cells, and treated patient cells) (234). GAPDH is frequently used as housekeeping gene, but because it displays variable stability with tissues, cell types, and experimental conditions, validating the use of this gene is mandatory before tackling any RT-qPCR experiments. For Oturai and al., GAPDH was found to be unsuitable for their experimental conditions.

In comparison, in our study, mononuclear cells were obtained from cord blood and not peripheral blood and were magnetically sorted to render a homogeneous population rather than multiple types of cells capable of generating variability in gene expression. Even within a same subset of cells, the variability of expression between experiments was remarkable.

To validate a reference gene for human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) seeded onto substrates of different stiffness, Chen *et al.* concluded that GAPDH was among the least stable genes and that B2M and HPRT1 were the two most stable genes, which is inconsistent with our findings (231). As we used cells directly extracted from cord blood or saphenous veins, the variability between samples was such that at least three biological replicates were required to address and overcome the variability issues.

Żyżyńska *et al.* compared the relative expression results of eight candidates with HUVECs extracted from three different donors. Their findings regard one cell type with different biological replicates, and with the variability of expression, the ranking by three programs produced different results (235), thus proving that in terms of reference gene identification, using three programs is fully justified. Similarly, in identifying housekeeping genes in HUVECs treated with hydrogen peroxide, RPLP0 was shown to be among the

most stable genes, however in our study, this candidate was found to be the least stable gene (236).

Our findings highlight that the use of a non-stable reference gene presenting variances may lead to incorrect results that can limit the possibility of demonstrating relevant biological differences. An optimal setup for reference gene validation must be carried out for every experiment and every type of sample, whether treated or not. In this regard, this study shows that the greater the number of samples used for gene validation, the better the chances of overcoming variability issues among samples or biological replicates.

5. CONCLUSION

Our investigation demonstrates that the combination of three housekeeping genes, namely, YWHAZ, GAPDH, and UBC was necessary to obtain reliable normalization data by RT-qPCR for the assessment of ECFCs for the proposed experimental conditions. Gene expression was indeed variable among the samples and experimental conditions. This work will thus be useful to compare the relative gene expression of stem cell markers and mature endothelial cell markers of mononuclear cells enriched CD34+ population, treated and untreated EPCs, and endothelial mature cells.

Acknowledgments

The authors would like to thank “La Région Aquitaine” (Convention N°2014-1R10101-00002863) and “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-13-BS09-0021-02) (M.C.D). This work was supported by the National Science and Engineering Research Council (NSERC-Canada) (GL). G.L and M.C.D contributed equally to this work. The authors express their gratitude to Marie-France Côté and Sylvie Giroux for technical assistance.

Author contributions

Caroline Royer, Andrée-Anne Guay Bégin and Lucie Levesque conceived and designed the study. Caroline Royer performed the experiments. Caroline Royer analyzed the data and wrote the paper. Andrée-Anne Guay Bégin, Laurent Plawinski, Lucie

Levesque, Marie-Christine Durrieu and Gaétan Laroche reviewed and edited the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Chapitre 4 : Microstructuration bioactive de biomatériaux pour l'induction de la différenciation des ECFCs

Bioactive Micropatterning of Biomaterials for Induction of ECFCs

Differentiation

Caroline Royer¹⁻²⁻³⁻⁴⁻⁵, Andrée-Anne Guay-Bégin⁴, Christel Chanseau², Pascale Chevallier⁴⁻⁵, Laurence Bordenave⁶, Gaétan Laroche^{4-5, *, †} and Marie-Christine Durrieu^{1-2-3, *, †}

¹Univ. Bordeaux, Chimie et Biologie des Membranes et Nano-Objets (UMR5248 CBMN), Pessac (France)

²CNRS, CBMN UMR5248, Pessac (France)

³Bordeaux INP, CBMN UMR5248, Pessac (France)

⁴Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Centre de recherche du CHU de Québec - Université Laval, Hôpital Saint-François d'Assise, Québec (Canada)

⁵Département de génie des mines, de la métallurgie et des matériaux, Centre de Recherche sur les Matériaux Avancés, Québec (Canada)

⁶Université Bordeaux, INSERM U1026, Bioingénierie tissulaire, Bordeaux (France)

(*: equally contributed)

(†: corresponding authors)

Key words: Surface functionalization, peptides grafting, endothelialization, endothelial progenitor cells, vascular biomaterial

Publication soumise dans *Biomaterials*

Résumé

Les matériaux synthétiques utilisés de nos jours pour les pontages sont prometteurs, mais ils ne sont pas totalement biocompatibles ou hémocompatibles en raison de l'absence de taux de perméabilité à long terme. La modification chimique de l'extrême surface de ces matériaux pourrait conduire à une surface interne des prothèses plus adaptée avec des propriétés hémocompatibles. Le défi ici est de recréer un endothélium continu et fonctionnel sur cette surface interne pour éviter de déclencher un thrombus ou une hyperplasie néointimale. La stratégie ici retenue est l'immobilisation de molécules bioactives originales en surface du biomatériau afin d'améliorer le recrutement de cellules progénitrices endothéliales, première population de cellule recrutée sur le site d'un dommage vasculaire. Dans ce travail, deux molécules bioactives ont été choisies pour leur capacité à recruter, améliorer l'adhésion et induire la différenciation des cellules progénitrices endothéliales. Ces deux molécules, le GRGDS et la Sitagliptine, ont été greffées avec succès sur des surfaces en polyéthylène terephthalate. Des surfaces homogènes et microstructurées (c'est-à-dire comportant des micro-motifs de principes actifs avec une géométrie et une taille contrôlée) ont été comparées afin de fournir des zones de restriction qui peuvent déclencher l'alignement des cellules. Nous souhaitons ainsi évaluer l'influence d'une telle structuration sur le devenir des ECFC. Le comportement des cellules sur ces biomatériaux fonctionnalisés a été analysé. Leur capacité à contrôler le devenir des cellules endothéliales formant des colonies (ECFC) en termes de différenciation a été démontrée par RT-qPCR, immunofluorescence et tests enzymatiques.

Mots-clés : Fonctionnalisation de surface, greffage de peptides, endothélialisation, cellules progénitrices endothéliales, biomatériaux pour application vasculaire

Abstract

The synthetic materials used nowadays for bypasses are promising, but they are not fully biocompatible or hemocompatible due to the lack of long-term patency rate. The native endothelium is known to provide antithrombogenic surface as well as prevent neointimal hyperplasia, thereby, the regeneration of the intima in arterial graft have been widely accepted as an ideal approach to improve their biocompatibility. Synthetic grafts do not provide appealing surface for endothelial cells to adhere and colonize the inner surface.

Chemical surface modifications of these biomaterials could lead to a more suitable inner prosthesis surface. The immobilization of selected bioactive molecules can improve the recruitment of endothelial progenitor cells, which are the first cell type recruited at the site of a vascular damage. In this work, three active molecules were chosen for their abilities to recruit, enhance adhesion and induce differentiation of endothelial progenitor cells. Two molecules, GRGDS, and sitagliptin, were successfully grafted onto PET surfaces. Homogeneous and micropatterned surfaces were compared, in order to provide restrained cues triggering cell alignment, and evaluate the influence of such structuration on Endothelial Cell Forming Colony (ECFCs) fate. We then analyze cells behavior onto functionalized biomaterials. Their abilities to control ECFCs fate were demonstrated via RT-qPCR, immunofluorescence, and enzymatic tests.

Key words: Surface functionalization, peptides grafting, endothelialization, endothelial progenitor cells, vascular biomaterial

1. INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are the major cause of death worldwide (25,237). Cardiovascular diseases include all the pathologies related to heart and vessels. In most cases, they are due to the narrowing of the lumen of arteries and causes blood flow disturbance. Those vascular disorders are often treated by stent to mechanically restore luminal patency. For serious arterial diseases replacing the dysfunctional arteries with a substitute by creating a bypass is necessary. Prostheses made with poly(ethylene terephthalate) (PET or Dacron[®]) are often used by surgeons to replace large diameter arteries, while expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE or Teflon[®]) is preferred for small vascular replacements (83). Despite their biostability, Dacron[®] and Teflon[®] cannot provide a good patency rate due to the nature of their thrombogenic surface that may cause neointimal hyperplasia, thrombosis or atherosclerotic degeneration (83,238). Since Dacron prostheses are known to be permeable to blood, these substitutes are routinely coated with gelatin (239), collagen or albumin (13). Those coatings are biodegradable and can be degraded within four weeks after implantation (240) and allow endothelial cell adhesion and reduce cell removal after exposure to shear stress (241–244), but after few weeks their degradation cannot provide a sufficient amount of proteins to enhance cell adhesion. Additionally, coating can help to seal the largest pores and prevent blood leakage.

Surface modification could ensure or improve the implant to provide a better substrate for cell growth and improve interaction between the implant and surrounding tissues. Moreover, the formation of a continuous endothelium layer was demonstrated to prevent thrombosis, as the endothelial cells were shown to be the only cell type expressing antithrombogenic potential *in vitro* (245). Endothelial progenitor cells (EPCs) recruitment *in situ* is a promising strategy to improve graft patency, as this type of cells exhibits a high proliferation rate and has the ability to replenish the endothelial monolayer inside the graft (65,208,246). Therefore, EPCs have been used for the endothelialization of artificial vascular stents (158,247–251), aortic valves (252) and arterial prostheses (219,253–255). As aforementioned, the *ex vivo* seeding with EPCs demonstrated high patency rate in animal model (256). Despite these encouraging results, *ex-vivo* cell-based graft cannot be used in clinical applications due to time-consuming, costly procedure and the impossibility to use them for emergency (257).

The success of vascular substitute relies not only on the regeneration of the monolayer of cells that form the endothelium but also on the fact that this endothelium can

be as functional as in the native vessel. The control over endothelial cells (cells forming the endothelium) or endothelial progenitor cells is a key factor in this context.

The extracellular matrix (ECM) is the microenvironment of cells. This matrix ensures the attachment of cells as well as biochemical and structural supports. The ECM has a role in the cell-cell communication, cell adhesion and differentiation by the action of different proteins, polysaccharide structures and growth factors (258). Using proteins isolated from the ECM present many advantages on mimicking cell environment. However, the use of protein can generate disadvantages in the field of medical applications, such as proteolytic degradation, change of conformation (259). Previous works (131,260) show that it is possible to achieve higher control of molecule immobilization and cell response with smaller molecular structures. Contrary to proteins, immunogenicity can be minimized by using smaller sequences like peptides. Moreover, the grafting of smaller sequences as peptides can be done with greater stability as compared to proteins and at the same time the grafting density onto materials can be easier to control. Among those small molecules derived from the biological components of ECM, the RGD sequence is one of the most studied peptides derived from the extracellular matrix (110). RGD is the smallest sequence responsible for adhesion in fibronectin (128). RGD can bind to cell integrin receptors on a variety of cell types to influence cell adhesion, cytoskeletal reorganization, spreading and migration (261).

The approach presented herein is based on the recruitment and adhesion of ECFCs, which are a subtype of EPCs able to form colonies but also on their *in-situ* differentiation on the bioactive PET substrates. To this end, GRGDS, and sitagliptin molecules were grafted onto the polymer. Sitagliptin, first used for diabetes mellitus diseases (262), shows ability to inhibit dipeptidyl peptidase 4 (DPP4), which is freely available in the serum and is expressed on the surface of progenitor cells. DPP4 inactivates SDF-1 α by cleavage of the two terminal amino acids and prevents its binding to the CXCR4 receptor (21–24). Through the inhibition of DPP4, the SDF-1 α cleavage does not occur and therefore the SDF-1 α / CXCR4 interaction is possible, leading to the direct recruitment of progenitor cells *in vivo* and the increase of endothelial regeneration after injury (22). The objective of this work is to enable the re-endothelialization of the surface of PET by reforming a functional endothelium.

In addition to homogeneous grafting of peptides and bioactive molecules, the control of the microenvironment of cells can be a way to trigger the differentiation process (263). In the present study, the control of the organization of the bioactive molecules on biomaterial surfaces is here defined by different sizes and shapes of patterns, able to influence the cells placement, orientation, migration and their functions. Encouraging cells to migrate into a specific geometrical constraint can be challenging the use of photolithography applied to biology can help to overcome difficulties, by providing geometrical cues to direct cell direction (264). In terms of pattern size, it is fairly well described in the literature that patterns with a smaller dimension (less than 60 μm) provide a greater elongation of the cells and induce their alignment along the lines (260). Feinberg *et al.* showed that on 5 μm fibronectin lanes features spaced by 5 μm , pulmonary endothelial cells are not able to align themselves along the fibronectin cues (265). Moreover, with their work on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), Kidoaki *et al.* (266) proved that 10 μm fibronectin lanes with 10 μm spacing allowed the alignment of the cells. Di Canio *et al.* (182) determined that there is a critical minimum size to be able to induce alignment of cells (human coronary artery endothelial cells). In their study with human coronary ECs, 9.2 μm was the minimum width in which this population of cells can align. They explained that this minimum size restriction is due to the mean size of the nucleus [77].

Our work focuses on (i) the development of bioactive homogeneous surfaces; (ii) the synthesis of bioactive micropatterned surfaces using photolithography (iii) the understanding of the impact of peptide and geometrical cues on ECFCs adhesion, and differentiation. The present work focuses on the surface grafting of GRGDS peptides as well as sitagliptin on PET films (homogeneously or with various micropatterns) in order to improve the recruitment, the adhesion, and differentiation of the ECFCs. All the bioactive surfaces were characterized (XPS, AFM, TBO, fluorescent microscopy, DPPA inhibition assay) to ensure the covalent grafting of molecules before *in vitro* studies. The potential on the differentiation of ECFCs from cord blood into endothelial mature cells were then evaluated on all the modified PET films homogeneous and micropatterned by RT-qPCR and immunofluorescence by following the expression of CD34, KDR, and vWF.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Axially bi-oriented PET films were purchased from Goodfellow (France, thickness: 100 μm). NaOH, KMnO_4 , H_2SO_4 and HCl were obtained by Sigma (France). Acetonitrile, dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethylaminopropyl-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES buffer) and 1-(2-Amino-ethyl)-pyrrole-2,5-dione hydrochloride were obtained from Sigma-Aldrich (France). GRGDS and GRGDS-TAMRA peptides were synthesized by Genecust (Luxembourg). Sitagliptin was purchased from Biovision (Milpitas, CA, USA).

2.2 Covalent immobilization of biomolecules onto PET surfaces

Molecules grafting was based on Chollet *et al.* protocol (152). The PET films were first cleaned in ethanol under sonication for one hour. Then the materials were modified by hydrolysis and oxidation in order to promote the formation COOH groups on the PET surface (referred as "PET-COOH") (6); the PET-COOH material was immersed in a solution of EDC (0.2 M) and NHS (0.1M) in MES buffer (0.1M in MilliQ Water) for 17 h (referred as "PET-NHS"), surfaces were then rinsed out with ultrapure water for 2 hours. The immobilization of the biomolecules was realized in a solution of sitagliptin (10^{-3} M in ultrapure water, pH adjusted to 9 with NaOH solution) or peptides (GRGDS at 10^{-5} M in ultrapure water, pH adjusted to 6,5 with NaOH solution) for 15 h at room temperature. After grafting, materials were rinsed out in ultrapure water for 6 cycles of 15 minutes under ultrasonication (water was changed at every cycle) in order to remove the physically adsorbed peptides.

2.3 Preparation of micropatterned surface

Micropatterns on polymer surfaces were fabricated by photolithography as previously reported. Briefly, the surface of materials was coated with S1818 photoresist (Rohm and Haas, USA) and spun at 1100 rpm for 30 s to obtain a uniform photoresist layer with thickness of 2 μm . The surfaces were baked for 1 min at 100 $^{\circ}\text{C}$. The films were then exposed to UV light (60 W) through a high-resolution Cr mask with predesigned pattern dimensions for 8 s. The films were then developed in Microposit Developer solution (Rohm and Haas, USA) to dissolve exposed photoresist, resulting in the desired pattern on polymer surface.

2.4 Surface Characterization

2.4.1 X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

The surface chemical composition was investigated after each step necessary for the covalent peptide grafting by XPS using a PHI 5600-ci spectrometer (Physical Electronics, Eden Prairie, MN, USA). The survey spectra were recorded using a standard aluminum anode X-ray source (1486.6 eV) at 300W with charge neutralization. High-resolution C1s XPS spectra were recorded using standard magnesium X-ray source (1253.6 eV) at 150W without charge neutralization. Curve-fitting was performed by referencing each spectrum to carbon-carbon bond at 285.0 eV. The size of the analytical X-ray spot was about 0.5 mm². Three measurements per sample were carried out to ascertain the homogeneity of the surface modification.

2.4.2 Atomic force microscopy (AFM)

Surface roughness was determined by AFM on 20×20 μm² scanned areas using tapping mode (line scan rate = 1 Hz). Three measurements per sample were carried out at room temperature in a clean room with a Dimension 3100 Atomic Force Microscope (Veeco, Santa-Barbara, CA, USA) using etched silicon tips (OTESPA, tip radius of curvature <10 nm, aspect ratio ≈ 1.6/1). All conditions were tested three times, with three measurements on each surface. The surface roughness was calculated by the root mean square (R_{RMS}) parameter using NanoScope v.1.40 analysis software from Bruker.

2.4.3 Evaluation of carboxyl density by using Toluidine Blue assay

After all modification steps, the amount of carboxylic acid groups onto the films was quantified using the toluidine blue-O (TBO) method in which the dye stains the deprotonated acidic groups through ionic interaction. In brief, a solution of 5×10⁻⁴M TBO was prepared by dissolving TBO powder in NaOH solution (pH 10). Modified PET discs were placed in 10 mL of TBO solution and the samples under shaking for 6h. After TBO binding, the supernatant was removed from the tube and the stained PET surface was washed with NaOH solution (pH 10) and pure water two times. Five milliliters of 50% acetic acid was added to remove the TBO dye from the surfaces during 10 min. Two hundred microliters of the washed solution from each sample was loaded into a 96 well plate and the optical density at 633 nm was measured with a spectrophotometer (Biotek,

ELx808 absorbance Reader, USA). The concentration of the carboxyl groups was determined with a calibration curve (supplementary data, Fig. S2) containing several samples with different carboxyl group concentrations. The calculation is based on the assumption that 1 mole of TBO was complexed with 1 mole of carboxyl groups (268).

2.4.5 Evaluation of peptide density by fluorescence microscopy

Tagged fluorescent peptides were immobilized and analysed by fluorescence microscopy to determine the density of RGD on surfaces, according to Pichavant *et al.* (269,270). Briefly, TAMRA fluorochromes were covalently linked to the end of each of the peptides via Lysine (K) residue. The fluorescent peptides were immobilized onto PET, as described previously, and rinsed with tween 20 at 0,1% to avoid any aggregate and to remove adsorbed fluorescent peptides. The fluorescence intensity of the resulting surfaces was monitored using a fluorescence microscope (LeicaDM5500B, Germany) at 10X magnification. Native PET showed residual fluorescence intensity, which was subtracted considered as a blank for measurement of our peptides grafted surfaces. A calibration curve was first built for each labelled peptide by depositing a series of TAMRA-labelled peptide solutions with precisely measured concentrations on native and cleaned PET. The intensity of fluorescence was quantified with ImageJ software. The fluorescent surfaces were observed at the same magnification (x10 at 2000ms) and total fluorescence of the surfaces was quantified with ImageJ as well. Finally, the density of fluorescent peptides density was evaluated (in nmol/cm²) and determined according to the calibration curve.

2.4.6 Validation of the activity of grafted sitagliptin, DPP4 activity Assay

The DPP4 Activity Assay (BioVision, Milpitas, CA) kit was originally used to assess the activity of the DPP4 enzyme in tissue or cells. For the purpose of the present study, the protocol provided by the company was modified as following in order to be able to measure the inhibition of DPP4 with sitagliptin-grafted PET. The PET-Sitagliptin surfaces were incubated with DPP4 enzyme, DPP4 substrate and DPP4 assay buffer. After 30 minutes of incubation in darkness at 30°C, the fluorescence was measured at excitation and emission wavelengths of 360 nm 460 nm, respectively. PET-COOH and PET-NHS surfaces were used as negative controls. A standard calibration curve was prepared with

different concentrations of sitagliptin in solution to measure the inhibition of DPP4 in order to evaluate the amount of the surface-grafted biomolecule.

2.5 Cell culture

ECFCs were obtained from cord blood donation; all procedures were approved by the CHU de Québec - Université Laval ethics committee. Mononuclear cells were firstly isolated from total cord blood by density gradient centrifugation with Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, Canada). Cells were then rinsed out two times with PBS and centrifuged at 200G for 5 minutes and once in EGM2-MV (10% calf serum, Lonza, Basel). Cells were enriched with CD34+ cells by magnetic activated cell sorting on OctoMacs columns (CD34 microbead kit ultrapure, Miltenyi Biotec, Germany) according to the manufacturer's instructions. After cell sorting, the purity of CD34+ cells was above 92 %. CD34+ were finally plated on type-I collagen coated 48 wells plate or onto the various modified materials (surfaces were sterilized with 70% Ethanol overnight and rinsed with PBS before seeding) at a density of 2.5×10^5 cells per well. The medium (EGM2-MV, Lonza, Switzerland) was changed 4 days after plating, and every 3 days thereafter. Colonies were expected to appear around 12 to 15 days after plating. Colony appearance was continuously monitored. Cells were plated onto bioactive materials at day 19 post-plating. After 21 days post plating, cells were harvested or fixed for either RT-qPCR or immunofluorescence.

2.5.1 RT-qPCR

To study the abilities of PET modified surfaces to induce differentiation of late endothelial progenitor cells, we focus our research on RT-qPCR method. 21 days after seeding, emergent colonies were harvested, and the RNA was extracted from this cell population. To avoid contamination with mononuclear cells that weren't differentiated onto ECFCs, only the colony of pure ECFCs was harvested by scraping the unwanted cells. TRIzol™ Reagent solution was directly added to the wells (300 µL), the rest of the RNA isolation was made following the Invitrogen procedure. Genomic DNA was wiped out using Qiagen reverse transcription kit, following Qiagen instructions. After reverse transcription, gene expression was monitored using 7500 fast real-time PCR System (Applied Biosystems). PCR was performed using TaqMan® Fast Advanced Master Mix. TaqMan probes were used to quantify gene expression of CD34, KDR and vWF. GAPDH, YWHAZ and UBC were used as internal control, these set of housekeeping genes showed the lowest

variability in our experimental conditions (271). Results are shown in fold change following the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method (272).

CD34	Hs02576480_m1
KDR	Hs00911700_m1
vWF	Hs01109446_m1
GAPDH	Hs02786624_g1
YWHAZ	Hs03044281_g1
UBC	Hs00824723_m1

Table 10: TaqMan probes for RT-qPCR.

2.5.2 Differentiation of cells by fluorescent microscopy

Cells were seeded on the surfaces at a density of 50000 cell/cm² during 48h (with the first 24 hours in EBM2 and 24 hours in EBM2 with 5 % of fetal serum). Cells were fixed after 48 hours of culture with a 4% paraformaldehyde solution, permeabilized with 0.5% Triton-X100 and blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Samples were then incubated with mouse anti-human CD34 (clone 581), or mouse anti-human VEGFR2 (ThermoFisher) and rabbit anti-human vWF (ThermoFisher) primary antibodies at 37°C for 1h and coupled with Alexa Fluor-488 rabbit anti-mouse IgG secondary antibody or Alexa Fluor-8 donkey anti-rabbit 594 IgG secondary antibody (Invitrogen, France) for 30 min at room temperature. Nuclei were counterstained by DAPI (ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI ThermoFisher, Canada) for 10 min at room temperature. The samples were mounted and observed with fluorescence microscopy (LeicaDM5500B, Germany). Labelled-cell fluorescence was measured with ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). At least 30 cells per condition were analyzed in this study. To study if a cell is positive for a marker or not we decided to use CD34 expression of HSVECs to use as the background, this type of cell is known to not express CD34, in the same way we analyze cells expressing vWF with mononuclear cells vWF expression as the background.

3.RESULTS

SURFACE CHARACTERIZATION OF IMMOBILIZED BIOMOLECULES ON PET SURFACES

3.1 XPS

XPS was used to evaluate the chemical composition of the surfaces after the different modification steps. Surface compositions of the samples are shown in the XPS survey analyses in

Table 11, while high resolution C1s XPS spectra are shown in Figure 42. Native PET exhibits carbon and oxygen in a 0.38 ratio (Table 2), in close agreement with the value of 0.4 expected from the polymer chemical structure. The surface of these samples also displays a very low amount of nitrogen (1.4 ± 0.6 %), which is completely removed after the oxidation process. As expected, the hydrolysis and oxidation procedure lead to an increase of the oxygen surface concentration, with an O/C ratio now reaching 0.45, therefore supporting the potential formation of carboxylic acid groups on the PET surface. Successful activation of the carboxylic acid groups that reached 1.7%. Further grafting of peptides on the surface of PET was rather difficult to ascertain on the sole basis of the XPS survey spectra analysis and required a finer investigation of the XPS high resolution spectra coupled with fluorescence measurements. That said, surface conjugation of sitagliptin was unambiguously confirmed through the observation of a fluorine XPS signal, as this atom was not already present on the PET-NHS surface.

The high-resolution spectrum of carbon C1s shows three contributions in native PET which are C-C, C-H and C=C at 285.0 eV, C-O-C at 286.5 eV and O-C=O at 289 eV. After hydrolysis and oxidation, the proportion of C-O-C bonds decreased, concomitant to the increase of the proportion of O-C=O, in agreement with the formation of carboxylic acid functionalities.

The peptide grafting of GRGDS leads to the appearance of a component at 287.5 eV in the C1s high-resolution spectra, assigned to the peptidyl (N-C=O) bond. In the case of sitagliptin modified surfaces, the peak appearing at 292 eV, corresponding to CF₃ bond, confirm that sitagliptin is grafted on PET surface.

Table 11: Experimental atomic composition (%) obtained by XPS analysis for native and modified PET surfaces.

	%C	%O	%N	%F	O/C	N/C
Native PET	71.0±1	27.0±1	1.4±0.6	-	0.38	-
PET-COOH	69.0±1	30.0±1	0.3±0.6	-	0.45	-
PET-NHS	71.5±0.4	26.6±0.5	1.7±0.6	-	0.37	0.023
PET-GRGDS	73.0±0.9	26.1±0.8	1.2±0.3	-	0.36	0.016
PET-sitagliptin	70.2±0.3	24.5±0.3	3.2±0.2	1.8±0.4	0.35	0.046

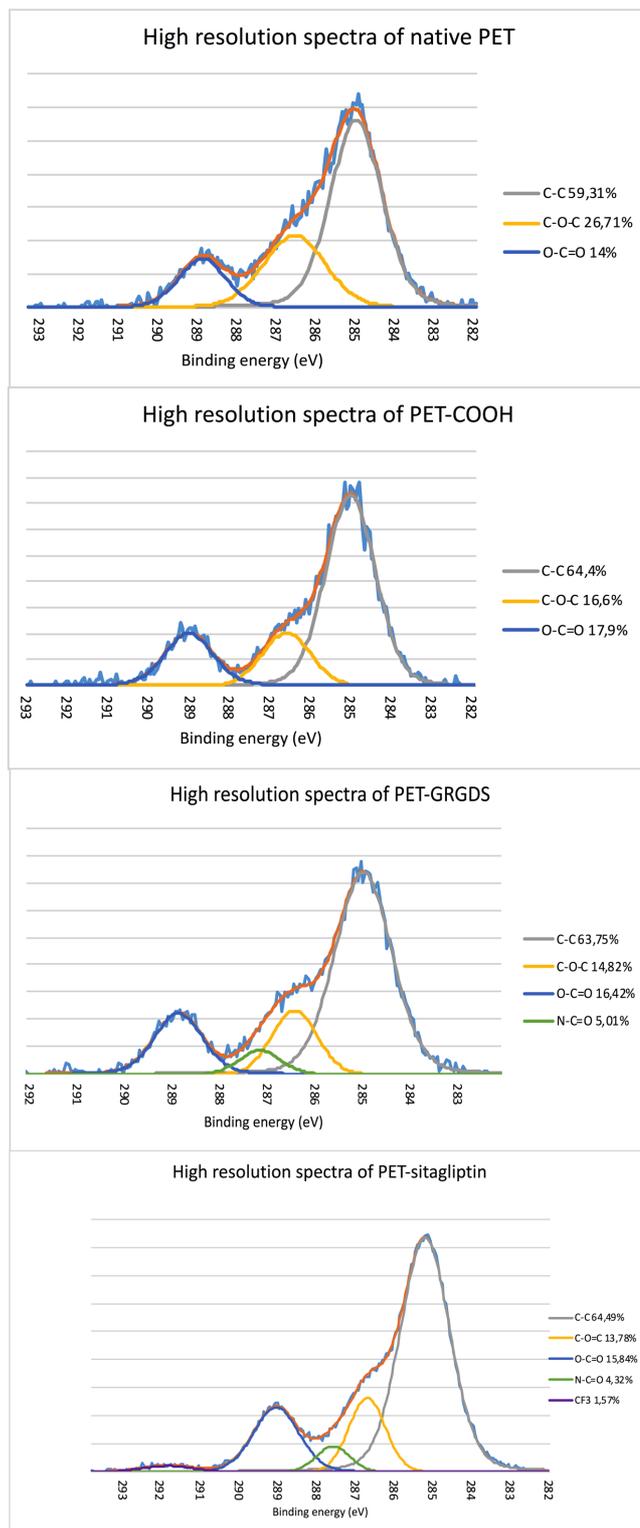


Figure 42: High resolution spectra of C1s, of all the steps of the modification of PET films.

3.2 Evaluation of surface topography by AFM

Table 12: Surface roughness (Ra, nm) of different surfaces by AFM analysis.

	Native PET	PET- COOH	PET- NHS	PET- GRGDS	PET- sitagliptin
Roughness Ra (nm)	5±1	10±1	12±2	11±2	11±1

The surface topography after all steps of surface modifications was evaluated and is shown in Table 12. The major changes were observed between native PET and hydrolyzed and oxidized PET. Indeed, the roughness (Ra) of native PET was 5±1 nm as compared to 10±1 nm for PET-COOH; the modification of surface roughness was expected as the film undergoes the hydrolysis and oxidation treatment which somewhat etched the extreme surface of the film. By contrast, the activation of the surface by EDC/NHS and further biomolecule immobilization did not significantly change the surface topography as the measured roughness of all these surfaces ranges between 11 and 12 nm.

3.3 Peptide density

Peptide density on each surface was evaluated with fluorescence microscopy. First, GRGDS-TAMRA fluorophore-tagged peptides were homogeneously immobilized on PET surfaces using identical strategy (see Fig.S1 in supplementary data) than the one used for unlabelled peptides. The red fluorescence emission intensity measured from the GRGDSK-TAMRA surfaces, enable to conclude to homogeneous peptide grafting and to measure this peptide surface concentration as being 1.9 ± 0.1 pmol/mm² (1,1 peptide/nm²), in Figure 43.

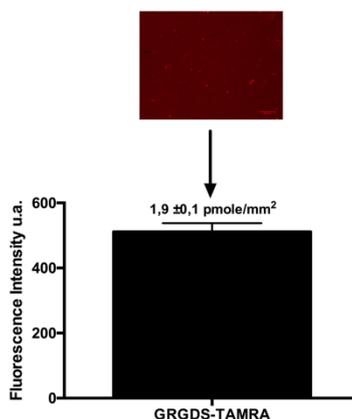


Figure 43: Fluorescent peptide density on PET surfaces, estimated by fluorescence microscopy. Fluorescent images of surface grafted with fluorescent peptides: a GRGDSK– TAMRA in red, 10^{-5} M in solution, 10^{-5} M in solution. (Scale bar 100 μ m).

3.4 Toluidine Blue-O assay

The Toluidine Blue-O test was used to evaluate carboxyl group density on surfaces after the different steps of the aforementioned surface modification procedure. Native PET already contains carboxyl groups due to the inherent presence of these chemical functionalities at the end of the polymer chains. However, the difference between native PET and PET-COOH, in terms of carboxylic acid functionality surface content, is significantly different, going from 18 ± 8 pmol/mm² (~ 11 COOH/nm²) for native PET, up to 145 ± 4 pmol/mm² (~ 87 COOH/nm²) for PET-COOH. After EDC/NHS, the carboxyl density decreased by more than half because of the binding of NHS on the COOH chemical groups (leading to a density of [COOH]= 66 ± 7 pmol/mm²; ~ 39 COOH/nm²). This means that the reaction yield between PET-COOH and EDC/NHS is approximately 55%, therefore explaining the presence of COOH residual groups. Further bioactive molecule grafting makes it difficult to predict the resulting surface concentration of COOH groups because the newly surfaces conjugated molecules contain various numbers of carboxylic acid groups

(two for the GRGDS). That said, the values of 77 ± 7 pmol/mm² (~ 46 COOH/nm²) for PET-GRGDS, and 70 ± 4 pmol/mm² (~ 42 COOH/nm²) for PET-sitagliptin are quite consistent and seem to demonstrate the successful grafting of these molecules. Taken together, the TBO and fluorescence microscopy data enable to confirm covalent surface peptide grafting as well as measuring the peptide surface concentration.

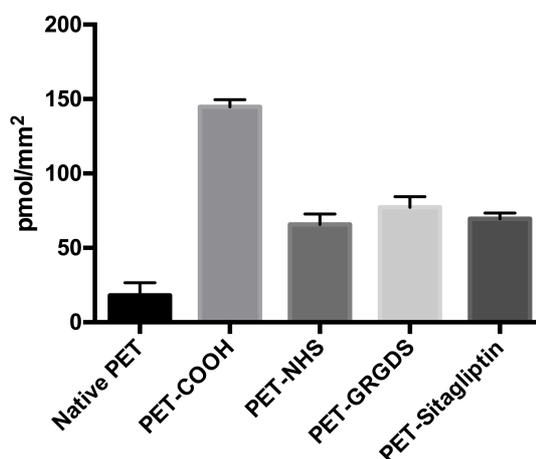


Figure 44: Evaluation of COOH density onto modified surfaces. Differences are significant between native PET and the rest of the modified surfaces. In the same way value of COOH densities of oxidized surfaces is significantly higher compared to all others surfaces. p value ≤ 0.0001 .

3.5 Inhibition assay of DPP4 by sitagliptin grafted surfaces

PET-sitagliptin surfaces were tested for their ability to inhibit the dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) enzyme. The results obtained with this method reveal that even when grafted on a surface, sitagliptin is able to inhibit DPP4 enzyme.

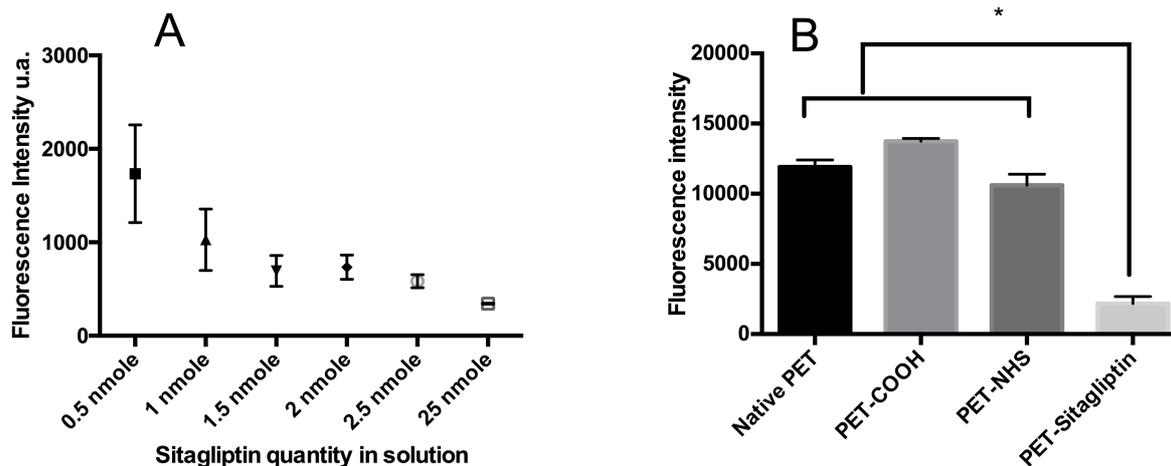


Figure 45: Standard curve of DPP4 inhibition with sitagliptin in solution (A) Inhibition of DPP4 by sitagliptin immobilized on PET film (B) p value ≤ 0.0001 . DPP4 cleaves a substrate to release a quenched fluorescent group (Excitation/Emission wavelengths = 360/460 nm). In presence of a DPP4 inhibitor, the cleavage is inhibited. A lower fluorescence corresponds to the inhibition of DPP4.

As shown in Figure 45A, only a small amount of sitagliptin is required to inhibit the DPP4 activity as 0.5 nmole is enough to reduce the fluorescence by a factor of 100. For the sitagliptin-grafted surfaces (see Figure 45 B), the fluorescent signal is clearly decreased as compared to the control samples. This means that sitagliptin keeps its activity even if it is immobilized on a surface. Moreover, this molecule surface concentration is estimated to be between 0.25 nmole and 0.5 nmole from the standard curve presented in Figure 3A, considering that sitagliptin was grafted on both side of the 2 cm² PET samples. This amount of grafted sitagliptin on the PET surfaces enables a significant reduction of the cleavage activity of DPP4 without cells (see Figure 45B).

3.6 Micropatterning of surfaces, validation of the method and patterns

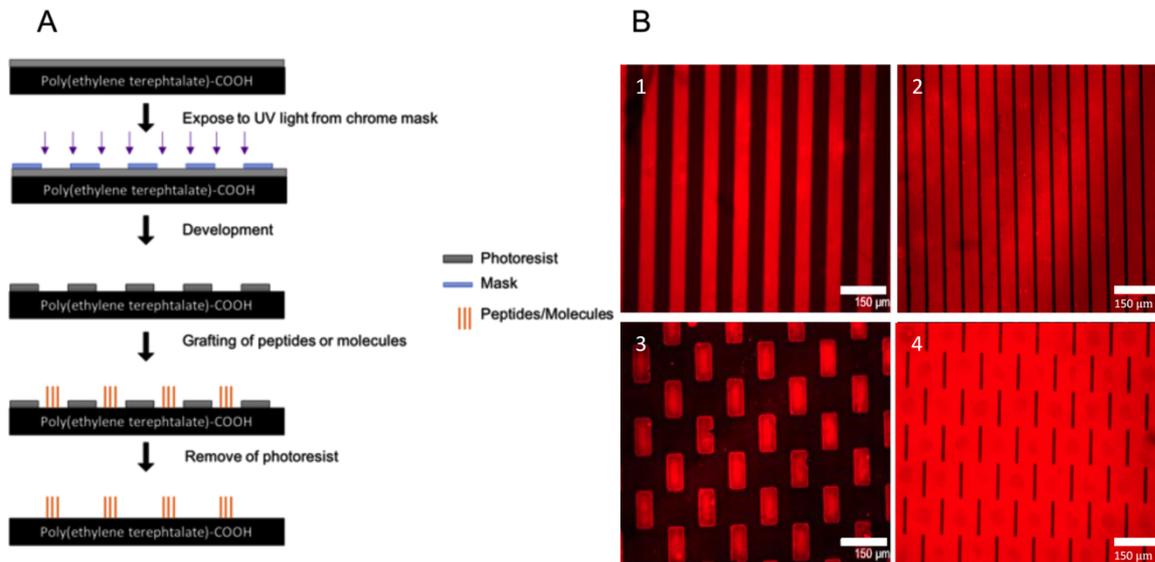


Figure 46: (A) Schematic representation of peptide micropatterning onto polymer surfaces using photolithography. (B) Fluorescence microscopy images of the four patterns used in this work; Lines of 50 μm (1) or 10 μm (2) and rectangles of 50 μm (3), and rectangles of 10 μm width (4). Here GRGDSK-TAMRA (in red) and sitagliptin (1,2,3, and 4, sitagliptin is not conjugated with a fluorophore) were co-grafted to prove that we are able to graft two peptides on the same surfaces with controlled design (3).

To ascertain the photolithography process, immobilization of fluorescent peptides (GRGDSK-TAMRA) onto polymer surfaces was used for validation. The surfaces with fluorescent peptides and various geometries are shown in Figure 46 A and B. These data confirm the successful grafting of peptides onto polymer surfaces, the size of the patterns and the excellent definition of the peptide area contour. All micropatterned surfaces were bifunctionalized with the GRGDS/sitagliptin couple.

IN VITRO EVALUATION

3.7 Differentiation of ECFCs on bioactive surfaces

We sought to determine whether and how much ECFCs cultured and adhered on bioactive surfaces express characteristic features of stemness or endothelial cells lineage. Therefore, we measured mRNA expression of endothelial lineage cell surface markers (KDR and vWF) and stem cells markers (CD34) in ECFCs adhered to modified PET

surfaces using RT-qPCR and protein expression of the same markers using immunofluorescence. Oxidized PET surfaces were used as control for all modified surfaces while collagen-coated surfaces were also used as reference because ECFCs were cultured on collagen coated surfaces *in vitro*. At this point, homogeneous and micropatterned surfaces were investigated. The homogeneous investigated surfaces were PET-COOH, PET coated with collagen, GRGDS-PET, sitagliptin-PET, and a mixture of GRGDS and sitagliptin grafted onto PET. For the micropatterned surfaces, lanes with different width and broken and staggered lines were all bifunctionalized, with GRGDS peptides and sitagliptin in order to provide surfaces with both adhesion and differentiation molecules.

As seen in Figure 47A, the CD34 gene expression on most of the investigated surfaces, with the exception of PET-COOH, collagen, and PET-GRGDS. Sitagliptin, even grafted, is able to downregulate the expression of CD34. Of note, bifunctionalized surfaces, either homogenous or micropatterned, lead to a downregulation of the CD34 gene expression, meaning that the presence of the sitagliptin together with the microstructuration have an impact on the expression of CD34. The expression of CD34 was then analyzed by fluorescence microscopy and enable to conclude that the PET-GRGDS surfaces exhibit the highest expression, therefore indicating that those homogeneous surfaces have the ability to maintain the stemness character or delay the differentiation. Cells harvested from sitagliptin surfaces and GRGDS/Sita 10x50 exhibit a lower expression of this marker as compared to the calibrator and the control samples, meaning that this molecule is able to induce the downregulation of CD34. There are no significant differences among the other conditions.

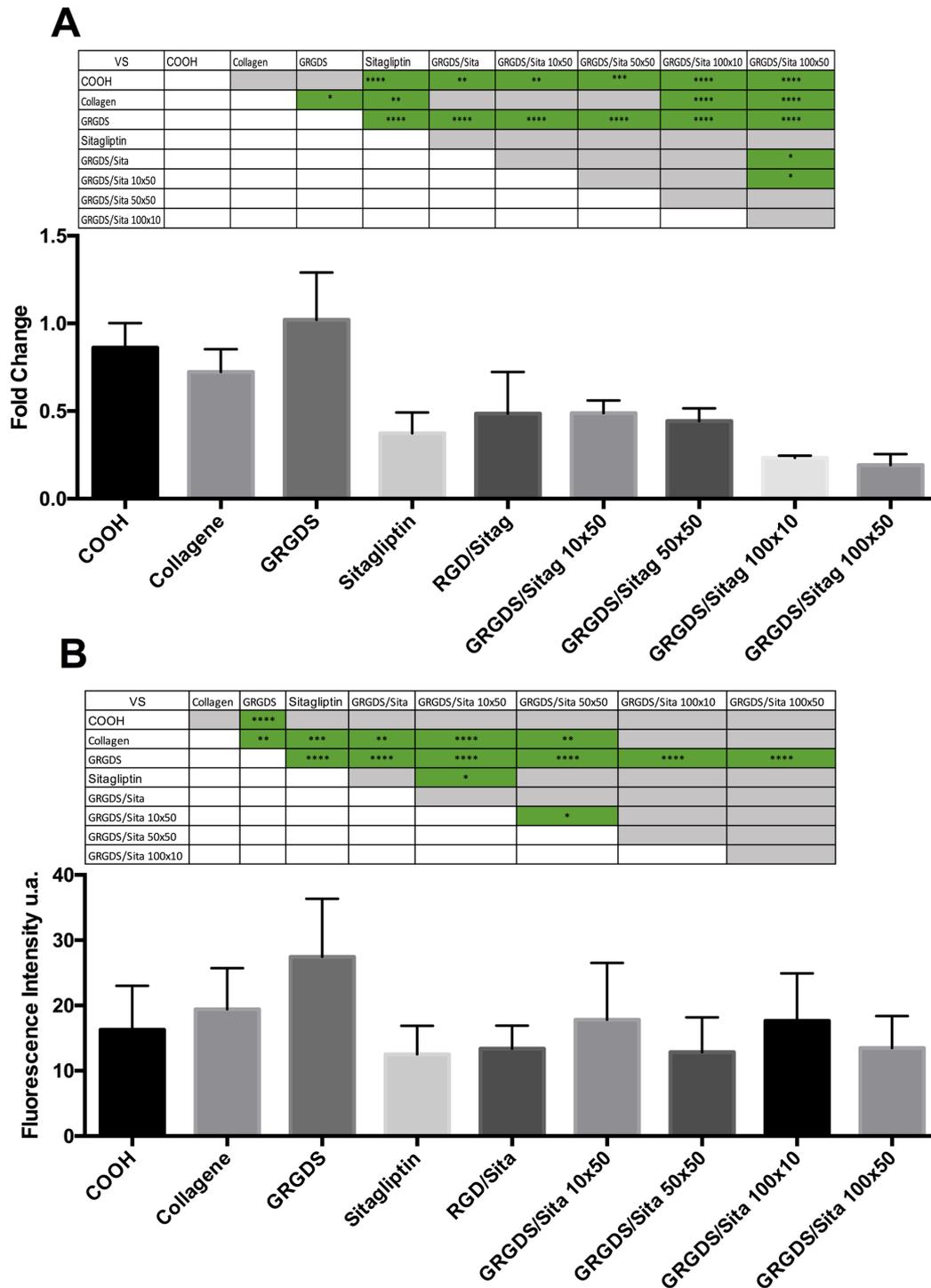


Figure 47: CD34 gene expression measured by RT-qPCR (A) and CD34 protein expression evaluated by fluorescence microscopy (B) on the surfaces grafted with GRGDS and sitagliptin. For a practical approach the statistical analysis is presented on a table. The statistical analysis was done by a One-way ANOVA followed by a Tuckey analysis. P values are represented as following * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001 , **** ≤ 0.0001 .

In order to assess the endothelial lineage phenotype, we investigated the mRNA of KDR (also called VEGFR2) (Figure 48A) and vWF (Von Willebrand Factor) (Figure 48C). KDR expression is largely upregulated compared to the calibrator (ECFCs at P0) for all investigated conditions. However, three conditions stand out from the others, and display a fold change value about 4, oxidized surfaces, GRGDS grafted surfaces and GRGDS/sitagliptin 100x10 patterned surfaces. Those three surfaces have a significantly higher impact on ECFCs compared to other conditions tested.

Von Willebrand Factor is expressed in the calibrator. The gene expression in qPCR results seems downregulated on cells harvested from bioactive surfaces (Figure 48C). However, results showed that four surfaces emerge from all the conditions, namely oxidized surfaces, GRGDS-grafted surfaces and patterned surfaces with GRGDS/sitagliptin 100x10 and GRGDS/sitagliptin 100x50. Here the expression of vWF is still lower than the calibrator but remains higher than other conditions, meaning that these surfaces are able to induce more expression of vWF than the others that were investigated. In that way, GRGDS/sitagliptin 100x10 surfaces appear to be the substrate that gives the higher response, followed by GRGDS surfaces and GRGDS/sitagliptin 100x50. Overall, the results indicate that GRGDS, either micropatterned or homogenous grafted, lead to a phenotype more directed to the endothelial cells lineage while, at the same time, retaining the stemness character of the cells. Sitagliptin grafted surfaces alone does not promote the expression of endothelial markers. However, when associated with microstructuration and the GRGDS peptide, sitagliptin can upregulate vWF gene expression.

In general terms, microstructured surfaces grafted with GRGDS/sitagliptin in the conditions 100x10 and 100x50 exhibit a higher expression with vWF. The GRGDS/sitagliptin 100x10 surface, enable to reduce the stemness phenotype on ECFCs and induce the expression of endothelial lineage marker. Finally, some of the GRGDS/sitagliptin patterns performed better than the homogeneously GRGDS/sitagliptin coated surfaces, therefore pointing toward the impact of micropatterning on ECFCs differentiation.

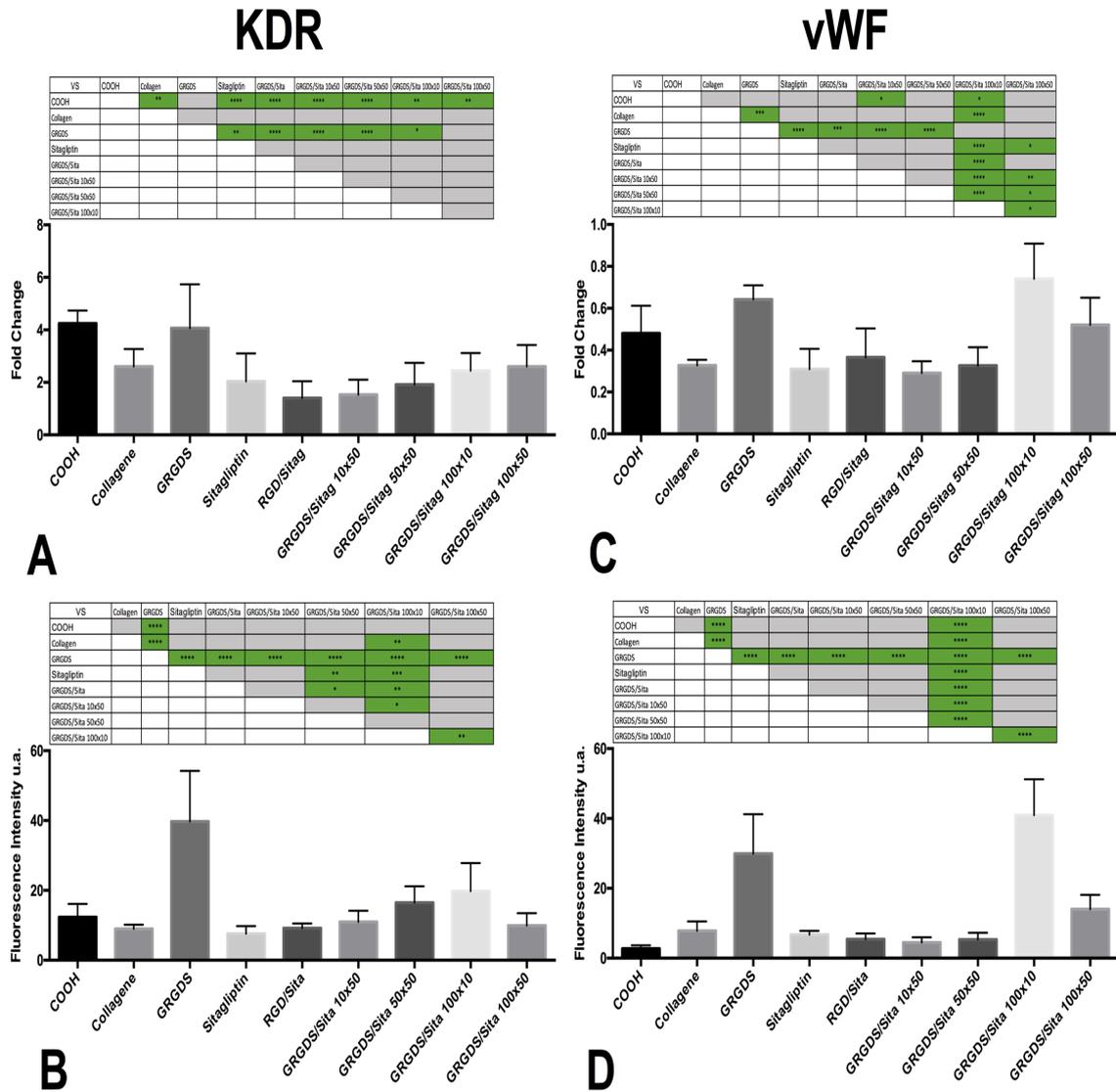


Figure 48: Expression of KDR (A and B) and vWF (C and D) on the surfaces grafted with GRGDS and sitagliptin. RT-qPCR results are expressed in fold change (A and C), immunofluorescence quantifications are represented on the graphs B and D. For a practical approach the statistical analysis is presented on a table. The statistical analysis was done by a One-way ANOVA followed by a Tuckey analysis. p values are represented as following * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , * ≤ 0.001 , **** ≤ 0.0001 .**

The vWF and KDR gene expression were further confirmed by immunofluorescence measurements (Figure 48 B and D). The most obvious outcome here is that the surfaces grafted with GRGDS and GRGDS/Sita 100x10 exhibits the highest gene and protein expression as compared to the other investigated surfaces. Of note, the GRGDS/sitagliptin 100x10 microstructured surfaces stood out from the other investigated samples in terms of vWF expression, therefore pointing toward a clear potential for GRGDS/sitagliptin 10x100 microstructured surfaces to promote a more endothelial phenotype to EFCFs.

From all the conditions tested, either homogeneously or patterned, only few were able to reduce the expression of stemness markers and raise the expression of endothelial markers. For example, the GRGDS coated surfaces were able to increase the expression of KDR and vWF with, however, no significant decrease of the CD34 expression as compared to the control. Sitagliptin was shown to downregulate CD34 expression without increasing the expression of endothelial markers. However, when co-conjugated with GRGDS as 10x100 patterns, sitagliptin enable the expression of both KDR and vWF, as seen by both RT-qPCR and immunofluorescence experiments.

The fluorescence microscopy can enable us to quantify the expression of certain markers by measuring the fluorescent intensity of region of interest. To have a proper quantification the expression of at least 30 cells is necessary. But this technique associated with the good control can tell us whether a cell is positive for a marker or not. Here we choose to determine which surface gives the highest percentage of cells that are positive for CD34 and vWF. We know that HSVECs do not express CD34 stemness marker then the mean fluorescence intensity of the expression of CD34 on HSVECs is set as the background and all the cells on the other condition with a fluorescence intensity higher than the mean fluorescence of HSVECs should be considered as positive for the marker. Consequently, the percentages of positive and negative cells for the marker is determined (see Table 13 and Table 14).

Table 13: Quantification of CD34-positives after 2 days of culture onto various bioactive surfaces. The expression of CD34 by HSVECs was used as the background. The average fluorescence value of HSVECs and other conditions was compared on immunofluorescences images. A cell is positive when the fluorescent intensity value of the region of interest (the entire cell) is higher than the average fluorescent intensity value of HSVECs (the standard deviation was included in the value). At least 30 cells were measured for each condition.

	Negative cells %	Positive cells %
COOH	15	85
Collagen	15	85
GRGDS	0	100
Sitagliptin	50	50
GRGDS/Sita	32	68
GRGDS/Sita 10x50	30	70
GRGDS/Sita 50x50	35	65
GRGDS/Sita 100x10	48	52
GRGDS/Sita 100x50	48	52

Results presented in the Table 13 showed that all cells seeded on the GRGDS surfaces (100% of the cells) still express CD34 after 48 hours of seeding. The same results are obtained with the control surfaces, the oxidized PET and the collagen (85% of the cells are CD34-positives). However, when cells are in contact with sitagliptin for 2 days, the percentage of CD34-positive cells decrease. These results confirm the potential of sitagliptin on the differentiation of ECFCs. Regarding the micropatterning, the GRGDS/Sita 100x10 and GRGDS 100x50 give the lower quantity of CD34-positive cells (52%). When grafted homogeneously with the GRGDS cells are expressing more CD34 (85% of the cells

are CD34-positives). Here, the bi-functionalization with GRGDS seems to have an impact on the expression of stemness markers.

For vWF the same quantification was established with mononuclear cells as the background, that type of cells does not express vWF.

Table 14: Quantification of vWF-positives cells after 2 days of culture onto various bioactive surfaces. The expression of vWF by CD34+ cells was used as the background. The average fluorescence value of CD34+ cells and other conditions was compared on immunofluorescences images. A cell is considered as positive when the fluorescence intensity value of the region of interest (the entire cell) is higher than the average fluorescent intensity value of CD34+ (the standard deviation was included in the value). At least 30 cells were measured for each condition.

	Negative cells %	Positive cells %
COOH	77	23
Collagen	82	18
GRGDS	5	95
Sitagliptin	61	39
GRGDS/Sita	48	52
GRGDS/Sita 10x50	65	35
GRGDS/Sita 50x50	83	17
GRGDS/Sita 100x10	7	93
GRGDS/Sita 100x50	22	78

The endothelial marker vWF here (see Table 14) seems to be upregulated with the grafting of GRGDS onto the surfaces. When the ratio of GRGDS is higher than the sitagliptin for example on the GRGDS/Sita 10x50 the value of vWF-positive cells is 35 % and when the ratio of GRGDS is lower on GRGDS/Sita 50x50 the number of vWF-positive cells decreases (17%). For GRGDS/Sita 100x10 and GRGDS/Sita 100x50, the percentage of positive cells remains high, here the quantity of GRGDS is higher than GRGDS/Sita

50x50. For KDR this quantification was not possible, this marker is one of the first endothelial lineage marker to appear during the process of differentiation, it was already expressed on CD34+ cells after 4 days in culture.

4. DISCUSSION

Autologous endothelialization appears like the best strategy to improve hemocompatibility of synthetic vascular substitutes. The ideal strategy would be to develop a bioactive material able to selectively recruit or capture EPCs from the bloodstream, help them to proliferate and differentiate to form a full monolayer in the prosthesis.

The aim of this study was to immobilize three active principles to study the specific interaction between the modified substrates and endothelial progenitor cells. Among these three biomolecules, one of them was chosen for its cell adhesive ability (GRGDS peptide), while the two others were selected to induce differentiation of ECFCs into mature endothelial cells (sitagliptin). The two peptides were isolated from cell *in vivo* environment, from components of the extracellular matrix. Cells are sensitive to physical, biochemical and chemical stimuli from their surrounding environment, and using a molecule already in the ECM can promote a better cell response (273–275). The process of endothelial progenitor differentiation has not been studied widely. Moreover, the influence of constrained 2D environments with geometrical and chemical cues on endothelial differentiation from ECFCs has not been previously examined.

PET substrates modified with GRGDS, REDV, YIGLR or SVVYGLR were used to enhance adhesion, proliferation and migration of endothelial mature cells. The RGD is the most common peptide motif responsible for cell adhesion, but this tripeptide is not specific for endothelial cells (131,138). This RGD peptide is well known to be cell adhesive with an interaction with cell integrins but not specifically for endothelial cell adhesion (129).

The four-step modification procedure was employed to covalently immobilize these bioactive molecules (GRGDS or/and sitagliptin) onto PET surfaces (see in supplementary data). All the steps of the grafting of each molecule onto PET surfaces were characterized by XPS (Figure 42), AFM and toluidin blue assay (Figure 44). The peptide density on PET surfaces was evaluated by fluorescence microscopy and was similar on each surface, 1,1 GRGDS/nm² (see figure supplementary data). In the case of PET-sitagliptin, the density of

this latter molecule was evaluated with an enzymatic assay (Figure 45). The fact that each biomolecule was immobilized onto PET surfaces by the same conjugation scheme with a similar surface density makes it possible to compare the specific effects of each peptide onto ECFCs behaviors. As previously demonstrated by Massia and Hubbel, the minimal density of RGD peptide to improve cell adhesion is 1 fmol/cm² while 10 fmol/cm² are required to form focal contacts for fibroblasts (276). In the case of endothelial cells, Le Saux *et al.* showed that a density of 6x10⁵ RGD molecules/mm² (or 0,1 fmol/cm²) is necessary to induce adhesion of ECs and that 6x10⁸ RGD/mm² (or 10 fmol/cm²) is the minimum peptide surface density for cells spreading on RGD-modified gold samples. Chollet *et al.* showed that MC3T3 and endothelial cells were able to form focal contacts with RGDC-modified PET at a density of 1 pmol/mm². At a lower density the number of adhered cells was lower and the area of focal adhesion was smaller at a density higher than 2,4 pmol/mm² the number of cells adhered decreases (138,277,278). In the present study, the surface density of GRGDS on PET was found to be 1.9±0.1 pmol/mm² which is by far enough to have an effect on the adhesion and spreading of cells. According to previous studies, materials grafted with such a high density of RGD peptide showed an enhanced cell adhesion and focal contact size (131,138,152).

As the endothelial cell is an adherent type of cell, their precursor needs then to adhere to the extracellular matrix (ECM) or to a substrate to achieve differentiation. It was demonstrated that fibronectin coated surfaces promotes differentiation of CD34+ cells from cord blood with induction [60] by VEGF, either *in vitro* and in animal tumor models (115,279). After adhesion, on ECM or on a substrate, the second step of differentiation is the proliferation of the EPCs. In the work of Igreja *et al.* (280), gene expression shows that EPCs can achieve at least 100 time doubling of population before senescence due to high telomerase activity (61,281). The third and last step is the acquisition of endothelial markers (VE-cadherin also known as CD144, CD31, vWF) and gene associated with endothelial function, such as eNOS by the adhesive EPCs (282). Expression of endothelial surface and functional markers appear after two to three weeks of culture (280,282). By following the stem cell marker CD34, we were able to follow the differentiation of ECFCs seeded on surfaces, this marker undergoes gene expression modulation depending on the surfaces. Cells harvested on the GRGDS surfaces and control COOH and collagen exhibit the highest expression. The surface grafted with sitagliptin promote the differentiation of ECFC by decreasing the expression of CD34. Micropatterned surfaces GRGDS/Sita 100x10 can

promote the expression of vWF and KDR as long as the downregulation of stemness markers. The microfeatures here are able to promote the downregulation of CD34 leading to nearly mature endothelial cells. It has been shown that constrain endothelial cells in a geometrical cue has an impact on their fate (263,283,284). With their work, Kusuma *et al.* showed that on 2D micropatterned surfaces (grafted with fibronectin), human induced pluripotent stem cells cultured on smaller island of fibronectin promoted EC differentiation with a yield of 70 % for 80 μm of diameter against 50 % for cells seeded onto bigger patterns 225 and 500 μm (285). Here once again, the size of the 2D structuration matters and allows a better regulation of differentiation of cells.

In the present work, cell confinement was achieved with biochemical restriction. The gene expression of cells seeded onto microstructured surfaces is still little-known. Huang *et al.* showed that the expression of Krüppel-like factor 2 (KLF2), a transcription factor known for its fluid shear stress dependence, was increased not only to ECs under fluid shear stress but also for cells that were elongated by micropatterning (286). One can then hypothesize that similar results can be obtained with other endothelial markers such as KDR and vWF. It is well known that shear stress induces gene expression modifications on ECFCs (287–289). The present study added up some additional information as it showed that the chemical cues and the geometric biological constraint have an effect on their differentiation by reducing CD34 expression for the benefit of KDR and vWF expression.

KDR expression is known to be modulated by the relation between integrin and fibronectin from the extracellular matrix (115,290). Here, the results enable to conclude that there is a correlation between the cells adhesion and the expression of KDR, as the expression of this marker is higher on cells harvested from GRGDS surfaces. The binding of $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_5\beta_3$ subunit of integrins to extracellular matrix protein such as fibronectin and collagen is likely to elevate the expression of VEGF and VEGFR2 (or KDR) (291).

In the present study, modulation of cell adhesion was made through GRGDS, as the interaction between the $\alpha_5\beta_1$ integrin and fibronectin have been shown to be essential in the initial step of differentiation (126,280). Moreover, the $\alpha_5\beta_3$ integrin plays a role in the cell homing and adhesion through an interaction with RGD as the main ligand (292). Indeed, it seems that EPCs differentiation is triggered by adhesion to the ECM or an equivalent substrate. It has been shown that shear stress is a key factor for ECFCs adhesion, as they respond to shear stress that can transmit signals into the cell, and finally resulting in

induced-mechanotransduction response. However, the precise mechanism by which mechanotransduction is transformed into cell response remains unclear (288,293). The literature proves that adhesion is the critical factor to consider when recreating the lining of endothelial cells onto a biomaterial. In this context, the use of adhesive peptide can be beneficial to induce the differentiation of ECFCs.

However, another phenomenon can regulate the homing and the differentiation of EPCs. For instance, SDF-1 α /CXCR4 is the major pathway that can control the homing and migration of circulating progenitors cells to a vascular damaged site (164,294). After a vascular injury which damages the endothelial monolayer (with detachment of cells), attached platelet, smooth muscle cells and activated endothelial surrounding cells secrete SDF-1 α . This latter factor can bind with CXCR4 which is expressed at circulating endothelial progenitors and thus promotes their recruitment to the vascular lesion. This interaction is regulated by DPP4, which is freely circulating in the serum and expressed on the surface of progenitor cells. As sitagliptin is able to inhibit DPP4, the binding of SDF-1 α on CXCR4 is therefore possible, leading to the recruitment and homing of cells at the surface of our materials. *In vivo*, treatment with sitagliptin can increase the mRNA and the protein expression of SDF-1 α and CXCR4 in a model of mice subjected to a critical limb ischemia (295). Sitagliptin alone is not sufficient to promote ECFCs differentiation, when the microstructuration is added along with the GRGDS peptide, the expression of endothelial lineage markers is higher. Further studies would imply to determine if the microstructuration of only one peptide could give the same response.

Several studies have already shown that the surface conjugation of peptides or biologically active molecules, was able to drive processes such as adhesion, proliferation, and differentiation of cells. The present work demonstrated that the presence these molecules on the material surface is not the sole determinant of cell fate. Indeed, their spatial organization also has a key influence. The link between the interaction of integrin and extracellular matrix in endothelial differentiation is already demonstrated. The bi-functionalization of an adhesive molecule and a molecule known to induce the differentiation of endothelial progenitor cells according to a well-defined organization can be a promising approach in clinical application to achieve a faster differentiation of ECFCs into ECs resulting in a functional endothelium.

5. CONCLUSION

In this study, the potential use of cell adhesion molecules such as RGD, and sitagliptin, to induce differentiation of ECFCs and obtain monolayer of endothelial cells functions on polymer surfaces was assessed. Covalent immobilization of each peptide alone is sufficient to facilitate mononuclear cells ECFCs attachment.

Sitagliptin is able to induce a rapid differentiation of ECFCs by the modulation of the gene expression of CD34, KDR, and vWF. It is clear that the geometrical cues can have an impact on cell fate depending on the shape and the size. The GRGDS-sitagliptin 100x10 surface is the biomaterials capable of promoting the differentiation of ECFCs. The bi-functionalization together with the micropatterning of GRGDS peptides and sitagliptin has potential applications in promoting endothelialization. They are able to induce the differentiation of ECFCs in an efficient lining of mature cells, and they can serve for the construction of an endothelial cells layer *in situ* giving improving the hemocompatibility of synthetic graft surfaces.

ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge the “Region Aquitaine”, the National Science and Engineering Research Council (NSERC-Canada), and the Centre Québécois sur les Matériaux Fonctionnels (CQMF) for financial support. Marie-Pierre Foulc and Jeanne-Marie Granger from Rescoll for their help on the surface characterization. Cedric Ayela (IMS Bordeaux, France) and Christian Sara-Bournet (Sherbrooke University, Canada) for the training in the photolithography process and the manufacture of the mask. Reine Bareille, Noélie Thébaud, and Audrey Aussel from Biotis (Bordeaux, France) for their help and insight on ECFCs extraction and culture.

Supporting Information

Bioactive Micropatterning of Biomaterials for Induction of ECFCs Differentiation

Caroline Royer¹⁻²⁻³⁻⁴⁻⁵, Andrée-Anne Guay-Bégin⁴, Christel Chanseau¹, Pascale Chevallier⁴⁻⁵, Laurence Bordenave⁶, Gaétan Laroche^{4-5, *, †} and Marie-Christine Durrieu^{1-2-3, *, †}

¹Univ. Bordeaux, Chimie et Biologie des Membranes et Nano-Objets (UMR5248 CBMN), Pessac (France)

²CNRS, CBMN UMR5248, Pessac (France)

³Bordeaux INP, CBMN UMR5248, Pessac (France)

⁴Laboratoire d'Ingénierie de Surface, Centre de recherche du CHU de Québec - Université Laval, Hôpital Saint-François d'Assise, Canada

⁵Département de génie des mines, de la métallurgie et des matériaux, Centre de Recherche sur les Matériaux Avancés, Canada

⁶Université Bordeaux, INSERM U1026, Bioingénierie tissulaire, Bordeaux (France)

(* : equally contributed)

(† : corresponding authors)

Content

Fig. S1. Sequence of the PET surface modification procedure.

Fig S2. Acid acetic calibration plot for evaluation of the carboxyl groups density on the surface modified PET samples.

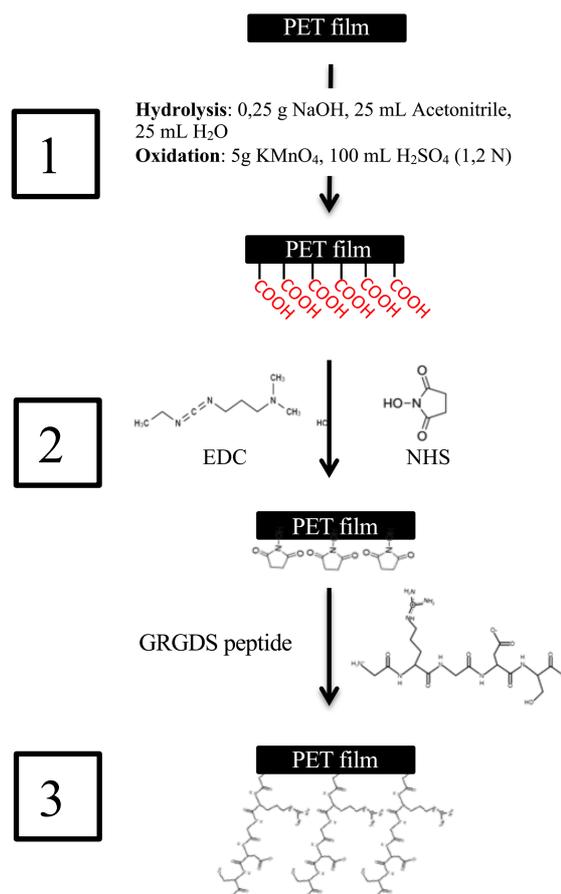


Fig. S. 1 Sequence of the PET surface modification procedure. (1) PET surface preparation in order to obtain –COOH end chains, (2) reaction with dimethylaminopropyl-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS), (3) immobilization of GRGDS through amine bonding. Sitagliptin is grafted the same way.

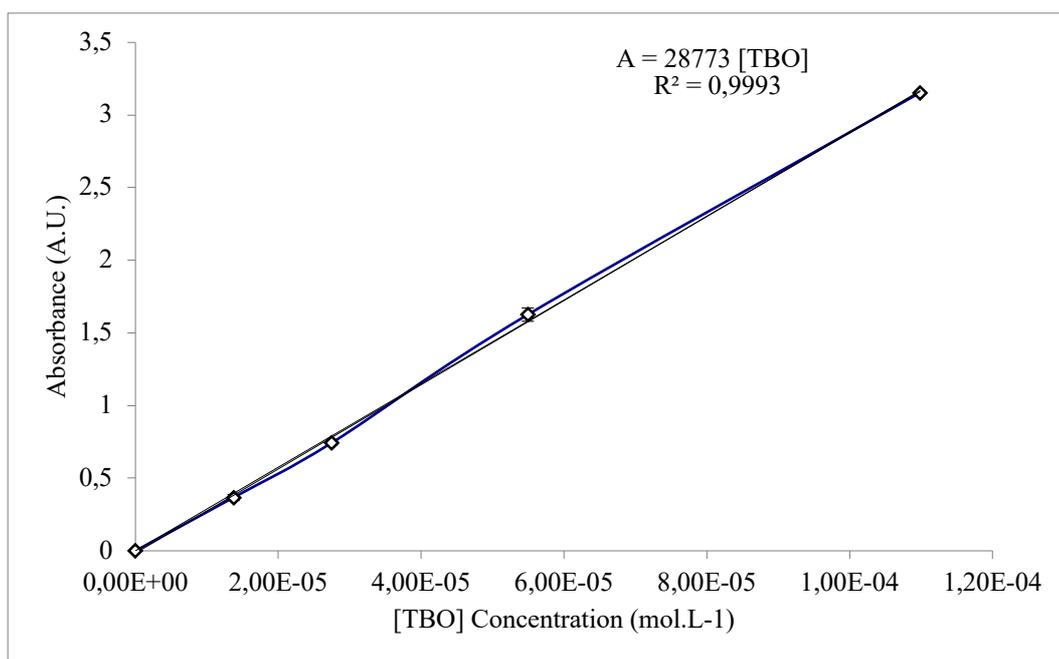


Fig. S. 2 Acid acetic calibration plot for evaluation of the carboxyl groups density on the surface modified PET samples. The concentration of the carboxyl groups is determined with a calibration plot containing several samples with different carboxyl group concentrations. The calculation is based on the assumption that 1 mol of TBO has complexed exactly with 1 mol carboxyl groups. In black the tendency curve.

Chapitre 5 : Étude complémentaire

VERS UNE ADHESION SELECTIVE DES ECFCs ET LEUR DIFFERENCIATION

Le greffage d'un peptide spécifique pour l'adhésion des ECFCs, pourra permettre cibler ces dernières seulement. Le peptide RSFLLRN permet la mobilisation et la différenciation des ECFCs (155), pour greffer cette molécule en surface nous avons utilisé la même stratégie que pour le peptide GRGDS et la sitagliptine (voir Fig. S. 1). Le peptide GHM permet l'adhésion sélective de cellules endothéliales progénitrices (159). Pour le greffage du peptide GHM, une autre stratégie de greffage a été adoptée (Figure 49). En effet, ce peptide de 23 acides aminés contient amines secondaires capable de réagir avec les groupements carboxyles. Nous avons donc choisi d'utiliser la cystéine sur l'extrémité C-term pour le greffage afin de garantir que l'extrémité active en N-terminale soit libre d'accès.

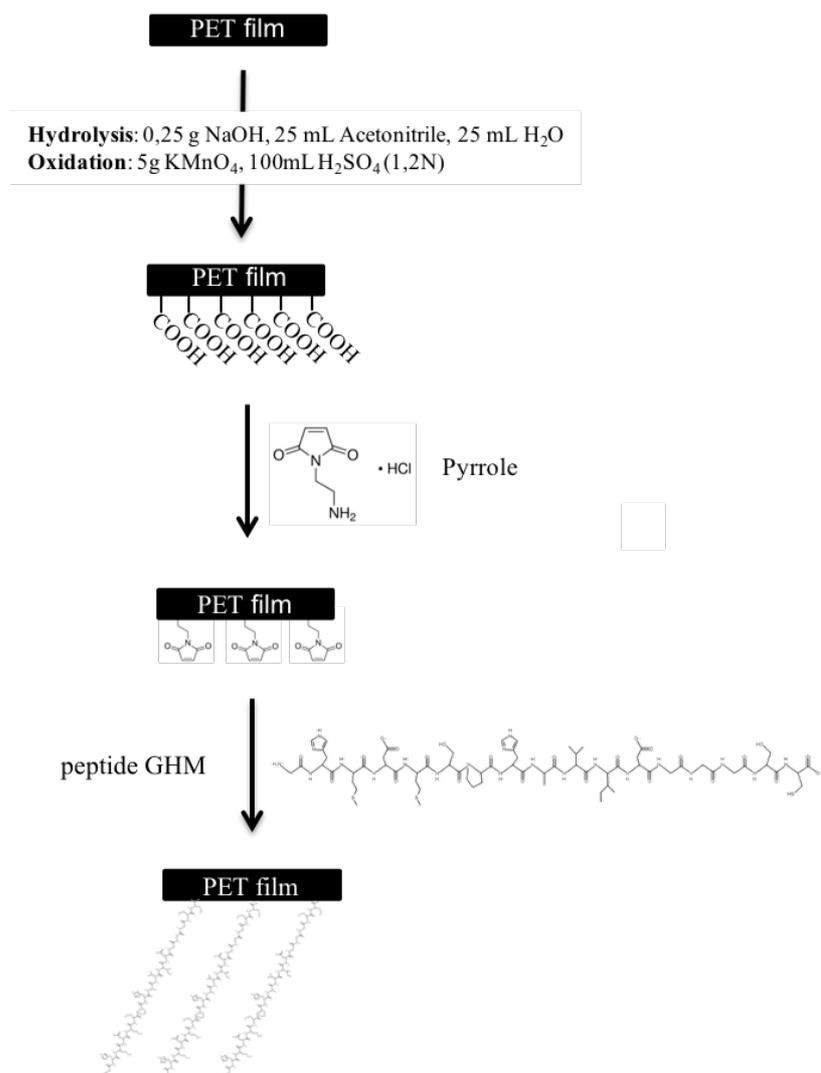


Figure 49 : Séquence de modification du PET-GHM. (1) Préparation des surfaces de PET pour obtenir des groupements carboxyles (–COOH), (2) Réaction avec le 1-(2-amino-ethyl) -pyrrole-2,5-dione hydrochloride (pyrrole), (3) immobilisation du peptide GHM.

De la même manière les surfaces PET-GHM et PET-RSFLLRN ont été évaluées par XPS, AFM, TBO et par microscopie à fluorescence. Pour le greffage peptidique, nous utiliserons un autre bras d'ancrage qui permettra de lier le maléimide du pyrrole avec les groupements sulfhydryles des thiols présents dans la formule développée du peptide (celui-ci contient des cystéines). Les résultats de composition de surfaces obtenue par XPS montrent que le pourcentage d'azote en surface augmente avec le greffage de l'intermédiaire et du GHM mais aussi après le greffage du peptide RSFLLRN.

Table 15 : Composition de surface des matériaux obtenus par XPS, % atomique.

	%C	%O	%N	O/C	N/C
PET-Pyrrole	72,5±0,3	26,3±0,4	1,2±0,1	0,36	0,017
PET-GHM	72,6±0,4	26,1±0,7	1,2±0,3	0,36	0,017
PET-NHS	71.5±0.4	26.6±0.5	1.7±0.6	0.37	0.023
PET-RSFLLRN	72±1	24,5±0,3	2,1±0,5	0.34	0.029

Comme avec les autres surfaces bioactives (voir la Figure 42 et la Table 11 du Chapitre 5) la liaison peptidique est visible sur les spectres en haute résolution du carbone à environ 287,5 eV pour les surfaces modifiées avec le peptide GHM et RSFLLRN (voir Figure 50).

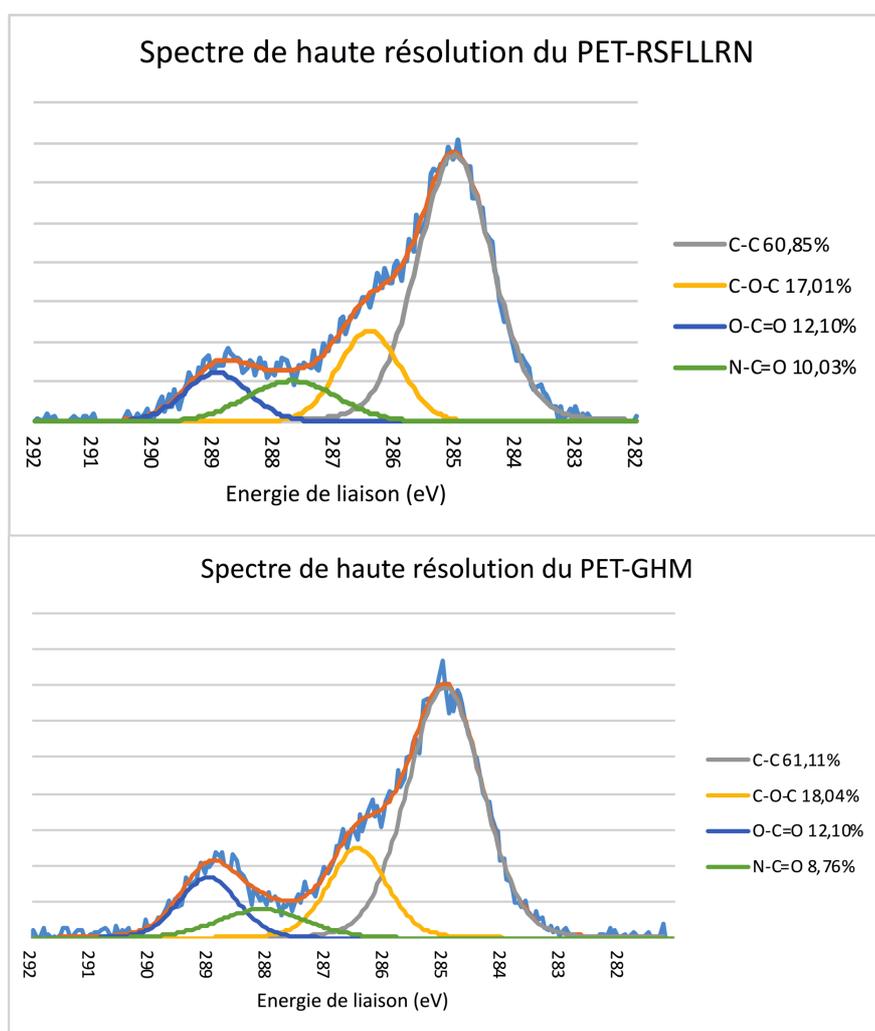


Figure 50 : Spectre de haute résolution du PET-GHM et du PET-RSFLLRN.

Les matériaux modifiés avec GHM ont une rugosité de 10 ± 2 nm, la densité de groupements carboxyles est de 102 ± 14 pmol/cm² (soit 60 COOH/nm²). Dans le cas du PET-RSFLLRN 11 ± 3 nm avec une densité de groupements carboxyles de 70 ± 4 pmol/mm² (~ 42 COOH/nm²). C'est la microscopie à fluorescence et l'estimation de la densité de peptide greffée qui nous permet de prouver que ces peptides sont bien greffés de façon covalente. La densité de GHM greffée est d'environ $2,1 \pm 0,1$ pmol/cm² (soit 1,3 GHM/nm²) et les surfaces greffées avec un peptide GHM-KTAMRA présentent une couleur rouge homogène après plusieurs étapes de rinçage. De la même manière avec le peptide SFLLRN, la densité est évaluée à $2,3 \pm 0,2$ pmol/mm² (soit 1,4 peptide/nm²), par ailleurs, les surfaces greffées avec ce peptides marqués FITC présentent une couleur vertes homogènes après plusieurs étapes de rinçage.

Il reste encore à faire pour déterminer si ce peptide permet une réponse des cellules endothéliales progénitrices plus spécifique que le peptide GRGDS. Ce peptide est issu du travail de thèse de Xin Wang montre qu'il est spécifique pour les cellules progénitrices endothéliales, il sera donc nécessaire de tester de peptides en conditions in vitro pour valider ces résultats.

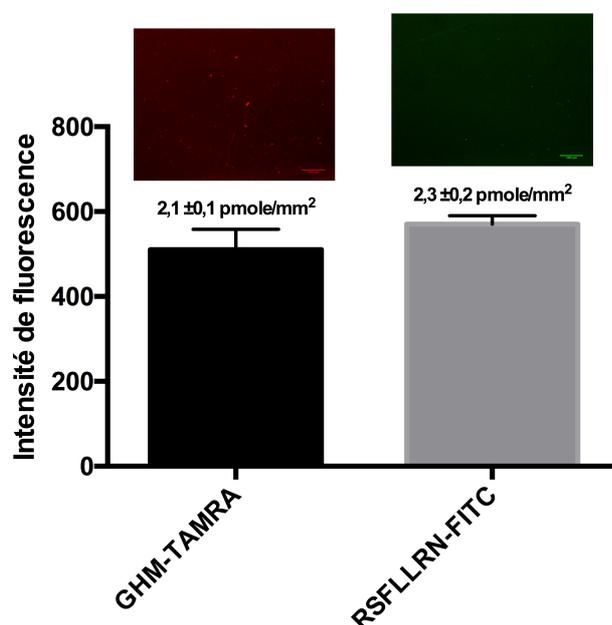


Figure 51 : Image de microscopie à fluorescence du PET modifié avec le peptide GHMK-TAMRA (en rouge) et le RSFLLRNK-FITC (en vert). Barre d'échelle 100 μ m.

Dans un premier temps nous avons décidé de substituer seulement une molécule sur les deux utilisé dans le Chapitre 5 (publication numéro 2). Pour savoir si les conclusions

obtenues découlent de la bi-fonctionnalisation ou du micropatterning la sitagliptine sera remplacée par le peptide RSFLLRN et l'effet des surfaces modifiées sera étudié par RT-qPCR et immunofluorescence. Le peptide SFLLRN est capable d'induire la mobilisation des ECFC en augmentant l'expression de SDF-1 et de CXCR4 (155,163). Ici, nous avons comparé l'expression des marqueurs CD34, KDR et vWF des ECFC ensemencées sur des films de PET fonctionnalisés par le peptide SFLLRN (appelés ci-après SFL) ou par le couple GRGDS / SFL, mais aussi sur deux surfaces microstructurées (GRGDS / SFL 10x50 et GRGDS / SFL 50x50).

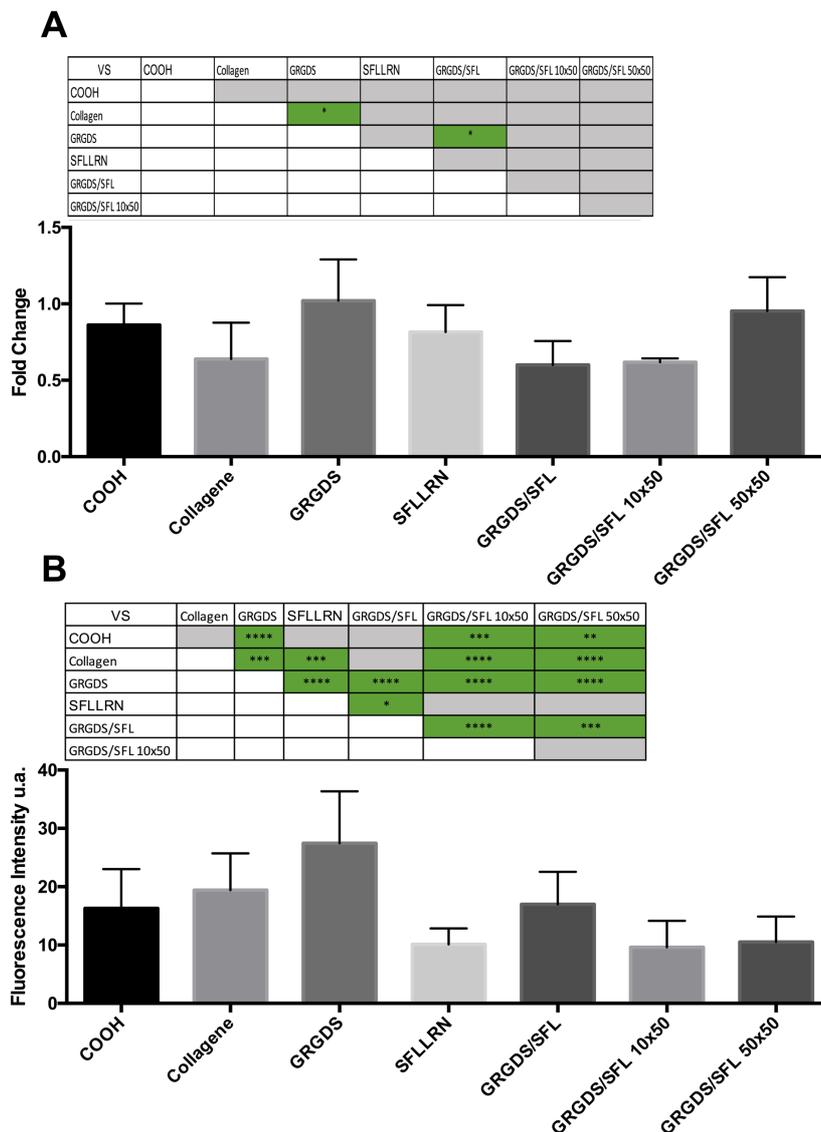


Figure 52 : Expression de CD34 (A et B) sur les surfaces greffées avec GRGDS et/ou SFLLRN. Les résultats de RT-qPCR sont exprimés en Fold change (A), les quantifications d'immunofluorescence sont représentées sur l'histogramme B. Pour une approche pratique, l'analyse statistique est présentée dans un tableau. L'analyse statistique a été réalisée par un

One-way ANOVA suivi d'une analyse de Tuckey. Les valeurs p sont représentées comme suit * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01, *** ≤ 0,001, **** ≤ 0,0001.

Les mêmes surfaces contrôles à savoir PET-COOH et collagène ont été utilisées. L'expression génique de CD34 sur les films GRGDS et SFLLRN n'est pas significativement différente, mais ici la microstructuration a montré une tendance en diminuant l'expression de ce marqueur (voir Figure 52A). Ici, il n'y a pas de différence significative entre les surfaces à motifs. La quantification en immunofluorescence (Figure 52B), permet de dire que le GRGDS peut retarder la différenciation des ECFC et que la microstructuration peut contrarier accélérer la disparition progressive du marqueur de lignage des souches.

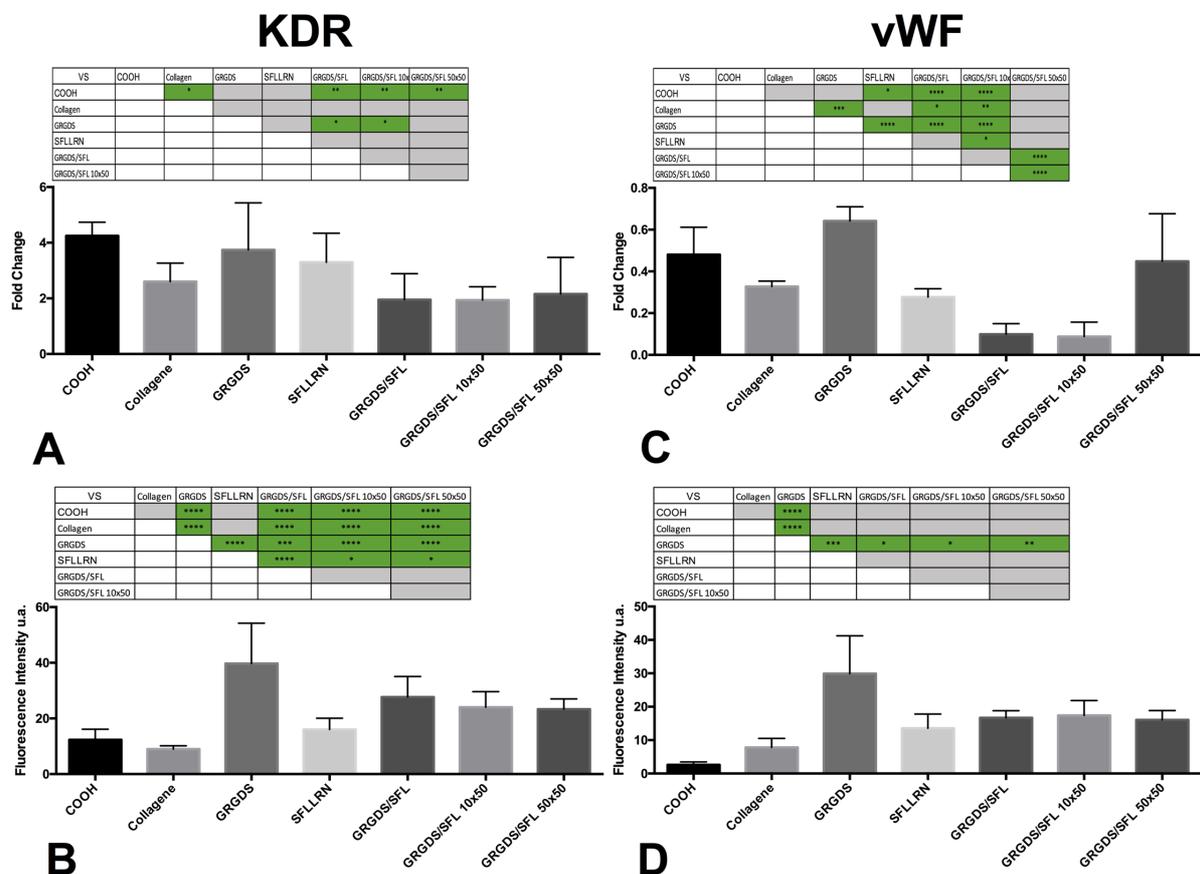


Figure 53 : Expression de KDR (A et B) et de vWF (C et D) sur les surfaces greffées avec GRGDS et/ou SFLLRN. Les résultats de RT-qPCR sont exprimés en facteur de variation (A et C), les quantifications d'immunofluorescence sont représentées sur les graphiques B et D. Pour une approche pratique, l'analyse statistique est présentée dans un tableau. L'analyse statistique a été réalisée par un One-way ANOVA suivi d'une analyse de Tuckey. Les valeurs p sont représentées comme suit * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01, *** ≤ 0,001, **** ≤ 0,0001.

Nous avons analysé les marqueurs de lignée endothéliale, KDR (Figure 53 A et B) et vWF (Figure 53 C et D). Les conclusions sont que, lorsque le SFLLRN est greffé à la surface, l'expression génique de KDR est toujours supérieure à celle de l'échantillon calibrateur. La co-immobilisation de GRGDS et de SFLLRN provoque une déplétion de l'expression du récepteur du VEGFR2 (KDR), mais il n'y a pas de différence significative entre les surfaces microstructurées. La quantification de KDR dans l'immunofluorescence a montré que GRGDS (Figure 53) possède l'expression la plus élevée. SFLLRN en opposition avec les résultats de qPCR présente l'expression la plus basse avec les contrôles. Les surfaces co-greffées nous permettent de dire que, par rapport au contrôle, l'expression de KDR est augmentée.

En ce qui concerne l'expression de vWF (Figure 53), les surfaces qui sont capables de moduler l'expression génique de vWF vers le haut sont les surfaces GRGDS. Le peptide SFLLRN lui, est capable de réguler négativement cette expression. Les surfaces micropatternées ici ne déclenchent pas la même réponse cellulaire, le modèle GRGDS / SFL 10x50 présente une très faible expression génique du vWF par rapport au GRGDS / SFL 50x50. De même, le profil de fluorescence nous permet de dire qu'une fois de plus, la surface de GRGDS permet la plus grande expression protéique du vWF.

La microscopie à fluorescence peut nous permettre de quantifier l'expression de certains marqueurs en mesurant l'intensité de fluorescence de la région d'intérêt. Pour avoir une quantification correcte, la mesure d'au moins 30 cellules est nécessaire. Cette technique associée au bon contrôle peut nous indiquer si une cellule est positive pour un marqueur ou non. Ici, nous choisissons de déterminer quelle surface donne le pourcentage le plus élevé de cellules positives pour CD34 et vWF. Nous savons que les HSVECs n'expriment pas le marqueur souche CD34, alors l'intensité moyenne de fluorescence de l'expression de CD34 sur les HSVECs est définie comme contrôle négatif ou background et toutes les cellules présentant une intensité de fluorescence supérieure à la fluorescence moyenne des HSVECs seront considérées positives pour le marqueur. En conséquence, les pourcentages de cellules positives et négatives pour les marqueurs CD34 et vWF sont déterminés (voir Table 16 et Table 17).

Table 16: Quantification des CD34⁺ après 2 jours de culture sur diverses surfaces bioactives. L'expression de CD34 par les HSVECs a été utilisée comme contrôle négatif. La valeur moyenne de fluorescence des HSVECs et d'autres conditions a été comparée sur des images d'immunofluorescence. Une cellule est considérée positive lorsque la valeur de l'intensité de fluorescence de la région d'intérêt (la cellule entière) est supérieure à la valeur de l'intensité de fluorescence moyenne des HSVECs (l'écart type était inclus dans la valeur). Au moins 30 cellules ont été mesurées pour chaque condition.

	Cellules négatives %	Cellules positives %
COOH	15	85
Collagène	15	85
GRGDS	0	100
SFL	68	32
GRGDS/SFL	15	85
GRGDS/SFL 10x50	74	26
GRGDS/SFL 50x50	68	32

Table 17 : Quantification des cellules vWF⁺ après 2 jours de culture sur diverses surfaces bioactives. L'expression de vWF par les CD34⁺ a été utilisée comme contrôle négatif. La valeur moyenne de fluorescence des CD34⁺ et d'autres conditions a été comparée sur des images d'immunofluorescence. Une cellule est considérée positive lorsque la valeur de l'intensité de fluorescence de la région d'intérêt (la cellule entière) est supérieure à la valeur de l'intensité de fluorescence moyenne des CD34⁺ (l'écart type était inclus dans la valeur). Au moins 30 cellules ont été mesurées pour chaque condition.

	Cellules négatives %	Cellules positives %
COOH	77	23
Collagène	82	18
GRGDS	5	95
SFL	64	36
GRGDS/SFL	63	38
GRGDS/SFL 10x50	41	59
GRGDS/SFL 50x50	29	71

Chapitre 6 : Discussion générale

Ce travail de doctorat s'inscrit dans la perspective de développer un biomatériau innovant capable de fournir un environnement favorable pour le recrutement, l'adhésion et la différenciation des cellules progénitrices endothéliales. L'aspect innovant de ce projet réside dans le choix des principes actifs et de la microstructuration de surface mais aussi dans son approche multidisciplinaire qui combine la chimie de surfaces, la biologie cellulaire et la biologie moléculaire. L'ensemble de ces disciplines doit être pris en compte lors du développement de nouveaux biomatériaux.

L'un des points clés de ce travail est le choix des principes actifs. Depuis quelques années les équipes de recherche travaillent dans le but de modifier les propriétés physico-chimique et mécanique de surfaces des prothèses synthétiques afin de contrôler la réponse cellulaire (296–298).

Un des défis à relever ici est de fournir un environnement favorable à un type cellulaire spécifique pour recréer un endothélium sain et ainsi obtenir la surface hémocompatible de référence qui pourra être en contact avec le sang : l'endothélium.

De nombreuses études montrent qu'*in vitro* l'endothélialisation des prothèses vasculaires améliore leur perméabilité à long terme et prévient les phénomènes de thrombose, mais aucune étude *in vivo* n'a montré un succès de ces prothèses à long terme (296,299,300). L'endothélium est considéré comme un organe à part entière. Son fonctionnement est complexe (37), et c'est pourquoi les études convergent vers une régénération d'un endothélium *in situ*. Les contraintes pratiques (coûts, mains d'œuvre, temps de culture des cellules, réponse immunitaire) ne permettent pas de développer une prothèse prête à l'emploi déjà endothélialisée. Basé sur ce constat, les stratégies de revêtements pour recruter de façon sélective les cellules endothéliales semble la meilleure stratégie. L'endothélium doit être continu et fonctionnel, le biomatériau devra donc permettre à l'endothélium d'assurer ses fonctions anti-thrombogène et de régulation de la prolifération des cellules musculaires lisses (pour ne pas favoriser l'hyperplasie néointimale) (54,104,301).

A ce jour, il n'existe encore aucun biomatériau capable d'induire la ré-endothélialisation des prothèses vasculaires *in vivo* chez l'homme. Même si de nombreuses études à ce sujet existent, les modèles d'études ne sont souvent pas appropriés.

L'endothélialisation transanastomotique reste limitée chez l'homme mais pas chez l'animal ce qui crée des disparités dans les résultats obtenus chez l'homme et l'animal (156). La fonctionnalisation doit pouvoir permettre le recrutement des ECFCs *in situ* dans la lumière de la prothèse et ainsi assurer l'adhésion des cellules, leur prolifération et leur différenciation.

Dans ce travail, le choix des molécules s'est porté sur l'utilisation de peptides (GRGDS, SFLLRN et GHM). Ces séquences d'acides aminés permettent un meilleur contrôle du greffage, de l'orientation et de la densité que des protéines entières. Également, nous avons choisi d'utiliser une molécule pharmaceutique, la sitagliptine pour son caractère innovant et sa capacité à recruter les EPCs sur les sites des lésions vasculaires (164).

CARACTERISATION DES CELLULES

Avant de commencer les tests sur les surfaces bioactives et comme mentionné dans la section 4.3 de la revue de littérature, il a été nécessaire de s'assurer que les cellules obtenues sont des ECFCs. Les cellules souches CD34⁺ issues du sang de cordon sont des précurseurs de plusieurs types cellulaires (lister). Il est actuellement connu que les EPCs et donc les ECFCs sont contenues dans la portion CD34⁺ des cellules mononucléées (62). Pour s'affranchir de certaines contaminations par d'autres types cellulaires nous avons donc choisi de n'ensemencer que les cellules CD34⁺ sur nos surfaces bioactives homogènes ou micropatternées. Après un tri magnétique, la pureté des cellules CD34⁺ est de plus de 92% et le rendement après le tri est entre 1 % et 2 %. Comme toutes les cellules CD34⁺ ne sont pas destinées à devenir des ECFCs, la présence de contamination par d'autres types cellulaires (fibroblastes, cellules souches mésenchymateuses) a été surveillée. Les ECFCs sont les seules cellules issues de la différenciation des cellules mononucléées à pouvoir former des structures capillaires dans une matrice de matrigel (208,210). Ici, les cellules mononucléées ont été extraites à partir du sang de cordon puis triées pour ne garder que la fraction CD34 positive. Une fois cette fraction mise en culture, l'apparition de colonies d'ECFCs a été surveillée à chaque changement de milieu. Après en moyenne 12 jours de culture, les cellules apparaissent, leur prolifération est rapide et elles adoptent une morphologie similaire aux cellules endothéliales matures. Les cellules que nous obtenons sont capables de former des structures capillaires contrairement aux cellules mononucléées CD34⁺. Pour caractériser le phénotype des ECFCs obtenues, nous avons étudié l'expression génique de 4 marqueurs, CD34 et CD133 qui sont des marqueurs de cellules souches puis

KDR et vWF qui sont des marqueurs de la lignée endothéliale. Ici, les ECFCs à passage 1 sont comparées avec des cellules mononucléées CD34+, des ECFCs à passage 5 et des cellules de veines saphène. Dans la littérature les marqueurs les plus souvent utilisés pour définir les ECFCs sont CD34, CD133 et KDR, leur phénotype est décrit comme suit CD34⁺/CD133⁻/KDR⁺ (48,59,200,302). Les ECFCs que nous obtenons après 19 jours de culture expriment CD33, KDR et vWF mais très peu CD133, leur prolifération est rapide et elles sont capable de former des structures capillaires ce qui montre que ce sont réellement des ECFCs ayant un potentiel de ré-endothelialisation.

Le premier article de ce projet nous a permis de déterminer quels gènes de référence utiliser pour normaliser les résultats de RT-qPCR de façon fiable. Les cellules mononucléées et les ECFCs sollicitées à se différencier sont soumises à des changements d'expression génique (218). Pour pouvoir normaliser les résultats nous nous sommes focalisés à identifier des gènes de référence dont l'expression ne varie pas au cours de la différenciation et des conditions expérimentales (substrat, conditions de culture, facteurs de croissances par exemple) (303,304). Les gènes utilisés pour normaliser les résultats de PCR sont GAPDH, YWHAZ et UBC.

GREFFAGE, CARACTERISATION DE SURFACE ET DE L'ACTIVITE DES PRINCIPES ACTIFS

En premier lieu, une attention particulière a été portée à la caractérisation des surfaces développées. Notre objectif était de s'assurer que les molécules étaient greffées de façon covalente en surface du PET. Cette étude a été réalisée par spectroscopie de photoélectrons et par microscopie à fluorescence en vérifiant qu'après différentes techniques de rinçage des surfaces bioactives (résultats en annexe), une densité peptidique stable était obtenue avec une concentration de 10⁻⁵M. Parallèlement, sur les surfaces bioactives micropatternées, nous avons démontré la faisabilité d'élaboration de micromotifs bioactifs avec une géométrie et une taille parfaitement contrôlée.

Les travaux de Ponsonnet *et al.* montrent qu'il existe une relation entre les propriétés de surfaces (rugosité et mouillabilité) et le comportement cellulaire (305). Les images AFM et les mesures de rugosité montrent que le matériau n'est modifié que sur quelques nanomètres et qu'il n'y a pas de différence de rugosité entre la surface contrôle PET-COOH et les surfaces bioactives ce qui permet de conclure que la différence de comportement sera inhérente aux propriétés biologiques du matériau et non à sa rugosité de surface. Maintenant

que le greffage des peptides est assuré et que c'est bien l'éventuelle bioactivité de la surface qui pourra influencer sur le comportement cellulaire, il est nécessaire de s'assurer du maintien de la bioactivité des matériaux. Les peptides et les molécules une fois greffés ne gardent parfois pas leur propriété biologique. Cela peut être dû à un encombrement stérique, à une mauvaise présentation de la séquence active (112). Aussi, certains principes actifs doivent être internalisés pour être actifs.

Dans le cas du tripeptide RGD (GRGDS dans ce projet), la littérature fait état d'une large utilisation de cette séquence active (voir Chapitre 2). Il est actuellement connu que la densité de principes actifs immobilisés en surface de matériaux impacte sur le comportement cellulaire. Notre objectif a été dans ce travail d'immobiliser en surface une densité reconnue dans la littérature comme suffisante pour favoriser l'adhésion ou la différenciation cellulaire. La densité de RGD immobilisée en surface dans ce travail est similaire à celle mesurée dans le cadre d'anciens travaux effectués dans notre laboratoire (131,138,270,278), et montre un impact sur l'adhésion des cellules. Dans le cas des autres principes actifs SFLLRN et la sitagliptine, il n'existe pas à ce jour de travaux qui utilisent ces peptides ou ces molécules greffés en surface d'un biomatériau. Toutefois, pour la sitagliptine, le test enzymatique de l'inhibition de DPP4 nous indique que la quantité de sitagliptine greffée en surface est suffisante pour induire une inhibition de DPP4 et donc inhiber le clivage de SDF-1 ce qui pourra promouvoir la mobilisation et la différenciation des ECFCs (72,73). Pour le peptide SFLLRN uniquement utilisé en solution dans la littérature (155,163) à une concentration de 75 μM , ce qui est environ 10 fois supérieur à la quantité greffée sur les surface SFLLRN, notre hypothèse est que la densité immobilisée sur nos surfaces est suffisante pour avoir un effet sur les EPC. Ces résultats présentés dans la section chapitre 5 montrent que les principes actifs (GRGDS et sitagliptine) sont greffés de façon covalente avec une densité d'environ 2 pmol/mm^2 pour le peptide et entre 5 et 10 pmol/mm^2 pour la sitagliptine. Dans ce cas précis et avec ces principes actifs un greffage covalent est nécessaire. En effet, la couche de cellules endothéliales mettra plusieurs semaines à se former, la bioactivité de la surface doit donc résister dans le temps afin de garder ses propriétés adhésives. Le peptide RGD ne permet l'adhésion des HUVECs que lorsqu'il est greffé de façon covalente (306). Dans la présente étude, la densité de peptide GRGDS immobilisé en surface du PET étaient respectivement de $1,9 \pm 0,1 \text{ pmol}/\text{mm}^2$ ce qui est de loin suffisant pour avoir un effet sur l'adhésion et l'étalement des cellules. Selon nos études antérieures, les matériaux greffés avec une telle densité de peptide RGD

améliorent l'adhésion cellulaire et permettent un meilleur ancrage des cellules via des adhésions focales matures (131,138,270,278).

DIFFERENCIATION DES ECFCs

Les cellules endothéliales sont constamment exposées à des contraintes de cisaillement ou shear stress. Ces contraintes influencent différentes réponses cellulaires incluant, des changements de morphologie, un alignement et d'autres fonctions biochimiques via des voies de mécano-transduction (53,180,293,307).

In vitro et sous contraintes de cisaillement les cellules endothéliales matures et progénitrices s'alignent dans la direction du flux. Toutefois, les EPCs sont soumises à des changements phénotypiques, elles se différencient; l'expression des marqueurs d'immaturité diminue au profit des marqueurs de la lignée endothéliale (287,293,308). Dans ce projet nous souhaitons analyser et étudier l'effet de l'alignement des cellules sur les EPCs (plus particulièrement les ECFCs) sans y ajouter de contrainte physique comme la présence d'un flux. Le processus de différenciation des progéniteurs endothéliaux n'est pas encore complètement élucidé (voir la partie revue de littérature). Cette régulation temporelle peut être divisée en trois étapes. La première étape implique l'adhésion des progéniteurs endothéliaux. Comme les cellules endothéliales font partie d'un type de cellule adhérente, les EPCs doivent adhérer à la matrice extracellulaire (ECM) ou à un substrat pour se différencier. Il a été démontré que la fibronectine favorise la différenciation des cellules CD34 + du sang de cordon avec induction par le VEGF, soit *in vitro*, soit dans des modèles de tumeurs animales (235,236). Après adhésion, sur l'ECM ou sur un substrat, la deuxième étape de différenciation est l'état de prolifération des EPCs. Puis la troisième étape est l'acquisition d'un phénotype endothélial mature. Nos résultats montrent que sur les surfaces homogènes GRGDS, COOH et collagène, les ECFCs gardent leur caractère souche avec une expression de CD34 plus élevée tout en allant vers un phénotype endothélial, elles sont donc maintenues dans un état progéniteur, 100 % des cellules cultivées sur les surfaces GRGDS expriment CD34 alors que ce chiffre diminue jusqu'à 32 % pour les surfaces homogènes SFLLRN.

Dans ce projet, nous souhaitons obtenir une couche de cellules endothéliales matures sur des surfaces bioactives, le GRGDS seul ne permet pas d'obtenir des cellules endothéliales matures, toutefois la microstructuration et/ou le greffage d'un second principe actif permet de faire basculer la tendance. Les cellules expriment très peu le CD34 et

fortement les marqueurs endothéliaux KDR et vWF dans le cas des surfaces GRGDS/Sita 100x10. Ici les résultats obtenus en RT-qPCR et immunofluorescence ne peuvent pas être comparés puisque ce sont deux techniques différentes. L'ARNm messager extrait et étudié en RT-qPCR ne sera pas forcément traduit en protéines, il n'existe pas de corrélation entre le transcrit et la protéine traduite. De plus, la RT-qPCR est une méthode automatique qui n'est pas associée à un grand taux d'erreur ni à la subjectivité de l'expérimentateur comme l'immunofluorescence (309). Toutefois la technique de RT-qPCR est très dépendante de la qualité de l'échantillon, des conditions expérimentales et de la normalisation, voilà pourquoi il est difficile de comparer les résultats d'une étude à l'autre.

In vivo les EPCs sont des cellules circulantes qui sont mobilisées sur le site d'une lésion via l'activation de SDF1/CXCR4, dans la circulation ces cellules expriment toujours les marqueurs souches, mais une fois adhérentes à un substrat ou à la matrice extracellulaire, l'expression de CD34 diminue et celle de CD133 disparaît rapidement. Il existe donc une corrélation entre l'adhésion de ces cellules et leur différenciation. Dans leur travaux, Ohnishi *et al.* montrent que les cellules souches hématopoïétiques qui expriment fortement CD34 adoptent une morphologie ronde avec des microvillosités et sont des cellules non adhérentes. Ces résultats montrent qu'il existe une corrélation entre la protéine de surface CD34 et l'adhésion des cellules à une surface (310). Dans ce projet, les cellules mononucléées CD34⁺ sont rondes et n'adhèrent pas au substrat alors que les ECFCs qui expriment beaucoup moins le CD34 sont capables d'adhérer. Nos résultats sont donc en accord avec ces travaux.

La liaison des sous-unités $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 5\beta 3$ des intégrines des cellules avec des protéines de l'ECM comme la fibronectine ou le collagène augmente l'activité de VEGF et de son récepteur VEGFR2. Le peptide RGD issu de la fibronectine est la séquence qui interagit avec les sous-unités $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 5\beta 3$. Les EPC mises en culture sur les surfaces GRGDS présentent la plus haute expression de VEGFR2 (KDR). Ce peptide a donc non seulement la capacité d'améliorer le potentiel adhésif des biomatériaux mais aussi d'induire la différenciation des cellules endothéliales progénitrices, tout en gardant leur caractère progéniteur avec le maintien de l'expression de CD34. La bioactivité des surfaces homogènes a été démontrée, par rapport aux matériaux contrôles, avec une réponse différente d'expression génique et protéique des marqueurs CD34, KDR et vWF. Cette bioactivité a été validée dans le cas de la sitagliptine avec le test DPP4 (Chapitre 4).

Les surfaces micropatternées permettent elles aussi d'induire une différenciation des ECFCs en ECs puisque dans le cas des surfaces GRGDS/Sita 100x10, l'expression de CD34 est très faible mais l'expression des deux marqueurs de la lignée endothéliale est plus haute sur ces surfaces. La géométrie de ces structures 2D permet une diminution de l'expression de CD34, il a été démontré que la restriction biochimique des cellules endothéliales a un impact sur leur devenir (283,284). Kusuma et al. montrent que des IPCs (cellules souches pluripotentes induites) peuvent se différencier en cellules endothéliales sur les îlots de fibronectine. Le meilleur rendement (70 %) est obtenu avec les îlots de plus petit diamètre, 80 µm (285). Dans ce projet, nous nous intéressons à l'effet de la structuration en 2D mais sans contrainte externe, pour déterminer si l'arrangement et la présentation des principes actifs a un effet sur la différenciation. La conclusion que nous pouvons faire et que la différenciation est plus rapide sur des motifs de plus petites tailles GRGDS/Sita 100x10 et GRGDS/Sita 100x50.

Le lien entre l'interaction des intégrines et la matrice extracellulaire dans la différenciation endothéliale a déjà été démontré dans la littérature et les résultats obtenus dans ce travail montrent que

La bi-fonctionnalisation d'une molécule adhésive et une molécule connue pour induire la différenciation des cellules progénitrices endothéliales peuvent constituer une approche prometteuse en application clinique pour atteindre une vitesse plus rapide de différenciation des ECFCs en CE mature pour pouvoir recréer une couche de cellules endothéliales continue et fonctionnelle.

Chapitre 7 : Conclusion et perspectives

Dans le contexte du remplacement d'artère l'objectif général de ce projet visait à développer une surface bioactive capable de recruter et d'induire la différenciation des cellules progénitrices endothéliales.

D'une part, nous avons pu greffer les principes actifs sélectionnés de façon covalente avec une densité suffisante pour induire un effet sur le comportement cellulaire. Des surfaces homogènes et microstructurées ont été comparées pour étudier l'effet d'une contrainte géométrique sur la différenciation des ECFCs. D'autre part, ce projet nous a permis d'améliorer nos connaissances sur le comportement et la cinétique de différenciation des EPCs ou ECFCs. Ce terme EPCs apparaît à la lumière de ce travail comme souvent utilisé à mauvais escient dans la littérature. En effet, il désigne un ensemble hiérarchisé de cellules avec des caractéristiques différentes. Dans une application vasculaire, on utilisera plutôt les ECFCs qui sont obtenues en mettant en culture des cellules mononucléées issues du sang total (cordon ou périphérique) sur une surface revêtue de collagène et qui ont des capacités de prolifération supérieures aux cellules endothéliales matures.

La multidisciplinarité de ce projet nous permet de conclure qu'à la suite d'une étude approfondie des différents domaines nous sommes en mesure de conclure les points suivants :

1. Les principes actifs (GRGDS, Sitagliptine, SFLLRN) ont pu être greffés de façon covalente à une densité contrôlée.

2. Les traitements de surfaces n'endommagent pas le biomatériau, puisqu'il ne modifie celui que sur quelques nanomètres (voir les images AFM en Annexe 3).

3. La sitagliptine a été greffée pour la première fois sur un substrat. Son activité une fois greffée a pu être démontrée avec un test enzymatique d'inhibition au DPP4 pour la première fois.

4. Des gènes de références communs aux cellules mononucléées, aux ECFCs et aux cellules de veine saphène ont pu être utilisés pour normaliser les résultats obtenus par RT-qPCR (GAPDH, YWHAZ, UBC).

5. Les matériaux microstructurés induisent une différenciation plus rapide que les matériaux homogènes, nous avons donc pu établir un profil de la cinétique de différenciation des ECFCs. Les matériaux fonctionnalisés avec le GRGDS/Sita 100x10 et GRGDS/Sita 100x50 semblent être les meilleurs candidats.

Il reste à présent encore plusieurs verrous à lever dans ce projet pour être capable de développer un matériau idéal.

- D'un point de vue physico-chimique il apparaît intéressant d'associer les propriétés inductives de l'adhésion et de la différenciation de ces surfaces avec des propriétés anti-fouling, qui vont donc limiter l'adsorption de protéines, de plaquettes ou de cellules non spécifiques. L'utilisation d'un PEG fonctionnalisé par un peptide qui va inhiber l'adsorption non spécifique mais pourra induire l'adhésion ou la différenciation des cellules semble être un bon compromis. Le peptide GRGDS bien qu'utilisé très souvent dans l'application vasculaire manque de sélectivité vis-à-vis des cellules endothéliales progénitrices ou matures. Un peptide spécifique comme le REDV, ou un peptide issu de la séquence active du VEGF ou du SDF-1 pourront être testés. Le peptide RGD, ou GRGDS dans le cadre de ce travail permet l'adhésion de plusieurs types cellulaires, dans le cadre de ce projet nous souhaitons tester un peptide ou une molécule qui a la capacité de favoriser l'adhésion des cellules endothéliales progénitrices de façon spécifique. C'est pourquoi le peptide GHM a été sélectionné, toutefois la caractérisation biologique de ces surfaces reste à faire.
- D'un point de vue biologique, il va être nécessaire de tester les surfaces bioactives en culture sous flux. Dans un premier temps, pour tester la résistance du revêtement à une contrainte de cisaillement (donc un premier temps sans cellules). Dans un second temps, la force d'adhésion des cellules sur les surfaces pourra être étudiée sous flux, en évaluant la quantité de cellules restant adhérentes. Puis, les expériences avec une contrainte de cisaillement peuvent permettre d'estimer le potentiel de recrutement des surfaces vis-à-vis des ECFCs en mettant dans le réacteur sous flux les matériaux sans cellules et en faisant passer les cellules dans un milieu de culture adéquat à la surface des matériaux.

- Concernant la régulation de la prolifération des SMCs, il serait intéressant de coupler un peptide qui induit la différenciation avec une molécule qui inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses comme le mesylate d'imatinib (311,312). Ou éventuellement en exploitant l'idée d'un double revêtement avec une face interne qui promeut l'adhésion et la différenciation des ECFCs et une face externe qui limite la prolifération des SMCs.

La structuration 2D provoque des changements dans le cytosquelette et la morphologie des cellules. En plus de modifier les caractéristiques du cytosquelette, l'alignement et l'adhésion des ECFCs peut modifier leur phénotype, et réguler de nombreux mécanismes comme la prolifération, l'apoptose, la migration et la fonctionnalité des cellules. Cette étude a permis de mieux comprendre la cinétique de différenciation des ECFCs et les facteurs qui peuvent influencer sur l'expression de marqueurs souche et de la lignée endothéliales. Les principes actifs engendrent des réponses différentes selon leur présentation, homogène ou micropatternée. Ce travail peut aider à la compréhension des phénomènes environnementaux qui régulent la différenciation des ECFCs et a un potentiel certain le développement de nouveaux biomatériaux pour les applications vasculaires.

Références

1. Bordenave L, Menu P, Baquey C. Developments towards tissue-engineered, small-diameter arterial substitutes. *Expert Rev Med Devices*. 2008 May 1;5(3):337–47.
2. Bos GW, Poot AA, Beugeling T, van Aken WG, Feijen J. Small-Diameter Vascular Graft Prostheses: Current Status. *Arch Physiol Biochem*. 1998 Jan 1;106(2):100–15.
3. Cohen DE, Melton D. Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine. *Nat Rev Genet*. 2011 Apr;12(4):243–52.
4. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006 Aug;126(4):663–76.
5. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *science*. 2007;318(5858):1917–1920.
6. Langer R, Vacanti JP. *Tissue Engineering*. *Science*. 1993;260(5110):920–6.
7. Mansbridge J. Skin substitutes to enhance wound healing. *Expert Opin Investig Drugs*. 1998;7(5):803.
8. Seifu DG, Purnama A, Mequanint K, Mantovani D. Small-diameter vascular tissue engineering. *Nat Rev Cardiol*. 2013 May 21;10(7):410–21.
9. The European Society for Biomaterials 9th European Conference on Biomaterials Chester, UK 9–11th September, 1991 in conjunction with 2nd Consensus Conference on Definitions in Biomaterials 7–8th September, 1991 and IUPAC working party on blood compatibility. *J Mater Sci Mater Med*. 1991;2(1):62–62.
10. Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(30):5897–909.
11. Patel NR, Gohil PP. A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance. *Int J Emerg Technol Adv Eng*. 2012;2(4):91–101.
12. Teo AJT, Mishra A, Park I, Kim Y-J, Park W-T, Yoon Y-J. Polymeric Biomaterials for Medical Implants and Devices. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016 Apr 11;2(4):454–72.
13. Hiob MA, She S, Muiznieks LD, Weiss AS. Biomaterials and Modifications in the Development of Small-Diameter Vascular Grafts. *ACS Biomater Sci Eng*. 2017 May 8;3(5):712–23.
14. Mahapatro A. Bio-functional nano-coatings on metallic biomaterials. *Mater Sci Eng C*. 2015 Oct;55:227–51.
15. Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Mater Res*. 1998;13(01):94–117.

16. Zakaria SM, Sharif Zein SH, Othman MR, Yang F, Jansen JA. Nanophase Hydroxyapatite as a Biomaterial in Advanced Hard Tissue Engineering: A Review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013 Oct;19(5):431–41.
17. Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons. *An Introduction to Materials in Medicine.* Biomater Sci. 2012;3.
18. Gomes ME, Reis RL. Biodegradable polymers and composites in biomedical applications: from catgut to tissue engineering. Part 2 Systems for temporary replacement and advanced tissue regeneration. *Int Mater Rev.* 2004 Oct;49(5):274–85.
19. Erisken C, Kalyon DM, Wang H. Functionally graded electrospun polycaprolactone and β -tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications. *Biomaterials.* 2008 Oct;29(30):4065–73.
20. Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials.* 2000;21(22):2215–2231.
21. Dee KC, Puleo DA, Bizios R. *An introduction to tissue-biomaterial interactions.* Hoboken, NJ: Wiley-Liss; 2002. 228 p.
22. Sridharan R, Cameron AR, Kelly DJ, Kearney CJ, O'Brien FJ. Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles. *Mater Today.* 2015;18(6):313–325.
23. Morais JM, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Biomaterials/Tissue Interactions: Possible Solutions to Overcome Foreign Body Response. *AAPS J.* 2010 Jun;12(2):188–96.
24. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res.* 2001;31(1):81–110.
25. WHO. Cardiovascular diseases (CVDs) Global status report on noncommunicable diseases 2014 [Internet]. 2015. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf?ua=1
26. Agence de la santé publique du Canada. Le fardeau économique de la maladie au Canada, 2005–2008 [Internet]. 2014 [cited 2016 Nov 14]. Available from: <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ebic-femc/2005-2008/assets/pdf/ebic-femc-2005-2008-fra.pdf>
27. Srivasta D, OLSON EN, CHIEN KR, LUSIS AJ, CARMELIET P, JAIN RK, et al. Vascular biology. *Nature* [Internet]. 2000 [cited 2016 Oct 19];407(6801). Available from: [http://148.216.10.92/archivos%20PDF%20de%20trabajo%20UMSNH/Aphilosofia/2007/Vascular%20biology.doc](http://148.216.10.92/archivos%20PDF%20de%20trabajo%20UMSNH/Afilosofia/2007/Vascular%20biology.doc)
28. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. 2002;420:7.
29. Reneman RS, Arts T, Hoeks APG. Wall Shear Stress – an Important Determinant of Endothelial Cell Function and Structure – in the Arterial System in vivo. *J Vasc Res.* 2006;43(3):251–69.
30. Hahn C, Schwartz MA. Mechanotransduction in vascular physiology and

atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Jan;10(1):53–62.

31. Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest.* 2005 Jan;85(1):9–23.

32. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2000;87(7):e10–e17.

33. Kasper Hoebe, Edith Janssen, Bruce Beutler. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2004;5(10):971.

34. Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec;338(1):558–67.

35. Lanotte L, Mauer J, Mendez S, Fedosov DA, Fromental J-M, Claveria V, et al. Red cells' dynamic morphologies govern blood shear thinning under microcirculatory flow conditions. *Proc Natl Acad Sci.* 2016 Nov 22;113(47):13289–94.

36. Mulligan-Kehoe MJ, Simons M. Vasa Vasorum in Normal and Diseased Arteries. *Circulation.* 2014 Jun 17;129(24):2557–66.

37. Moncada S, Higgs A. The vascular endothelium II [Internet]. Vol. 176. Springer Science & Business Media; 2006 [cited 2016 Oct 19]. Available from: <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=Af9GAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA2&dq=%22and+production:+LE-TEX+Jelonek,+Schmidt+%26+V%C3%B6ckler+GbR,+Leipzig,%22+%22been+very+productive+and+its+results+have+contributed,+arguably+more%22+%22result,+we+have+produced+two+volumes+which+is+a+good+representation+of%22+&ots=pWvPS484sk&sig=55Bvmcx-fF1GbnuTooE8nBV1DqM>

38. Chien S. Molecular basis of rheological modulation of endothelial functions: importance of stress direction. *Biorheology.* 2006;43(2):95.

39. D'Amore PA, Trinidad-Vasquez M, Rich NM. Seeding of Dacron Vascular Prostheses with Endothelium of Aortic Origin1. *J Surg Res.* 1983;34(1):33–43.

40. Fox SI. *Human Physiology*, 8th. Boston, McGraw-Hill. 2004.

41. Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, Byrns RE. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90(17):8103–8107.

42. Eichmann A, Pardanaud L, Yuan L, Moyon D. Vasculogenesis and the search for the hemangioblast. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11(2):207–214.

43. Era T, Izumi N, Hayashi M, Tada S, Nishikawa S, Nishikawa S-I. Multiple Mesoderm Subsets Give Rise to Endothelial Cells, Whereas Hematopoietic Cells Are Differentiated Only from a Restricted Subset in Embryonic Stem Cell Differentiation Culture. *Stem Cells.* 2008 Feb;26(2):401–11.

44. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005 Dec 15;438(7070):932–6.

45. Peter Carmeliet. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6(4):389.
46. Semenza GL. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: Mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem.* 2007 Nov 1;102(4):840–7.
47. Azzi S, Gavard J. Vaisseaux sanguins et tumeurs ou l’art du dialogue. *médecine/sciences.* 2014 Apr;30(4):408–14.
48. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964–966.
49. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev.* 2001;100(2):157–163.
50. Balaji S, King A, Crombleholme TM, Keswani SG. The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Adv Wound Care.* 2013 Jul;2(6):283–95.
51. Aird WC. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, Function, and Mechanisms. *Circ Res.* 2007 Feb 2;100(2):158–73.
52. Goligorsky MS, Patschan D, Kuo M-C. Weibel–Palade bodies—sentinels of acute stress. *Nat Rev Nephrol.* 2009 Jul;5(7):423–6.
53. Malek AM, Izumo S. Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci.* 1996;109(4):713–726.
54. McGuigan AP, Sefton MV. The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity. *Biomaterials.* 2007;28(16):2547–2571.
55. Boos CJ, Lip GYH, Blann AD. Circulating Endothelial Cells in Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Oct;48(8):1538–47.
56. Mead LE, Prater D, Yoder MC, Ingram DA. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from human blood. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2008;Chapter 2:Unit 2C.1.
57. Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood.* 2007;109(11):4761–4768.
58. Murohara T, Ikeda H, Onitsuka I, Ueno T, Matsui K. Endothelial progenitor cells in the human umbilical cord blood. *CIRCULATION.* 1998;98(17):729–729.
59. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95(3):952–958.
60. Smadja DM, Gaussem P. Caractérisation des progéniteurs endothéliaux et stratégies d’expansion *in vitro.* *J Société Biol.* 2009;203(2):197–207.
61. Ingram DA. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor

cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2752–60.

62. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*. 2004;8(4):498–508.

63. Timmermans F, Plum J, Yöder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med*. 2008 Dec 3;13(1):87–102.

64. Eggermann J, Kliche S, Jarmy G, Hoffmann K, Mayr-Beyrle U, Debatin K-M, et al. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res*. 2003;58(2):478–486.

65. Ingram DA, Mead LE, Moore DB, Woodard W, Fenoglio A, Yoder MC. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005;105(7):2783–2786.

66. Sun X, Cheng L, Duan H, Lin G, Lu G. Characterization and comparison of embryonic stem cell-derived KDR⁺ cells with endothelial cells. *Microvasc Res*. 2012 Sep;84(2):149–54.

67. Thebaud NB, Bareille R, Remy M, Bourget C, Daculsi R, Bordenave L. Human progenitor-derived endothelial cells vs. venous endothelial cells for vascular tissue engineering: an *in vitro* study. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010;n/a-n/a.

68. Papapetropoulos A, García-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1997;100(12):3131.

69. Jujo K, Ii M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 Oct;45(4):530–44.

70. Drake CJ. Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2003 Feb;69(1):73–82.

71. Tilling L, Chowieńczyk P, Clapp B. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *Br J Clin Pharmacol*. 2009 Oct;68(4):484–92.

72. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1–CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol*. 2007 Jul;28(7):299–307.

73. Cheng M, Qin G. Progenitor Cell Mobilization and Recruitment: SDF-1, CXCR4, $\alpha 4$ -integrin, and c-kit. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2018 Aug 13]. p. 243–64. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123984593000113>

74. Eguchi M, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol*. 2007 Mar 28;11(1):18–25.

75. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *AJP Cell Physiol*. 2004 Sep 1;287(3):C572–9.

76. Smadja DM, Gaussem P. Caractérisation des progéniteurs endothéliaux et

stratégies d'expansion *in vitro*. J Société Biol. 2009;203(2):197–207.

77. Masuda H, Alev C, Akimaru H, Ito R, Shizuno T, Kobori M, et al. Methodological Development of a Clonogenic Assay to Determine Endothelial Progenitor Cell Potential. *Circ Res*. 2011 Jun 24;109(1):20–37.

78. Ferratge S, Ha G, Carpentier G, Arouche N, Bascetin R, Muller L, et al. Initial clonogenic potential of human endothelial progenitor cells is predictive of their further properties and establishes a functional hierarchy related to immaturity. *Stem Cell Res* [Internet]. 2017 Apr [cited 2017 Apr 25]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1873506117300752>

79. Ahrens I, Domeij H, Topcic D, Haviv I, Merivirta R-M, Agrotis A, et al. Successful In Vitro Expansion and Differentiation of Cord Blood Derived CD34+ Cells into Early Endothelial Progenitor Cells Reveals Highly Differential Gene Expression. Covas DT, editor. *PLoS ONE*. 2011 Aug 12;6(8):e23210.

80. Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing Identity, Phenotype, and Fate of Endothelial Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Sep 1;28(9):1584–95.

81. Hadi HA, Carr CS, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1(3):183.

82. Seifu DG, Purnama A, Mequanint K, Mantovani D. Small-diameter vascular tissue engineering. *Nat Rev Cardiol*. 2013 May 21;10(7):410–21.

83. Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeysens F. The Tissue-Engineered Vascular Graft—Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2015 Oct 8 [cited 2017 Apr 29]; Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2015.0100>

84. 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(5):S327–S331.

85. Deutsch M, Meinhart J, Zilla P, Howanietz N, Gorlitzer M, Froeschl A, et al. Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *J Vasc Surg*. 2009 Feb;49(2):352–62.

86. Kunlin J. [Long vein transplantation in treatment of ischemia caused by arteritis]. *Rev Chir*. 1951;70(7–8):206.

87. Tineli RA, Viaro F, Dalio MB, Reis GS, Basseto S, Vicente WV de A, et al. Forças mecânicas e veias safenas humanas: implicação na revascularização do miocárdio. *Rev Bras Cir Cardiovasc* [Internet]. 2007 Mar [cited 2018 Aug 13];22(1). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-76382007000100016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

88. Chakfé N, Dieval F, Thaveau F, Rinckenbach S, Hassani O, Camelot G, et al. Substituts vasculaires. *Ann Chir*. 2004;129(5):301–9.

89. Langer RM, Kahan BD. Alexis Carrel's legacy: visionary of vascular surgery and organ transplantation. In: *Transplantation proceedings*. Elsevier; 2002. p. 1061–1066.

90. Hufnagel. Permanent intubation of the thoracic aorta. *Am Heart J.* 1947;34(5):768.
91. Blakemore AH, Voorhees AB. The Use of Tubes Constructed from Vinyon “N” Cloth in Bridging Arterial Defects—Experimental and Clinical. *Ann Surg.* 1954 Sep;140(3):324–33.
92. Creech O Jr, DeBakey ME, Self M, Halpert B. The fate of heterologous arterial grafts: An experimental study. *Surgery.* 1954;36(3):431–44.
93. Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM. Current status of prosthetic bypass grafts: A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005 Jul;74B(1):570–81.
94. He H, Shirota T, Yasui H, Matsuda T. Canine endothelial progenitor cell-lined hybrid vascular graft with nonthrombogenic potential. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Aug;126(2):455–64.
95. Huang AH, Niklason LE. Engineering of arteries in vitro. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Jun;71(11):2103–18.
96. Vaz CM, van Tuijl S, Bouten CVC, Baaijens FPT. Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique. *Acta Biomater.* 2005 Sep;1(5):575–82.
97. Huang C, Chen R, Ke Q, Morsi Y, Zhang K, Mo X. Electrospun collagen–chitosan–TPU nanofibrous scaffolds for tissue engineered tubular grafts. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011 Feb 1;82(2):307–15.
98. Poh M, Boyer M, Solan A, Dahl SLM, Pedrotty D, Banik SSR, et al. Blood vessels engineered from human cells. 2005;365:3.
99. Bajpai VK, Andreadis ST. Stem Cell Sources for Vascular Tissue Engineering and Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012 Oct;18(5):405–25.
100. Williams DF. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials.* 2014 Dec;35(38):10009–14.
101. Ratner BD. *Biomaterials science an introduction to materials in medicine* [Internet]. [S.l.]: Academic Press; 2013. Available from: Accès via ScienceDirect <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123746269>
102. Gorbet MB, Sefton MV. Review: Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. In: *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium* [Internet]. Elsevier; 2004 [cited 2018 Aug 15]. p. 219–41. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080451541500253>
103. Davies PF, Civelek M, Fang Y, Fleming I. The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. *Cardiovasc Res.* 2013 Jul 15;99(2):315–27.
104. Lemson MS, Tordoir JHM, Daemen MJAP, Kitslaar PJEHM. Intimal Hyperplasia in Vascular Grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000 Apr;19(4):336–50.

105. Abbott WM, Megerman J, Hasson JE, L'Italien G, Warnock DF. Effect of compliance mismatch on vascular graft patency. *J Vasc Surg.* 1987;5(2):376–382.
106. Stewart SFC, Lyman DJ. Effects of an Artery/Vascular Graft Compliance Mismatch on Protein Transport: A Numerical Study. *Ann Biomed Eng.* 2004 Jul;32(7):991–1006.
107. Khoffi F. Contribution à l'étude de la compliance et du vieillissement des prothèses artérielles. :189.
108. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008;20(2):86–100.
109. Jonas RA, Ziemer G, Schoen FJ, Britton L, Castaneda AR. A new sealant for knitted Dacron prostheses: minimally cross-linked gelatin. *J Vasc Surg.* 1988;7(3):414–419.
110. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials.* 2003 Nov;24(24):4385–415.
111. Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials.* 2003 Nov;24(24):4353–64.
112. Collier JH, Segura T. Evolving the use of peptides as components of biomaterials. *Biomaterials.* 2011 Jun;32(18):4198–204.
113. Sgarioto M, Vigneron P, Patterson J, Malherbe F, Nagel M-D, Egles C. Collagen type I together with fibronectin provide a better support for endothelialization. *C R Biol.* 2012 Aug;335(8):520–8.
114. Lee K, Silva EA, Mooney DJ. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J R Soc Interface.* 2011 Feb 6;8(55):153–70.
115. 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 Mar;39(3):655–60.
116. Edlund U, Sauter T, Albertsson A-C. Covalent VEGF protein immobilization on resorbable polymeric surfaces. *Polym Adv Technol.* 2011 Jan;22(1):166–71.
117. Le Saux G, Plawinski L, Parrot C, Nlate S, Servant L, Teichmann M, et al. Surface bound VEGF mimicking peptide maintains endothelial cell proliferation in the absence of soluble VEGF *in vitro*: SVVYGLR TO MAINTAIN HUVEC PROLIFERATION. *J Biomed Mater Res A.* 2016 Jun;104(6):1425–36.
118. Poh CK, Shi Z, Lim TY, Neoh KG, Wang W. The effect of VEGF functionalization of titanium on endothelial cells *in vitro*. *Biomaterials.* 2010 Mar;31(7):1578–85.
119. Randone B, Cavallaro G, Polistena A, Cucina A, Coluccia P, Graziano P, et al. Dual Role of VEGF in Pretreated Experimental ePTFE Arterial Grafts. *J Surg Res.* 2005 Aug;127(2):70–9.

120. Suzuki Y, Yamamoto K, Ando J, Matsumoto K, Matsuda T. Arterial shear stress augments the differentiation of endothelial progenitor cells adhered to VEGF-bound surfaces. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jun;423(1):91–7.
121. De Visscher G, Mesure L, Meuris B, Ivanova A, Flameng W. Improved endothelialization and reduced thrombosis by coating a synthetic vascular graft with fibronectin and stem cell homing factor SDF-1 α . *Acta Biomater*. 2012 Mar;8(3):1330–8.
122. Baumann L, Prokoph S, Gabriel C, Freudenberg U, Werner C, Beck-Sickinger AG. A novel, biased-like SDF-1 derivative acts synergistically with starPEG-based heparin hydrogels and improves eEPC migration in vitro. *J Controlled Release*. 2012 Aug;162(1):68–75.
123. Zhou M, Liu Z, Li K, Qiao W, Jiang X, Ran F, et al. Beneficial effects of granulocyte-colony stimulating factor on small-diameter heparin immobilized decellularized vascular graft. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Aug 19;95A(2):600–10.
124. Zeng W, Yuan W, Li L, Mi J, Xu S, Wen C, et al. The promotion of endothelial progenitor cells recruitment by nerve growth factors in tissue-engineered blood vessels. *Biomaterials*. 2010 Mar;31(7):1636–45.
125. Krishna OD, Kiick KL. Protein- and peptide-modified synthetic polymeric biomaterials. *Biopolymers*. 2010 Jan 20;94(1):32–48.
126. Caiado F, Dias S. Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(1):4.
127. Iivanainen E, Kähäri V-M, Heino J, Elenius K. Endothelial cell–Matrix interactions. *Microsc Res Tech*. 2002 Dec 23;60(1):13–22.
128. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Oct;81(19):5985–8.
129. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins. *Science*. 1987;238(4826):491–7.
130. LEI_YIFENG_2012.pdf.
131. Lei Y, Rémy M, Labrugère C, Durrieu M-C. Peptide immobilization on polyethylene terephthalate surfaces to study specific endothelial cell adhesion, spreading and migration. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Nov;23(11):2761–72.
132. Bellis SL. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*. 2011 Jun;32(18):4205–10.
133. Ren X, Feng Y, Guo J, Wang H, Li Q, Yang J, et al. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem Soc Rev*. 2015;44(15):5680–742.
134. Ruiz-Rodríguez J, Miguel M, Preciado S, Acosta GA, Adan J, Bidon-Chanal A, et al. Polythiazole linkers as functional rigid connectors: a new RGD cyclopeptide with enhanced integrin selectivity. *Chem Sci*. 2014 May 23;5(10):3929.

135. Ren X, Feng Y, Guo J, Wang H, Li Q, Yang J, et al. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem Soc Rev*. 2015;44(15):5680–742.
136. Kanie K, Narita Y, Zhao Y, Kuwabara F, Satake M, Honda S, et al. Collagen type IV-specific tripeptides for selective adhesion of endothelial and smooth muscle cells. *Biotechnol Bioeng*. 2012 Jul;109(7):1808–16.
137. Le Saux G, Magenau A, Gunaratnam K, Kilian KA, Böcking T, Gooding JJ, et al. Spacing of Integrin Ligands Influences Signal Transduction in Endothelial Cells. *Biophys J*. 2011 Aug;101(4):764–73.
138. Chollet C, Chanseau C, Remy M, Guignandon A, Bareille R, Labrugère C, et al. The effect of RGD density on osteoblast and endothelial cell behavior on RGD-grafted polyethylene terephthalate surfaces. *Biomaterials*. 2009 Feb;30(5):711–20.
139. Yin M, Yuan Y, Liu C, Wang J. Combinatorial coating of adhesive polypeptide and anti-CD34 antibody for improved endothelial cell adhesion and proliferation. *J Mater Sci Mater Med*. 2009 Jul;20(7):1513–23.
140. Rotmans JJ. In Vivo Cell Seeding With Anti-CD34 Antibodies Successfully Accelerates Endothelialization but Stimulates Intimal Hyperplasia in Porcine Arteriovenous Expanded Polytetrafluoroethylene Grafts. *Circulation*. 2005 Jun 27;112(1):12–8.
141. Li J, Li D, Gong F, Jiang S, Yu H, An Y. Anti-CD133 Antibody Immobilized on the Surface of Stents Enhances Endothelialization. *BioMed Res Int*. 2014;2014:1–9.
142. Markway BD, Mccarty OJT, Marzec UM, Courtman DW, Hanson SR, Hinds MT. Capture of Flowing Endothelial Cells Using Surface-Immobilized Anti-Kinase Insert Domain Receptor Antibody. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011;110306233138079.
143. Zhang M, Wang Z, Wang Z, Feng S, Xu H, Zhao Q, et al. Immobilization of anti-CD31 antibody on electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffolds through hydrophobins for specific adhesion of endothelial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011 Jun;85(1):32–9.
144. Marchand-Brynaert J, Deldime M, Dupont I, Dewez J-L, Schneider Y-J. Surface Functionalization of Poly(ethylene terephthalate) Film and Membrane by Controlled Wet Chemistry: Chemical Characterization of Carboxylated Surfaces. *J Colloid Interface Sci*. 1995 Jul 1;173(1):236–44.
145. Mougnot P, Koch M, Dupont I, Schneider Y-J, Marchand-Brynaert J. Surface Functionalization of Polyethylene Terephthalate Film and Membranes by Controlled Wet Chemistry: II. Reactivity Assays of Hydroxyl Chain Ends. *J Colloid Interface Sci*. 1996;177(1):162–170.
146. Boxus T, Deldimerubbens M, Mougnot P, Schneider Y, Marchandbrynaert J. Chemical assays of end-groups displayed on the surface of poly(ethylene terephthalate) (PET) films and membranes by radiolabeling. *Polym Adv Technol*. 1996;7(7):589–98.
147. Fischer-Colbrie G, Heumann S, Liebminger S, Almansa E, Cavaco-Paulo A, Guebitz GM. New enzymes with potential for PET surface modification. *Biocatal Biotransformation* 2004 Vol225-6 P341-346. 2004;22(5–6):341–6.

148. Pu FR, Williams RL, Markkula TK, Hunt JA. Effects of plasma treated PET and PTFE on expression of adhesion molecules by human endothelial cells in vitro. *Biomaterials*. 2002;23(11):2411–2428.
149. Siow KS, Britcher L, Kumar S, Griesser HJ. Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review. *Plasma Process Polym*. 2006 Aug 15;3(6–7):392–418.
150. Jingrun R, Jin W, Hong S, Nan H. Surface modification of polyethylene terephthalate with albumin and gelatin for improvement of anticoagulation and endothelialization. *Appl Surf Sci*. 2008 Nov;255(2):263–6.
151. Thalla PK, Contreras-García A, Fadlallah H, Barrette J, De Crescenzo G, Merhi Y, et al. A Versatile Star PEG Grafting Method for the Generation of Nonfouling and Nonthrombogenic Surfaces. *BioMed Res Int*. 2013;2013:1–12.
152. Chollet C, Chanseau C, Brouillaud B, Durrieu MC. RGD peptides grafting onto poly(ethylene terephthalate) with well controlled densities. *Biomol Eng*. 2007 Nov;24(5):477–82.
153. LeBaron RG, Athanasiou KA. Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials. *Tissue Eng*. 2000;6(2):85–103.
154. Lee TT, García JR, Paez JI, Singh A, Phelps EA, Weis S, et al. Light-triggered in vivo activation of adhesive peptides regulates cell adhesion, inflammation and vascularization of biomaterials. *Nat Mater*. 2014 Dec 15;14(3):352–60.
155. Smadja DM. PAR-1 Activation on Human Late Endothelial Progenitor Cells Enhances Angiogenesis In Vitro With Upregulation of the SDF-1/CXCR4 System. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Nov 1;25(11):2321–7.
156. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials*. 2007 Dec;28(34):5009–27.
157. Zhou M, Liu Z, Liu C, Jiang X, Wei Z, Qiao W, et al. Tissue engineering of small-diameter vascular grafts by endothelial progenitor cells seeding heparin-coated decellularized scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012 Jan;100B(1):111–20.
158. Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, Ong ATL, McFadden EP, Sianos G, et al. Endothelial Progenitor Cell Capture by Stents Coated With Antibody Against CD34. *J Am Coll Cardiol*. 2005 May;45(10):1574–9.
159. Wang X. Peptide linked polymers for cardiovascular applications [Internet]. The Ohio State University; 2012 [cited 2016 Mar 10]. Available from: https://etd.ohiolink.edu/!etd.send_file?accession=osu1340826344&disposition=inline
160. Veleva AN, Heath DE, Cooper SL, Patterson C. Selective endothelial cell attachment to peptide-modified terpolymers. *Biomaterials*. 2008 Sep;29(27):3656–61.
161. Veleva AN, Cooper SL, Patterson C. Selection and initial characterization of novel peptide ligands that bind specifically to human blood outgrowth endothelial cells. *Biotechnol Bioeng*. 2007 Sep 1;98(1):306–12.
162. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al.

Ischemia-and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999;5(4):434–438.

163. Smadja DM, Bieche I, Emmerich J, Aiach M, Gaussem P. PAR-1 activation has different effects on the angiogenic activity of endothelial progenitor cells derived from human adult and cord blood. *J Thromb Haemost.* 2006;4(12):2729–2731.

164. Brenner C, Kränkel N, Kühnenthal S, Israel L, Remm F, Fischer C, et al. Short-term inhibition of DPP-4 enhances endothelial regeneration after acute arterial injury via enhanced recruitment of circulating progenitor cells. *Int J Cardiol.* 2014 Nov;177(1):266–75.

165. Chang G, Zhang P, Ye L, Lu K, Wang Y, Duan Q, et al. Protective effects of sitagliptin on myocardial injury and cardiac function in an ischemia/reperfusion rat model. *Eur J Pharmacol.* 2013 Oct;718(1–3):105–13.

166. Liu Z, Stanojevic V, Avadhani S, Yano T, Habener JF. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4) axis activation induces intra-islet glucagon-like peptide-1 (GLP-1) production and enhances beta cell survival. *Diabetologia.* 2011 Aug;54(8):2067–76.

167. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann W, Zeiher A, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Nov;39(5):733–42.

168. Zhang C, Srinivasan Y, Arlow DH, Fung JJ, Palmer D, Zheng Y, et al. High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature.* 2012 Dec 9;492(7429):387–92.

169. Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong J-P. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:381.

170. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res.* 2010 Jan;339(1):269–80.

171. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand Binding to Integrins. *J Biol Chem.* 2000 Jul 21;275(29):21785–8.

172. Wudebwe UNG, Bannerman A, Goldberg-Oppenheimer P, Paxton JZ, Williams RL, Grover LM. Exploiting cell-mediated contraction and adhesion to structure tissues in vitro. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2014 Dec 22;370(1661):20140200–20140200.

173. Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science.* 1997;276(5317):1425–8.

174. Cavalcanti-Adam EA, Volberg T, Micoulet A, Kessler H, Geiger B, Spatz JP. Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics Are Regulated by Spacing of Integrin Ligands. *Biophys J.* 2007 Apr;92(8):2964–74.

175. Pompe T, Mitdank C, Werner C. Quantitative analysis of fibronectin fibrillogenesis by endothelial cells on biomaterials. *J Phys Condens Matter.* 2004 Jul 7;16(26):S2421–6.

176. Pompe T, Renner L, Werner C. Nanoscale Features of Fibronectin Fibrillogenesis Depend on Protein-Substrate Interaction and Cytoskeleton Structure. *Biophys J*. 2005 Jan;88(1):527–34.
177. Peng R, Yao X, Ding J. Effect of cell anisotropy on differentiation of stem cells on micropatterned surfaces through the controlled single cell adhesion. *Biomaterials*. 2011 Nov;32(32):8048–57.
178. Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT, Mrksich M. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Mar 16;107(11):4872–7.
179. Cooke JP. Flow, NO, and atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(3):768–770.
180. Conway DE, Williams MR, Eskin SG, McIntire LV. Endothelial cell responses to atheroprone flow are driven by two separate flow components: low time-average shear stress and fluid flow reversal. *AJP Heart Circ Physiol*. 2010 Feb 1;298(2):H367–74.
181. Hoesli CA, Garnier A, Juneau P-M, Chevallier P, Duchesne C, Laroche G. A fluorophore-tagged RGD peptide to control endothelial cell adhesion to micropatterned surfaces. *Biomaterials*. 2014 Jan;35(3):879–90.
182. Di Canio C, Lamponi S, Barbucci R. Spiral and square microstructured surfaces: The effect of the decreasing size of photo-immobilized hyaluronan domains on cell growth. *J Biomed Mater Res A*. 2010;92(1):276–84.
183. Li S, Bhatia S, Hu YL, Shiu YT, Li YS, Usami S, et al. Effects of morphological patterning on endothelial cell migration. *Biorheology*. 2001;38(2–3):101.
184. Qin D, Xia Y, Whitesides GM. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nat Protoc*. 2010 Mar;5(3):491–502.
185. Aline Cerf, Christophe Vieu. *Soft Lithography, a Tool to Address Single-Objects Investigations*. INTECH Open Access Publisher; 2010.
186. Xia, Kim, Zhao, Rogers, Prentiss, Whitesides. Complex Optical Surfaces Formed by Replica Molding Against Elastomeric Masters. *Science*. 1996;273(5273):347.
187. Choi JS, Piao Y, Seo TS. Fabrication of a circular PDMS microchannel to construct 3D culture microsystem. In: 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. 2012.
188. Choi JS, Piao Y, Seo TS. Circumferential alignment of vascular smooth muscle cells in a circular microfluidic channel. *Biomaterials*. 2014 Jan;35(1):63–70.
189. Ye F, Jiang J, Chang H, Xie L, Deng J, Ma Z, et al. Improved single-cell culture achieved using micromolding in capillaries technology coupled with poly (HEMA). *Biomicrofluidics*. 2015 Jul;9(4):044106.
190. Norman J, Desai T. Methods for Fabrication of Nanoscale Topography for Tissue Engineering Scaffolds. *Ann Biomed Eng*. 2006;34(1):89–101.

191. Murr LE, Amato KN, Li SJ, Tian YX, Cheng XY, Gaytan SM, et al. Microstructure and mechanical properties of open-cellular biomaterials prototypes for total knee replacement implants fabricated by electron beam melting. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011 Oct;4(7):1396–411.
192. Barcelo S, Li Z. Nanoimprint lithography for nanodevice fabrication. *Nano Converg* [Internet]. 2016 Dec [cited 2018 Aug 19];3(1). Available from: <http://nanoconvergencejournal.springeropen.com/articles/10.1186/s40580-016-0081-y>
193. Stewart MD, Willson CG. Imprint Materials for Nanoscale Devices. *MRS Bull*. 2005;30(12):947–51.
194. Engel E, Martínez E, Mills CA, Funes M, Planell JA, Samitier J. Mesenchymal stem cell differentiation on microstructured poly (methyl methacrylate) substrates. *Ann Anat*. 2009;191(1):136–44.
195. Franco D, Klingauf M, Bednarzik M, Cecchini M, Kurtcuoglu V, Gobrecht J, et al. Control of initial endothelial spreading by topographic activation of focal adhesion kinase. *Soft Matter*. 2011;7(16):7313–24.
196. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr 1;55(4):611–22.
197. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*. 2010 Apr;50(4):S1–5.
198. Taylor SC, Mrkusich EM. The State of RT-Quantitative PCR: Firsthand Observations of Implementation of Minimum Information for the Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE). *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2014;24(1):46–52.
199. Hung H-S, Shyu W-C, Tsai C-H, Hsu S-H, Lin S-Z. Transplantation of Endothelial Progenitor Cells as Therapeutics for Cardiovascular Diseases. *Cell Transplant*. 2009 Sep;18(9):1003–12.
200. Urbich C. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ Res*. 2004 Aug 20;95(4):343–53.
201. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11(1):73–91.
202. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964–966.
203. Patan S. Vasculogenesis and Angiogenesis as Mechanisms of Vascular Network Formation, Growth and Remodeling. *J Neurooncol*. 2000;50(1):1–15.
204. Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008 Jun;11(2):109–19.

205. Shi Q, Wu MH-D, Hayashida N, Wechezak AR, Clowes AW, Sauvage LR. Proof of fall-out endothelialization of impervious dacron grafts in the aorta and inferior vena cava of the dog. *J Vasc Surg.* 1994;20(4):546–57.
206. Liu T, Liu S, Zhang K, Chen J, Huang N. Endothelialization of implanted cardiovascular biomaterial surfaces: The development from *in vitro* to *in vivo*: Endothelialization of Implanted Cardiovascular Biomaterial Surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2014 Oct;102(10):3754–72.
207. Kawamoto A, Losordo DW. Endothelial Progenitor Cells for Cardiovascular Regeneration. *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18(1):33–7.
208. Yoder MC. Human Endothelial Progenitor Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Jul 1;2(7):a006692–a006692.
209. Cheng C-C, Chang S-J, Chueh Y-N, Huang T-S, Huang P-H, Cheng S-M, et al. Distinct angiogenesis roles and surface markers of early and late endothelial progenitor cells revealed by functional group analyses. *BMC Genomics.* 2013;14(1):182.
210. Hur J, Yoon C-H, Kim H-S, Choi J-H, Kang H-J, Hwang K-K, et al. Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Feb 1;24(2):288–93.
211. Prasain N, Lee MR, Vemula S, Meador JL, Yoshimoto M, Ferkowicz MJ, et al. Differentiation of human pluripotent stem cells to cells similar to cord-blood endothelial colony-forming cells. *Nat Biotechnol.* 2014 Oct 12;32(11):1151–7.
212. Kushner EJ, Van Guilder GP, MacEneaney OJ, Cech JN, Stauffer BL, DeSouza CA. Aging and endothelial progenitor cell telomere length in healthy men. *Clin Chem Lab Med [Internet].* 2009 Jan 1 [cited 2017 Nov 20];47(1). Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.2009.47.issue-1/cclm.2009.016/cclm.2009.016.xml>
213. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 2000;105(11):1527.
214. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood.* 2007;109(5):1801–1809.
215. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002;29(1):23–39.
216. Deindl E, Boengler K, Van Royen N, Schaper W. Differential expression of GAPDH and β -actin in growing collateral arteries. *Mol Cell Biochem.* 2002;236(1):139–146.
217. Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jan;313(4):856–62.
218. Synnergren J, Giesler TL, Adak S, Tandon R, Noaksson K, Lindahl A, et al.

Differentiating human embryonic stem cells express a unique housekeeping gene signature. *Stem Cells*. 2007;25(2):473–480.

219. Thébaud NB, Bareille R, Daculsi R, Bourget C, Rémy M, Kerdjoudj H, et al. Polyelectrolyte multilayer films allow seeded human progenitor-derived endothelial cells to remain functional under shear stress in vitro. *Acta Biomater*. 2010 Apr;6(4):1437–45.

220. Kim J, Jeon Y-J, Kim HE, Shin JM, Chung HM, Chae J-I. Comparative proteomic analysis of endothelial cells progenitor cells derived from cord blood- and peripheral blood for cell therapy. *Biomaterials*. 2013 Feb;34(6):1669–85.

221. Boivin M-C, Chevallier P, Hoesli CA, Lagueux J, Bareille R, Rémy M, et al. Human saphenous vein endothelial cell adhesion and expansion on micropatterned polytetrafluoroethylene. *J Biomed Mater Res A*. 2013 Mar;101A(3):694–703.

222. Tichopad A. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res*. 2003 Oct 15;31(20):122e – 122.

223. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. 2004;26(6):509–515.

224. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004;64(15):5245–5250.

225. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):research0034–1.

226. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol*. 2006;7(1):33.

227. Forootan A, Sjöback R, Björkman J, Sjögreen B, Linz L, Kubista M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol Detect Quantif*. 2017 Jun;12:1–6.

228. Ragni E, Viganò M, Rebullà P, Giordano R, Lazzari L. What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes. *J Cell Mol Med*. 2013 Jan;17(1):168–80.

229. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int J Biol Sci*. 2013;9(10):1057–69.

230. Stellos K, Langer H, Daub K, Schoenberger T, Gauss A, Geisler T, et al. Platelet-Derived Stromal Cell-Derived Factor-1 Regulates Adhesion and Promotes Differentiation of Human CD34+ Cells to Endothelial Progenitor Cells. *Circulation*. 2008 Jan 15;117(2):206–15.

231. Chen G, Zhao L, Feng J, You G, Sun Q, Li P, et al. Validation of Reliable Reference Genes for Real-Time PCR in Human Umbilical Vein Endothelial Cells on Substrates with Different Stiffness. Lionetti V, editor. PLoS ONE. 2013 Jun 28;8(6):e67360.
232. Brett P., Harle J, Salih V, Mihoc R, Olsen I, Jones F., et al. Roughness response genes in osteoblasts. *Bone*. 2004 Jul;35(1):124–33.
233. Chen W-C, Chen Y-S, Ko C-L, Lin Y, Kuo T-H, Kuo H-N. Interaction of progenitor bone cells with different surface modifications of titanium implant. *Mater Sci Eng C*. 2014 Apr;37:305–13.
234. Oturai DB, Søndergaard HB, Börnsen L, Sellebjerg F, Romme Christensen J. Identification of Suitable Reference Genes for Peripheral Blood Mononuclear Cell Subset Studies in Multiple Sclerosis. *Scand J Immunol*. 2016 Jan;83(1):72–80.
235. Żyżyńska-Granica B, Koziak K. Identification of Suitable Reference Genes for Real-Time PCR Analysis of Statin-Treated Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Song Q, editor. PLoS ONE. 2012 Dec 10;7(12):e51547.
236. Li T, Diao H, Zhao L, Xing Y, Zhang J, Liu N, et al. Identification of suitable reference genes for real-time quantitative PCR analysis of hydrogen peroxide-treated human umbilical vein endothelial cells. *BMC Mol Biol* [Internet]. 2017 Dec [cited 2017 Oct 12];18(1). Available from: <http://bmcmolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12867-017-0086-z>
237. Zoghbi WA, Duncan T, Antman E, Barbosa M, Champagne B, Chen D, et al. Sustainable Development Goals and the Future of Cardiovascular Health: A Statement From the Global Cardiovascular Disease Taskforce. *J Am Heart Assoc*. 2014 Sep 22;3(5):e000504–e000504.
238. Chlupac J, Filova E, Bacakova L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol Res*. 2009;58:S119.
239. Jonas RA, Ziemer G, Schoen FJ, Britton L, Castaneda AR. A new sealant for knitted Dacron prostheses: minimally cross-linked gelatin. *J Vasc Surg*. 1988;7(3):414–419.
240. Takami Y, Tajima K, Kato W, Fujii K, Hibino M, Munakata H, et al. Long-term size follow-up of knitted Dacron grafts (Gelseal) used in the ascending aorta. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2012 May 1;14(5):529–31.
241. Vohra R, Thomson GJL, Carr HMH, Sharma H, Walker MG. Comparison of different vascular prostheses and matrices in relation to endothelial seeding. *Br J Surg*. 1991;78(4):417–420.
242. Begovac PC, Thomson RC, Fisher JL, Hughson A, Gällhagen A. Improvements in GORE-TEX® vascular graft performance by Carmeda® bioactive surface heparin immobilization. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003 May;25(5):432–7.
243. 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 May;26(13):1457–66.

244. Kumar TRS, Krishnan LK. Fibrin-mediated endothelial cell adhesion to vascular biomaterials resists shear stress due to flow. *J Mater Sci Mater Med*. 2002;13(8):751–755.
245. van Hinsbergh VWM. Endothelium—role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol*. 2012 Jan;34(1):93–106.
246. Schmidt D, Breymann C, Weber A, Guenter CI, Neuenschwander S, Zund G, et al. Umbilical Cord Blood Derived Endothelial Progenitor Cells for Tissue Engineering of Vascular Grafts. *Ann Thorac Surg*. 2004 Dec;78(6):2094–8.
247. Shirota T, Yasui H, Shimokawa H, Matsuda T. Fabrication of endothelial progenitor cell (EPC)-seeded intravascular stent devices and in vitro endothelialization on hybrid vascular tissue. *Biomaterials*. 2003 Jun;24(13):2295–302.
248. Blindt R, Vogt F, Astafieva I, Fach C, Hristov M, Krott N, et al. A Novel Drug-Eluting Stent Coated With an Integrin-Binding Cyclic Arg-Gly-Asp Peptide Inhibits Neointimal Hyperplasia by Recruiting Endothelial Progenitor Cells. *J Am Coll Cardiol*. 2006 May;47(9):1786–95.
249. Kang C-K, Lim W-H, Kyeong S, Choe W-S, Kim H-S, Jun B-H, et al. Fabrication of biofunctional stents with endothelial progenitor cell specificity for vascular re-endothelialization. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013 Feb;102:744–51.
250. Lee JM, Choe W, Kim B-K, Seo W-W, Lim W-H, Kang C-K, et al. Comparison of endothelialization and neointimal formation with stents coated with antibodies against CD34 and vascular endothelial-cadherin. *Biomaterials*. 2012 Dec;33(35):8917–27.
251. Lin Q, Ding X, Qiu F, Song X, Fu G, Ji J. In situ endothelialization of intravascular stents coated with an anti-CD34 antibody functionalized heparin–collagen multilayer. *Biomaterials*. 2010 May;31(14):4017–25.
252. Ye X, Hu X, Wang H, Liu J, Zhao Q. Polyelectrolyte multilayer film on decellularized porcine aortic valve can reduce the adhesion of blood cells without affecting the growth of human circulating progenitor cells. *Acta Biomater*. 2012 Mar;8(3):1057–67.
253. Li Q, Wang Z, Zhang S, Zheng W, Zhao Q, Zhang J, et al. Functionalization of the surface of electrospun poly(epsilon-caprolactone) mats using zwitterionic poly(carboxybetaine methacrylate) and cell-specific peptide for endothelial progenitor cells capture. *Mater Sci Eng C*. 2013 Apr;33(3):1646–53.
254. Chen X, Wang J, An Q, Li D, Liu P, Zhu W, et al. Electrospun poly(l-lactic acid-co-epsilon-caprolactone) fibers loaded with heparin and vascular endothelial growth factor to improve blood compatibility and endothelial progenitor cell proliferation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015 Apr;128:106–14.
255. Bérard X, Rémy-Zolghadri M, Bourget C, Turner N, Bareille R, Daculsi R, et al. Capability of human umbilical cord blood progenitor-derived endothelial cells to form an efficient lining on a polyester vascular graft in vitro. *Acta Biomater*. 2009 May;5(4):1147–57.
256. Chang N-J, Lam C-F, Lin C-C, Chen W-L, Li C-F, Lin Y-T, et al. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells in porous PLGA scaffolds create

a microenvironment for the regeneration of hyaline cartilage in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Oct;21(10):1613–22.

257. Rotmans JJ, Heyligers JM, Stroes ES, Pasterkamp G. Endothelial progenitor cell-seeded grafts: rash and risky. *Can J Cardiol*. 2006;22(11):929–932.

258. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2009 Mar;17(2):153–62.

259. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*. 2003 Nov;24(24):4385–415.

260. Colin T, Durrieu M-C, Joie J, Lei Y, Mammeri Y, Poignard C, et al. Modeling of the migration of endothelial cells on bioactive micropatterned polymers. *Math Biosci Eng*. 2013 Jun;10(4):997–1015.

261. Kapp TG, Rechenmacher F, Neubauer S, Maltsev OV, Cavalcanti-Adam EA, Zarka R, et al. A Comprehensive Evaluation of the Activity and Selectivity Profile of Ligands for RGD-binding Integrins. *Sci Rep*. 2017 Jan 11;7:39805.

262. Charbonnel B, Karasik A, Liu J, Wu M, Meininger G. Efficacy and Safety of the Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Sitagliptin Added to Ongoing Metformin Therapy in Patients With Type 2 Diabetes Inadequately Controlled With Metformin Alone. *Diabetes Care*. 2006 Dec 1;29(12):2638.

263. Schaffer. Engineering microenvironments to control stem cell fate and function. *StemBook* [Internet]. 2008 [cited 2018 Jun 27]; Available from: <http://www.stembook.org/node/484>

264. Whitesides GM, Ostuni E, Takayama S, Jiang X, Ingber DE. Soft Lithography in Biology and Biochemistry. *Annu Rev Biomed Eng*. 2001 Aug;3(1):335–73.

265. Feinberg AW, Wilkerson WR, Seegert CA, Gibson AL, Hoipkemeier-Wilson L, Brennan AB. Systematic variation of microtopography, surface chemistry and elastic modulus and the state dependent effect on endothelial cell alignment. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Aug;86A(2):522–34.

266. Kidoaki S, Matsuda T. Shape-engineered vascular endothelial cells: Nitric oxide production, cell elasticity, and actin cytoskeletal features. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Jun 1;81A(3):728–35.

267. Lamponi S, Forbicioni M, Barbucci R. The role of fibronectin in cell adhesion to spiral patterned TiO₂ nanoparticles. *J Appl Biomater Biomech JABB*. 2009;7(2):104.

268. Uchida E, Uyama Y, Ikada Y. SORPTION OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT ANIONS INTO THIN POLYCATION LAYERS GRAFTED ONTO A FILM. *LANGMUIR*. 1993;9(4):1121–4.

269. Pichavant L, Amador G, Jacqueline C, Brouillaud B, Héroguez V, Durrieu M-C. pH-controlled delivery of gentamicin sulfate from orthopedic devices preventing nosocomial infections. *J Controlled Release*. 2012 Sep;162(2):373–81.

270. Bilem I, Chevallier P, Plawinski L, Sone ED, Durrieu MC, Laroche G. RGD

and BMP-2 mimetic peptide crosstalk enhances osteogenic commitment of human bone marrow stem cells. *Acta Biomater.* 2016 May;36:132–42.

271. Royer C, Bégin A-AG, Plawinski L, Lévesque L, Durrieu M-C, Laroche G. Validation of reference genes for real-time PCR of cord blood mononuclear cells, differentiating endothelial progenitor cells, and mature endothelial cells. *Exp Cell Res* [Internet]. 2018 Jul 4; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482718303896>

272. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402–8.

273. Discher DE, Janmey P, Wang Y. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science.* 2005;310(5751):1139–1143.

274. Stevens MM, George JH. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science.* 2005;310(5751):1135–1138.

275. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 2005 Jan;23(1):47–55.

276. Massia SP, Hubbell JA. An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *J Cell Biol.* 1991;114(5):1089–1100.

277. Le Saux G, Magenau A, Böcking T, Gaus K, Gooding JJ. The Relative Importance of Topography and RGD Ligand Density for Endothelial Cell Adhesion. Johannes L, editor. *PLoS ONE.* 2011 Jul 11;6(7):e21869.

278. Chollet C, Labrugère C, Durrieu M-C. Influence de la densité de peptides RGD greffés en surface de polyéthylène téréphtalate sur l'attachement des MC3T3. *IRBM.* 2008 Mar;29(1):7–12.

279. Jin H. A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J Clin Invest.* 2006 Mar 1;116(3):652–62.

280. Igreja C, Fragoso R, Caiado F, Clode N, Henriques A, Camargo L, et al. Detailed molecular characterization of cord blood-derived endothelial progenitors. *Exp Hematol.* 2008 Feb;36(2):193.e1-193.e15.

281. Bompais H, Chagraoui J, Canron X, Crisan M, Liu XH, Anjo A, et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood.* 2004;103(7):2577–2584.

282. Qiao W, Niu L, Liu Z, Qiao T, Liu C. Endothelial nitric oxide synthase as a marker for human endothelial progenitor cells. *Tohoku J Exp Med.* 2010;221(1):19.

283. Huang NF, Patlolla B, Abilez O, Sharma H, Rajadas J, Beygui RE, et al. A matrix micropatterning platform for cell localization and stem cell fate determination. *Acta Biomater.* 2010 Dec;6(12):4614–21.

284. Huang NF, Lai ES, Ribeiro AJS, Pan S, Pruitt BL, Fuller GG, et al. Spatial patterning of endothelium modulates cell morphology, adhesiveness and transcriptional

signature. *Biomaterials*. 2013 Apr;34(12):2928–37.

285. Kusuma S, Smith Q, Facklam A, Gerecht S. Micropattern size-dependent endothelial differentiation from a human induced pluripotent stem cell line: Micropattern size-dependent endothelial differentiation from a human induced pluripotent stem cell line. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017 Mar;11(3):855–61.

286. Wang YC, Ho C-C. Micropatterning of proteins and mammalian cells on biomaterials. *FASEB J*. 2004 Mar;18(3):525–7.

287. Ankeny RF, Ankeny CJ, Nerem RM, Jo H. *Maturing EPCs into endothelial cells: may the force be with the EPCs*. Focus on “Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells.” *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2012 Sep 15;303(6):C589–91.

288. Angelos MG, Brown MA, Satterwhite LL, Levering VW, Shaked NT, Truskey GA. Dynamic Adhesion of Umbilical Cord Blood Endothelial Progenitor Cells under Laminar Shear Stress. *Biophys J*. 2010 Dec;99(11):3545–54.

289. Cheng M, Guan X, Li H, Cui X, Zhang X, Li X, et al. Shear Stress Regulates Late EPC Differentiation via Mechanosensitive Molecule-Mediated Cytoskeletal Rearrangement. Pesce M, editor. *PLoS ONE*. 2013 Jul 2;8(7):e67675.

290. Smadja DM, Bièche I, Helley D, Laurendeau I, Simonin G, Muller L, et al. Increased VEGFR2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis with up-regulation of integrin α_6 . *J Cell Mol Med*. 2007 Sep;11(5):1149–61.

291. de la Puente P, Muz B, Azab F, Azab AK. Cell Trafficking of Endothelial Progenitor Cells in Tumor Progression. *Clin Cancer Res*. 2013 Jul 1;19(13):3360–8.

292. Kokubo T, Uchida H, Choi E. Integrin $\alpha(v)\beta_3$ as a target in the prevention of neointimal hyperplasia. *J Vasc Surg*. 2007;45:33A-38A.

293. Obi S, Yamamoto K, Shimizu N, Kumagaya S, Masumura T, Sokabe T, et al. Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985*. 2009;106(1):203.

294. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1–CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol*. 2007;28(7):299–307.

295. Chua S, Sheu J-J, Chen Y-L, Chang L-T, Sun C-K, Leu S, et al. Sitagliptin therapy enhances the number of circulating angiogenic cells and angiogenesis—evaluations in vitro and in the rat critical limb ischemia model. *Cytotherapy*. 2013 Sep;15(9):1148–63.

296. Adipurnama I, Yang M-C, Ciach T, Butruk-Raszeja B. Surface modification and endothelialization of polyurethane for vascular tissue engineering applications: a review. *Biomater Sci*. 2017;5(1):22–37.

297. Aper T, Haverich A, Teebken O. New developments in tissue engineering of vascular prosthetic grafts. *VASA-J Vasc Dis*. 2009;38(2):99–122.

298. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials*. 2007 Dec;28(34):5009–27.

299. Goh E, Wong E, Farhatnia Y, Tan A, Seifalian A. Accelerating in Situ Endothelialisation of Cardiovascular Bypass Grafts. *Int J Mol Sci*. 2014 Dec 29;16(1):597–627.
300. Avci-Adali M, Perle N, Ziemer G, Wendel HP. Current concepts and new developments for autologous in vivo endothelialisation of biomaterials for intravascular applications. *Eur Cell Mater*. 2011;21:157–176.
301. Greenwald SE, Berry CL. Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties. *J Pathol*. 2000 Feb;190(3):292–9.
302. Eggermann J. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res*. 2003 May 1;58(2):478–86.
303. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*. 2004;37(1):112.
304. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. 2004;26(6):509–515.
305. Ponsonnet L, Reybier K, Jaffrezic N, Comte V, Lagneau C, Lissac M, et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Mater Sci Eng C*. 2003 Jun;23(4):551–60.
306. Dettin M, Zamuner A, Roso M, Iucci G, Samouillan V, Danesin R, et al. Facile and selective covalent grafting of an RGD-peptide to electrospun scaffolds improves HUVEC adhesion: FACILE AND SELECTIVE COVALENT GRAFTING. *J Pept Sci*. 2015 Oct;21(10):786–95.
307. Sinha R, Le Gac S, Verdonschot N, van den Berg A, Koopman B, Rouwkema J. Endothelial cell alignment as a result of anisotropic strain and flow induced shear stress combinations. *Sci Rep*. 2016 Jul 12;6:29510.
308. Suzuki Y, Yamamoto K, Ando J, Matsumoto K, Matsuda T. Arterial shear stress augments the differentiation of endothelial progenitor cells adhered to VEGF-bound surfaces. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jun;423(1):91–7.
309. Vilmar A, Garcia-Foncillas J, Huarriz M, Santoni-Rugiu E, Sorensen JB. RT-PCR versus immunohistochemistry for correlation and quantification of ERCC1, BRCA1, TUBB3 and RRM1 in NSCLC. *Lung Cancer*. 2012 Mar;75(3):306–12.
310. Ohnishi H, Sasaki H, Nakamura Y, Kato S, Ando K, Narimatsu H, et al. Regulation of cell shape and adhesion by CD34. *Cell Adhes Migr*. 2013 Sep 25;7(5):426–33.
311. Vallières K, Petitclerc É, Laroche G. On the ability of imatinib mesylate to inhibit smooth muscle cell proliferation without delaying endothelialization: An in vitro study. *Vascul Pharmacol*. 2009 Jul;51(1):50–6.
312. Park YJ, Min S-I, Jung IM, Lee T, Ha J, Chung JK, et al. Different Responses

of Neointimal Cells to Imatinib Mesylate and Rapamycin Compared with Normal Vascular Smooth Muscle Cells. *Vasc Spec Int.* 2014 Mar 30;30(1):5–10.

ANNEXES

1. Détermination de la concentration de greffage

Afin de déterminer la concentration de principes à utiliser pour le greffage nous avons testé plusieurs concentrations et plusieurs durées de rinçage afin de s'affranchir des molécules pouvant être adsorbées en surfaces pour ne révéler que les molécules greffées de façon covalente. Le terme sonication dans la Figure 54 correspond à une séquence de rinçage de 6 fois 15 minutes de rinçage sous ultrasons dans de l'eau ultrapure, changée à chaque étape.

Avec une concentration de 10^{-5} M, il est possible d'atteindre un plateau après 10 jours de rinçage avec une valeur d'intensité de fluorescence très proche de 10^{-3} M. Nous utiliserons donc cette concentration pour greffer les peptides en surface des films de PET.

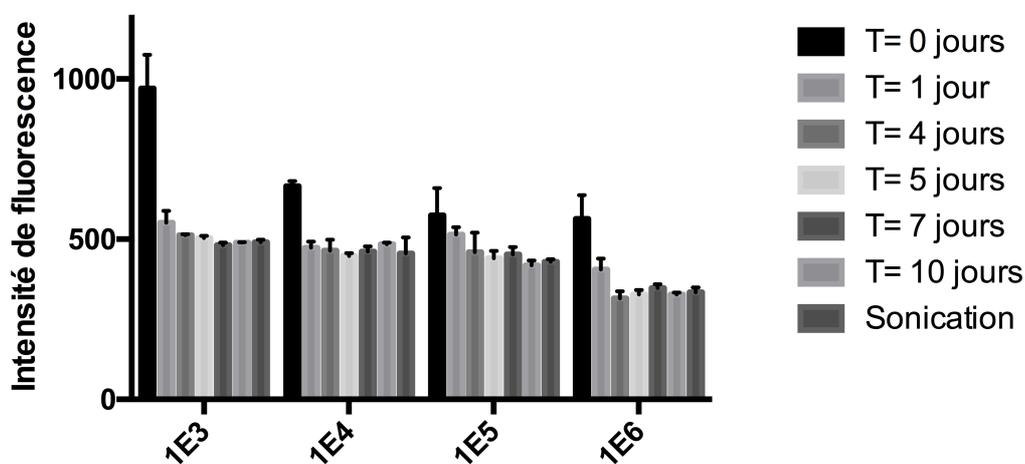


Figure 54 : Intensité de fluorescence mesurée par microscopie à fluorescence du GRGDSK-TAMRA après plusieurs durées de rinçage ou des rinçages sous ultrasons.

2. Protocole d'obtention des ECFCs

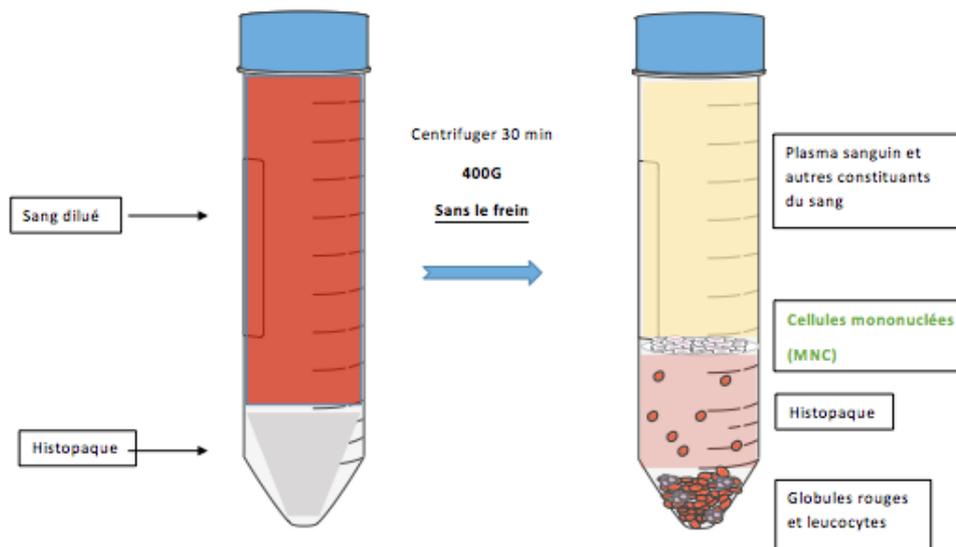
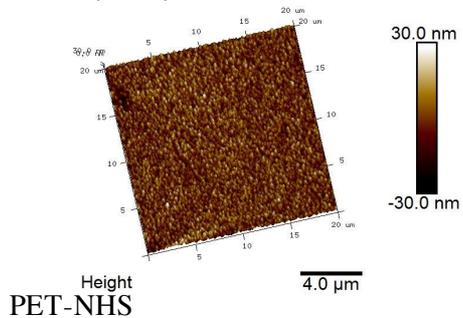


Figure 55 : Schéma de la séparation des cellules mononucléées issues du sang total.

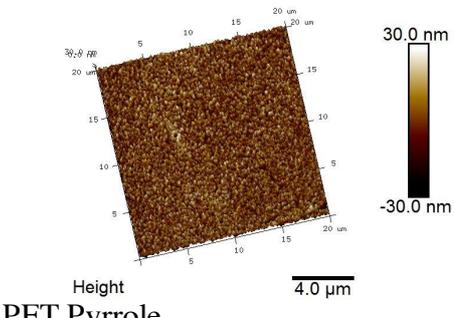
Brièvement, dans un tube falcon de 50 mL nous mettons de l'histopaque puis le sang dilué (dilution au $\frac{1}{2}$) dans du PBS EDTA 2mM en faisant bien attention que ces derniers ne se mélangent pas puis nous centrifugeons à 400 pendant 30 minutes, les constituants du sang vont être séparés par gradient de densité. Ensuite, nous allons prélever uniquement l'anneau de cellules mononucléées. Plusieurs rinçages seront effectués afin d'éliminer un maximum de globules rouges. Les cellules seront ensuite mises en culture sur une flasque pendant 2h en présence de milieu EGM2-MV pour éliminer les cellules adhérentes. Les cellules sont ensuite triées à l'aide de microbilles magnétiques marquées avec l'anticorps CD34, pour ne récupérer à la fin que la fraction de cellules CD34+. Les cellules sont ensuite ensemencées sur des puits de plaque 6 puits revêtus de collagène. Le milieu est ensuite changé après 4 jours de culture à 37 °C et 5% de CO₂. Ensuite le milieu est changé strictement tous les 3 jours. L'apparition de colonie d'ECFCs est surveillée à chaque changement de milieu. Les ECFCs apparaissent typiquement entre 11 et 20 jours.

3. Images AFM des matériaux modifiés

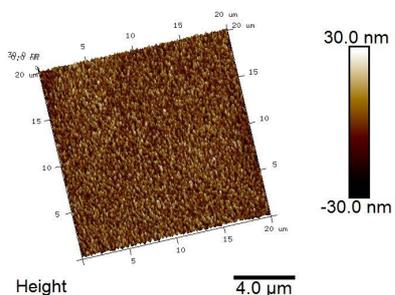
PET-Hydrolysé



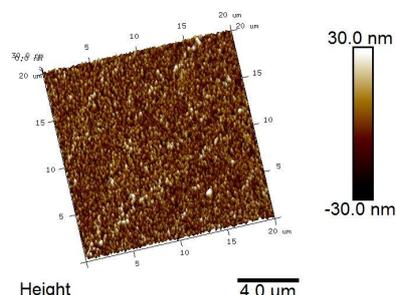
PET-COOH



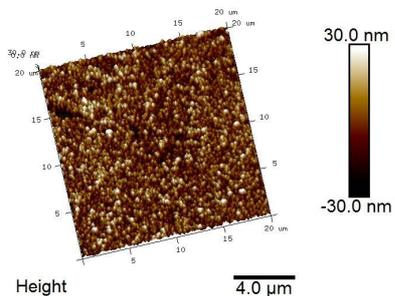
PET-NHS



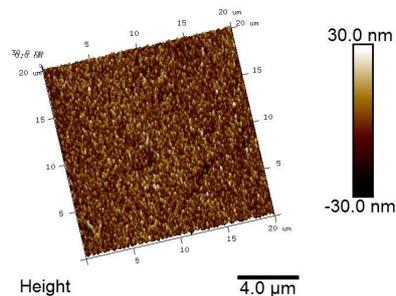
PET-Pyrrole



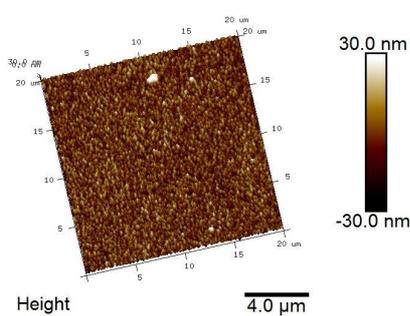
PET-RGD



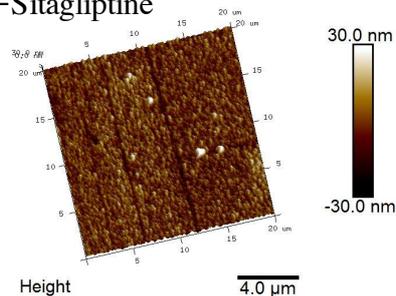
PET-GHM



PET-RSFLLRN



PET-Sitagliptine



Communications orales et affichées

Contribution dans des conférences internationales

1. Caroline Royer, Andrée-Anne Guay Bégin, Laurent Plawinski, Marie-Christine Durrieu and Gaétan Laroche. **Differentiation of Mononuclear Cells from Cord Blood in Endothelial Progenitors Cells onto Bioactive Poly (ethylene terephthalate) Film.** [Communication par affiche, 28th European Conference on Biomaterials, ESB 2017, 4 au 8 septembre 2017, Athènes, Grèce]

2. Caroline Royer, Laurent Plawinski, Cédric Ayela, Gaétan Laroche and Marie-Christine Durrieu. **Impact of peptides micro-patterning on Endothelial Progenitors and Endothelial Mature Cells.** [Communication orale, 10th World Biomaterials Congress, WBC2016, 17 au 22 mai 2016, Montréal, Canada]

3. Caroline Royer, Pascale Chevallier, Laurent Plawinski, Gaétan Laroche and Marie-Christine Durrieu. **Grafting of bioactive molecules on PET to recruit endothelial progenitor cells and enhance adhesion of endothelial cells.** [Communication par affiche, 9th European Symposium on Vascular Biomaterials, ESVB 2015, 16-17 Octobre 2015, Strasbourg, France]

4. Caroline Royer, Laurent Plawinski, Gaétan Laroche and Marie-Christine Durrieu. **Grafting of bioactive molecules on PET to recruit endothelial progenitor cells and enhance adhesion of endothelial cells.** [Communication orale, 27th European Conference on Biomaterials, ESB 2015, 30 aout-2 septembre 2015, Cracovie, Pologne]

Contribution dans des conférences nationales

1. Seconde place au concours Ma thèse en 180 secondes à la faculté de Sciences et Génie de l'Université Laval (Québec, Canada)

2. Caroline Royer, Andrée-Anne Guay Bégin, Laurent Plawinski Christel Chanseau, Marie-Christine Durrieu and Gaétan Laroche. **Differentiation of Mononuclear Cells from Cord Blood in Endothelial Progenitor Cells onto Bioactive Poly (ethylene terephthalate) Film.** [Communication orale, 7 éditions du colloque étudiant CERMA, 17 mars 2017, Québec, Canada]

3. Caroline Royer, Laurent Plawinski, Christel Chanseau, Marie-Christine Durrieu

and Gaétan Laroche. **Two-dimensional micropatterning of bioactive molecules to recruit and differentiate endothelial cell progenitors: Potential for endothelialization of poly (ethylene terephthalate).** [Communication orale, 9^{ème} colloque annuelle du CQMF, 24 et 25 novembre 2016, Montréal, Canada]

4. Caroline Royer, Laurent Plawinski, Cedric Ayela, Gaétan Laroche and Marie-Christine Durrieu. **Fabrication of innovative vascular biomaterials for endothelial progenitor cells recruitment and differentiation.** [Communication par affiche, 1^{er} Forum Franco-Québécois d'innovation en santé, 11 et 12 octobre 2016, Montréal, Canada]

5. Caroline Royer, Laurent Plawinski, Christel Chanseau, Laurence Bordenave, Gaétan Laroche, Marie-Christine Durrieu. **Spatially controlled simultaneous patterning of multiple biomolecules to guide endothelial progenitor cells adhesion and differentiation.** [Communication orale, Journée scientifique de la FR TecSan, 14 juin 2016, Bordeaux France]

6. Caroline Royer, Laurent Plawinski, Gaétan Laroche and Marie-Christine Durrieu. **Surface modification of polymer with innovative biomolecules to improve vascular prostheses hemocompatibility.** [Communication par affiche, Journée de l'école doctorale Sciences chimiques, avril 2016, Bordeaux France]

7. Caroline Royer, Pascale Chevallier, Laurent Plawinski, Gaétan Laroche and Marie-Christine Durrieu. **Impact of micropatterned PET with peptides on Endothelial Progenitors differentiation and Endothelial Cells adhesion.** [Communication orale, CBMN day, 7 avril 2016, Pessac, France]

8. Caroline Royer, Pascale Chevallier, Laurent Plawinski, Gaétan Laroche and Marie-Christine Durrieu. **Endothelialization of PET: Grafting of bioactive molecules to recruit endothelial progenitor cells and enhance adhesion of endothelial cells.** [Communication par affiche BIOMAT2015, 12 au 14 octobre 2015, Ile de Ré, France]