

Cellules endothéliales issues de progéniteurs versus cellules endothéliales matures : caractérisation en vue de leur utilisation en ingénierie vasculaire

RÉSUMÉ



Noëlie B. THEBAUD

INSERM, U577, Bordeaux, F-33076 France,
Université Victor-Segalen Bordeaux 2,
UFR d'Odontologie,
Université Victor-Segalen Bordeaux 2,
16-20, cours de la Marne,
33076 Bordeaux.
noelie.thebaud@inserm.fr

Reïne BAREILLE

INSERM, U577, Bordeaux, F-33076 France,
Université Victo-Segalen Bordeaux 2,
33076 Bordeaux

Murielle REMY

INSERM, U577, Bordeaux, F-33076 France,
Université Victo-Segalen Bordeaux 2,
33076 Bordeaux

Chantal BOURGET

INSERM, U577, Bordeaux, F-33076 France,
Université Victo-Segalen Bordeaux 2,
33076 Bordeaux

Richard DACULSI

INSERM, U577, Bordeaux, F-33076 France,
Université Victo-Segalen Bordeaux 2,
33076 Bordeaux

Laurence BORDENAVE

INSERM, U577, Bordeaux, F-33076 France,
Université Victor-Segalen Bordeaux 2,
33076 Bordeaux,
CIC-IT Biomatériaux, Pessac, F-33604 Pessac,
CHU Bordeaux, Hôpital Xavier Arnoz,
33604 Pessac



L'isolement des progéniteurs des cellules endothéliales à partir du sang périphérique humain a généré beaucoup d'espoirs dans le cadre de l'ingénierie tissulaire appliquée aux vaisseaux, en raison des bénéfices qu'ils pourraient apporter comparativement à des cellules endothéliales (CEs) matures. Nous avons étudié la capacité de cellules endothéliales issues de progéniteurs (PDECs pour *progenitor-derived endothelial cells*) à coloniser des matrices de colle de fibrine ou de collagène, comparativement à des CEs de la veine saphène humaine (HSVECS) ou à des CEs de la veine du cordon ombilical (HUVECs) : (a) en conditions statiques, afin de déterminer les conditions optimales de culture ; (b) sous contrainte de cisaillement (*shear stress*) dans des chambres de flux ou des constructions vasculaires tululaires, pour étudier la réponse cellulaire et l'expression au niveau des ARNm sur les deux revêtements, par des analyses sur puces à ADN (*macroarray*) ou par PCR quantitative. Les PDECs caractérisés : (a) peuvent coloniser et se développer sur colle de fibrine ; (b) présentent une résistance plus élevée au stress oxydatif que les HSVECs et les HUVECs ; (c) supportent une contrainte de cisaillement physiologique quand ils recouvrent les deux types de substrats, dans les chambres de flux, et l'expression de leurs gènes est modulée ; (d) colonisent une prothèse vasculaire enduite de collagène et résistent à des forces mécaniques. Nos résultats permettent d'améliorer la caractérisation des PDECs dans le cadre de leur utilisation en ingénierie vasculaire.

Mots clés

- ingénierie tissulaire appliquée aux vaisseaux
- PDECs
- cellules endothéliales
- étude *in vitro*
- *shear stress*
- microarray

AOS 2010;252:339-356
DOI: 10.1051/aos/2010405
© AEOS / EDP Sciences

Introduction

> En dépit d'avancées récentes montrant qu'il est possible de produire, par ingénierie tissulaire, des vaisseaux capables de rester fonctionnels *in vivo* [1-3], l'ingénierie d'un substitut vasculaire de petit calibre, utilisable en pontage périphérique ou coronarien, demeure un défi [4]. Dans un vaisseau de petit calibre issu de l'ingénierie vasculaire, la présence d'un endothélium fonctionnel est indispensable pour créer une interface antithrombogène avec le sang circulant et pour éviter l'initiation et la progression de la cascade pathophysiologique conduisant au développement d'hyperplasie intimale. Cet endothélium peut être formé par l'ensemencement de cellules endothéliales (CEs) humaines, qui peuvent être : des CEs autologues matures, ceci nécessitant la récolte des cellules, leur culture et leur amplification pendant plusieurs semaines, avant leur ensemencement sur des matrices vasculaires [1, 2, 5] ; ou des cellules souches adultes ou progéniteurs qui peuvent aujourd'hui constituer une source intéressante de cellules dans le cadre de stratégies thérapeutiques régénératives [6-10]. En effet, l'isolement des progéniteurs endothéliaux (EPCs pour *Endothelial Progenitor cells*) à partir de sang périphérique humain et de sang de cordon ombilical [11] a généré beaucoup d'espoir dans les domaines de la thérapie cellulaire et de la médecine régénérative, ces précurseurs démontrant de grands avantages : leur relative facilité d'isolement et leur capacité à être amplifiés en culture tout en conservant leur capacité de se différencier en CEs matures. Ainsi ont-ils été utilisés pour l'endothélialisation d'endoprothèses vasculaires artificielles [12] de valves pulmonaires humaines [13], ou de prothèses [14, 15], à la place de cellules matures. Cependant, selon Igreja [16], l'utilisation des EPCs à des fins thérapeutiques est limitée en raison de l'absence de

consensus concernant les conditions de culture optimales permettant leur expansion *ex vivo* et/ou leur différenciation en CEs matures. En plus de la source cellulaire, de nombreux matériaux ont été testés comme des matrices potentielles pour des applications au domaine de l'ingénierie vasculaire [17], chacun présentant des avantages et des inconvénients et aucun d'entre eux n'apparaissant comme le matériau de substitution idéal [18]. Parmi les matériaux naturels, certains, comme le collagène et la colle de fibrine, ont cependant retenu l'attention, principalement en raison de leur excellente biocompatibilité, de leur disponibilité et de la faible réponse inflammatoire qu'ils entraînent. D'autre part, il est bien connu que les CEs, *in vivo*, au sein d'un endothélium, sont continuellement exposées à différentes forces mécaniques (contrainte de cisaillement [ou *shear stress*], pression sanguine et contrainte circonférentielle) et des stimuli biochimiques, qui sont d'importants modulateurs des fonctions, de la croissance et de la structure des cellules vasculaires tant au niveau protéique qu'au niveau des ARNm. Sous contraintes de cisaillement, les CEs perçoivent les stimuli mécaniques et les convertissent en signaux biochimiques, conduisant à l'activation de cascades de signalisation partiellement connues aujourd'hui [19, 20]. Puisque l'endothélium qui revêt le (bio)matériel doit être fonctionnel et répondre aux contraintes exercées par son environnement de la même façon qu'un endothélium vasculaire « normal » peut le faire [21], il est fondamental d'étudier si les fonctions des CEs issues de progéniteurs (PDECs pour *Progenitors derived endothelial cells*) sont aussi modulées par ces stimuli mécaniques [15]. Différents auteurs ont montré récemment que ces cellules pourraient être utilisées pour endothélialiser des prothèses vasculaires [22, 23]. Afin de mieux comprendre la

nature complexe des interactions cellules-matériaux et ainsi prédire et contrôler la biocompatibilité de ces matériaux, nous avons voulu explorer dans cette étude la capacité des PDECs à endothélialiser deux types de revêtements couramment utilisés dans le domaine de l'ingénierie vasculaire pour la différenciation, l'adhésion et la prolifération des cellules, le collagène de type I et la colle de fibrine ; comparativement à

des cellules endothéliales matures de veine saphène humaine (HSVECs) et à des CE de veine de cordon ombilical (HUVECs), dans deux situations complémentaires : l'une statique et l'autre dynamique (exposition à une contrainte de cisaillement), dans des chambres de flux en deux dimensions ou dans des constructions tubulaires en 3D, afin d'étudier comment ces cellules répondent au *shear stress*.

Matériels et méthodes

Isolement et expansion de cellules humaines issues de cellules mononuclées (MNC) de sang périphérique

Les EPCs ont été isolés et cultivés comme précédemment décrit par Fuchs *et al.* [24]. Brièvement, les cellules mononuclées (MNCs) ont été isolées à partir de 45 mL de sang périphérique de donneurs sains, après dilution avec du PBS (*phosphate buffered saline*), 2 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 2 mM d'éthylenediaminetetraacetic acide (EDTA) grâce à une centrifugation par gradient de densité dans une solution de 1,077 g/mL Histopaque® (Sigma-Aldrich), lavées plusieurs fois avec du PBS et cultivées dans de l'EGM-2 (*endothelial cell growth medium-2*, Lonza-Verviers, France) avec les suppléments du kit et 5 % de SVF (GIBCO Life Technologies, Karlsruhe, Allemagne), sur plaques enduites de collagène (*collagen type I ; Rat tail*, BD Biosciences). Un total de 10^7 cellules/puits a été ensemencé sur des plaques de culture 24 puits. Au jour 4, les cellules non adhérentes ont été éliminées des cultures de MNCs. Le milieu de culture est changé tous les deux jours.

Des colonies présentant une morphologie pavimenteuse apparaissent au bout de 2 à 3 semaines de culture et sont alors sélectionnées. Ces cellules sont récoltées en utilisant de la trypsine (0,25 % trypsin-EDTA (Gibco) et sont réensemencées sur de nouveaux puits revêtus de collagènes. Les cellules sont amplifiées pendant plusieurs passages en utilisant les procédures standards de culture cellulaire [24].

Comme cellules contrôles, des cellules endothéliales matures sont isolées et cultivées à partir de veines saphènes (HSVECs) [25] ou à partir de veines de cordon ombilical (HUVECs) comme décrit par Bordenave *et al.*[26], et utilisées à des passages 2 ou 4.

Caractérisation des PDECs

La stabilité du phénotype endothélial pendant l'expansion de ces cellules a été examinée aux passages 5 et 15. Pour les différentes expériences, les cellules utilisées sont à des passages compris entre 10 et 15.

Les critères suivants ont été utilisés pour la caractérisation :

- incorporation cellulaire des Dil-Ac-LDL et fixation de la lectine UEA-1 ;

- marquage par immunofluorescence pour le CD31, la VE-cadhérine et le facteur de von Willebrand (vWF) selon Fush *et al.* [24] ;
- analyse par cytométrie en flux : les cellules ont été isolées des plaques de culture par un traitement rapide à la trypsine/EDTA puis fixées avec de la paraformaldéhyde (PFA) à 1 % pendant 20 minutes à 4 °C. Les cellules ont été incubées, soit avec des anticorps anti-CD45 ou CD34, conjugués à la phycoérythrine (PE), soit avec des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre CD31 ou KDR (Santa Cruz), suivi par une incubation avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 (BD Bioscience). Des immunoglobulines de même isotype servent de contrôle. L'analyse a été réalisée en utilisant un cytomètre de flux FACScan et le logiciel Cell Quest (BD Biosciences).

Évaluation de la prolifération des PDECs sur colle de fibrine

Afin de déterminer si les PDECs peuvent proliférer sur la colle de fibrine (Tissucol®, Baxter AG, Maurepas, France ; 1:5), les PDECs ou les HSVECS ont étéensemencés sur la colle de fibrine à deux densités différentes (10 000 et 20 000 cellules/cm²). Un test MTT a été effectué aux jours 1, 5 et 9. La densité optique est directement proportionnelle au nombre de cellules, comme nous l'avons vérifié avec les différents types de CE (résultats non montrés).

Mesure de la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et évaluation de l'apoptose

La formation de ROS a été mesurée à l'aide d'une sonde fluorescente, le 2' 7'-dichlorofluorescein (DCF). Le 2' 7'-dichlorodihydrofluorescein

(H2DCF-DA, Sigma) entre dans la cellule où des estérases intracellulaires clivent les groupements diacétate. Le H2DCF résultant est retenu dans le cytoplasme et oxydé en DCF par les ROS, devenant ainsi fluorescent. Brièvement, 1,5 x 10³ cellules (PDECs, HSVECS et HUVECS) ont étéensemencées en trois exemplaires dans des plaques 96 puis enduites de collagène et mises en culture pendant une nuit. Les cellules ont été lavées avec une solution de HBSS et incubées 25 minutes avec 50 µm de H2DCF-DA à 37 °C. Les cellules ont ensuite été lavées avec du HBSS et traitées avec différentes concentrations de H₂O₂ pendant une heure. Les intensités de fluorescence ont été mesurées en microplaques avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et une longueur d'onde d'émission de 530 nm à l'aide d'un lecteur de fluorescence (CytoFluor II).

Pour la détection de l'apoptose, les noyaux ont été marqués au Hoechst 33258. Les cellules cultivées pendant 24 h en plaque 48 puits, ont été exposées au H₂O₂ (100 µM) pendant 2 heures, puis fixées avec du paraformaldéhyde à 4 % et marquées au Hoechst (2,5 µg/mL dans du PBS, pH 7.0) pendant 5 minutes. Cinq champs sont comptés pour chaque image et le pourcentage de cellules apoptotiques par rapport au nombre total de cellules est déterminé [27].

Exposition des PDECs au *shear stress*

Pour les expositions au *shear stress*, deux types d'expériences ont été conduits, l'un dans des chambres de flux parallèles [28] désignées sous le terme de chambres en 2D ou dans des constructions tubulaires en 3D, faisant intervenir des prothèses endothélialisées avec des PDECs. Brièvement, pour la première condition, des lames de verre de 7,5 x 3,8 cm enduites de collagène ou de colle de fibrine ont été ense-

mencées avec des PDECs ou des HSVEC (40 000 cellules/cm²) qui forment après quatre jours une monocouche confluente. La lame de verre forme le sommet de la chambre de flux qui a été créée par interposition d'un joint de silicone entre la lame de verre et une plaque acrylique. Les expérimentations sous contrainte de cisaillement ont été effectuées à 37 °C, à 5 % de CO₂, pendant 6 heures et le milieu de culture est de l'IMDM à 5 % de SVF. Selon la mécanique des fluides newtoniens, le flux laminaire appliqué aux cellules a été calculé à 1,2 Pa [29]. Des PDECs ou des HSVEC non exposés au *shear stress* ont servi de contrôles.

Concernant la construction en 3D, nous avons utilisé les prothèses vasculaires INTERGARD™, en polyester tricoté, fabriquées par la société InterVascular, imprégnées avec les collagènes I + III d'origine bovine, stériles au moment de l'utilisation. Pour l'endothélialisation de la prothèse (diamètre interne de 6 mm et longueur de 20-25 cm), celle-ci a été mise en contact avec une suspension de PDECs. Les cellules ont été reprises dans du milieu EGM-2 pour obtenir une densité de 2,5 x 10⁵ cellules par cm² de prothèse. Après ligatures des extrémités de la prothèse, celle-ci a été placée dans un dispositif rotatif (Endostrabilisator, Biegler, Mauerbach, Autriche) pendant 4 heures, dans un incubateur à 37 °C contenant 5 % de CO₂ pour obtenir un revêtement homogène. Après cet ensemencement, les ligatures ont été enlevées, les prothèses endothélialisées ont été coupées en deux morceaux d'égale longueur et ensuite maintenues pendant 4 jours dans l'incubateur, à l'issue desquels elles ont été soumises aux conditions de flux pendant 6 heures ou maintenues en conditions statiques (n = 3). Le circuit de flux était un système clos constitué de tubes en plastique flexibles et d'une pompe péristaltique qui délivre un flux lami-

naire pulsatile. Une sonde à ultrasons (Débitmètre T110, Transonic Systems Inc., New York, États-Unis) a été utilisée pour enregistrer le flux. Le *shear stress* induit était de 1,2 Pa, connu pour induire *in vitro* l'expression de plusieurs gènes précoces. Une pression de 120/60 mmHg et une température de 37 °C ont été maintenues pendant les expériences. Les prothèses ont été exposées à du milieu EGM-2 supplémenté avec 8 % de Dextran (MW 75,000 Da ; Sigma-Aldrich) pour obtenir une solution d'une viscosité de 0,04 Pa.s. Nous avons montré que le Dextran est non cytotoxique à cette concentration (données non montrées). Les échantillons de prothèse ont été observés avec un microscope à fluorescence après marquage (Kit viability/cytotoxicity/Live/Dead, Molecular Probes, Leiden, Pays-Bas) pour évaluer la présence de cellules et leur viabilité, avant et après exposition à la contrainte de cisaillement [30].

Expression des ARNm : analyse par puces ADN (microarray) et RT-PCR quantitative en temps réel

Après exposition (ou non) au flux pendant six heures, les cellules ont été détachées de la prothèse avec une solution de trypsine-EDTA (0,125 % et 12,5 mM respectivement pour la trypsine et l'EDTA). Les cellules ont été rincées dans du PBS, puis l'ARN total a été extrait avec le Kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Allemagne). La moitié des ARN totaux a été consacrée à l'analyse MicroArray et l'autre moitié à l'analyse RT-PCR quantitative en temps réel. Quatre microgrammes de cRNA marqués avec la biotin-UTP (synthétisés à partir de 3 microgrammes d'ARN total) ont été hybridés pendant la nuit sur la membrane de microarray OHS-015 Oligo GEAR-

ray® DNA Microarray (SuperArray, Bioscience, États-Unis). Le protocole standard utilisé pour la préparation de l'échantillon et le traitement des membranes est disponible chez SuperArray. La détection par chémiluminescence est effectuée à l'aide de streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline et du substrat « CDP-Star ». Les données ont été analysées avec le logiciel GEArray Analysis Suite (SuperArray, Bioscience). Les résultats ont été exprimés comme un rapport de l'expression des gènes sous conditions de flux sur l'expression des gènes dans des conditions statiques, après normalisation par rapport à un gène de ménage en conditions statiques, grâce au logiciel GEArray Suite Software.

Pour l'analyse RT-PCR, l'ARN a été traité selon [25]. Les sondes utilisées sont présentées au tableau I (température d'hybridation et taille des produits de PCR). Les données ont été analysées avec le logiciel iCycler IQ™ software.

Chaque PCR a été exécuté en trois exemplaires. Les données ont été exprimées selon la méthode du Ct [31]. Dans cette méthode, le taux d'ARNm dans les cellules en conditions statiques a été arbitrairement normalisé à « 1 ». Comme ci-dessus, les résultats sont présentés comme un rapport de l'expression des gènes sous contrainte de cisaillement sur l'expression des gènes en conditions statiques.

Analyse statistique

Toutes les expériences ont été exécutées au moins trois fois et les données sont exprimées en moyenne \pm SD pour tous les histogrammes et moyenne \pm SEM quand c'est indiqué (courbes de croissance, production des ROS et apoptose). Des différences statistiques ont été déterminées par un test de Mann-Whitney et les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

Tableau I
Les critères DSM-IV du BDD.

Target	Sequences	Annealing Temp. (°C)	Length of PCR Product (bp)
PECAM	Sense (5'-3') : CCT GCT GAC CCT TCT GCT CTG Antisense (3'-5') : TAC AGT CGT GGT GGA GAG TGC	65	74
Beta1 INT	Sense (5'-3') : TGA AGC CAG CAA CGG ACA GAT Antisense (3'-5') : CTT ACA GAC ACC ACA CTC CCA	65	61
VE-cad	Sense (5'-3') : GGC TCA GAC ATC CAC ATA ACC Antisense (3'-5') : CTT ACC AGG GCG TTC AGG GAC	62	145
FT	Sense (5'-3') : AGA AAG GCA GGA GTG GGG CAG Antisense (3'-5') : TCC AGG GTG TTC ATG CTC CGA	65	171
vWF	Sense (5'-3') : CCC CTG AAG CCC CTC CTC CTA Antisense (3'-5') : ACG AAC GCC ACA TCC AGA ACC	65	124
PLAT	Sense (5'-3') : ATC CCG CCT CTT CTT CTT CAG Antisense (3'-5') : GCA CTC TTC CCT CTC CTG TAG	62	116
P0 Gène de ménage	Sense (5'-3') : ATG CCC AGG GAA GAC AGG GC Antisense (3'-5') : CCA TCA GCA CCA CAG CCT TC	65	165

Matériels et méthodes

Expression par les PDECs des caractères endothéliaux principaux

Les PDECs utilisés entre les passages 10 et 15 présentent toutes les caractéristiques des CEs : mor-

phologie pavimenteuse (**fig. 1 a**), expression *in situ* de marqueurs de CEs (**fig. 1 b à f**), expression par cytométrie en flux de marqueurs endothéliaux ou absence de marqueurs de cellules hématopoïétiques (**fig. 1 g**) et capacité de formation de tube dans du matrigel (**fig. 1 i et j**).

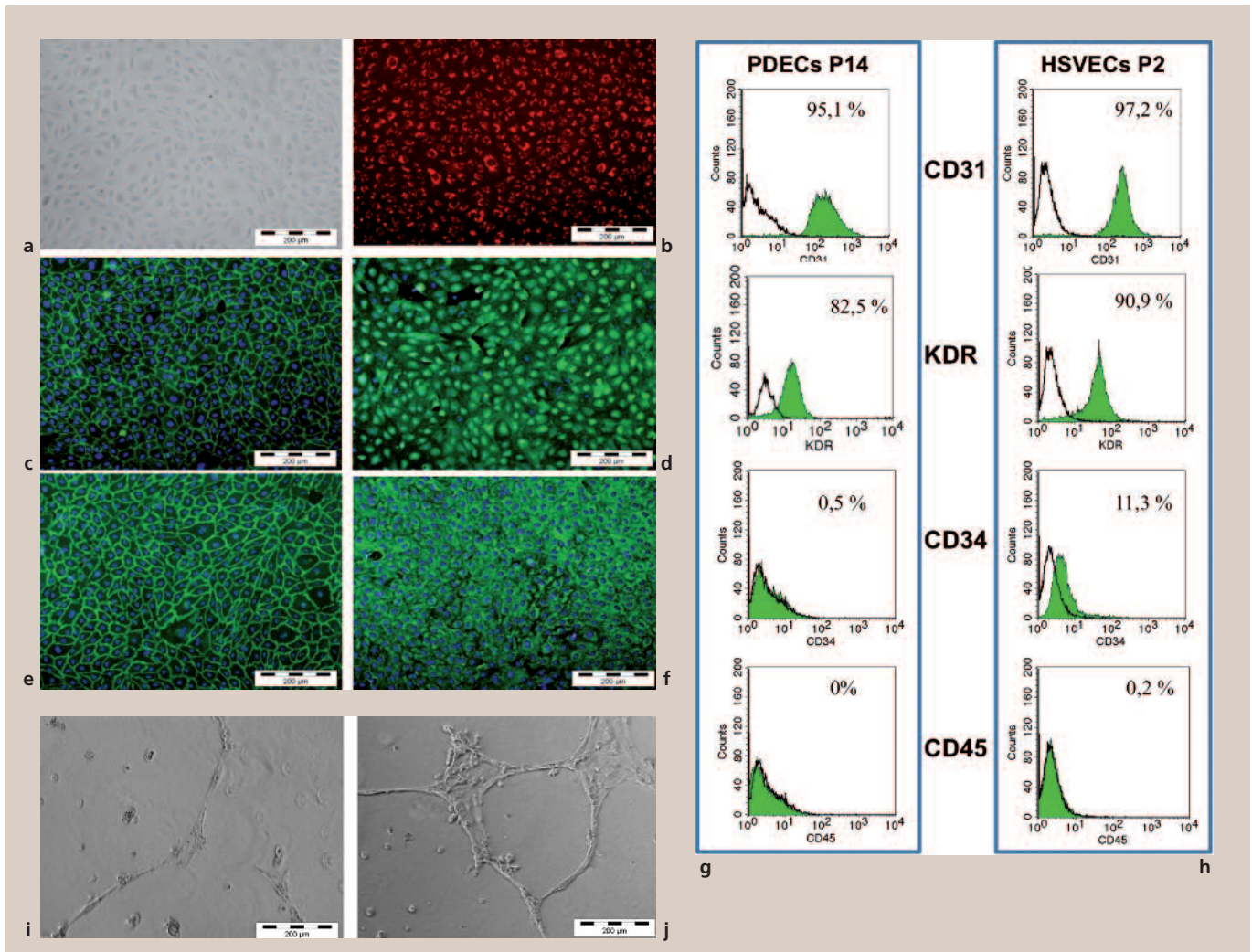


Fig. 1 Caractérisation des PDECs en passage 15. (a) morphologie pavimenteuse. (b) Incorporation cellulaire des dil-Ac-LDL. (c) marquage par immunofluorescence du CD31. (d) Fixation de la lectine UEA-1. (e) Marquage par immunofluorescence de la VE-cadhérine et du (f) vWF. Caractérisation des (g) PDECs en passage 14 *versus* des (h) HSVECs en passage 2, par cytométrie en flux, pour CD31, KDR (VEGFR-2), CD34 et CD45. (i) Formation de tubes dans du matrigel par les PDECs (en passage 15), à une densité d'ensemencement de 20 000 cellules/cm² après 24 heures. (j) Formation de tubes, dans du matrigel, par les PDECs (en passage 15), à une densité d'ensemencement de 50 000 cellules/cm² après 24 heures.

Les résultats sont obtenus à partir de trois expériences exécutées pour chacune avec trois lignées cellulaires (obtenues de trois donneurs).

Les PDECs sont capables de coloniser et de proliférer sur colle de fibrine

La figure 2 montre la prolifération des PDECs sur la couche de colle de fibrine comparative-ment avec des HSVECS, grâce à un test MTT avec deux densités cellulaires différentes pendant 9 jours de culture. Quelle que soit la densité cellulaire initiale, les deux modèles de cellules, dans leur milieu d'expansion adéquat, sont capables de proliférer avec des différences significatives obtenues entre le jour 1 et le

jour 5. Un plateau a été atteint pour les HSVECS à partir du jour 5, tandis que le nombre de cellules augmente toujours de façon significative entre les jours 5 et 9 ($p < 0,05$) pour les PDECs. Les figures 2 a et 2 b montrent la morphologie cellulaire au jour 9 sur la colle de fibrine.

Les PDECs présentent une plus grande résistance au stress oxydatif que les HSVECs et les HUVECs

Nous avons examiné si les PDECs avaient un système de défense antioxydatif parce que le stress oxydatif est associé à beaucoup de troubles cardiovasculaires [32].

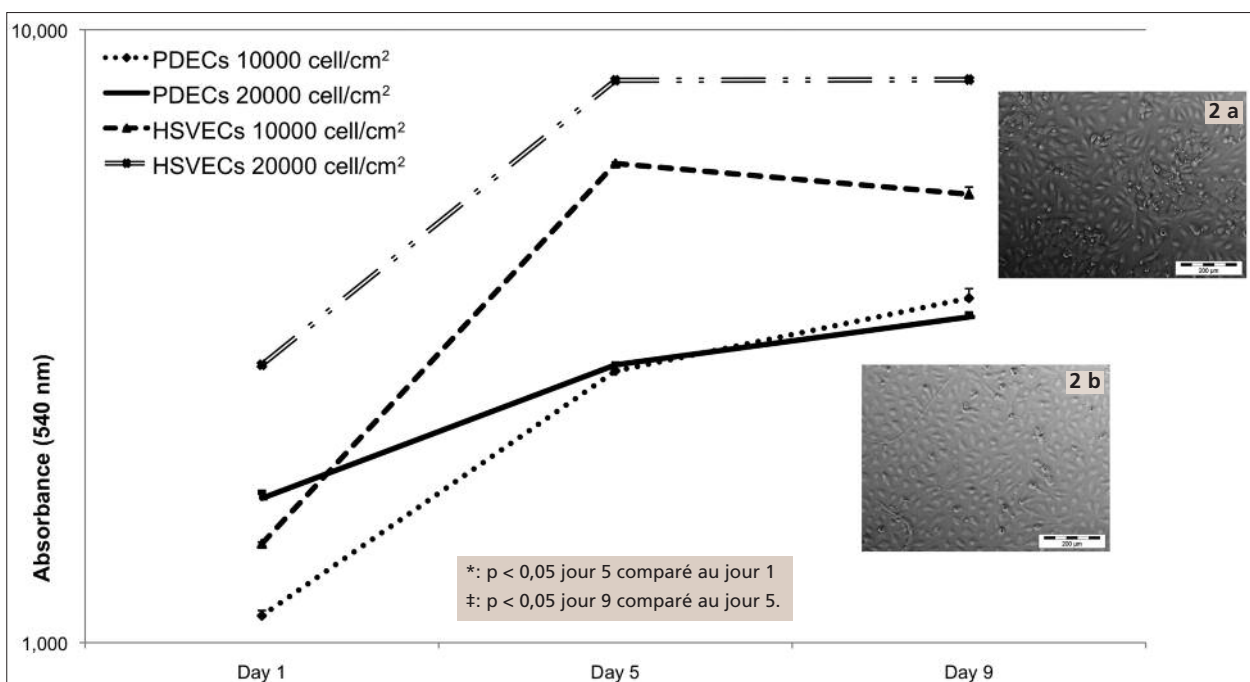


Fig. 2 Suivi de la prolifération des PDECs et des HSVECs sur colle de fibrine par test MTT et influence de la densité d'ensemencement cellulaire (moyenne \pm SEM, $n = 3$).

2 a : Aspect morphologique des HSVECs après 9 jours de culture sur colle de fibrine (densité initiale d'ensemencement : 20 000 cellules/cm²).

2 b : Aspect morphologique des PDECs après 9 jours de culture sur colle de fibrine (densité initiale d'ensemencement : 20 000 cellules/cm²).

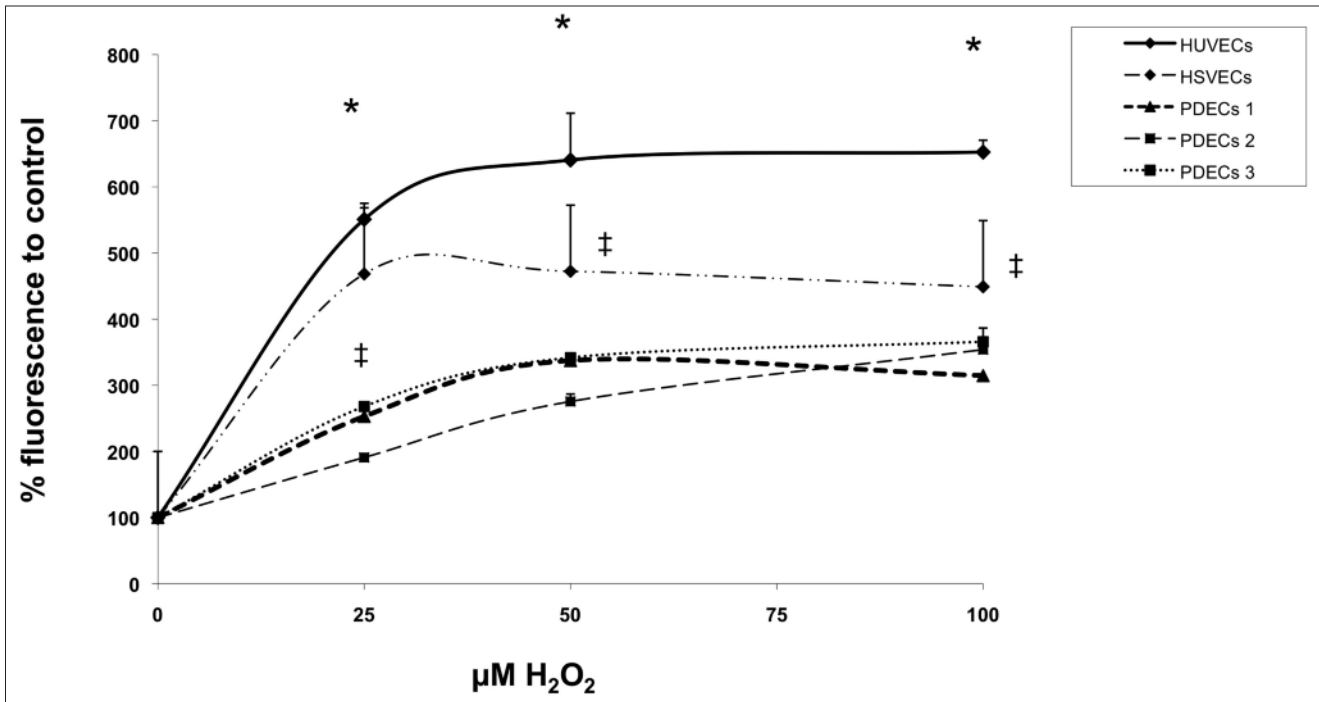


Fig. 3 Taux intracellulaire de ROS pour trois lignées de PDECs (correspondant à trois donneurs) comparativement aux taux obtenus pour des HUVECs et des HSVECs, en fonction de concentrations croissantes de H_2O_2 .

* $p < 0,05$ pour les HSVECs comparativement aux PDECs1, PDECs2 et PDECs3 ;

‡ $p < 0,05$ pour les HSVECs comparativement à au moins deux lignées de PDECs, aux trois concentrations de H_2O_2 .

Les PDECs, amplifiés sur collagène, montrent un taux intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) significativement plus bas que celui obtenu pour les HSVECs et les HUVECs quelles que soient les concentrations de H_2O_2 évaluées (**fig. 3**). La réponse de PDECs face à l' H_2O_2 est comparable pour trois lignées cellulaires obtenues de trois donneurs différents (**fig. 3**).

En lien avec les niveaux intracellulaires de ROS, nous avons exploré l'apoptose induite par le stress oxydatif en traitant les cellules avec $100 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 . Après un marquage des noyaux au Hoechst 33258, les cellules présentant une fragmentation de l'ADN sont comptées dans des conditions basales et stimulées.

Le tableau II montre que, dans des conditions non stimulées, les PDECs sont significativement moins endommagés que les autres types cellu-

lares. L'augmentation du pourcentage de cellules positives après le traitement au H_2O_2 met

Tableau II

Résultats de fragmentation nucléaire pour les cellules contrôle ou pour des cellules dont l'apoptose a été induite par $100 \mu\text{M}$ de H_2O_2 , exprimés en pourcentage de noyaux fragmentés (moyenne \pm SEM ; $n = 3$).

	Conditions basales (contrôle)	Après stimulation par le H_2O_2
HSVECs	13.6 ± 6.9	40.7 ± 1
HUVECs	19.5 ± 2	72.8 ± 8.5
PDECs	6.2 ± 1.5 *	12.5 ± 2.3 ** Δ

$p < 0.05$ PDECs versus HUVECs en conditions basales,

** $p < 0.05$ PDECs versus HUVECs stimulation par le H_2O_2 ,

Δ : $p < 0.05$ PDECs versus HSVECs après stimulation par l' H_2O_2 .

en évidence un effet significatif dans la fragmentation d'ADN pour les trois types cellulaires corrélés à une altération morphologique seulement observée dans les HSVECS et les HUVECS (résultats non montrés).

Les PDECs sur les deux substrats en configuration 2D sont capables de supporter une contrainte de cisaillement physiologique et l'expression des gènes est régulée au niveau de l'ARNm

Pour poursuivre la caractérisation des PDECs *versus* les HSVECS, nous nous sommes demandés si les PDECs étaient sensibles aux forces mécaniques et capables d'assurer la mécano-transduction. Dans ce but, le comportement des cellules a tout d'abord été exploré dans des chambres de flux parallèles.

Les PDECs ainsi que les HSVECS ensemencés sur collagène I ou colle de fibrine à une densité de 40 000 cellules/cm², 4 jours plus tôt, forment des monocouches confluentes (**fig. 4 a₁, a₃, b₁, b₃**). Ces monocouches ont été exposées à un *shear stress* pulsatile laminaire de 1,2 Pa (valeur physiologique selon [33]) pendant 6 heures, ou bien maintenues en conditions statiques. Aucune différence entre les deux types cellulaires n'a été observée : les PDECs restent fermement étalés sur le support comme les HSVECS (**fig. 4 a₂, a₄, b₂, b₄**, respectivement) et s'alignent dans la direction de flux, particulièrement sur colle de fibrine (**fig. 4 a₄, b₄**).

Nous avons ensuite analysé l'expression de 113 gènes connus pour être associés à la biologie de l'endothélium grâce à des membranes de macroarray. Les figures 5 a et 5 b montrent les résultats obtenus après 6 heures d'exposition au *shear stress*, présentés en rapport de l'expression des gènes en conditions de flux sur leur expression en conditions statiques.

Tenant compte des données de la littérature montrant qu'une variation d'un facteur 2 (en

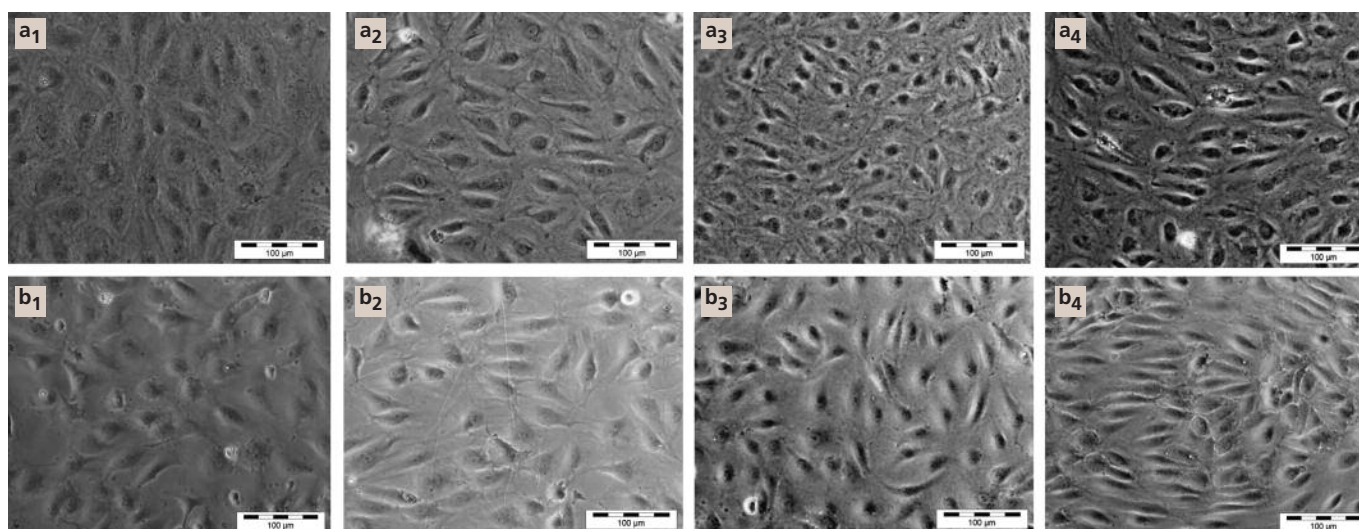


Fig. 4 Aspect morphologique des PDECs (a₁₋₄) ou des HSVECS (b₁₋₄) sur un revêtement de collagène I (1, 2) ou de colle de fibrine (3, 4), avant (1, 3) et après (2, 4) exposition à une contrainte de cisaillement pulsatile et laminaire pendant six heures, mettant en évidence la haute rétention des cellules et leur orientation dans la direction du flux après exposition au *shear stress*.

sur-ou sous-expression) est considérée comme une variation significative [34, 35], nous avons choisi de représenter uniquement les gènes présentant une variation minimale de 2 pour au moins une des quatre conditions (PDECs sur col-

lagène I ou colle de fibrine, HSVECs sur collagène I ou colle de fibrine) (**fig. 5 a et b**). Une expression accrue d'un certain nombre de gènes, impliqués dans l'adhérence, l'activité de cytokine, la balance hémostatique, dans l'acti-

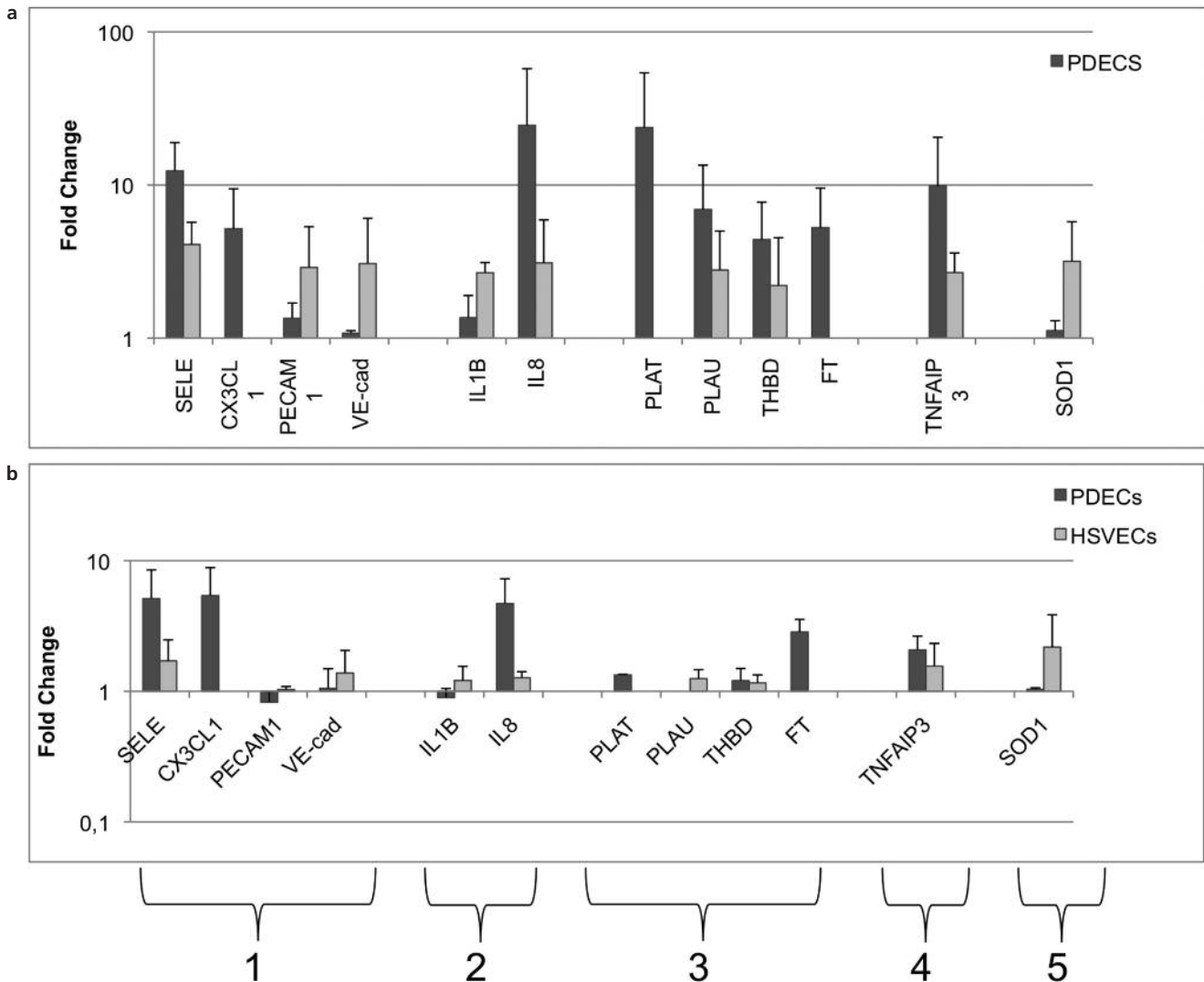


Fig. 5 La contrainte de cisaillement régule l'expression des gènes des PDECs et des HSVECs sur les deux substrats. Expression quantitative des gènes (obtenue par Oligo GE Array® DNA MicroArray) pour les PDECs ou les HSVECs sur (a) collagène I ou sur (b) colle de fibrine, après exposition à la contrainte de cisaillement, exprimée comme un rapport de l'expression des gènes sous contrainte de cisaillement sur l'expression obtenue en conditions statiques, les gènes étant groupés en fonction de leur implication dans différentes fonctions : (1) adhésion cellulaire, (2) activité de cytokines, (3) balance hémostatique, (4) activité anti apoptotique, (5) réponse au stress.

SELE : Endothelial adhesion molecule 1. CX3CL1 : Chemokine ligand 1. PECAM1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (CD31). VE-cad : vascular endothelial cadherin. IL1B : Interleukin 1 beta. IL8 : Interleukin 8. PLAT : Plasminogen activator tissue. PLAU : Plasminogen activator urokinase. THBD : Thrombomodulin. FT : Tissue Factor. TNFAIP3 : Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3. SOD1 : Superoxide dismutase 1.

vité anti-apoptotique ou la réponse au stress, a été observée (**fig. 5 a et b**, groupes 1-5, respectivement).

Parmi les 113 gènes, tous ceux exprimés dans les HSVECS sont aussi exprimés dans les PDECs, dans les conditions statiques (données non montrées) indépendamment du substrat. Plus précisément et de façon intéressante, il apparaît que les PDECs sur le collagène I ou la colle de fibrine est plus sensible au *shear stress* que les HSVECs, puisqu'ils présentent une majorité de gènes dont la variation est supérieure à 2. Considérant les substrats, les PDECs aussi bien que les HSVECs sont plus sensibles au *shear stress* quand ils sont sur collagène I que sur colle de fibrine. En particulier, une variation de plus

de 10 a été observée pour SELE, IL8, PLAT, TNFAIP3, seulement pour les PDECs sur le collagène de type I (**fig. 5**).

Endothélialisation d'une prothèse vasculaire enduite de collagène avec des PDECs : performances liées à la réponse cellulaire au *shear stress*

Ces expériences correspondent à la configuration 3D et les résultats sont présentés dans la figure 6 mettant en évidence la mono-

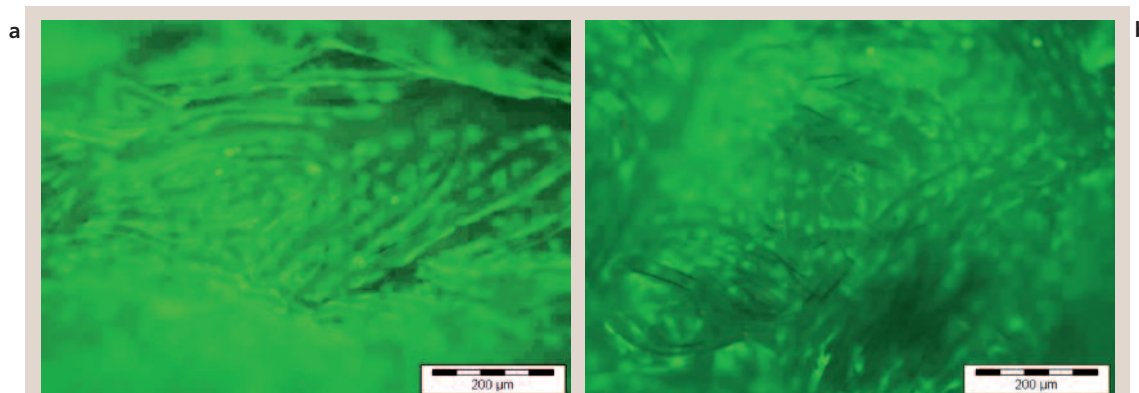
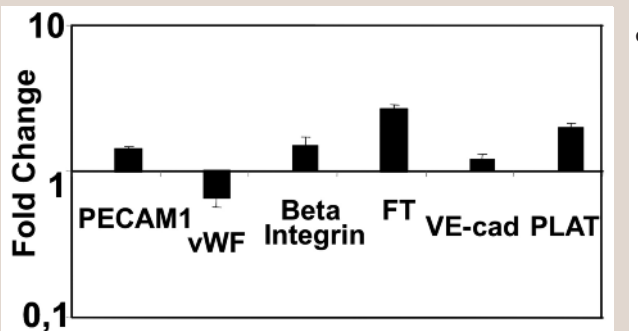


Fig. 6 Endothélialisation d'une prothèse vasculaire pré-imprégnée de collagène (Intergard), avec des PDECs et analyses subséquentes. (a, b) Observation avec un microscope à fluorescence des prothèses endothélialisées, en conditions statiques et sous flux, après marquages live/dead[®]. (c) Résultats obtenus en qRT-PCR pour des PDECs qui endothélialisent la prothèse Intergard et exposés au *shear stress*, exprimés en rapport de l'expression des gènes en conditions de flux sur l'expression des gènes en conditions statiques.

PECAM1, platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31); vWF, von Willebrand Factor ; 1, 1-Integrine; FT, Facteur Tissulaire; VE-cad, VE-cadhérine; PLAT, plasminogène activateur tissulaire (activateur tissulaire du plasminogène).



couche confluyente de PDECs, 4 jours après ensemencement, après marquage fluorescent des cellules par du Live/Dead, en conditions statiques et après exposition à la contrainte de cisaillement. Trois expériences ont été effectuées, dans lesquelles chaque prothèse exposée au *shear stress* avait son contrôle maintenu en conditions statiques. L'analyse après marquage Live/Dead des cellules confirme la présence de PDECs à la surface luminale des prothèses, aussi bien pour celles maintenues en conditions statiques (**fig. 6 a**) que pour celles exposées au *shear stress*

(**fig. 6 b**) pendant 6 heures. Dans cette configuration 3D, les PDECs peuvent aussi résister au *shear stress*. Pour étudier la réponse cellulaire au *shear stress*, nous avons réalisé des RT-PCR quantitative en temps réel pour les gènes suivants (**fig. 6 c**) : PECAM1, vWF, Intégrin Bêta, FT (facteur tissulaire), VE-cadhérine et PLAT). Ces résultats confirment en 3D quelques résultats de macroarray obtenus dans la configuration 2D, à savoir une augmentation significative des gènes codant PLAT et le facteur tissulaire après exposition au *shear stress*.

Discussion

Notre but avec cette étude était de mieux caractériser les PDECs pour leur utilisation en ingénierie vasculaire. Selon Brun *et al.* [22], ces PDECs doivent répondre à cinq critères concernant : la source cellulaire, la présence de marqueurs spécifiques des CEs, les propriétés d'adhérence aux substrats, les propriétés antithrombotiques et d'hyperplasie néointimale et d'inhibition de thrombose. Quatre de ces critères ont été étudiés et apparaissent comme satisfaisant dans notre étude. Contrairement à Igreja *et al.* [16] qui montrent que la différenciation des EPCs de sang de cordon est inhibée sur collagène I, nous avons obtenu des cellules endothéliales à partir d'EPCs de sang périphérique humain, présentant les marqueurs couramment utilisés pour caractériser ces cellules [36, 37, 24]. Nous considérons que dans l'étude présente les CEs amplifiées sont des *outgrowth endothelial cells* tardifs, en lien avec leur date d'apparition en culture et leur morphologie pavimenteuse [6]. Dans une étude récente, Smadja *et al.* [38] ont décrit de façon précise les progéniteurs endothéliaux

tardifs (*late EPCs*) et les différents noms sous lesquels ils peuvent être référencés (*late-EPCs*, PDECs, OECs...).

Dans nos expériences, la différenciation cellulaire de progéniteurs endothéliaux est obtenue dans un premier temps puis ces cellules une fois différenciées sont ensemencées sur collagène ou colle de fibrine. Ces substrats ont été choisis parce qu'on les considère comme les substrats optimaux pour obtenir l'endothélialisation de prothèses vasculaires avec des HUVECs [39], ainsi que comme de bons supports pour l'ingénierie vasculaire [17, 18].

Les deux substrats (collagène et colle de fibrine) permettent la prolifération des PDEC même de faible densité d'ensemencement, ceci étant très important pour l'ingénierie vasculaire puisque certains auteurs ont montré que la densité d'ensemencement cellulaire initiale sur prothèse doit être supérieure à 150 000/cm² [1] si l'on veut obtenir une endothélialisation, une condition qui ne nous semble pas nécessaire puisque nos cellules prolifèrent sur les deux substrats testés. De plus, nous avons

considéré qu'il était important, si l'on souhaite envisager l'utilisation de ces cellules dans le cadre de l'ingénierie vasculaire, de caractériser leur réponse aux contraintes de cisaillement quand elles recouvrent le collagène ou la colle de fibrine. L'application de forces hémodynamiques est fondamentale pour empêcher les cultures confluentes d'ECS de subir des altérations conduisant souvent à la mort cellulaire [30, 40, 41].

Après l'application d'un *shear stress*, il est connu que les cellules endothéliales ont tendance à s'aligner dans la direction du flux, ce processus étant temps et *shear stress* dépendants. Dès 1983, Ives *et al.* [42] ont montré l'importance de l'origine des cellules et du type de substrat dans la cinétique d'alignement des CE exposées à une contrainte de cisaillement. Shirota *et al.* [15] ont montré que des CE issues de sang périphérique humain, ensemencées sur des prothèses vasculaires enduites de gélatine, s'étirent et s'orientent dans la direction d'un *shear stress* de 30 dynes/cm² après 12 heures d'exposition. Dans notre étude, les PDECs commencent à s'orienter dans la direction du flux dès 6 heures d'exposition.

Les PDECs, dans le cadre de leur utilisation en ingénierie vasculaire, doivent être antithrombotiques. D'après notre étude, nous pouvons noter que les ARNm du PLAT (activateur tissulaire du plasminogène) et de la thrombomoduline sont fortement surexprimés après 6 heures d'exposition au *shear stress*, comparativement au contrôle statique, dans la configuration 2D, et de façon beaucoup plus importante sur collagène que sur colle de fibrine. Nous pouvons spéculer que le collagène pourrait favoriser, pour ces cellules, un phénotype antithrombogène même si l'analyse de réponse cellulaire au niveau de l'expression des protéines doit être poursuivie.

Peu d'études ont examiné les effets du substrat sur le caractère thrombogène des ECs (et la majorité en condition statique). Quelques rapports ont conclu qu'il n'y a aucun effet du substrat tandis que d'autres ont suggéré l'influence de celui-ci [35]. Nos résultats obtenus concernant l'expression des mRNA correspondent à ceux obtenus avec d'autres types de PDECs sur d'autres substrats [43, 44]. Cependant, récemment, Brown *et al.* [22] ont publié une étude concernant la caractérisation de progéniteurs endothéliaux de sang de cordon ombilical sur un support de fibronectine et exposés à un *shear stress* laminaire en chambre de flux parallèles. Dans leur étude, il n'y a pas de surexpression du taux d'ARNm de l'activateur tissulaire du plasminogène, alors qu'il est augmenté pour des CE d'aortes humaines soumises aux mêmes conditions. Nous avons trouvé des taux d'expression de l'ARNm de la cycloxygénase 2 semblables à ceux obtenus par Brown [22], alors que l'ARNm de eNOS n'est pas exprimé dans notre étude que ce soit pour les PDECs ou les HSVEC quel que soit le substrat. Tous ces résultats doivent être modulés par la composition du substrat et la complexité des expérimentations, qui vont des techniques d'obtention et d'amplification des cellules aux conditions d'exposition au *shear stress* (absence de sérum durant l'application du flux, durée d'exposition au *shear stress*). Un consensus est difficile à trouver car aucune expérience d'exposition aux contraintes de cisaillement n'est véritablement semblable, en particulier pour les PDECs qui n'ont pas beaucoup été étudiés dans ce domaine.

Le stress oxydatif est défini comme une situation caractérisée par la production accrue de radicaux libres (espèces réactives de l'oxygène, ROS), entraînant les dommages au niveau des structures biologiques. Des auteurs ont suggéré que ces radicaux libres jouent un rôle clé

dans les phénomènes d'athérosclérose [32]. En plus de leurs caractéristiques antithrombotiques, nous avons cherché à explorer l'influence du stress oxydatif sur les PDECs. Les radicaux libres exercent à la fois un effet cytotoxique direct sur l'endothélium vasculaire [45] et un effet indirect sur les EPCs et il a été montré que des taux élevés d' H_2O_2 réduisent très significativement leur nombre en augmentant l'apoptose [27]. Dans le système vasculaire humain, la protection contre le stress oxydatif se fait grâce à un réseau d'antioxydants endogènes, qui exercent leur effet protecteur des cellules en détruisant les ROS diminuant ainsi leur action destructrice [32]. Chez des volontaires sains, une expression plus importante d'enzymes antioxydantes intracellulaires (catalase, peroxydase et superoxyde dismutase) a été mise en évidence dans des EPCs que dans des CEs matures, rendant ces premières relativement résistantes au stress oxydatif [46]. De façon surprenante, les figures 5 a et 5 b montrent que l'expression de l'ARNm de la *SOD1* dans les HSVECs est augmentée par le *shear stress* et ceci beaucoup plus que dans les PDECs. Ce résultat peut

sembler contradictoire avec celui montrant une plus forte résistance des PDECs au stress oxydatif (**fig. 3**). Cependant, il est à noter que l'ARNm de la *SOD1* n'est pas exprimé en condition basale dans les HSVECs alors qu'il l'est dans les PDECs. Le *shear stress* entraîne une surexpression uniquement dans les HSVECs.

Nos résultats montrent aussi une inhibition de l'apoptose médiée par le *shear stress*, dans les deux modèles cellulaires, particulièrement pour les PDECs sur collagène, ceci étant en accord avec les travaux de Jin *et al.* sur les CEs bovines [47].

Enfin, nous avons utilisé ces PDECs bien caractérisés dans une configuration 3D, afin d'évaluer la faisabilité d'une endothélialisation de prothèse vasculaire, telle Intergard, avec ces cellules. La parfaite monocouche cellulaire obtenue sur la lumière de ces prothèses montre que l'expression des gènes de ces cellules est là aussi, régulée par la contrainte de cisaillement, particulièrement au niveau des gènes impliqués dans la régulation de la balance hémostatique.

Conclusion

Ces résultats contribuent à une meilleure qualification des PDECs :

- a) ils présentent une résistance élevée au stress oxydatif ;
- b) ils résistent à une contrainte de cisaillement physiologique aussi bien dans des chambre de

flux en 2D que dans des constructions vasculaires en 3D

- c) l'expression des gènes, au niveau des ARNm, est modulée par cette contrainte. Ces résultats sont particulièrement importants pour leur utilisation future *in vivo* dans le domaine de l'ingénierie vasculaire. ■

Bibliographie

1. Deutsch M, *et al.*
Long-term experience in autologous *in vitro* endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts.
J Vasc Surg, 2009;49(2): 352-62; discussion 362.
2. Gabbieri D, *et al.*
Aortocoronary endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene graft: 9-year patency.
Ann Thorac Surg 2007;83(3):1166-8.
3. McAllister TN, *et al.*
Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study.
Lancet 2009;373(9673):1440-6.
4. Bordenave L, Menu P, Baquey C.
Developments towards tissue-engineered, small-diameter arterial substitutes.
Expert Rev Med Devices 2008;5(3):337-47.
5. Laube HR, *et al.*
Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts.
J Thorac Cardiovasc Surg 2000;120(1):134-41.
6. Khoo CP, Pozzilli P, Alison MR.
Endothelial progenitor cells and their potential therapeutic applications.
Regen Med 2008;3(6):863-76.
7. Marsboom G, Janssens S.
Endothelial progenitor cells: new perspectives and applications in cardiovascular therapies.
Expert Rev Cardiovasc Ther 2008;6(5):687-701.
8. Pearson JD.
Endothelial progenitor cells – hype or hope?
J Thromb Haemost 2009;7(2):255-62.
9. Pompilio G, *et al.*
Endothelial progenitor cells and cardiovascular homeostasis: clinical implications.
Int J Cardiol 2009;131(2):156-67.
10. Roncalli JG, *et al.*
Endothelial progenitor cells in regenerative medicine and cancer: a decade of research.
Trends Biotechnol 2008;26(5):276-83.
11. Asahara T, *et al.*
Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.
Science 1997;275(5302):964-7.
12. Shirota T, Yasui H, Matsuda T.
Intraluminal tissue-engineered therapeutic stent using endothelial progenitor cell-inoculated hybrid tissue and *in vitro* performance.
Tissue Eng 2003;9(3):473-85.
13. Cebotari S, *et al.*
Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells.
Circulation 2006;114(1 Suppl):1132-7.
14. Kaushal S, *et al.*
Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells
expanded *ex vivo*.
Nat Med 2001;7(9):1035-40.
15. Shirota T, *et al.*
Human endothelial progenitor cell-seeded hybrid graft: proliferative and antithrombogenic potentials *in vitro* and fabrication processing.
Tissue Eng 2003;9(1):127-36.
16. Igreja C, *et al.*
Detailed molecular characterization of cord blood-derived endothelial progenitors.
Exp Hematol 2008;36(2):193 e1-193 e15.
17. Couet F, Rajan N, Mantovani D.
Macromolecular biomaterials for scaffold-based vascular tissue engineering.
Macromol Biosci 2007;7(5):701-18.
18. Shaikh FM, *et al.*
Fibrin: a natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering.
Cells Tissues Organs 2008;188(4):333-46.
19. Chien S.
Effects of disturbed flow on endothelial cells.
Ann Biomed Eng 2008;36(4):554-62.
20. Tzima E, *et al.*
A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress.
Nature 2005;437(7057):426-31.
21. Bordenave L, *et al.*
***In vitro* endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years**

- after the first realization.
 Clin Hemorheol Microcirc
 2005;33(3):227-34.
22. Brown MA, *et al.*
Characterization of Umbilical Cord Blood Derived Late Outgrowth Endothelial Progenitor Cells Exposed to Laminar Shear Stress.
 Tissue Eng Part A
 2009;15(11):3575-87.
23. Stroncek JD, *et al.*
Comparison of endothelial cell phenotypic markers of late-outgrowth endothelial progenitor cells isolated from patients with coronary artery disease and healthy volunteers.
 Tissue Eng Part A
 2009;15(11):3473-86.
24. Fuchs S, Hermanns MI, Kirkpatrick CJ.
Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures.
 Cell Tissue Res
 2006;326(1):79-92.
25. Fernandez P, *et al.*
Endothelial cells cultured on engineered vascular grafts are able to transduce shear stress.
 Tissue Eng
 2006;12(1):1-7.
26. Bordenave L, *et al.*
Endothelial cell compatibility testing of three different Pellethanes.
 J Biomed Mater Res
 1993;27(11):1367-81.
27. Urbich C, *et al.*
FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells.
 Faseb J 2005;19(8):974-6.
28. Frangos JA, *et al.*
Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells.
 Science
 1985;227(4693):1477-9.
29. Daculsi R, *et al.*
Unusual transduction response of progenitor-derived and mature endothelial cells exposed to laminar pulsatile shear stress.
 J Biomech
 2008;41(12):2781-5.
30. Berard X, *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;5(4):1147-57.
31. Giuliotti A, *et al.*
An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression.
 Methods
 2001;25(4):386-401.
32. Tousoulis D, *et al.*
Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases.
 Atherosclerosis
 2008;201(2):236-47.
33. Vogel M, *et al.*
Flow in the well: computational fluid dynamics is essential in flow chamber construction.
 Cytotechnology
 2007;55(1):41-54.
34. Garcia-Cardena G, *et al.*
Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype.
 Proc Natl Acad Sci U S A
 2001;98(8):4478-85.
35. McGuigan AP, Sefton MV.
The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity.
 Biomaterials
 2007;28(16):2547-71.
36. Bellik L, *et al.*
Human mature endothelial cells modulate peripheral blood mononuclear cell differentiation toward an endothelial phenotype.
 Exp Cell Res
 2008;314(16):2965-74.
37. Bompais H, *et al.*
Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells.
 Blood 2004;103(7):2577-84.
38. Smadja DM, Gaussem P.
[Characterization of endothelial progenitor cells and putative strategies to improve their expansion.].
 J Soc Biol
 2009;203(2):197-207.
39. Kaehler J, *et al.*
Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts.
 J Vasc Surg
 1989;9(4):535-41.
40. Bartling B, *et al.*
Shear stress-dependent expression of apoptosis-regulating genes in endothelial cells.

- Biochem Biophys Res Commun 2000;278(3):740-6.
41. Kaiser D, *et al.*
Apoptosis induced by lack of hemodynamic forces is a general endothelial feature even occurring in immortalized cell lines.
Endothelium 1999;6(4):325-34.
42. Ives CL, *et al.*
The importance of cell origin and substrate in the kinetics of endothelial cell alignment in response to steady flow.
Trans Am Soc Artif Intern Organs 1983;29:269-74.
43. Tao J, *et al.*
Effects of fluid shear stress on eNOS mRNA expression and NO production in human endothelial progenitor cells.
Cardiology 2006;106(2):82-8.
44. Yang Z, *et al.*
***In vitro* shear stress modulates antithrombotic potentials of human endothelial progenitor cells.**
J Thromb Thrombolysis 2007;23(2):121-7.
45. Griendling KK, FitzGerald GA.
Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies.
Circulation 2003;108(17):2034-40.
46. He T, *et al.*
Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24(11):2021-7.
47. Jin X, *et al.*
Induction of human inhibitor of apoptosis protein-2 by shear stress in endothelial cells.
FEBS Lett 2002;529(2-3):286-92.

SUMMARY

Progenitor-derived endothelial cells versus mature endothelial cells: perspectives in tissue engineering applications

Noelie B. THEBAUD
Reine BAREILLE
Murielle REMY
Chantal BOURGET
Richard DACULSI
Laurence BORDENAVE

Keywords

- vascular tissue engineering
- PDECs
- venous endothelial cells
- *in vitro* study
- shear stress
- microarray

The isolation of endothelial progenitor cells from human peripheral blood generates a great hope in vascular tissue engineering because of particular benefit when compared with mature endothelial cells. We explored the capability of progenitor-derived endothelial cells (PDECs) to line fibrin and collagen scaffolds in comparison with human saphenous and umbilical cord vein endothelial cells (HSVECs and HUVECs) : (a) in a static situation, allowing definition of the optimal cell culture conditions; (b) under shear stress conditions (flow chambers or tubular vascular constructs), allowing investigation of cell response and mRNA expression on both substrates by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time PCR. Well characterized PDECs: (a) were able to colonize and grow on fibrin glue; (b) exhibited higher resistance to oxidative stress than HSVECs and HUVECs; (c) withstood physiological shear stress when lining both substrates in flow chambers, and their gene expression was regulated; (d) colonized a collagen-impregnated vascular prosthesis and were able to sense mechanical forces. Our results provide an improved qualification of PDECs for vascular tissue engineering.