

Université de Montréal

**Le 17B-Estradiol combiné à un biopolymère à base de
chitosan accroît la biocompatibilité des cellules
progénitrices dérivées de la moelle osseuse.**

Par

Kim Tardif

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître *es* science (M.sc)
en Sciences Biomédicales
option générale

Juillet, 2009

© Kim Tardif, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Le 17B-Estradiol combiné à un biopolymère à base de
chitosan accroît la biocompatibilité des cellules
progénitrices dérivées de la moelle osseuse.**

Présenté par :
Kim Tardif

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Yahye Merhi, président-rapporteur
Dr. Jean-François Tanguay, directeur de recherche
Dre. Mariam Tabrizam, membre externe

Résumé

Les cellules dérivées de la moelle osseuse, principalement les cellules endothéliales progénitrices, sont réduites chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires. Leur mobilisation et leur incorporation aux sites de lésion vasculaire sont des événements prépondérants dans l'accélération des processus de réendothélialisation. Dans un modèle murin, le 17 β -estradiol favorise les processus de guérison vasculaire par la mobilisation et le recrutement des cellules endothéliales progénitrices dérivées de la moelle osseuse. Il existe présentement plusieurs stratégies afin d'augmenter la mobilisation des cellules progénitrices ainsi que leur incorporation à la paroi vasculaire. Cependant, peu d'études privilégient la livraison locale d'un nombre élevé de cellules progénitrices fonctionnelles par un véhicule biodégradable et leur maintien au site de lésion afin de favoriser la réendothélialisation ciblée. Un polymère d'intérêt pour cette application s'avère être le chitosan. Ce biopolymère non toxique et biodégradable est couramment utilisé dans l'ingénierie tissulaire et, depuis peu, est utilisé dans la guérison vasculaire. Le chitosan complexé à la phosphorylcholine voit sa solubilité s'accroître dans les solutions aqueuses ainsi que sa biocompatibilité cellulaire en condition physiologique.

Le projet de ce mémoire visait donc : 1) à étudier *in vitro*, la capacité d'un polymère de chitosan complexé à la phosphorylcholine à influencer l'adhésion, la survie, la différenciation et la fonctionnalité cellulaire dans un modèle murin de culture mixte de cellules dérivées de la moelle osseuse et 2) de déterminer l'impact de la présence du 17 β -estradiol sur ces mêmes comportements cellulaires.

Nos travaux démontrent que la matrice de chitosan-phosphorylcholine s'avère compatible avec notre modèle de culture cellulaire. En effet, ce polymère est capable de promouvoir l'organisation et le développement des cellules dérivées de la moelle osseuse de façon comparable à la matrice normalement utilisée dans la croissance *in vitro* des cellules endothéliales progénitrices, la fibronectine. De plus, ce polymère n'a nullement

compromis l'activité migratoire des cellules, laissant supposer qu'il pourrait éventuellement être un véhicule approprié pour effectuer une livraison cellulaire à un site de lésion.

Il s'avère que le 17β -estradiol, lorsqu'ajouté au milieu de culture ou complexé au polymère de chitosan phosphorylcholine, est capable de moduler le comportement cellulaire, et ce, de façon différente. Le 17β -estradiol complexé au polymère de chitosan-phosphorylcholine démontre, par rapport à sa forme soluble, une plus grande aptitude à accroître le nombre de cellules hématopoïétiques ainsi que des cellules endothéliales progénitrices dérivées de la moelle osseuse *in vitro*. De plus, le 17β -estradiol complexé au polymère de chitosan-phosphorylcholine permet une amplification marquée des cellules endothéliales progénitrices et leur offre un support adéquat afin de favoriser la guérison vasculaire.

L'ensemble de nos travaux suggère que le polymère de chitosan complexé à la phosphorylcholine en présence ou non de 17β -estradiol est une matrice compatible avec les cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse *in vitro*. Le 17β -estradiol complexé au polymère est toutefois plus efficace que sa forme soluble à promouvoir l'amplification du nombre de cellules progénitrices. Ce polymère représente un outil thérapeutique attrayant et une matrice de livraison d'agent bioactif prometteuse pour le recrutement cellulaire dans l'accélération de la guérison vasculaire.

Mots-clés: estradiol, chitosan-phosphorylcholine, cellules endothéliales progénitrices, biocompatibilité, guérison vasculaire

Abstract

Bone marrow derived cells, including endothelial progenitor cells, are reduced in numbers in patient with cardiovascular disease or risk factors. Mobilization and incorporation of these cells at the vascular lesion site are important events in the reendothelialization process. 17β -estradiol was shown in a mouse model of injury, to favour this healing process through mechanisms which involve the mobilization and incorporation of endothelial progenitor cells derived from the bone marrow. At the moment, there are many strategies to increase endothelial progenitor cells mobilization as well as recruitment into the vascular wall. However, few studies favour local delivery of a large number of functional progenitor cells on a biodegradable scaffold and to maintain them at the lesion site in order to promote reendothelialization. An interesting biopolymer for this application is chitosan. This non toxic and biodegradable biopolymer is commonly used in tissue engineering and was recently used in vascular healing. Phosphorylcholine modified chitosan can increase the water solubility and cell biocompatibility of the biopolymer in physiological condition.

This master project was thus designed to :1) evaluate, *in vitro*, the capacity of phosphorylcholine modified chitosan to influence cell adhesion, survival, differentiation and functionality in a mouse model of bone marrow mixed culture and 2) determine the impact of 17β -estradiol on these cell behaviours.

Our results suggest an adequate biocompatibility of phosphorylcholine modified chitosan with our cell culture system. Indeed, this polymer was able to promote cell organization and development of bone marrow derived cells in the same way that fibronectin, the most commonly matrix used in the progenitor cells *in vitro* culture. Moreover, cell migratory activity was not compromised by the chitosan polymer.

It appears that 17β -estradiol, when added to cell culture media or attached on phosphorylcholine modified chitosan is able to modulate differently cell behaviour. Our

data suggest that 17β -estradiol coupled to the chitosan polymer was superior to increase the number of haematopoietic and endothelial progenitor cells derived from bone marrow *in vitro* compared to the soluble form. 17β -estradiol coupled to the polymer of phosphorylcholine modified chitosan allowed an increased amplification of progenitor cell number and provided adequate scaffold to favour vascular healing.

We propose that phosphorylcholine modified chitosan in presence or not of 17β -estradiol is a compatible matrix with bone marrow derived progenitor cells *in vitro*. 17β -estradiol enhances the amplification of progenitor cell *in vitro* when associated to the polymer compared to its soluble form. This biopolymer may be an attractive matrix and a promising vehicle in a drug delivery therapeutic system for progenitor cells recruitment and to promote vascular healing.

Keywords: estradiol, chitosan-phosphorylcholine, endothelial progenitor cells, biocompatibility, vascular wound healing.

Table des matières

Liste des abréviations.....	xii
Liste des figures	xiv
Remerciements.....	xviii
1.0 Introduction.....	1
1.1 L'athérosclérose	2
1.1.1 Définition de la pathologie.....	2
1.1.2 Facteurs de risque des maladies cardiovasculaires	3
1.1.2.1 Âge et sexe	3
1.1.2.2 Hyperlipidémie.....	4
1.1.2.3 Sédentarité, obésité et diabète	4
1.1.2.4 Hypertension	4
1.1.2.5 Tabagisme	5
1.1.3 Physiologie des artères.....	5
1.1.3.1 Intima	5
1.1.3.2 Média	6
1.1.3.3 Adventice	7
1.1.4 Formation de l'athérosclérose.....	7
1.1.4.1 Apparition de la strie lipidique.....	7
1.1.4.2 Dysfonction endothéliale	7
1.1.4.3 Formation de la plaque d'athérosclérose.....	8
1.1.4.4 Progression de la plaque d'athérosclérose	9
1.1.4.5 Rupture de la plaque d'athérosclérose	10
1.1.4.5.1 Rupture de la capsule fibreuse	10
1.1.4.5.2 Érosion de la plaque	10
1.2 Les estrogènes.....	12
1.2.1 Synthèse des estrogènes	12
1.2.2 Les récepteurs aux estrogènes.....	14

1.2.2.1	La structure des récepteurs aux estrogènes	14
1.2.2.2	La localisation des récepteurs aux estrogènes.....	15
1.2.2.3	L'activation des récepteurs aux estrogènes.....	16
1.2.2.3.1	L'activation dépendante du ligand (voie classique).....	16
1.2.2.3.2	L'activation non-génomique dépendante du ligand.....	17
1.2.2.3.3	L'activation indépendante du ligand (voie alternative)	17
1.2.3	La signalisation	18
1.2.4	Les effets des estrogènes sur le système cardiovasculaire.....	18
1.2.4.1	Le profil lipidique	18
1.2.4.2	L'inflammation	19
1.2.4.3	La biodisponibilité du NO.....	19
1.2.4.4	La paroi vasculaire	20
1.2.4.5	Les cellules progénitrices.....	21
1.3	Les cellules endothéliales progénitrices.....	22
1.3.1	L'origine des CEP.....	22
1.3.2	La caractérisation des CEP.....	23
1.3.3	Les niches cellulaires dans la moelle osseuse.....	24
1.3.4	La mobilisation et le recrutement des CEP aux niches de la moelle osseuse.	26
1.3.5	L'impact des facteurs de risque cardiovasculaire sur les CEP.....	28
1.3.5.1	L'âge et le sexe	28
1.3.5.2	L'hyperlipidémie.....	29
1.3.5.3	Le diabète.....	30
1.3.5.4	La sédentarité et l'obésité	30
1.3.5.5	L'hypertension	31
1.3.5.6	Le tabagisme	31
1.3.5.7	La protéine C réactive.....	31
1.4	La réparation cardiovasculaire.....	33
1.4.1	La mobilisation des cellules progénitrices suite à une blessure vasculaire.....	34

1.4.2	Le recrutement des cellules progénitrices au site de lésion vasculaire	34
1.4.3	L'implication des cellules progénitrices dans l'angiogénèse.....	35
1.4.4	Les stratégies de réendothélialisation.....	37
1.4.4.1	Les estrogènes	37
1.4.4.2	Les endoprothèses	38
1.4.4.3	L'adhésion cellulaire aux endoprothèses	39
1.4.4.4	Les endoprothèses favorisant le recrutement cellulaire	41
1.5	Les biopolymères: l'implication du chitosan et de la phosphorylcholine.....	43
1.5.1	Les biopolymères et le domaine cardiovasculaire	44
1.5.2	Le chitosan	45
1.5.2.1	Les caractéristiques du chitosan.....	45
1.5.2.2	Utilisation du chitosan.....	46
1.5.2.3	La phosphorylcholine, une composante des biopolymères.....	47
1.6	But du travail.....	49
2.0	Articles scientifiques.....	51
2.1	ACCORD DES COAUTEURS.....	52
2.1.1	Lettre de l'éditeur	53
2.1.2	Phosphorylcholine-Modified Chitosan Matrix: an Attractive Platform for Progenitor Cells <i>In vitro</i> Amplification.	54
2.1.2.1	Abstract	56
2.1.2.2	Introduction.....	57
2.1.2.3	Materials and Methods.....	60
2.1.2.4	Results.....	64
2.1.2.5	Discussion	69
2.1.2.6	Conclusion	74
2.1.2.7	Acknowledgements.....	75
2.1.2.8	References.....	76
2.1.2.9	Legends.....	82

2.1.2.10	Figures.....	84
2.2	ACCORD DES COAUTEURS.....	90
2.2.1	17Beta-Estradiol Modified Chitosan-Phosphorylcholine Matrix Improved Prognitor Cells Amplification Compared to the Soluble Form.....	91
2.2.1.1	Abstract.....	92
2.2.1.2	Introduction.....	94
2.2.1.3	Materials and Methods.....	98
2.2.1.4	Results.....	105
2.2.1.5	Discussion.....	114
2.2.1.6	Conclusion.....	121
2.2.1.7	Acknowledgements.....	122
2.2.1.8	References.....	123
2.2.1.9	Figures.....	131
2.2.1.10	Legends.....	140
3.0	Discussion.....	142
3.1	Le chitosan: modulation de la réparation vasculaire par les cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse.....	145
3.1.1	L'inflammation et la thrombose.....	145
3.1.2	Les processus de réendothélialisation.....	147
3.1.3	Polymères biodégradables.....	148
3.1.4	Recrutement ou livraison cellulaire au site de lésion.....	149
3.2	Le chitosan: une matrice biocompatible avec les cellules dérivées de la moelle osseuse.....	152
3.2.1	Influence sur les processus biologiques.....	152
3.2.1.1	Toxicité du biopolymère de chitosan.....	153
3.2.1.2	Adhésion cellulaire.....	156
3.2.1.3	Populations cellulaires.....	157
3.2.1.4	Capacité migratoire.....	158

3.2.1.5	Induction de l'angiogénèse	159
3.3	Impact de l'estradiol sur les CDMO	162
3.3.1	L'estradiol dans les processus biologiques	162
3.3.1.1	Adhésion, survie et prolifération cellulaire.....	162
3.3.1.2	Populations cellulaires	166
3.3.1.3	Capacité migratoire	169
3.3.1.4	Induction de l'angiogénèse	170
4.0	Conclusion	172
5.0	Bibliographie.....	I
	Annexe I : Réaction de désacétylation du polymère de chitosan.....	XXI
	Annexe II : Structure des polymères à base de chitosan- phosphorylcholine.....	XXII

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
CE	Cellules endothéliales
CEP	Cellules endothéliales progénitrices
CDMO	Cellules dérivées de la moelle osseuse
CH	Chitosan
CH-PC	Chitosan-phosphorylcholine
CH-PC-E2	Chitosan-phosphorylcholine-17 β -Estradiol
CML	Cellules musculaires lisses
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CSM	Cellules souches mésenchymales
DDA	Degré de désacétylation
E2	17 β -Estradiol
eNOS	Oxyde nitrique synthétase endothéliale
ERE	Élément de réponse à l'estrogène
G-CSF	Facteur granulocytaire stimulant la formation de colonies
ICAM	Molécule d'adhésion intracellulaire
LDL	Lipoprotéine de faible densité
MAPK	Protéine mitogénique à activité kinase
MCP-1	Protéine chimioattractante des monocytes
MMP	Métalloprotéinase de la matrice extracellulaire
MO	Moelle osseuse
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthétase
oxyLDL	Lipides oxydés
PC	Phosphorylcholine

PI3K/Akt	Phosphatidylinositol-3-kinase/protéine kinase B
PSGL	Ligand de la glycoprotéine p-sélectine
RE	Récepteurs aux estrogènes
RE α	Récepteur aux estrogènes alpha
RE β	Récepteur aux estrogènes bêta
RGD	Arginine- Glycine- Acide aspartique (Arg-Gly-Asp)
SCF	Facteur de cellule souche
SDF-1	Facteur 1 dérivé du stroma
TNF- α	Facteur nécrosant alpha des tumeurs
VCAM	Molécule d'adhésion des cellules vasculaires
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR-2	Récepteur 2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VLA-4	Antigène tardif -4

Liste des figures

Figure 1. Structure de la paroi vasculaire. Trois tuniques composent la paroi vasculaire normale de la plus interne à la plus superficielle, il y a l'intima, la média et l'adventice. L'intima est composée d'une couche unique de CE responsables du maintien de l'homéostasie vasculaire. La média est formée de CML et de matrice extracellulaire permettant la contraction/relaxation de l'artère. L'adventice, formant la couche externe, est composée de terminaisons nerveuses et est responsable de la nutrition de la média par ses «vasa-vasorum». (Adaptée de www.hearthealthinternational.org)¹³

Figure 2. Évolution de la plaque d'athérosclérose. La formation de la plaque d'athérosclérose s'initie par l'adhésion et la migration des leucocytes dans la paroi vasculaire. La strie lipidique devient apparente suite à l'accumulation de lipides oxydés. Par la suite, le nombre de cellules spumeuses augmente et elles sécrètent des facteurs induisant la migration des CML. La plaque est alors une structure dense formée de gouttelettes lipidiques extracellulaires, de débris cellulaires et de cellules spumeuses. Elle est entourée d'une capsule fibreuse composée de CML et de collagène. Ultimement survient la rupture de la plaque menant à la formation d'un thrombus. (Adaptée de Rea P. (2008) *American Scientist*.)²

Figure 3. Synthèse de l'estrogène. Le cholestérol, précurseur des hormones stéroïdiennes, est utilisé dans la synthèse d'estrogène après sa liaison aux lipoprotéines. La synthèse d'estrogène fait intervenir l'androstenedione, l'estrone et la testostérone. L'aromatisation est l'ultime étape de la formation d'estrogène à partir de ces précurseurs. (Adaptée de Czubryt, MP. (2006) *Can J Physiol Pharmacol*.)³⁰

Figure 4. Structure des récepteurs aux estrogènes. RE α et RE β partagent une structure moléculaire similaire composée de plusieurs domaines fonctionnels (A-F). Le domaine A/B

contient la région d'activation transcriptionnelle AF-1 indépendante du ligand, le domaine de liaison à l'ADN (C/D) et le domaine de liaison au ligand (E/F) qui comprend aussi la région d'activation transcriptionnelle AF-2 dépendante du ligand. (Adaptée de Gennari, L. (2005) *Am J Epidemiol.*)³⁷

Figure 5. Localisation et structure des niches de cellules souches de la moelle osseuse.

La MO se compose de deux niches: la niche ostéoblastique et la niche vasculaire. La niche ostéoblastique se situe sous le périoste et fournit un microenvironnement favorisant la quiescence des CSH. Les cellules souches sont ancrées aux cellules stromales environnantes. La niche vasculaire est composée des CE sinusoidales et se retrouve dans la portion centrale des os. Elle facilite la migration transendothéliale des CSH lors de la mobilisation et du recrutement. (Adaptée de Yin, T. (2006). *J Clin Invest*)¹⁰⁴

Figure 6. Mécanisme du recrutement des cellules progénitrices en circulation vers la moelle osseuse.

(A) Les CEP sont d'abord ralenties par les sélectines exprimées constitutivement par les CE. (B) L'adhésion ferme et la transmigration sont des processus faisant intervenir l'axe SDF-1/CXCR4 mais aussi l'interaction VLA-4/VCAM. (C) Les CEP entrent dans la moelle osseuse et progressent de la niche vasculaire à la niche ostéoblastique. (D) Les cellules stromales expriment constitutivement du SDF-1 qui détermine un gradient qui attire et maintient les CEP dans la MO. (Adaptée de Peled, A. (2000) *Blood*)¹¹⁴

Figure 7. Mobilisation et recrutement des cellules dérivées de la moelle osseuse.

(A) La mobilisation des cellules de la MO vers la circulation sanguine est induite par divers effecteurs. (B) Les CEP circulantes seront par la suite recrutées au site de lésion en réponse aux facteurs sécrétés par les tissus lésés ou ischémiques ou (C) elles participeront à la

régénération de l'endothélium et à la formation de néovaisseaux. (Adaptée de Sata, M. (2004) *J Mol Cell Cardiol* et Hristov, M (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol*)^{165, 166}

Figure 8. Processus d'endothélialisation d'une surface synthétique. Plusieurs processus biologiques favorisant l'endothélialisation sont impliqués, incluant (1) l'induction de la mobilisation des CEP de la moelle osseuse, (2) le recrutement spécifique des CEP à la surface vasculaire synthétique, (3) l'adhésion cellulaire ferme induite par des motifs d'adhésion spécifique à la surface synthétique (concentration spatiale prédéterminée) et (4) la différenciation cellulaire dirigée suivant l'adhésion pour former un endothélium mature et complètement fonctionnel capable d'autorenouvellement. (Adaptée de de Mel (2008). *Biomacromolecules*)¹⁸³

Figure 9. Observation des CDMO en culture sur une matrice de CH. Les cellules sont d'abordensemencées sur la fibronectine durant une semaine puis sont transférées sur un film de CH (0,5%) de 1,5 mm d'épaisseur. Les CDMO sont observées au jour 1 (A), au jour 2 (B) et au jour 7 (C). Un changement morphologique, une désorganisation des colonies et une réduction rapide du nombre de cellules sont observés.

Figure 10. Expression du RE- α ainsi que de l'actine. Les CDMO sontensemencées sur le biopolymère de CH-PC-E2 ainsi que sur le CH-PC en présence d'E2 soluble. L'expression du RE- α ainsi que de l'actine sont quantifiés par immunobuvardage de type western. La modulation de l'expression de l'actine, la protéine de référence, est observée après une semaine de traitement avec différentes concentrations d'E2.

Figure 11 : Réaction de désacétylation du polymère de CH.

Figure 12 : Structure des polymères à base de chitosan-phosphorylcholine. A) Structure du polymère de CH-PC, B) structure du polymère de CH-PC-E2

*« La plus belle chose que nous
puissions éprouver, c'est le
mystère des choses. »*

Albert Einstein

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier le Dr Jean-François Tanguay de m'avoir permis de faire partie de son équipe. Ces quelques années passées au sein de votre laboratoire m'auront permis d'acquérir de nombreuses connaissances théoriques et pratiques en cardiologie, mais m'auront aussi permis de grandir sur le plan personnel.

Merci au Dr. Yahye Merhi et au Dre Mariam Tabrizam de prendre sur leur temps pour corriger ce mémoire.

Merci au Dre Isabelle Cloutier pour avoir cru en mon potentiel, un geste que je n'oublierai pas. Merci pour son soutien, ses nombreux conseils relatifs à mon projet ainsi qu'à la rédaction de mon mémoire et de mes articles scientifiques.

Un merci particulier à Caroline Lemieux, qui fut un brillant exemple de rigueur scientifique. Cette passion pour la science fut une inspiration qui me permit de développer mon esprit scientifique et mon sens critique afin de faire de la bonne science.

Un énorme merci à Julie Lebel, Sandra Gilligan, Pascale Geoffroy, Dominique Lauzier et Marie-Élaine Clavet qui m'ont beaucoup aidé avec les manipulations techniques. Sans vous, il m'aurait été impossible de considérer ces projets, ni même de les terminer.

J'aimerais remercier également Vikie Lamontagne. Nous avons partagé aux cours de ces années des moments heureux et d'autres plus difficiles, mais l'important c'est de faire ce que l'on aime dans la vie.

J'aimerais aussi remercier Émilie Cossette, ma stagiaire d'été, qui m'a procuré son aide et qui m'a aussi permis de m'accomplir d'une autre façon, soit celle d'apprendre à former les autres. Elle m'a permis de comprendre qu'une passion n'est rien si on ne peut la transmettre.

De même, j'aimerais remercier les autres membres du laboratoire. Merci à Souhad El Akoum, Geneviève Morin, Hortence Makui et Corinne St-Denis pour leur présence et l'agréable atmosphère qui régnait au laboratoire. Avec vous, j'ai fait partie d'une équipe pour qui l'entraide et le respect sont de vraies valeurs.

Enfin, je voudrais remercier mes parents qui m'ont toujours encouragée et permis de me rendre si loin. Je remercie surtout Mathieu qui m'a toujours soutenue et appuyée tout au long de ce parcours qui n'a pas toujours été évident. Merci de m'avoir écoutée et d'avoir trouvé les mots qui me faisaient du bien. Ni la distance ni les moments difficiles n'ont pu affecter ce lien qui nous uni et qui nous a rendus plus forts.

1.0 Introduction

1.1 L'athérosclérose

L'histoire de l'athérosclérose est fort complexe tout comme sa pathologie. Au cours du 20^e siècle, il a été possible d'identifier la présence de plaques d'athérosclérose sur des momies égyptiennes datant de l'époque pharaonique. Cette pathologie des artères de gros et de moyens calibres a donc toujours fait partie de notre histoire. Cependant, tous ne se sont pas toujours entendus sur la définition de l'athérosclérose. En effet au 19^e siècle, il régna un désaccord entre Rudolf Virchow, un pathologiste allemand qui voyait en l'athérosclérose une maladie proliférative et le pathologiste Carl Rokitansky qui croyait plutôt que l'athérome provenait de la résorption d'un thrombus. Le terme athérosclérose fit son apparition au début du 20^e siècle pour désigner cette pathologie. Il trouve ses racines dans les termes grecs *athere* et *Skleros* qui signifient bouillie durcie. Au cours du siècle dernier, il a été démontré que cette maladie est reliée à un déséquilibre entre les réactions anti- et pro-inflammatoires chroniques générées suite à un dommage de l'endothélium vasculaire. ¹

1.1.1 Définition de la pathologie

L'athérosclérose se caractérise traditionnellement par la présence d'un dépôt lipidique dans la couche sous-endothéliale de la paroi vasculaire. De nos jours, il est généralement accepté que cette pathologie s'avère beaucoup plus complexe. En effet, l'athérosclérose est initiée par la dysfonction endothéliale, mais c'est l'accumulation de lipides et l'établissement d'une réaction inflammatoire chronique qui mènent à la formation d'une plaque qui épaissit progressivement la paroi et réduit la lumière vasculaire. Les plaques d'athérosclérose se développent préférentiellement dans certaines parties de l'arbre vasculaire, principalement où il y a des ramifications comme dans la crosse aortique et les carotides. Cette particularité morphologique induit la perturbation du flot sanguin et désorganise les forces de cisaillement s'exerçant sur les parois des vaisseaux ce qui active

et augmente la perméabilité de l'endothélium. Les plaques d'athérosclérose sont aussi retrouvées au niveau des membres inférieurs et au niveau cérébral. Les complications liées à l'athérosclérose sont nombreuses, comme par exemple, l'angine de poitrine et l'ischémie cérébrale transitoire qui sont attribuables à la réduction de la lumière vasculaire. De plus, la rupture de la plaque occasionne la formation d'un caillot sanguin pouvant entraîner un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral selon l'emplacement du vaisseau obstrué.²

1.1.2 Facteurs de risque des maladies cardiovasculaires

L'athérosclérose est une maladie progressive responsable de la plupart des maladies cardiovasculaires. Elle se développe généralement avec l'âge, mais peut être exacerbée par la sédentarité et le tabagisme ou par la présence de maladies non contrôlées comme l'hypertension et le diabète. Ces dernières sont considérées comme des facteurs de risque pouvant provoquer des atteintes d'ordre chimique ou mécanique à l'endothélium. Cependant, il est possible de réduire l'incidence de maladies cardiovasculaires par le changement de ses habitudes de vie ainsi que par le contrôle adéquat de certaines pathologies comme le diabète ou l'hypertension.³

1.1.2.1 Âge et sexe

L'incidence de maladies cardiovasculaires est corrélée avec le vieillissement autant chez les hommes que chez les femmes. En effet, les cellules endothéliales (CE) sénescents démontrent un taux décroissant d'oxyde nitrique synthétase (NOS pour *nitric oxide synthase*), l'enzyme qui assure la production d'oxyde nitrique (NO pour *nitric oxide*). Le NO permet le maintien d'un endothélium fonctionnel moins susceptible aux agressions. Il assure une surface anti-thrombogénique et empêche la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) participant au développement des plaques d'athérosclérose.⁴

Les femmes pré-ménopausées démontrent un taux de maladies cardiovasculaires beaucoup plus bas que chez les hommes de même âge. Cependant, ce taux s'accroît rapidement avec la ménopause et devient analogue à celui des hommes. L'estrogène présent chez les femmes pré-ménopausées jouerait un rôle prépondérant dans cet effet cardioprotecteur. (révisé dans ⁵)

1.1.2.2 Hyperlipidémie

Des études épidémiologiques ont démontré une corrélation positive entre la concentration de cholestérol total et le taux de mortalité par maladie cardiovasculaire. L'hypercholestérolémie contribue à l'accumulation de lipides dans la paroi vasculaire et à la formation de cellules spumeuses participant à la formation et à la progression de la plaque d'athérosclérose. ⁶

1.1.2.3 Sédentarité, obésité et diabète

L'inactivité physique est associée à l'augmentation du stress oxydatif, de la dysfonction endothéliale ainsi qu'au développement de l'athérosclérose. ⁷ L'exercice physique permet l'amélioration des fonctions de l'endothélium, de la pression sanguine, de la sensibilité à l'insuline et de l'homéostasie ainsi que de la réparation vasculaire et la réduction de l'inflammation. ⁸ Les patients obèses présentent des taux sanguins élevés d'endothéline-1, un vasoconstricteur puissant favorisant une réactivité anormale des artères. ^{9, 10} De plus, le diabète en relation avec l'obésité, interfère dans la biodisponibilité du NO produit par les CE menant à la génération d'espèces oxygénées réactives qui compromettent la vasodilatation dépendante du NO.

1.1.2.4 Hypertension

Lors du développement de l'hypertension, des changements dans les forces de cisaillement qui maintiennent les fonctions de l'endothélium provoquent l'apparition de la

dysfonction endothéliale. La réactivité vasculaire est compromise, et ce, en association avec la production du NO. Un dérèglement dans la voie de signalisation du précurseur du NO est responsable de la réponse anormale de l'endothélium.¹¹

1.1.2.5 Tabagisme

Le tabagisme est une cause majeure des maladies coronariennes, des accidents vasculaires cérébraux et des maladies cardiaques périphériques. Le tabagisme favorise une hausse de la production d'anion superoxyde induisant une plus grande oxydation des lipides dans la paroi vasculaire et menant à l'initiation d'une réaction inflammatoire chronique.¹²

1.1.3 Physiologie des artères

La paroi d'une artère comprend trois tuniques concentriques qui sont de la plus interne à la plus externe; l'intima, la média et l'adventice (Figure 1). Toutes ces composantes de la paroi artérielle interagissent ensembles pour former un vaisseau dynamique capable de réagir et de s'adapter aux changements survenant dans son microenvironnement.

1.1.3.1 Intima

L'intima est la tunique interne, formée en état normal d'une couche unique de CE reposant sur une membrane basale composée de collagène, de laminine, de fibronectine et d'autres molécules de la matrice extracellulaire. Elle forme une barrière perméable et sélective régulant le passage de substances du sang, avec lequel elle est directement en contact, et les tissus. L'endothélium est critique dans le maintien de l'homéostasie

vasculaire et ses autres fonctions seront détaillées dans une section ultérieure (1.1.4.2 Dysfonction endothéliale).

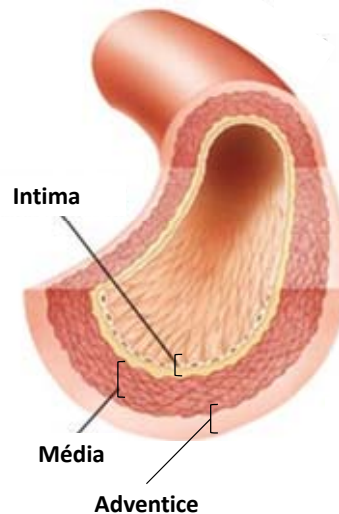


Figure 1. Structure de la paroi vasculaire. Trois tuniques composent la paroi vasculaire normale de la plus interne à la plus superficielle, il y a l'intima, la média et l'adventice. L'intima est composée d'une couche unique de CE responsables du maintien de l'homéostasie vasculaire. La média est formée de CML et de matrice extracellulaire permettant la contraction/relaxation de l'artère. L'adventice, formant la couche externe, est composée de terminaisons nerveuses et est responsable de la nutrition de la média par ses «vasa-vasorum». (Adaptée de www.hearthealthinternational.org)¹³

1.1.3.2 Média

La média est la tunique moyenne. Plus épaisse que l'intima, elle est de nature à la fois musculaire et élastique. Les CML qui la composent ont un phénotype non prolifératif ou contractile. Cette tunique contribue à l'intégrité structurelle des vaisseaux en permettant leur contraction et leur relaxation en réponse à la pression sanguine ou à certaines substances chimiques comme le NO.

1.1.3.3 Adventice

L'adventice est la tunique externe de l'artère. De nature fibreuse, elle est plus résistante et plus rigide que les deux autres. Elle contient les vaisseaux nourriciers permettant l'apport des nutriments et de l'oxygène aux grosses artères les «vasa-vasorum». Elle est composée de fibres élastiques, de collagène, de neurofibres (les «vasa-nervorum») et cette structure peut également contenir des cellules comme des fibroblastes.

1.1.4 Formation de l'athérosclérose

1.1.4.1 Apparition de la strie lipidique

L'excès de lipoprotéines de faible densité (LDL pour *low density lipoprotein*) favorise l'accumulation de lipides dans la média de l'artère. Des interactions électrostatiques entre les lipoprotéines et les protéoglycans de la matrice extracellulaire retiennent les LDL dans la paroi vasculaire. Les LDL seront ensuite modifiés chimiquement, plus souvent oxydés, par les espèces réactives dont les anions superoxydes. L'apparition des lipides oxydés (oxyLDL) initie une réponse inflammatoire dans la paroi vasculaire par l'activation des CE et l'induction de l'expression de molécules adhésion.¹⁴

1.1.4.2 Dysfonction endothéliale

Les facteurs de risque conventionnels (tabagisme, obésité, hypertension, diabète, hypercholestérolémie) agissent de pair avec les facteurs hémodynamiques (forces de cisaillement élevées) afin d'induire la dysfonction endothéliale.

L'endothélium fonctionnel régule le tonus vasculaire en maintenant un équilibre entre la sécrétion de vasodilatateurs (NO, prostacycline) et de vasoconstricteurs (endothéline-1, angiotensine II). Les CE produisent du NO via leur Oxyde nitrique synthétase endothéliale

(eNOS pour *endothelial nitric oxide synthase*), permettant la relaxation des CML et le maintien d'une surface antithrombogénique. L'endothélium assure l'intégrité de la membrane basale, l'inhibition de l'adhésion/infiltration des leucocytes et la prolifération des CML.^{15, 16} En réponse aux agressions biochimiques ou physiques, l'endothélium se retrouve dans un état activé. La perméabilité membranaire augmente alors en raison d'un changement morphologique des CE en réponse à une perturbation du flot sanguin. Lorsqu'elles sont soumises à un flot sanguin uniforme, les CE ont une forme ellipsoïdale et sont alignées dans la direction de la circulation. Cependant, dans les bifurcations artérielles, là où le flot sanguin est perturbé, les CE adoptent une forme polygonale sans orientation précise contribuant à l'augmentation de la perméabilité de l'endothélium.¹⁷ La dysfonction endothéliale est caractérisée par la diminution de la vasodilatation dépendante du NO suite à la diminution de l'activité de la eNOS ainsi que par un déséquilibre entre la sécrétion des vasoconstricteurs et vasodilatateurs. L'endothélium activé est en outre, caractérisé par un état pro-inflammatoire et pro-thrombogénique.¹⁸

1.1.4.3 Formation de la plaque d'athérosclérose

Le recrutement des monocytes à partir de la circulation est principalement dirigé par l'interaction du ligand de la glycoprotéine P-sélectine (PSGL-1 pour *P-selectin glycoprotein ligand -1*) et des sélectines exprimées à la surface des CE activées. Cette interaction permet le roulement ainsi que le ralentissement des monocytes sur l'endothélium. Cela permet également l'établissement d'une proximité favorisant un contact entre les monocytes et les autres molécules d'adhésion exprimées par les CE.¹⁹ Un lien faible initial s'établit entre les CE et les monocytes afin de les immobiliser sur l'endothélium. L'adhésion ferme à la paroi vasculaire se fait par l'interaction de leurs intégrines ($\beta 2$) et les immunoglobulines comme la molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM pour *Vascular Cell Adhesion Molecule*) et la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM pour *Intercellular Cell Adhesion Molecule*) à la surface des CE activées. La liaison de ICAM et VCAM à leur ligand respectif, soit l'intégrine $\beta 2$ et

l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ ou l'antigène tardif-4 (VLA-4 pour *very late antigen 4*), induit des changements morphologiques permettant la transmigration des monocytes.²⁰

Les CE et les CML sécrètent alors la protéine chimioattractante des monocytes (MCP-1 pour *monocyte chemoattractant protein-1*) attirant davantage de monocytes dans l'espace subendothélial. Le facteur stimulant la formation de colonie de macrophages est sécrété par les CE activées et induit la prolifération, la survie ainsi que la différenciation des monocytes en macrophages. Les macrophages internalisent les oxyLDL par leurs récepteurs non spécifiques et l'excès de lipides ainsi accumulé en absence d'un afflux efficace de lipides à haute densité mène à leur transformation en cellules spumeuses.²¹

1.1.4.4 Progression de la plaque d'athérosclérose

La perturbation de l'équilibre de l'activité anti- et pro-inflammatoire est importante dans la progression de la plaque d'athérosclérose. Les cellules spumeuses sécrètent des cytokines initiant une réponse inflammatoire. Les lymphocytes T s'infiltrent puis sont activés. Ils sécrètent ainsi d'autres cytokines, dont l'interféron gamma qui amplifient la réponse inflammatoire. Les oxyLDL initient alors une nouvelle ronde de recrutement de cellules inflammatoires.²² Les cellules spumeuses sécrètent le facteur de croissance dérivé des plaquettes qui initie la migration et la prolifération des CML. La plasticité des CML, soit leur habileté à passer d'un phénotype contractile à un phénotype prolifératif, ainsi que la dissolution de la matrice extracellulaire par les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMP pour *matrix metalloproteinase*) rend ce phénomène possible. Les CML emmagasinent aussi des oxyLDL contribuant à l'augmentation du nombre de cellules spumeuses et à la formation de la capsule fibreuse. (Figure 2) L'accumulation de collagène sécrété par les CML contribue à une stabilisation de la plaque d'athérosclérose par la formation d'une chape fibreuse. Par la suite, les CML sécrètent des protéines accélérant la calcification et la minéralisation de la plaque.²³

1.1.4.5 Rupture de la plaque d'athérosclérose

Les plaques d'athérosclérose avancées sont caractérisées par un noyau de gouttelettes lipidiques extracellulaires, de débris cellulaires et de cellules spumeuses, lequel est entouré d'une capsule fibreuse composée de CML et de collagène. Les infarctus du myocarde surviennent suite à l'obstruction d'un vaisseau par un thrombus formé suite à la rupture de la capsule fibreuse ou à l'érosion de la plaque d'athérosclérose.

1.1.4.5.1 Rupture de la capsule fibreuse

Une plaque vulnérable est une structure amincie de la capsule fibreuse qui devient fragile lorsque soumise au stress mécanique se caractérisant par un nombre restreint de CML, une activité apoptotique intense, une inflammation active et l'accumulation extracellulaire de lipides. L'apoptose des cellules spumeuses, induite par les cytokines pro-inflammatoires ainsi que l'infiltration des LDL dépassant la capacité des macrophages à les ingérer, contribue à l'accumulation extracellulaire des lipides.²⁴ La rupture survient préférentiellement où la capsule fibreuse est plus mince et où les cellules immunitaires activées sont abondantes. Ces cellules produisent des agents pro-inflammatoires et des enzymes protéolytiques qui affaiblissent la capsule fibreuse. Une réduction du collagène sous l'action des MMP et la sécrétion de protéinases altèrent la composition de la plaque, entraînant sa déstabilisation et ultimement sa rupture.²⁵

1.1.4.5.2 Érosion de la plaque

Alternativement, l'érosion de la plaque se produit à la surface endothéliale. Il y a formation d'un thrombus superposé à une plaque déendothélialisée, mais intacte. L'augmentation de l'activité des MMP et des gélatinases augmentent la desquamation de l'endothélium. Le collagène de la matrice extracellulaire ainsi exposé active l'agrégation plaquettaire et ultérieurement la cascade de coagulation.²⁵

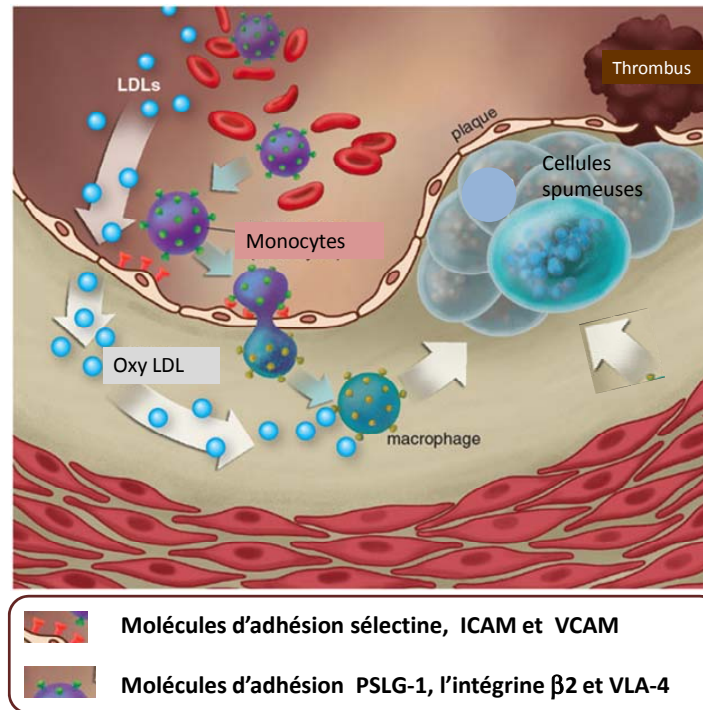


Figure 2. Évolution de la plaque d'athérosclérose. La formation de la plaque d'athérosclérose s'initie par l'adhésion et la migration des leucocytes dans la paroi vasculaire. La strie lipidique devient apparente suite à l'accumulation de lipides oxydés. Par la suite, le nombre de cellules spumeuses augmente et elles sécrètent des facteurs induisant la migration des CML. La plaque est alors une structure dense formée de gouttelettes lipidiques extracellulaires, de débris cellulaires et de cellules spumeuses. Elle est entourée d'une capsule fibreuse composée de CML et de collagène. Ultimement survient la rupture de la plaque menant à la formation d'un thrombus. (Adaptée de Rea P. (2008) *American Scientist*.)²

1.2 Les estrogènes

Les estrogènes sont des hormones stéroïdiennes impliquées dans le développement des caractères sexuels féminins. Chez la femme, les estrogènes sont produits dans les ovaires par la thèque interne et les cellules folliculaires de l'ovule en maturation. La sécrétion ovarienne ainsi que la concentration sanguine d'estrogène qui en résulte varie pendant le cycle menstruel, ce qui en assure sa régulation. La voie de synthèse des estrogènes s'initie à partir des androgènes sécrétés par les cellules de la thèque interne qui diffusent vers les cellules folliculaires où ils seront convertis en estrogènes par une aromatisation. Les estrogènes sont également produits en petite quantité par d'autres tissus tels le foie, les glandes surrénales, les seins et le tissu adipeux. Ces sources secondaires d'estrogènes sont particulièrement importantes chez les femmes ménopausées.²⁶ Chez l'homme, les estrogènes sont principalement produits par la conversion des androgènes dans différents sites périphériques et par une source secondaire, les cellules de Sertoli dans les testicules.²⁷ Bien que les estrogènes soient présents chez les deux sexes, une quantité significativement plus importante se retrouve chez les femmes pré-ménopausées (variant de 100 à 600 pmol) comparativement à celle retrouvée chez les hommes (variant de 5-20 pmol).²⁸

1.2.1 Synthèse des estrogènes

Les trois estrogènes naturels, l'estriol, l'estradiol (E2) et l'estrone, sont tous produits à partir du cholestérol. L'E2 possède le plus puissant effet biologique et est la principale forme circulante d'estrogène chez la femme préménopausée. Alors que, chez les femmes ménopausées, le taux d'estrone est supérieur à celui de l'E2 dans le sang. Le cholestérol, précurseur des hormones stéroïdiennes, est utilisé dans la synthèse d'estrogène après sa liaison aux lipoprotéines. L'aromatisation est l'ultime étape de la formation de l'E2 et elle est catalysée par la P450, un complexe enzymatique de l'aromatase monooxygénase.

(Figure 3). Par la suite, trois réactions consécutives d'hydroxylation sont nécessaires pour former l'estrone et l'E2 ainsi que leurs précurseurs l'androstenedione et la testostérone respectivement.²⁹

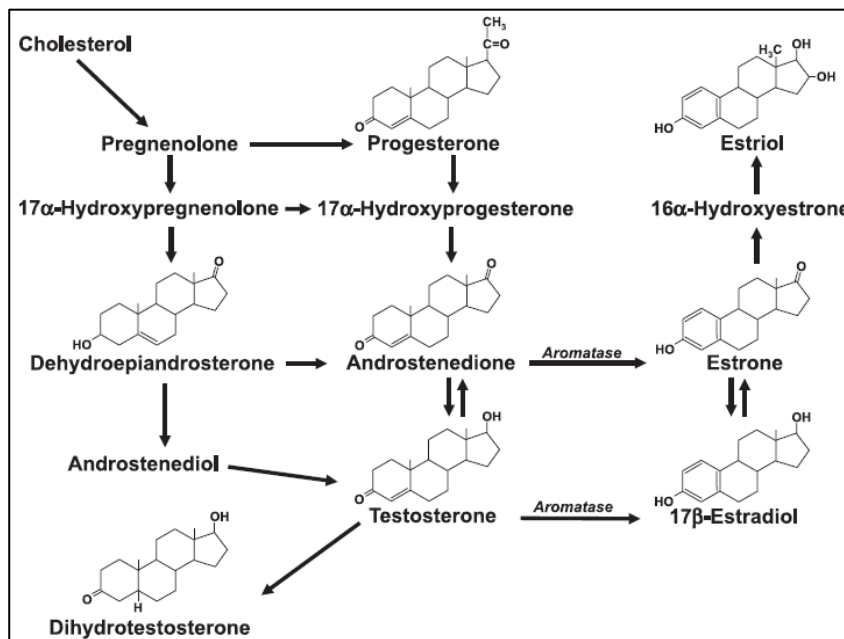


Figure 3. Synthèse de l'estrogène. Le cholestérol, précurseur des hormones stéroïdiennes, est utilisé dans la synthèse d'estrogène après sa liaison aux lipoprotéines. La synthèse d'estrogène fait intervenir l'androstenedione, l'estrone et la testostérone. L'aromatase est l'ultime étape de la formation d'estrogène à partir de ces précurseurs. (Adaptée de Czubryt, MP. (2006) *Can J Physiol Pharmacol.*)³⁰

1.2.2 Les récepteurs aux estrogènes

Les estrogènes exercent leurs actions via les récepteurs aux estrogènes (RE). Il existe deux RE retrouvés sous différentes isoformes ou des variantes épissées. Le RE α , découvert en 1986, fut le premier des RE à être identifié et ce n'est que plus récemment qu'un deuxième RE fut identifié puis nommé RE β .^{31,32}

1.2.2.1 La structure des récepteurs aux estrogènes

Les RE α et β font partie de la super famille des récepteurs hormonaux nucléaires et partagent une structure moléculaire similaire composée de plusieurs domaines fonctionnels (A-F) (Figure 4). Le domaine A/B en partie N-terminal possède la plus grande variabilité et une homologie de seulement 20 % est partagée entre le RE α et le RE β . Il contient un domaine fonctionnel d'activation indépendante de la liaison du ligand (AF-1) qui interagit directement avec la machinerie transcriptionnelle.³³ Ce domaine plus court chez RE β , possède une faible activité contrairement à celui de RE α , qui est très actif.³⁴ Le domaine de liaison à l'ADN (C/D) est la séquence la plus conservée présentant une homologie de 95 % entre RE α et RE β . Ce domaine contient deux doigts de zinc impliqués dans la liaison à l'ADN ainsi que dans la dimérisation du récepteur. Le domaine de liaison au ligand (E/F) situé dans la partie C-terminal est le deuxième domaine le plus conservé avec 55 % d'homologie entre les deux RE.³⁵ Ce domaine contient une deuxième région d'activation transcriptionnelle (AF-2) qui est dépendante du ligand. La liaison du ligand à ce domaine entraîne la dimérisation et la translocation des RE au noyau.³⁶ Ces récepteurs peuvent donc être retrouvés sous forme d'homodimères (RE α /RE α et RE β /RE β) ou d'hétérodimères (RE α /RE β) suite à leur activation.

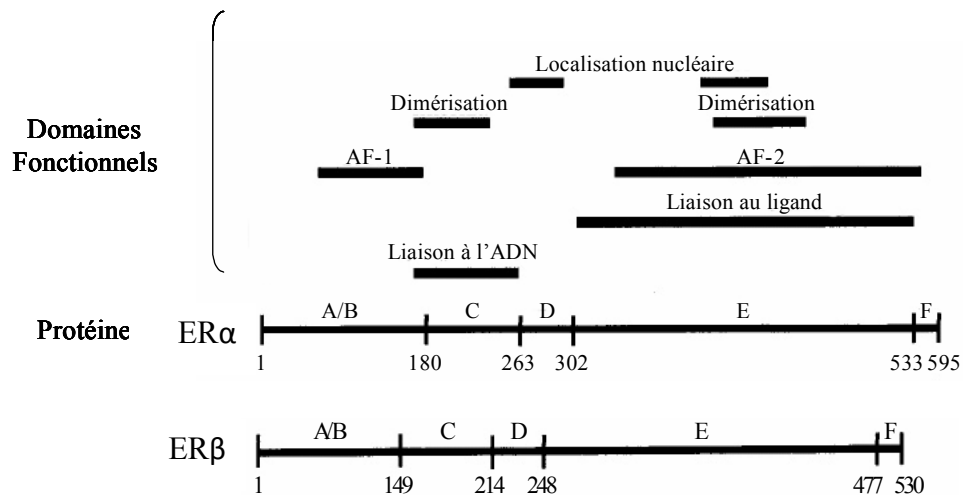


Figure 4. Structure des récepteurs aux œstrogènes. RE α et RE β partagent une structure moléculaire similaire composée de plusieurs domaines fonctionnels (A-F). Le domaine A/B contient la région d'activation transcriptionnelle AF-1 indépendante du ligand, le domaine de liaison à l'ADN (C/D) et le domaine de liaison au ligand (E/F) qui comprend aussi la région d'activation transcriptionnelle AF-2 dépendante du ligand. (Adaptée de Gennari, L. (2005) *Am J Epidemiol.*)³⁷

Malgré leur grande homologie structurelle, les gènes qui les encodent sont situés sur différents chromosomes. Le gène codant pour RE α , *ERS1* est localisé sur le chromosome 6q et le gène codant pour RE β , soit *ERS2* est localisé sur le chromosome 14q. RE α est une protéine de 595 acides aminés ayant un poids moléculaire de 66 kDa. RE β , quant à lui, est une protéine de 530 acides aminés ayant un poids moléculaire de 54kD.³⁸

1.2.2.2 La localisation des récepteurs aux œstrogènes

La distribution tissulaire des RE α et β est différente, ce qui suppose qu'ils assurent des fonctions distinctes selon les tissus dans lesquels ils sont exprimés. RE α prédomine dans les glandes mammaires, l'utérus, les ovaires, les poumons, le cerveau, les glandes

thyroïdes, les os, le foie, les reins, l'estomac, le côlon, le cœur et les vaisseaux sanguins. Quant à RE β , il est retrouvé dans les testicules, la prostate, les ovaires, les reins, les vaisseaux sanguins et certaines régions du cerveau. Au niveau cardiovasculaire, les RE α et RE β sont colocalisés sur les CE et les CML.³⁹ Les deux récepteurs sont également exprimés par les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules stromales de la moelle osseuse (MO).⁴⁰ D'ailleurs, l'estrogène joue un rôle dans la prévention de l'ostéoporose puisqu'il prévient la résorption osseuse en inhibant la fonction des ostéoclastes.⁴¹

1.2.2.3 L'activation des récepteurs aux estrogènes

L'activation des RE peut être classée en deux catégories soit l'activation entraînant des actions génomiques et celle entraînant des actions non-génomiques. L'action génomique est plus lente, survient en quelques heures et nécessite l'activation des voies dépendantes et indépendantes du ligand menant à l'activation de la transcription génique. Alors que l'action non-génomique ou extranucléaire est rapide, se produit en quelques secondes à quelques minutes, et ne requiert pas d'activité transcriptionnelle. Les actions non génomiques des estrogènes peuvent agir en synergie avec les actions génomiques retardées.²⁹

1.2.2.3.1 L'activation dépendante du ligand (voie classique)

Les RE, lorsqu'ils ne sont pas attachés à leur ligand se retrouvent dans le cytoplasme ou au niveau nucléaire et sont liés à des protéines chaperonnes ou de choc thermique qui stabilisent les récepteurs dans leurs états inactivés en masquant le site de liaison à l'ADN.⁴² Lorsque les estrogènes diffusent à l'intérieur de la cellule et se lient au site de liaison du ligand, les RE se dissocient des protéines chaperonnes. Le complexe estrogène-récepteur migre au noyau où il formera des homodimères ou des hétérodimères. Les protéines cytosoliques calvéoline-1 stimulent le processus de translocation au noyau via l'interaction directe avec le récepteur.⁴³ Le complexe se lie alors à une séquence

spécifique sur l'ADN des différents gènes cibles appelée 'élément de réponse à l'estrogène' (ERE). Il lie également les coactivateurs ou les corépresseurs du récepteur nucléaire. L'estrogène peut également réguler la transcription de gènes qui n'ont pas d'ERE par l'association à d'autres protéines ou par la modulation d'autres facteurs de transcription. Par exemple, l'association de l'estrogène à la sous unité de la protéine activatrice-1 résulte en l'activation de facteurs de transcription.⁴⁴

1.2.2.3.2 L'activation non-génomique dépendante du ligand

L'activation des RE sans induction de l'activité transcriptionnelle nucléaire est possible par l'interaction des estrogènes avec les RE membranaires tels les RE couplés aux protéines G.^{45, 46} D'autres mécanismes d'activation ont été identifiés. Par exemple, la striatine, une protéine des calvéolines identifiée comme ancre moléculaire pour RE α à la membrane cellulaire, organise l'activation du complexe RE α -eNOS par l'estrogène, permettant la production rapide de NO dans les CE vasculaires.⁴⁷

1.2.2.3.3 L'activation indépendante du ligand (voie alternative)

Les RE sont des phosphoprotéines et leurs fonctions peuvent être modifiées par leur phosphorylation en absence d'estrogène. La phosphorylation des résidus sérine/thréonine est catalysée par des enzymes tels que les récepteurs tyrosine kinase ou des protéines mitogéniques à activité kinase (MAPK pour *Mitogen-activated protein kinase*).⁴⁸ Certains activateurs d'enzyme à activité kinase sont des facteurs de croissance. En effet, le facteur de croissance épidermique⁴⁹, l'insuline, le facteur de croissance à l'insuline-1⁵⁰ et le facteur de croissance transformant bêta⁵¹, peuvent mimer les effets de l'estrogène par leur liaison aux RE et activer la transcription dépendante des RE.

1.2.3 La signalisation

Plusieurs voies métaboliques et cascades de signalisation intracellulaire peuvent être associées à l'action rapide de l'estrogène : les voies métaboliques de l'adénylate cyclase ⁵², de la phospholipase C ⁵³, des MAPK ⁵⁴ ou encore l'activation des voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G ⁵⁵. Enfin, les estrogènes activent plusieurs voies métaboliques qui peuvent avoir la même cible. Par exemple, la production de NO est partiellement dépendante de l'activation des MAPK, mais peut également être produite via la modulation de la voie métabolique de la phosphatidylinositol-3-kinase/protéine kinase B (PI3K/Akt). ⁵⁶⁻⁵⁸

1.2.4 Les effets des estrogènes sur le système cardiovasculaire

L'effet cardioprotecteur de l'estrogène se reflète à plusieurs niveaux et semble intervenir dans le processus d'athérosclérose ainsi que celui de réparation vasculaire. (Ces derniers seront discutés dans la section 1.4.4.1 les estrogènes dans les stratégies de réendothélialisation).

1.2.4.1 Le profil lipidique

L'estrogène améliore le profil lipidique puisqu'il tend à augmenter le nombre de récepteurs de lipoprotéines au foie entraînant ainsi une diminution de la concentration des LDL sanguins. ⁵⁹ Cet effet peut indirectement atténuer la progression de la plaque par la réduction de la disponibilité des LDL. L'estrogène entraîne également une augmentation des lipides à haute densité par la modulation des gènes d'apoprotéines hépatiques. ⁶⁰ De plus, l'estrogène prévient la formation de la strie lipidique dans un modèle murin ApoE^{-/-} ou LDL^{-/-} puisqu'il tend à diminuer le taux de cholestérol et de triglycérides sanguins. ^{61, 62}

L'estrogène joue un rôle important dans la régulation de la concentration de lipides sanguins, mais peut également avoir une influence bénéfique sur la nature des lipides en circulation. L'estrogène permet la réduction de la peroxydation des LDL responsable de la formation des oxyLDL présents dans la plaque d'athérosclérose. Cet effet se reflète dans la diminution du nombre d'oxyLDL ainsi que de l'apoptose des CE induite par ces lipides modifiés.⁶³ Toutes ces actions contribuent globalement à la réduction du stress oxydatif responsable de la modification des lipides par la diminution de la production d'anion superoxyde.⁶⁴

1.2.4.2 L'inflammation

Les effets athéroprotecteurs de l'estrogène sont dépendants de la production de NO, de l'induction de COX-2 (contrôle de l'inflammation) et de la production de la prostacycline (antiplaquettaire/vasorelaxant) jouant un rôle important dans la prévention de la formation de la strie lipidique.⁶⁵ L'estrogène réduit l'expression des molécules d'adhésion E-sélectine, ICAM et VCAM, induites par un environnement pro-inflammatoire, *in vitro*, soit en présence du facteur nécrosant des tumeurs alpha (TNF- α pour *tumor necrosis factor alpha*) ou d'oxyLDL.^{66, 67} L'estrogène contribue à la réduction de la sécrétion de cytokines comme MCP-1 entraînant de ce fait la diminution du recrutement des monocytes et leucocytes à la paroi vasculaire.^{68, 69} Notre laboratoire a d'ailleurs démontré que l'estrogène permet la réduction, au niveau des CE, de l'expression du récepteur CD40 ainsi que de son ligand induite par l'interféron gamma. Cette réduction est associée à la diminution de l'adhésion des neutrophiles aux CE.⁷⁰

1.2.4.3 La biodisponibilité du NO

L'estrogène accroît la production de NO par les CE résultant en une augmentation de la vasodilatation locale des vaisseaux.⁷¹ De plus, l'estrogène atténue l'expression de l'endothéline-1, ce qui assure une plus grande vasodilatation en réponse à l'estrogène.⁷²

Des études d'inactivation des RE ont permis de découvrir que la production de NO suite à un traitement à l'estrogène est dirigée par RE α .⁷³ Elle est associée à une activité plus intense de la eNOS mais également à son expression protéique accrue suite à un traitement à l'estrogène.^{74,75} L'activation de la forme inductible de NOS pourrait aussi contribuer à la disponibilité du NO.⁷⁶ L'augmentation de la biodisponibilité du NO se fait par l'implication de la voie métabolique PI3K/AKT ainsi que par l'activation des MAPK.⁷⁷

L'estrogène est capable d'agir sur la production d'espèces réactives oxygénées à partir du NO. En effet, l'apoptose des cellules observée dans la plaque d'athérosclérose résulte partiellement de la production de peroxynitrite, un radical très réactif et cytotoxique produit à partir du NO. L'estrogène participe à la réduction du stress oxydatif en diminuant l'expression de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase, un enzyme requis dans la production d'anion super oxyde. L'estrogène agit comme antioxydant puisqu'il améliore le ratio NO/super oxyde et contribue à la réduction de l'inflammation chronique liée à la progression de la plaque d'athérosclérose.⁷⁸ L'augmentation de NO contribue également à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire diminuant les risques de thrombose. De plus, l'estrogène diminue la production de l'angiotensine II ce qui amène une réduction de la relâche des espèces réactives oxydées et participe ainsi à la réduction du stress oxydatif.⁷⁹

1.2.4.4 La paroi vasculaire

L'estrogène exerce des effets contraires sur les deux principaux types cellulaires de la paroi vasculaire dans les processus du maintien de l'intégrité de l'endothélium et de la réponse à une blessure vasculaire. En effet, l'estrogène stimule la prolifération et la migration des CE tout en inhibant ces mêmes processus chez les CML. Notre laboratoire a démontré que ces inductions ou inhibitions étaient reliées à la voie des MAPK, c'est-à-dire p42/44 et p38. L'estrogène active ces voies dans les CE par son interaction avec RE α alors qu'il inhibe ces mêmes voies métaboliques dans les CML, une action qui s'est avérée

dépendante de RE β .⁸⁰ L'estrogène est un agent favorisant la survie des CE en inhibant l'apoptose induite par le TNF- α .⁸¹ L'effet antiapoptotique des estrogènes est complexe et peut être à la fois dépendant et indépendant de l'action de leurs récepteurs, avec l'implication potentielle des MAPK, des protéines Fas, Bcl-2 et de la NOS²⁸

1.2.4.5 Les cellules progénitrices

Les estrogènes exercent des actions sur divers mécanismes cellulaires des cellules endothéliales progénitrices (CEP). Ainsi, un traitement à l'estrogène stimule la prolifération, la migration aussi bien que la survie des CEP par l'inhibition de l'apoptose. Il fut constaté qu'à la suite d'un traitement à l'estrogène, un plus grand nombre de CEP sont mobilisées dans la circulation et ceci est corrélé avec une augmentation de la réendothélialisation des vaisseaux lésés. Un modèle murin transgénique eNOS^{-/-} traité avec l'estrogène, a permis de déterminer que ces phénomènes sont dépendants de l'expression de la eNOS.^{82, 83}

L'estrogène stimule la survie des CEP par l'inhibition de leur apoptose, mais également en retardant leur sénescence par l'augmentation de l'expression de la sous unité catalytique de la transcriptase inverse de la télomérase.⁸⁴ Cet effet protecteur permet de réduire la sénescence des CEP induite *in vitro* par l'angiotensine II et celle habituellement observée chez les rats spontanément hypertendus.^{85, 86}

1.3 Les cellules endothéliales progénitrices

Découvertes par Asahara et ses collègues il y a plus d'une décennie, les angioblastes ou CEP furent isolés pour la première fois à partir de sang périphérique humain.⁸⁷ Ces cellules ont démontré un potentiel à se différencier en CE matures et à participer à la régénération de l'endothélium ainsi qu'à la formation de nouveaux vaisseaux. Isolées initialement selon l'expression des marqueurs de surface cellulaire CD34 et le récepteur du facteur de croissance vasculaire (VEGFR-2 pour *Vascular endothelial growth factor receptor 2*) ou le récepteur à domaine kinase, ces cellules peuvent également exprimer des marqueurs endothéliaux comme CD31 et Tie-2 lorsqu'elles sont mises en culture. Par la suite, la source des CEP en circulation fut identifiée. La MO s'est avérée capable de générer les cellules ayant l'habileté de se différencier en CE matures et à migrer aux sites ischémiques.⁸⁸ Depuis, d'autres sources de CEP ont été identifiées tels le cordon ombilical et le tissu adipeux. (révisé dans⁸⁹)

1.3.1 L'origine des CEP

L'origine des CEP n'a pas encore été clairement identifiée. Les CEP et les cellules souches hématopoïétiques (CSH) co-expriment plusieurs marqueurs de surface cellulaire comme CD34, CD133, VEGFR-2 et Tie2.⁹⁰ Conséquemment, deux théories sont actuellement proposées pour déterminer l'origine des CEP. La première repose sur le fait que structurellement les CSH et les CE proviendraient d'une origine commune, l'hémangioblaste qui lors du développement embryonnaire, génère les CE et les cellules hématopoïétiques.⁹¹ D'ailleurs, de récentes études ont permis d'établir la présence d'un hémangioblaste chez l'adulte qui permettrait le maintien des CE et des CEP en circulation.⁹² La seconde stipule plutôt que les CEP dériveraient des CSH.⁹³ L'origine véritable des CEP se trouve peut-être quelque part entre ces deux théories puisque les CEP forment un groupe hétérogène de cellules pouvant provenir de diverses populations cellulaires.

1.3.2 La caractérisation des CEP

La caractérisation des CEP est, encore aujourd'hui grandement discutée puisqu'il n'existe aucune identification absolue des CEP par des marqueurs cellulaires spécifiques. Cependant au fil des recherches, il s'est établi un accord général pour certains marqueurs de surface cellulaire afin de définir les CEP, c'est-à-dire CD34, VEGFR-2 et CD133.

Cette difficulté à définir les CEP provient surtout du fait qu'elles forment un groupe hétérogène de cellules d'origines diverses et qui sont associées à différents profils d'expression de protéines de surface cellulaire correspondant à leur stade de différenciation.^{93, 94} Par exemple, des études ont démontré que les cellules ayant des marqueurs de lignée endothéliale tels CD31 ou le facteur de von Willebrand ainsi que les cellules mononucléées isolées du sang périphérique (CD14⁺) pouvaient s'incorporer aux sites de lésions vasculaires et se différencier pour adopter un phénotype endothélial mature.⁹⁵ Également, il a été démontré que les cellules isolées de la MO exprimant le marqueur de CSH CD117⁺ pouvaient se différencier en CE matures *in vitro*. Ainsi, leur transplantation augmente la formation de nouveaux vaisseaux dans un modèle d'ischémie des membres postérieurs.⁹⁶ Enfin, les cellules souches mésenchymales (CSM) peuvent également être impliquées dans la guérison cardiovasculaire suite à un infarctus du myocarde.⁹⁷

L'hétérogénéité des populations des CEP en culture a mené à caractériser deux grandes classes de CEP dites précoces et tardives. Les différences entre ces deux classes se reflètent dans leur morphologie, leur taux de croissance et leur capacité à sécréter différents facteurs angiogéniques. Les CEP précoces sont fusiformes et ont une croissance maximale entre les 2^e et 3^e semaines de culture puis meurent vers la 4^e semaine. De plus, elles sont capables de sécréter une multitude de facteurs pro- et anti- angiogéniques.⁹⁸ Les CEP tardives, quant à elles adoptent une forme arrondie. Elles apparaissent après 2 à 3 semaines de culture et sont maintenues jusqu'à douze semaines en culture sans changement de

phénotype. Les CEP tardives semblent se développer préférentiellement de sous-populations exprimant le marqueur myéloïde CD14.⁹⁵

1.3.3 Les niches cellulaires dans la moelle osseuse

La localisation physique près de la surface osseuse des CSH dans la MO a été démontrée en premier en 1975.⁹⁹ Le terme niche, utilisé afin de décrire le microenvironnement spécifique des CSH dans la MO, a été proposé pour la première fois par Schofield. Il suggéra que les CSH sont en contact intime avec les ostéoblastes et que ce contact cellule-cellule est responsable de la capacité proliférative des CSH tout en inhibant leur différenciation.¹⁰⁰ Maintenant, il est reconnu que la MO contient deux niches; la niche ostéoblastique et la niche vasculaire. (Figure 5) Des études récentes démontrent cependant que cette organisation est beaucoup plus complexe puisqu'il y aurait différentes classes de niches chacune soutenant des fonctions uniques de tissu particulier.¹⁰¹

La structure de la niche ostéoblastique se compose des CSH qui sont entourées des cellules mésenchymales (CSM) dans la MO, sous le périoste. Les CSM sont la source de la majorité des cellules de lignée stromale de la MO incluant les chondrocytes, les ostéoblastes, les fibroblastes et les adipocytes.¹⁰² Ces cellules fournissent un support physique, mais également physiologique pour la survie, l'autorenouvellement et la prolifération des cellules souches dans la MO. L'établissement de ce microenvironnement permet le maintien en quiescence des CSH et assure la régulation de l'équilibre entre l'autorenouvellement et la différenciation cellulaire.¹⁰³

La niche vasculaire est composée des CE sinusoidales de la MO. Cette niche joue un rôle dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la mobilisation des cellules souches. (Révisé dans¹⁰⁴)

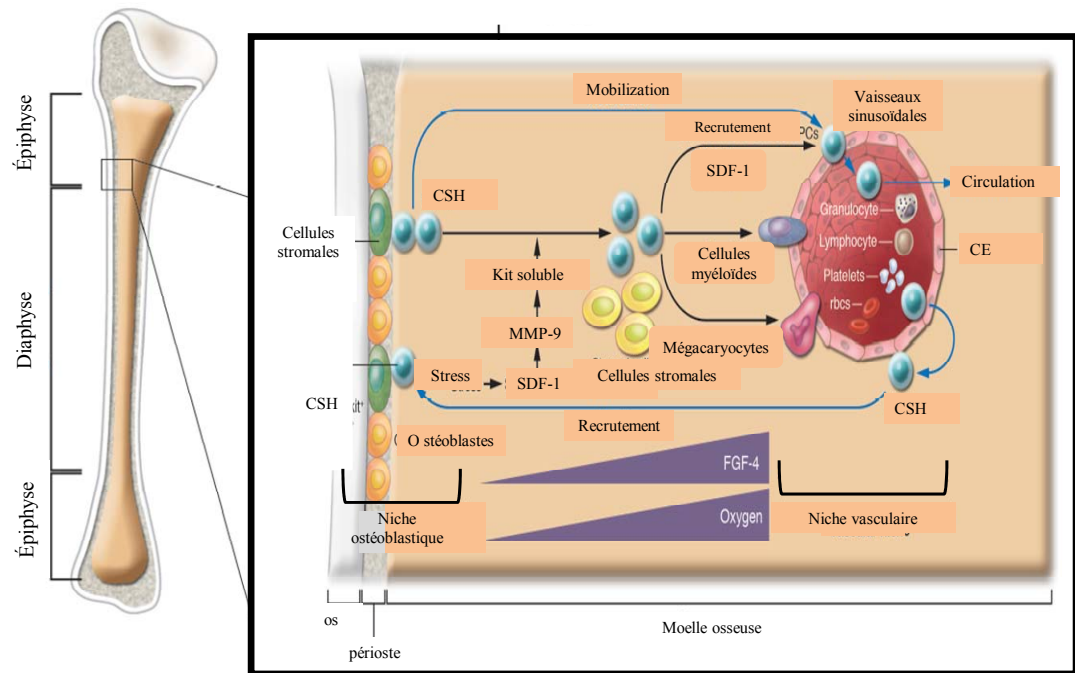


Figure 5. Localisation et structure des niches de cellules souches de la moelle osseuse. La MO se compose de deux niches: la niche ostéoblastique et la niche vasculaire. La niche ostéoblastique se situe sous le périoste et fournit un microenvironnement favorisant la quiescence des CSH. Les cellules souches sont ancrées aux cellules stromales environnantes. La niche vasculaire est composée des CE sinusoidales et se retrouve dans la portion centrale des os. Elle facilite la migration transendothéliale des CSH lors de la mobilisation et du recrutement. (Adaptée de Yin, T. (2006). J Clin Invest) ¹⁰⁴

1.3.4 La mobilisation et le recrutement des CEP aux niches de la moelle osseuse.

La circulation des CEP est définie selon deux grands axes soit la mobilisation et le recrutement. La mobilisation se définit comme étant l'étape où les cellules quittent la niche vasculaire pour entrer dans la circulation sanguine. Il y a par la suite, le recrutement vers la MO aussi appelé le «homing», lorsque les cellules circulantes reviennent vers la MO via la migration de la niche vasculaire vers la niche ostéoblastique. L'habileté des CSH à être mobilisées puis recrutées à la MO est reliée à des mécanismes de reconnaissance moléculaire spécifique, d'adhésion cellule-cellule ainsi que de migration transendothéliale.

105

La mobilisation des CSH est induite par la formation d'un gradient de substance chimioattractante de la niche ostéoblastique (bas) vers la niche vasculaire (élevé).¹⁰⁶ Certaines protéases alors exprimées dissocient les molécules d'adhésion et leurs récepteurs, comme VCAM et l'intégrine $\beta 1$, CXCR12 et CXCR4 ou encore le facteur de cellules souches (SCF pour *stem cell factor*) et c-kit, jouant un rôle dans la rétention des CSH à la surface des ostéoblastes. L'activation de la MMP-9 promeut également la transformation de kit ligand, lié à la membrane des ostéoblastes, en sa forme soluble et conséquemment permet le mouvement des cellules progénitrices c-kit⁺ vers la niche vasculaire de la MO, une étape essentielle à leur mobilisation.¹⁰⁷ De plus, le SCF stimule l'adhésion des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques aux cellules stromales par l'activation de l'expression VLA-4 et VLA-5, indiquant que la liaison à la membrane par le SCF peut affecter les propriétés d'adhésion à la niche ostéoblastique par la modification des intégrines.^{108, 109}

Le recrutement des cellules vers la MO se fait sensiblement selon les mêmes étapes que le recrutement des monocytes aux sites d'inflammation. (Voir section 1.1.4.3 formation de la plaque d'athérosclérose). Le roulement des CEP serait principalement assuré par

CD44, le ligand majeur de E-sélectine ainsi que par PSGL-1.¹¹⁰ L'adhésion ferme et la transmigration sont des processus faisant intervenir principalement l'axe du facteur dérivé du stroma-1 (SDF-1 pour *stromal derived factor*)/CXCR4 mais également l'interaction VLA-4/VCAM avec une contribution secondaire des intégrines $\beta 2$ fortement exprimées par les CEP. Les CE, les ostéoblastes, et les autres cellules stromales expriment constitutivement le SDF-1 ou CXCL12 qui détermine un gradient qui attire et maintient les CEP dans la MO.¹¹¹ Le SDF-1 ainsi généré par les CE induit la transendothélialisation des CEP par l'activation de l'expression de molécules d'adhésion.¹¹² Les CE de la MO expriment constitutivement certaines molécules d'adhésion comme la P- et E-sélectine, l'intégrine $\alpha 4$ et VCAM-1, normalement exprimées par un endothélium activé.¹¹³

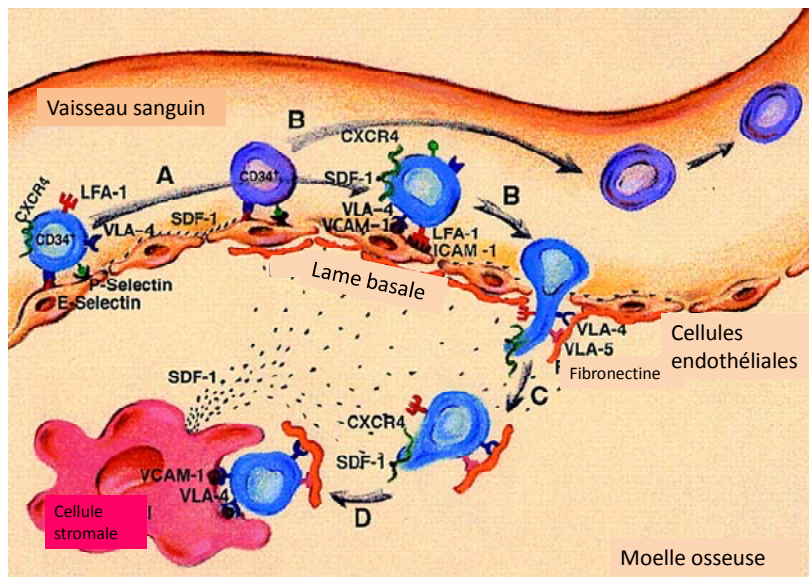


Figure 6. Mécanisme du recrutement des cellules progénitrices en circulation vers la moelle osseuse. (A) Les CEP sont d'abord ralenties par les sélectines exprimées constitutivement par les CE. (B) L'adhésion ferme et la transmigration sont des processus faisant intervenir l'axe SDF-1/CXCR4 mais aussi l'interaction VLA-4/VCAM. (C) Les CEP entrent dans la moelle osseuse et progressent de la niche vasculaire à la niche ostéoblastique. (D) Les cellules stromales expriment constitutivement du SDF-1 qui

détermine un gradient qui attire et maintient les CEP dans la MO. (Adaptée de Peled, A. (2000) Blood)¹¹⁴

1.3.5 L'impact des facteurs de risque cardiovasculaire sur les CEP

Les incidents cardiovasculaires sont influencés, d'un côté par le nombre de facteurs de risque et de l'autre par le nombre de CEP présentes en circulation. Il a été démontré qu'une corrélation inverse existe entre le nombre de facteurs de risque et le nombre de CEP circulantes.¹¹⁵ La mesure des CEP en circulation fut proposée comme indicateur de prédiction d'incidents cardiovasculaires après l'observation, chez les patients asymptomatiques, d'une association entre le taux de CEP circulantes et la dysfonction endothéliale en plus de la sévérité de l'athérosclérose.¹¹⁶ Un faible taux de CEP circulantes pourrait résulter de l'influence néfaste des facteurs de risque tel le tabagisme ainsi que le diabète qui modulent le stress oxydatif, l'activité du NO et les processus physiques pouvant influencer la mobilisation ou la demi-vie des CEP.¹¹⁷

1.3.5.1 L'âge et le sexe

L'estrogène présent chez les femmes pré-ménopausées est impliqué dans la modulation des taux circulant de CEP. Les recherches de plusieurs équipes, dont celles effectuées dans notre laboratoire, ont permis de mettre en évidence une corrélation entre la modulation des taux d'estrogène au cours du cycle menstruel et les variations des niveaux de CEP en circulation chez la femme pré-ménopausée.^{118, 119} L'augmentation du nombre de CEP circulantes en corrélation avec un taux élevé d'estrogène sanguin est également observée chez les femmes enceintes et les femmes suivant des traitements de fertilité *in vitro*.^{83, 120} Il fut démontré que les femmes pré-ménopausées présentes des taux circulants de CEP supérieurs aux hommes. Cependant, chez les femmes ménopausées ce taux est

semblable à celui des hommes de même âge et représente un risque cardiovasculaire accru comparativement aux femmes pré-ménopausées.¹²¹

Le nombre et la fonctionnalité des CEP s'épuisent progressivement avec l'âge contribuant à la progression de l'athérosclérose, la réduction de l'angiogenèse, le déclin des capacités à maintenir l'homéostasie et la réparation vasculaire.¹²²⁻¹²⁴ La dégradation de ces processus est accélérée par la présence des facteurs de risque. L'étude de la MO des souris âgées a permis de démontrer que les CEP ont des capacités prolifératives et migratoires déficientes par rapport aux jeunes souris.¹²⁵ De plus, la reconstitution de la MO d'une souris âgée à l'aide de la MO d'une souris plus jeune permet le rétablissement des fonctions angiogéniques.¹²⁶ Enfin, la greffe de cellules de MO d'une jeune souris apoE^{-/-} ou d'une souris non athérosclérotique chez une souris apoE^{-/-} retarde la progression de l'athérosclérose. Ceci suggère que la réparation vasculaire, déficiente en raison de l'âge de la souris, est un déterminant critique dans l'initiation et la progression de la maladie vasculaire.¹²⁷

1.3.5.2 L'hyperlipidémie

L'accumulation de lipides dans la paroi vasculaire, contribuant à la progression de la plaque d'athérosclérose, est favorisée par l'excès de lipides en circulation. Une corrélation inverse a été observée entre le taux de cholestérol sanguin et le nombre de colonies de progéniteurs formées *in vitro*, une mesure indirecte du nombre de CEP.¹¹⁷ L'hyperlipidémie influence négativement la capacité d'adhésion, de prolifération, de migration ainsi que la vasculogénèse *in vitro* des CEP de patients atteints de maladies cardiovasculaires. Cependant, ces effets sont renversés par la prise d'inhibiteur de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase, également appelés statines. Les statines activent la voie métabolique dépendante du PI3K/AKT stimulant la prolifération des CEP.

La nature des lipides peut également influencer le nombre et la fonctionnalité des CEP. En effet, les patients atteints de maladies coronariennes présentent un faible taux de CEP circulantes et un taux important d'oxyLDL. Des études ont démontré qu'en présence d'oxyLDL, l'adhésion et la migration des CEP étaient grandement réduites alors que l'apoptose est considérablement augmentée. De plus, il s'avère que ces effets néfastes se produisent via l'inhibition de l'eNOS exprimée par les CEP suggérant une implication du NO dans la survie des CEP.¹²⁹

1.3.5.3 Le diabète

Les patients présentant un diabète de type 2, souvent associé à un excès de poids sont à risque de développer une résistance à l'insuline. Chez les patients atteints de syndrome métabolique et de diabète, une diminution des capacités prolifératives et d'adhésion des CEP a déjà été observée.^{130, 131} L'hyperglycémie entraîne la réduction de la production de NO et de l'activité de la MMP-9 essentielle à la relâche des CEP de la MO. Elle réduit également l'activité mitogénique, la prolifération, la migration et augmente l'apoptose des CEP *in vitro*.^{132, 133} Ceci a été confirmé dans des études avec des modèles murins où le taux circulant ainsi que la mobilisation des CEP étaient diminués. Ces études ont également démontré que malgré un niveau circulant faible, le taux de CEP dans la MO demeure élevé suggérant une prolifération accrue des cellules souches afin de compenser leur mortalité élevée.¹³⁴ Les CEP démontrent également des capacités réduites à s'intégrer aux néovaisseaux dans les organes ischémiques et à contribuer à la réendothélialisation après une lésion.¹³⁵ Chez les diabétiques, la revascularisation suivant une ischémie des membres postérieurs est sévèrement compromise.

1.3.5.4 La sédentarité et l'obésité

La sédentarité ainsi que l'obésité sont souvent associées avec l'hyperlipidémie et le diabète de type 2 comme facteurs de risque pouvant diminuer le nombre de CEP et

désorganiser leurs fonctions. La réduction du nombre de CEP chez les patients obèses est un phénomène réversible puisque le taux de CEP peut être augmenté avec la perte de poids et la reprise d'activité physique.¹³⁶ Un nombre élevé de CEP a été observé chez les patients faisant de l'exercice physique durant un programme de réhabilitation suivant un événement cardiovasculaire et chez les personnes en santé faisant 30 minutes d'exercice par jour.^{8, 137, 138} Il existe une corrélation entre l'augmentation du nombre de CEP en circulation, l'amélioration des fonctions endothéliales, ainsi que l'exercice d'endurance, ce qui indique un lien entre la réactivité vasculaire et la mobilisation de CEP.¹³⁹

1.3.5.5 L'hypertension

Le nombre de CEP (CD133⁺ et CD34⁺, VEGFR-2⁺) est diminué chez les patients ayant une pression systolique élevée.¹¹⁵ Des études ont démontré que l'angiotensine II, un médiateur potentiel des effets nuisibles de l'hypertension, accélère la sénescence des CEP par la diminution de l'activité de la télomérase, un effet qui est inhibé par un bloqueur du récepteur de type 1.⁸⁵ L'angiotensine II inhibe la prolifération des CEP par l'augmentation du stress oxydatif, un effet également prévenu par les inhibiteurs du récepteur de l'angiotensine.¹⁴⁰

1.3.5.6 Le tabagisme

Le tabagisme est reconnu pour être le facteur de risque majeur dans le développement des maladies cardiovasculaires. Il réduit fortement le nombre de CEP par l'augmentation du stress oxydatif et du taux d'apoptose.^{115, 141} Les fumeurs chroniques voient cependant leur taux de CEP augmenter avec la cessation du tabagisme.¹⁴²

1.3.5.7 La protéine C réactive

La protéine C réactive sert d'indicateur de mauvais pronostic chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires puisque l'incidence d'évènement cardiovasculaire est

en corrélation avec l'augmentation de sa concentration sanguine. La protéine C réactive influence négativement le nombre de CEP et réduit leur capacité d'adhésion, de prolifération, de survie et de différenciation.¹⁴³

1.4 La réparation cardiovasculaire

L'endothélium de la paroi vasculaire possède la capacité de s'auto-renouveler, c'est-à-dire de remplacer par lui-même les CE de la paroi suite à une blessure. Des études, lors desquelles une partie de l'intima était retirée chirurgicalement des vaisseaux, ont permis de mettre en évidence ce phénomène. En effet, les CE matures en bordure d'une lésion étaient capables de proliférer et de migrer afin de rétablir l'intégrité de l'endothélium. Cette intégrité dépend donc d'un équilibre entre la sévérité ainsi que la fréquence des blessures subies et la capacité de l'endothélium à se régénérer. S'il est jeune et en santé, la réparation locale sera complète. Toutefois, s'il est âgé ou soumis à l'assaut des facteurs de risque cardiovasculaire, la réparation locale sera déficiente ou incomplète.¹⁴⁴

Récemment, il fut démontré que la réparation vasculaire implique également la contribution de cellules présentes dans la circulation sanguine, les CEP. La réendothélialisation est un processus clé dans l'homéostasie et la guérison vasculaire puisqu'un endothélium intact et fonctionnel est un élément critique dans la prévention du développement d'une plaque d'athérosclérose. L'implication des CEP provenant de la MO dans la réendothélialisation fut établie lors d'études de reconstitution de la MO. En effet, l'incorporation de cellules dérivées de la MO (CDMO) d'une souris donneuse fut détectée dans l'endothélium vasculaire d'une souris receveuse après l'injection de cellules progénitrices hématopoïétiques.¹⁴⁵ Les CEP sont impliquées autant dans la réparation vasculaire comme les processus de réendothélialisation permettant de diminuer l'hyperplasie de la néointima, que dans l'amélioration des fonctions ventriculaires après un infarctus du myocarde. (révisé dans¹⁴⁶)

1.4.1 La mobilisation des cellules progénitrices suite à une blessure vasculaire

Les CEP mobilisées dans la circulation sanguine à partir de la MO, participent à la réparation vasculaire suite à leur incorporation aux sites de lésion ou d'ischémie.¹⁴⁷ Les tissus ischémiques sécrètent du SDF-1 afin d'augmenter la mobilisation et diriger le recrutement des CEP au site de lésion.¹⁴⁸ Plusieurs autres facteurs sont utilisés de façon locale ou systémique afin d'accroître la mobilisation des CEP pour accélérer la réendothélialisation et réduire la formation de la néointima. Ainsi, des études *in vivo* ont permis d'identifier plusieurs effecteurs de la mobilisation des CEP tels les statines¹⁴⁹, le SCF, l'angiopoïétine¹⁵⁰, l'érythropoïétine¹⁵¹, ainsi que des cytokines inflammatoires telles MCP-1¹⁵² et certaines hormones comme l'estrogène⁸³. Le facteur granulocytaire stimulant la formation de colonies (G-CSF pour *granulocyte colony stimulating factor*) est aussi couramment utilisé dans l'induction *in vivo* de la mobilisation des CEP.¹⁵³

1.4.2 Le recrutement des cellules progénitrices au site de lésion vasculaire

Les mécanismes de réparation vasculaire via le recrutement cellulaire au site de lésion sont grandement étudiés. Il fut d'ailleurs établi que les plaquettes sont impliquées dans le recrutement des CEP à la paroi vasculaire. Ces études ont permis de démontrer que la réparation vasculaire s'initie par l'activation et l'adhésion des plaquettes suite à un bris dans l'endothélium. En effet, les sites dénudés de CE sur la paroi vasculaire se couvrent de plaquettes qui sécrètent des facteurs induisant le recrutement et l'adhésion des CEP sans déclencher la cascade de coagulation.^{154, 155} Ceci suggère que les mécanismes ainsi que le

profil d'activation des plaquettes pourraient être différents de celui de la cascade d'activation de la coagulation.

Tout d'abord, les CEP sont ralenties par les sélectines exprimées à la surface des plaquettes et de l'endothélium activé. La présence du ligand PSGL-1 sur les plaquettes permet leur interaction avec les cellules CD34⁺ dont elles stimulent le chimiotactisme et la migration via leurs intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$.^{156, 157} Par la suite, l'adhésion ferme des cellules se fait par les interactions entre les molécules d'adhésion telles ICAM et VCAM présentes sur les CEP et les CE matures activées.¹⁵⁸ Ainsi, le recrutement des CEP à une lésion vasculaire implique la même cascade d'évènements que celle impliquée lors du recrutement des monocytes à la paroi vasculaire. (Voir section 1.1.4.3 formation de la plaque d'athérosclérose) Un autre mécanisme de recrutement des CEP à la paroi vasculaire fut récemment mis en évidence, soit l'implication de c-kit exprimé à la surface des CEP. L'interaction de c-kit et de son ligand, exprimé par l'endothélium activé, permettrait l'adhésion des CEP circulantes aux sites de lésion et participerait à la réendothélialisation.¹⁵⁹

1.4.3 L'implication des cellules progénitrices dans l'angiogénèse

L'intégration des CEP à un endothélium lésé afin d'en remplacer les CE altérées lors d'une blessure vasculaire n'est pas le seul mécanisme de réparation dans lequel les CEP sont impliquées. Il fut déterminé que ces cellules sont capables de stimuler la croissance de néovaisseaux à partir de vaisseaux déjà existants, ce processus étant nommé angiogénèse. Dans les modèles d'ischémie des membres postérieurs, la transplantation de CEP isolées augmente la perfusion des tissus ischémiques alors que l'injection de CE matures ne parvient pas à produire cet effet.¹⁶⁰ Le SDF-1, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF pour *vascular endothelial growth factor*) et le G-CSF sont

couramment utilisés dans l'induction *in vivo* de l'angiogénèse par le recrutement des CEP.^{153, 161, 162} De plus, elles peuvent induire l'angiogénèse par leur effet paracrine, puisqu'elles sont capables de sécréter de facteurs tel le VEGF qui stimule la migration des CE des vaisseaux environnants.¹⁶³ Cependant, l'utilisation des CEP dans la vascularisation thérapeutique est compliquée par la présence des facteurs de risque cardiovasculaire comme l'âge ou le diabète puisqu'ils contribuent à la réduction du nombre ainsi que de la fonctionnalité des CEP disponibles.¹⁶⁴

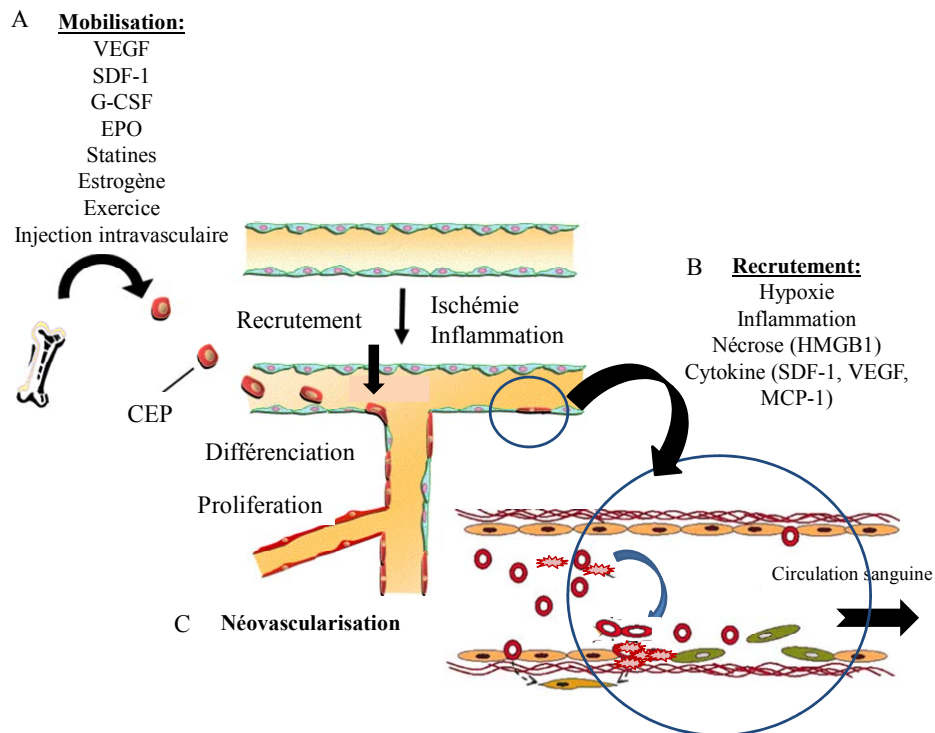


Figure 7. Mobilisation et recrutement des cellules dérivées de la moelle osseuse. (A) La mobilisation des cellules de la MO vers la circulation sanguine est induite par divers effecteurs. (B) Les CEP circulantes seront par la suite recrutées au site de lésion en réponse aux facteurs sécrétés par les tissus lésés ou ischémiques ou (C) elles participeront à la régénération de l'endothélium et à la formation de néovaisseaux. (Adaptée de Sata, M. (2004) *J Mol Cell Cardiol* et Hristov, M (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol*)^{165, 166}

1.4.4 Les stratégies de réendothélialisation

La réendothélialisation des vaisseaux lésés n'a pas toujours été la principale stratégie afin d'induire la guérison vasculaire. La livraison d'agents thérapeutiques ainsi que l'apposition d'endoprothèses permanentes favorisant la réendothélialisation sont des stratégies de guérison vasculaire récentes. Plusieurs études furent réalisées et permirent la mise en évidence de l'importance de la nature des agents thérapeutiques ainsi que des matrices de livraison utilisées.

1.4.4.1 Les estrogènes

Les estrogènes, comme nous l'avons vu précédemment, interviennent dans plusieurs mécanismes protecteurs contribuant au maintien des fonctions du système cardiovasculaire. Ils jouent également un rôle important dans la réparation vasculaire ainsi que dans la réduction des processus inflammatoires des plaques d'athérosclérose.

Afin de déterminer l'implication de l'estrogène dans le processus de réendothélialisation, des études comparatives entre les mâles et les femelles ont été réalisées dans un modèle murin de blessure vasculaire. L'ovariectomie des femelles fut associée à une réponse néointimale robuste comparable à celle des mâles, un effet grandement atténué par un traitement systémique à l'estrogène. Cette protection fut d'abord attribuée à la capacité des estrogènes à inhiber la prolifération des CML au site de blessure.¹⁶⁷ Cependant, il fut par la suite démontré que la protection vasculaire des estrogènes était surtout attribuée à l'augmentation de la réendothélialisation au site de blessure, un phénomène partiellement présent chez les souris $ER\beta^{-/-}$ mais sévèrement atténué chez les souris $ER\alpha^{-/-}$.¹⁶⁸ Notre laboratoire a démontré qu'une livraison locale d'E2 suite à une angioplastie ou précédant l'apposition d'une endoprothèse vasculaire est efficace pour accélérer la réendothélialisation et réduire la formation de la néointima dans un modèle porcin.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Un traitement local à l'E2 possède plusieurs avantages comme permettre la

réduction des concentrations d'E2 employées et prévenir l'utilisation de concentrations systémiques élevées pouvant être non souhaitables pour les autres tissus exposés. Il permet également le recours à des doses efficaces dont la relâche est ciblée et contrôlée.

La livraison locale d'estrogène peut aussi se faire par l'apposition d'une endoprothèse vasculaire recouverte d'estrogène. L'apposition d'une telle endoprothèse chez l'humain s'est déjà avérée sécuritaire puisqu'elle est corrélée avec de faibles incidences de resténose sans association avec l'inflammation. Cependant, lors de cette étude, la formation de la néointima n'a pu être significativement diminuée en comparaison à celle observée suite à l'apposition d'une endoprothèse nue. Toutefois la prolifération et la migration des CML sont grandement limitées par l'estrogène présent sur l'endoprothèse.¹⁷²

1.4.4.2 Les endoprothèses

La première approche afin de permettre la revascularisation fut de procéder à une angioplastie, c'est-à-dire une réouverture mécanique d'un vaisseau obstrué par une plaque d'athérosclérose.¹⁷³ Malgré l'efficacité de cette intervention, il fut constaté qu'elle présentait certaines complications telle l'apparition de resténose. Cette pathologie se définit comme le rétrécissement de la lumière d'une artère. Elle résulte de l'hyperplasie de la néointima formée suite à la migration et à la prolifération exagérées des CML induites par un stress mécanique attribué à l'angioplastie. La fréquence de resténose chez les patients varie de 30 à 60 % selon les facteurs de risque, le type de lésion et les aspects techniques de l'intervention.¹⁷⁴ Afin de prévenir les risques de resténose, l'apposition d'une endoprothèse vasculaire métallique permanente s'avéra plus efficace qu'une simple réouverture du vaisseau. Cette structure offrait une surface inerte contribuant à la guérison vasculaire sans provoquer l'activation du système immunitaire. Une telle endoprothèse permit la réduction de la fréquence de la resténose en éliminant le remodelage négatif de la paroi vasculaire. Cependant, la fréquence de resténose demeure élevée soit de 15 à 20% chez les patients portant une endoprothèse.¹⁷⁵ Par la suite, les nouvelles technologies ciblèrent l'inhibition

spécifique des cellules impliquées dans l'apparition de la resténose. L'utilisation d'endoprothèses vasculaires comme plateforme de livraison locale d'agents thérapeutiques a permis une réduction de la resténose supérieure aux endoprothèses vasculaires nues. En effet, la fréquence de resténose fut réduite à moins de 10% par l'apposition d'endoprothèses permettant l'élution d'agents antiprolifératifs ou anti-inflammatoires. La rapamycine et le paclitaxel par exemple sont couramment utilisés sur ce type d'endoprothèse et inhibent la migration ainsi que la prolifération des CML dans les modèles animaux.^{176, 177} Cependant, ces études ont également démontré une réendothélialisation incomplète des vaisseaux suite à l'apposition de ce type d'endoprothèse en comparaison avec les endoprothèses nues. Les effets inhibiteurs des agents thérapeutiques utilisés sur ces endoprothèses sont principalement responsables du délai de la guérison vasculaire en retardant les processus naturels de réparation.¹⁷⁸ De plus, les polymères non biodégradables pourraient induire une inflammation suite à leur implantation dans les artères de porc.¹⁷⁹ De nos jours, le développement d'endoprothèse vasculaire pouvant influencer le processus de réactivité vasculaire est grandement favorisé. En effet, les recherches sont maintenant concentrées sur le développement de matériaux et d'agents thérapeutiques pouvant accélérer les processus de réendothélialisation. De plus, la mise en évidence de l'implication des CEP dans la réparation de l'endothélium vasculaire a permis le développement de nouvelles endoprothèses vasculaires en évaluation clinique permettant le recrutement cellulaire pour accélérer les processus de réendothélialisation.

1.4.4.3 L'adhésion cellulaire aux endoprothèses

Pour développer une stratégie permettant d'accélérer la réendothélialisation à l'aide d'endoprothèse synthétique, une compréhension du processus d'adhésion cellulaire est primordiale.

Tout d'abord, l'adhésion cellulaire sur une surface naturelle, comme la paroi vasculaire ou la matrice extracellulaire, est initiée par de faibles interactions chimiques

telles l'établissement de ponts hydrogènes ou d'interactions électrostatiques. Par la suite, l'adhésion ferme des cellules se produit par l'interaction des intégrines et des glycoprotéines cellulaires contenant la séquence Arg-Gly-Asp (RGD) comme le collagène de type 1 ou la fibronectine. Chaque intégrine reconnaît une séquence RGD sur différentes protéines. Cette interaction est cruciale dans la formation du point focal d'adhésion permettant aux cellules d'adhérer fermement à la matrice extracellulaire.¹⁸⁰

L'adhésion cellulaire peut également se faire sur une surface synthétique comme les différents polymères utilisés dans l'ingénierie tissulaire. L'ancrage cellulaire à une surface synthétique est fort complexe et se fait principalement en suivant les mêmes étapes que l'adhésion à une surface naturelle. (Figure 8) Elle implique l'attachement cellulaire par des interactions électrostatiques, les modifications morphologiques des cellules, la formation du complexe d'adhésion focale ainsi que la production et la réorganisation des protéines du cytosquelette.¹⁸¹ Plusieurs facteurs physiques ou chimiques influencent l'adhésion cellulaire par exemple, la charge électrique, la rugosité de la surface, les propriétés physiques (flexibilité ou rigidité), la porosité, la solubilité, le pH ou la présence de groupes fonctionnels sur les polymères. (Révisé dans¹⁸²)

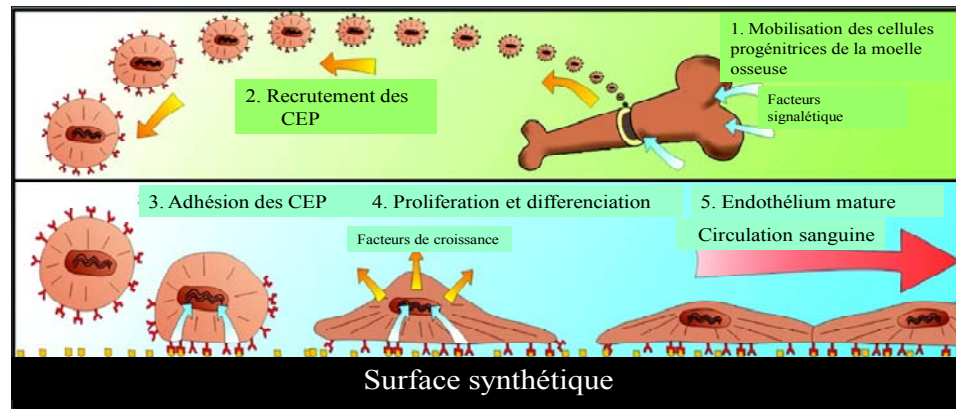


Figure 8. Processus d'endothélialisation d'une surface synthétique. Plusieurs processus biologiques favorisant l'endothélialisation sont impliqués, incluant (1) l'induction de la mobilisation des CEP de la moelle osseuse, (2) le recrutement spécifique des CEP à la surface vasculaire synthétique, (3) l'adhésion cellulaire ferme induite par des motifs d'adhésion spécifique à la surface synthétique (concentration spatiale prédéterminée) et (4) la différenciation cellulaire dirigée suivant l'adhésion pour former un endothélium mature et complètement fonctionnel capable d'autorenouvellement. (Adaptée de de Mel (2008). Biomacromolécules)¹⁸³

1.4.4.4 Les endoprothèses favorisant le recrutement cellulaire

Il existe différentes endoprothèses favorisant le recrutement de cellules progénitrices afin d'accélérer la réendothélialisation. Tout d'abord, la séquence RGD fut utilisée dans un modèle porcin afin de tester l'efficacité d'une endoprothèse vasculaire recouverte de peptides afin de favoriser la réendothélialisation. Néanmoins, malgré l'efficacité de cette technique, la spécificité des peptides fut remise en question, car plusieurs protéines peuvent lier cette séquence sur les CEP mais également sur les plaquettes et les leucocytes.¹⁸⁴ Par la suite, l'apposition d'endoprothèse recouverte

d'anticorps CD34 favorisant la captation des cellules progénitrices en circulation pour accroître la réendothélialisation fut proposée. Des études réalisées dans un modèle porcin puis chez l'humain ont démontré des résultats mitigés quant à l'efficacité de cette endoprothèse à réduire la resténose. De plus, le choix de l'anticorps pour attirer les CEP demeure très controversé puisqu'il n'existe à ce jour aucun consensus sur les marqueurs de surface cellulaire définissant les CEP.^{185, 186} Finalement, il fut proposé qu'une endoprothèse recouverte de CEP puisse être plus efficace puisqu'elle ne présentait pas l'inconvénient de l'hétérogénéité des cellules ainsi mobilisées au site de réendothélialisation. Cette endoprothèse fut testée dans un modèle canin et permit la mise en évidence de la réduction de la néointima et l'accélération de la réendothélialisation.¹⁸⁷

Toutes ces études ont un point en commun, soit l'apposition d'une structure permanente dans les vaisseaux sanguins. Suite à la guérison vasculaire, les endoprothèses demeurent dans la paroi ce qui peut limiter de futures interventions ou initier dans certains cas des phénomènes inflammatoires. L'endoprothèse vasculaire idéale se présente aujourd'hui comme celle pouvant accélérer la réendothélialisation et donc permettre une guérison vasculaire complète sans demeurer au site de lésion. Pour ce faire, le développement d'endoprothèse vasculaire ou d'autres véhicules de livraison locale faite à partir de polymères biodégradables est présentement en cours.

1.5 Les biopolymères: l'implication du chitosan et de la phosphorylcholine

La reconstruction tissulaire représente l'une des plus importantes utilisations des biopolymères. L'insertion de matrices, de cellules ou de molécules thérapeutiques dans un organisme afin d'en régénérer les tissus est appelée ingénierie tissulaire. Cette discipline est née de l'interaction entre différents champs d'études dont l'objectif est la génération de nouveaux matériaux biologiques pour remplacer des tissus ou des organes endommagés. Le développement de tissus synthétiques a grandement ciblé la conception de matériaux reproduisant la nature physique et mécanique des tissus natifs. Ces substituts sont formés d'une variété de matériaux (naturels, synthétiques, céramiques ou métaux) conçus pour imiter la structure en trois dimensions des autogreffes tissulaires tout en étant capables de soutenir les cellulesensemencées sur ces matériaux. Ils peuvent également agir comme véhicule pour certains antibiotiques ou agents thérapeutiques dépendamment de la nature de la lésion à réparer. Le biopolymère idéal est considéré comme celui pouvant être réorganisé et résorbé par la croissance cellulaire et graduellement remplacé par la formation de matrice extracellulaire ainsi que par des cellules différenciées. La construction bio-artificielle ne doit donc pas être considérée comme un substitut durable, mais comme une structure temporaire facilitant la régénération tissulaire. (Révisé dans ¹⁸²)

Les biopolymères sont utilisés depuis longtemps dans l'ingénierie tissulaire de la peau, des os, du cartilage et sont maintenant utilisés dans la régénération des nerfs et des vaisseaux sanguins. Certains biopolymères ou certaines molécules ont des utilisations spécifiques correspondant à leur faculté à promouvoir la différenciation d'un type cellulaire particulier ou encore par leurs propriétés physicochimiques. Par exemple, l'acide hyaluronique, un composé minéral des os, favorise la différenciation des cellules

mésenchymales en ostéoblastes et est utilisé principalement dans la régénération osseuse.¹⁸⁸ Les protéines de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine, sont utilisées généralement dans la régénération de la peau¹⁸⁹ et les composés biodégradables, comme les acides gras, sont utilisés comme véhicule dans les systèmes d'injection d'agents thérapeutiques. (Révisé dans¹⁹⁰)

La biocompatibilité des biopolymères avec les cellules dépend de l'équilibre entre différents facteurs comme le poids moléculaire, la structure (linéaire ou en branche), la flexibilité de la conformation structurelle ainsi que la densité des charges.¹⁹¹ Il est également possible d'utiliser les biopolymères purs ou combinés avec d'autres molécules ou biopolymères afin d'augmenter leur biocompatibilité. Ces différentes molécules peuvent être intégrées au biopolymère par mélange physique ou par modification chimique.¹⁹²

1.5.1 Les biopolymères et le domaine cardiovasculaire

Dans le domaine cardiovasculaire, les biopolymères sont utilisés dans la reconstruction de vaisseaux sanguins et dans les systèmes de livraison d'agents thérapeutiques afin de réduire la formation de la néointima suite à une angioplastie ou permettant l'angiogenèse dans les modèles d'ischémie du myocarde.¹⁹³⁻¹⁹⁵ Les matériaux utilisés doivent empêcher la formation de thrombus et l'activation de la réaction inflammatoire. Pour ce faire, les biopolymères subissent des modifications physicochimiques et de bio-fonctionnalisation afin d'obtenir une surface favorisant les interactions protéine-cellule. Présentement, il y a deux principales stratégies pour moduler les interactions cellule-matrice. La première tend à créer une surface inerte pour l'adsorption des protéines et l'adhésion cellulaire tout en prévenant l'activation du système immunitaire, la coagulation, la formation de thrombus ainsi que la déposition de matrice extracellulaire. Ce genre de matériel est utilisé dans le remplacement des valves cardiaques

ou dans l'injection de vésicules contenant des agents thérapeutiques.¹⁸² La deuxième stratégie vise la création de matériaux qui contribuent à l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation, la viabilité à long terme et la fonctionnalité contrôlée des cellules. Cette stratégie est utilisée généralement dans la reconstruction osseuse et la greffe de peau, mais également dans la réendothélialisation et la reconstruction de vaisseaux sanguins.^{182, 196}

1.5.2 Le chitosan

1.5.2.1 Les caractéristiques du chitosan

Le chitosan (CH) est un biopolymère de plus en plus utilisé dans l'ingénierie tissulaire puisqu'il présente d'intéressantes caractéristiques. Tout d'abord, le CH est obtenu par la déacétylation alcaline de la chitine qui est considérée comme le composé organique le plus important après la cellulose. La chitine est le composant majeur de l'exosquelette des insectes et de la carapace des crustacés comme les crabes. Elle entre également dans la composition des champignons, des algues et des levures. Ce biopolymère est formé d'une longue chaîne de disaccharide de N-acétyl-glucosamine et de glucosamine liée en β (1 \rightarrow 4). Le CH est considéré comme étant biodégradable puisqu'il est facilement hydrolysable et métabolisé par une variété d'enzymes tels la chitosanase et les lysosymes.¹⁹⁷

Le CH est défini par son degré de déacétylation. Ce dernier représente la proportion d'unité de glucosamine par rapport au nombre total d'unités qui composent le biopolymère. Lorsque cette valeur est au-dessus de 50%, le biopolymère obtenu est nommé CH et en dessous de 50% le biopolymère est toujours considéré comme étant de la chitine. Le degré de déacétylation du CH est responsable de sa solubilité dans les acides organiques ($2 < \text{pH} < 6$). La solubilité du CH nécessite un passage en solution acide ($\text{pH} < 6$) en raison de la

protonation des groupes amines. Le polymère de CH peut par la suite être neutralisé afin de permettre une meilleure biocompatibilité avec les tissus. Il est possible d'augmenter la solubilité du biopolymère de CH dans les solutions aqueuses par des modifications chimiques.¹⁹⁸

Un haut degré de désacétylation confère à la structure une plus grande proportion de groupes chargés positifs à pH neutre ainsi qu'une surface étendue attribuable à la répulsion des charges. Ces caractéristiques permettent aux cellules d'adhérer plus facilement au biopolymère puisque les cellules s'attachent de façon non spécifique par des interactions électrostatiques se produisant directement entre les groupes amines (NH^{3+}) et certains groupes de la membrane cellulaire chargés négativement.¹⁹⁹ D'ailleurs, des études ont démontré que l'adhésion cellulaire est corrélée avec le degré de désacétylation du CH.²⁰⁰ De plus, puisque le CH ne possède pas de sites spécifiques aux intégrines pour lier les cellules, il est possible de retrouver le CH modifié par certaines protéines afin de favoriser l'adhésion cellulaire. La structure poreuse des biopolymères de CH favorise la migration des cellules à travers les canaux et présente une organisation idéale pour la thérapie vasculaire dirigée. (Révisé dans²⁰¹)

1.5.2.2 Utilisation du chitosan

Les biopolymères de CH sont utilisés dans des domaines très variés comme le traitement des eaux usées, l'agriculture, les cosmétiques, la transformation alimentaire et la réparation tissulaire.^{202, 203} Le CH est un biopolymère bioactif possédant des propriétés très diversifiées. En effet, il peut agir comme agent anti-thrombogénique²⁰⁴, antibiotique²⁰⁵ et anti-tumorale.²⁰⁶ Il est employé dans une variété de systèmes implantables ou injectables afin d'effectuer la livraison d'agents thérapeutiques inhibant la resténose ou induisant l'angiogénèse.¹⁹³⁻¹⁹⁵ De plus, il favorise la guérison de blessures de divers tissus comme la peau, le cartilage et les os.²⁰⁷⁻²⁰⁹ Le CH est capable de stimuler les fonctions cellulaires et d'induire la relâche de cytokines permettant la réorganisation des tissus conjonctifs sans

provoquer de réaction inflammatoire ou allergique. Les biopolymères à base de CH sont retrouvés sous diverses formes telles qu'hydrogels, films, fibres, microsphères ou comprimés selon leur usage.

L'utilisation de CH dans la réparation vasculaire est de plus en plus fréquente puisque ce polymère représente une plateforme intéressante pour les endoprothèses biodégradables. En effet, les endoprothèses à base de CH sont des structures rigides offrant une alternative aux endoprothèses courantes. Elles ont démontré, lors de leur utilisation dans les modèles animaux, une grande stabilité ainsi qu'une conservation adéquate de leur propriété élastique lors de leur déploiement dans un vaisseau.²¹⁰ Suite à leur implantation, la réponse vasculaire est comparable à celle observée avec les endoprothèses métalliques nues dans les modèles porcins.²¹¹

1.5.2.3 La phosphorylcholine, une composante des biopolymères

La combinaison du CH avec divers composés peut entraîner une augmentation de sa biocompatibilité en raison d'effets synergiques des différents composants. En effet, l'incorporation de lipides à la structure du CH permet de reproduire les propriétés de la membrane cellulaire. La phosphorylcholine (PC), est un lipide neutre de la double couche lipidique formant la membrane cellulaire permettant l'augmentation de la biocompatibilité des polymères avec lesquels elle est complexée. Au niveau cardiovasculaire, la PC est utilisée dans la fabrication d'endoprothèse vasculaire dont l'efficacité a déjà été démontrée dans un modèle porcine.²¹² La PC associée à des biopolymères comme le CH augmente leur solubilité dans les solutions aqueuses en conditions physiologiques.¹⁹⁸ L'ajout de PC améliore la biocompatibilité des biopolymères et peut faciliter leur rétention au site de livraison. La nature chimique de la PC confère un certain équilibre des charges présentes sur le polymère. Les charges positives, d'un polymère de CH par exemple, peuvent alors interagir avec les charges négatives de la membrane cellulaire ou des protéoglycans de la matrice extracellulaire. Ces interactions rendent possible la rétention de cellules telles les

CEP sur le biopolymère de CH et pourraient éventuellement favoriser les processus de la réendothélialisation vasculaire.

1.6 But du travail

De récentes études sur la guérison vasculaire ont démontré l'importance de la réendothélialisation dans le contrôle de la resténose. Les endoprothèses vasculaires sont désormais conçues afin de limiter la formation de la néointima et l'inhibition de la prolifération des CE entourant la lésion. Au cours des dernières années, notre laboratoire a étudié l'implication de l'estrogène dans la diminution de la resténose et dans la guérison vasculaire dans un modèle porcin. Ainsi, nous avons démontré que l'E2 permet l'accélération du processus de réendothélialisation tout en inhibant la progression de la resténose dans une artère lorsque la livraison se fait localement. L'estrogène se présente comme étant un agent thérapeutique idéal puisqu'il permet l'inhibition de la prolifération ainsi que de la migration des CML tout en favorisant la survie et la prolifération des CE de la paroi vasculaire. Cependant, pour effectuer une livraison locale sur un vaisseau *in vivo*, un véhicule s'avère nécessaire afin de maintenir la concentration d'E2 optimale tout au long du processus de guérison vasculaire.

Lorsque nous avons débuté cette étude, les polymères à base de CH semblaient une avenue intéressante puisque ces polymères présentent des caractéristiques idéales pour favoriser la guérison vasculaire. Mon projet avait pour objectif, dans un premier temps, de déterminer la biocompatibilité d'un polymère de CH complexé à la phosphorylcholine (CH-PC) avec les cellules dérivées de la MO en comparaison avec la fibronectine, une matrice couramment utilisée pour favoriser la croissance *in vitro* des CEP. Dans un deuxième temps, il nous fallait évaluer l'impact de l'E2 sur la biocompatibilité des cellules dérivées de la MO en culture sur un polymère de CH-PC. Afin de déterminer l'impact de l'E2 sur la biocompatibilité du polymère, nous avons comparé l'impact de l'E2 soluble et de l'E2 intégré au polymère de CH-PC (CH-PC-E2).

Le but de ces travaux de maîtrise était de déterminer si un polymère à base de CH est un biopolymère adéquat pour supporter la croissance cellulaire dans le cadre d'une

livraison cellulaire dans un vaisseau sanguin afin d'en favoriser la guérison. Les CEP en culture dans notre modèle de culture cellulaire de MO complète représentent une source intéressante de cellules progénitrices ayant le potentiel d'être mobilisées au site de lésion vasculaire. Cette étude se veut un premier pas dans le développement de polymère permettant le dépôt des CEP directement au site de lésion à l'aide d'un véhicule assurant le maintien des cellules progénitrices au site de réparation sans l'utilisation d'une endoprothèse permanente.

2.0 Articles scientifiques

2.1 ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Kim Tardif, Maîtrise en Sciences Biomédicales option générale (2-484-1-0)

2. Description de l'article

Ordre des auteurs : Kim Tardif, Isabelle Cloutier, Zhimei Miao, Françoise M. Winnik, Caroline Lemieux et Jean-François Tanguay

Titre de l'article: Phosphorylcholine-Modified Chitosan Matrix: an attractive platform for progenitor cells in vitro amplification.

État actuel de l'article: Soumis dans la revue Stem cell.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Kim Tardif inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Le 17B-Estradiol combiné à un biopolymère à base de chitosan accroît la biocompatibilité des cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse.

2.1.1 Lettre de l'éditeur

Dear Mrs. Tardif:

This confirms receipt of your manuscript, "PHOSPHORYLCHOLINE-MODIFIED CHITOSAN MATRIX: AN ATTRACTIVE PLATFORM FOR PROGENITOR CELLS IN VITRO AMPLIFICATION.."

The Stem Cells Editorial Office will begin processing your submission as soon as possible. However, submissions that do not include the completed required forms and permissions, or those that deviate from file requirements of no more than seven figures or tables, will be delayed until all the requirements are met. If you have not done so, please review our submission information here: <http://www.stemcells.com/SpringboardWebApp/userfiles/stemc/file/StemCellsAuthorInstfinal.pdf>.

If you find that you have not met all of our requirements, you are welcome to email Christen Brady in our office to outline your plan for completing or amending your submission. Please be sure to refer to your assigned manuscript number: SC-09-0692.

Thank you for your submission. We wish you continued progress in your important research.

Sincerely,

Miodrag Stojkovic, Ph.D.
Editor
Stem Cells

2.1.2 Phosphorylcholine-Modified Chitosan Matrix: an Attractive Platform for Progenitor Cells *In vitro* Amplification.

Kim Tardif,^{1,2} Isabelle Cloutier,² Zhimei Miao,³ Françoise M. Winnik,³ Caroline Lemieux^{1,2} and Jean-François Tanguay^{1,2,4}

¹Département des Sciences Biomédicales; ² Centre de Recherche, Institut de cardiologie de Montréal, Montréal, Québec, Canada, ³ Faculté de Pharmacie and Département de chimie and ⁴ Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Kim Tardif : conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing.

Isabelle Cloutier: conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing.

Zhimei Miao : provision of study material.

Françoise M. Winnik : provision of study material.

Caroline Lemieux : manuscript writing

Jean-François Tanguay : conception and design, final approval of manuscript

Corresponding author: Dr Jean-François Tanguay, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330 ext. 3250; Fax: (514) 593-2596; E-mail:

This project was supported financially by grants from the Canadian Institutes of Health Research, one (CIHR; # RMF-79023) for a team grant application for regenerative medicine and nanomedicine and one operating grant (CIHR #159684) to Dr Tanguay.

None of the authors has competing financial interest to declare.

Key words: Chitosan-phosphorylcholine, bone marrow derived progenitor cells, biocompatibility, reendothelialization

2.1.2.1 Abstract

Purpose and objectives: The reendothelialization process by mobilization of endothelial progenitors cells (EPC) is limited in patients with cardiovascular risk factors or disease. Therefore, methodologies to favour their recruitment are needed. Chitosan (CH), a biopolymer can be combined to phosphorylcholine (PC) to increase its solubility or processability within physiological environment. This study was performed to evaluate the capacity of CH-PC polymer to influence the survival and the amplification of EPCs.

Methods and results: A murine whole bone marrow culture system was used to evaluate the survival, migration and amplification of bone marrow-derived cells (BMDC) on CH-PC compared to fibronectin matrix. Cell growth and organization with typical colonies were obtained on both matrixes but only CH-PC led to spontaneous formation of tube-like structures. CH-PC increased the proportion of hematopoietic cells (CD117⁺) (24.7±10.9% vs fibronectin 10.9±6.2%) and EPCs (3.14±0.7% vs fibronectin 0.25±0.1%) while mesenchymal fraction (CD44⁺) was decreased (78.7±4.2% vs fibronectin 92.7±0.96%). CH-PC sustained the survival of various cell lineages including osteoblasts, smooth muscle and endothelial cells. Finally, cell response to chemotactic signals induced *in vitro* by G-CSF and FBS was still effective through the CH-PC.

Conclusion: CH-based polymer provides biocompatible matrix to promote survival and amplification of progenitor cells including EPC.

2.1.2.2 Introduction

Recovery of the endothelium integrity is a major factor in reducing risks of future cardiovascular events following an initial vascular injury. It is postulated that the mobilization and incorporation of bone marrow derived cells (BMDC) including endothelial progenitors cells (EPC), play an important role in improving reendothelialization of injured vessels, reducing neointima formation and favouring recovery after myocardial infarction.^{1,2} As the number and mobilization of EPC decrease with age and in patients with diabetes or cardiovascular diseases such as atherosclerosis and hypertension,³⁻⁵ The effectiveness of vascular repair is strongly influenced by aging and cardiovascular risk factors.⁵

Tissue engineering based on the use of biocompatible polymers provides a powerful means to assist and accelerate the natural healing process. Chitosan, a derivative of chitin, a component from shellfish exoskeleton, is a non-toxic, biocompatible and biodegradable polymer that has been used for its biological activities in the engineering of various tissue. The properties of chitosans depend on structural factors, such as molecular weight and degree of deacetylation (DDA).^{6,7} Chitosan matrixes present a bioadhesive surface due to its cationic nature which allows pH-dependant electrostatic interactions with cells at physiological pH.⁸ As tissue engineering is focused on polymers that mimic the extracellular matrix, the major inconvenient of chitosan is its lack of solubility in aqueous media at neutral pH.⁹ To be used, the polymer needs to be dissolved at low pH, which limits the range of possible applications. The development of a biopolymer soluble in physiological condition is essential to permit its use in liquid formulations or to avoid risks linked to incomplete neutralization of the desiccated polymer before *in vivo* implantation. Chitosan can be chemically modified through conjugation and/or combination with other biomaterials to improve its solubility at physiological pH or drug delivery properties.^{10,11} Thus, chitosan conjugated to phosphorylcholine (PC), a lipid head group naturally found on

the cell membrane, is soluble in physiological condition¹² As *in vitro* amplification of progenitor cells is seen as the initial step in an attractive approach to compensate decreasing number of circulating EPC in aging or cardiovascular patients, identification of an EPC-prone polymer would represent a significant leap for pro-healing/or regenerative cell-based vascular therapy.

In this study, we hypothesized that CH-PC with its structure and its biocompatibility would promote survival, migration and amplification of mouse BMDC and more specifically of EPC *in vitro*. To address this hypothesis, we used a whole bone marrow culture system, developed by our laboratory, which allows the cohabitation of both hematopoietic stem cells and mesenchymal cells, thus preserving the bone marrow environment.¹³ We used this system to evaluate the cell behaviour on CH-PC compared with fibronectin, the most commonly used matrix for progenitor cell cultures.

BMDC can be subdivided in two major populations: hematopoietic and mesenchymal cells. We chose c-kit as a marker for hematopoietic stem cells because in the adult bone marrow, c-kit is expressed on hematopoietic stem cells (HSC), EPC and their believed common precursor, the hemangioblast.¹⁴⁻¹⁶ Additionally, c-kit⁺ (CD117) cells derived from bone marrow can be endogenously recruited into the myocardium after infarction and have been shown to be critical for HSC mobilisation into the peripheral circulation.^{17,18} In our experiments, EPC were further defined by the additional expression of three other markers CD34, CD31 and VEGFR2.¹⁹ The mesenchymal fraction consisted of cells expressing CD44, encompassing stromal cells such as adipocytes and fibroblasts as well as mesenchymal stem cells, able to generate various cell types including chondrocytes, osteoblasts and adipocytes.²⁰ CD44 is a cell-surface receptor known to be expressed by all mesenchymal cells and to be essential for cell structural organization by binding to extracellular matrix components such as hyaluronan and fibronectin.²⁰ Furthermore, in a previous study, it was shown that co-transplantation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells (MSCs) and HSCs subcutaneously in immunodeficient mice, was more effective than MSCs alone to generate neovascularisation.²¹ Therefore, it was

important to more completely test our hypothesis to maintain a whole bone marrow preparation to recreate the bone marrow environment by maintaining mesenchymal and hematopoietic populations *in vitro*.

2.1.2.3 Materials and Methods

Preparation of CH-PC solution and film. CH powder, was obtained from Medipol (Lausanne, Switzerland). This polymer was deacetylated to reach a polymer of 96% degree of deacetylation (DDA), which was converted to CH-PC following a slightly modified procedure reported previously¹². A solution of phosphorylcholine glyceraldehyde (PC-CHO, 0.4 g, 1.64 mmol) in methanol (10 mL) was added drop wise to a solution of deacetylated chitosan (1 g, 6.2 mmol of monosaccharide residue) in aqueous acetic acid (50 mL, 1 wt %), kept at 0 °C. At the end of the addition, the solution was stirred for 30 min at 0 °C. The pH of the reaction mixture was then adjusted to 6.5. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature, and then cooled to 0 °C; a solution of sodium cyanoborohydride (0.8 g, 12.7 mmol, excess) in water (15 mL) was added drop wise under stirring. Thereafter, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 20 h. The reaction mixture was dialyzed (membrane of MWCO 12000-14000) first against water for 2 days, then against aqueous NaOH (0.05 M) for 1 day, and finally against water for 2 days. The CH-PC polymer was isolated by lyophilization. The PC content was determined from ¹H NMR data obtained in D₂O/35 wt% DCl (100/1, v/v) at 70 °C.

The CH-PC powder was dissolved in phosphate buffer (10 mM) pH 7.4 at a final concentration of 0.5%. In the biological fume hood, the solution was filtered using a vacuum system and used to coat 6-well culture plates (15 µL/10 mm²) and dried for 24 hours to obtain a uniform CH-PC film.

Cell culture. Six weeks old C57BL/6 female mice (Jackson Laboratoires, Bar Harbor, MA) were used as bone marrow donors. The animals were deeply anesthetized using Ketamine hydrochloride (Bioniche, Belleville, On) and Xylazine (Rompum, Bayer's Inc, Toronto, On) and euthanised by cardiac puncture. Bone marrow cells were collected from the dissected femurs and tibias by flushing with phosphate buffer saline (PBS, Invitrogen

corp., Carlsbad, CA) contained 2% fetal bovine serum (FBS, Hyclone Laboratories, Logan, UT). BMDC were plated in precoated CH-PC or fibronectin culture plates (Corning, Corning, NY). Cells were maintained in Hematopoietic Growth Medium (HPGM Lonza, Walkersville, MD) with 2 % FBS and antibiotics (penicillin-streptomycin, Invitrogen corp.), platelet derived growth factor (PDGF, 10ng/ml, Peprotech.Inc, Rocky Hill, NJ) and endothelial growth factor (EGF, 10ng/ml, Peprotech.Inc.) during the first 7 days. Afterward, cells were maintained in HPGM 2% FBS without additional growth factors for another 7 days. Cell survival, growth and organization were daily monitored over the 2 weeks period. Pictures of cell cultures at different time points were taken with an inverse light microscope (CKX41 of Olympus) equipped with a camera (QIMAGING, QICAM, Olympus) to obtain a computer-digitized image.

Cell migration assay. Cell migratory assays were performed using a transwell system according to the manufacturer's instructions (Millipore, Billerica, MA). Briefly, BDMC were plated for one week on fibronectin. After 7 days, cells were starved for 24 hours and removed from culture plates. BMDC were washed twice and resuspended in HPGM (lonza) containing 0,2% FBS and antibiotics. Transwell system with polycarbonate membrane chambers (8µm pore size) in 24-well plates was used. The membrane was coated or not with fibronectin or 0.5% solution of CH-PC and dried for 24 hours before the assay. The lower chamber was filled with HPGM alone or with FBS (10%, Hyclone Laboratories) or granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF; 100ng/ml, Peprotech Inc.). As a chemoattractant specificity control, G-CSF was added in the upper and lower chamber of selected wells. Resuspended BMDC ($2, 5 \times 10^5$) was added in the top chamber. After a 5-hours incubation at 37°C, 5% CO₂, the non-migrated cells were scraped out from the upper side of the membrane, washed twice in PBS and fixed with methanol before staining with eosin and hematoxylin (Sigma). Each condition was assessed in duplicate and all experiments were performed at least three times. Migrated cells were counted using a light microscope (BX45 of Olympus) equipped with a video camera (QIMAGING, QICAM,

Olympus) to obtain a computer-digitized image. The count of migrated cells was obtained from the mean number of five representative fields on each membrane.

Confocal microscopy. BDMC were grown for 7 or 14 days on Lab-Tek chamber slides (Nunc, Rochester, NY) coated with fibronectin or CH-PC. Cells were washed and fixed with 2% paraformaldehyde. The nonspecific binding sites were blocked with normal goat or donkey serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.). Cells were stained with the following primary antibodies: polyclonal goat-anti-mouse CD31 (SantaCruz Biotechnology Inc.), polyclonal rabbit-anti-mouse Von Willebrand factor (vWF, Abcam Cambridge, MA); polyclonal goat-anti-rat CD14 (Santacruz Biotechnology Inc.) or rabbit-anti-human actin smooth muscle (α -SMA; Labvision Corporation, Fremont, CA). To analyze the staining, secondary antibodies goat-anti-rabbit Alexa Fluor 488-conjugated (Invitrogen, Carlsbad, CA), goat-anti-rat IgG Alexa Fluor 555-conjugated (Invitrogen), donkey-anti-goat IgG Alexa Fluor 488-conjugated (Invitrogen) were used. Cell nuclei were visualized with Topro-3 iodine (Invitrogen). Cells were analyzed with a confocal microscope (LSM 510 of Zeiss) using the Zeiss LSM Image Browser system.

Alkaline phosphatase assay. The alkaline phosphatase activity was analyzed using an alkaline phosphatase kit based on naphthol AS-MX phosphate and fast violet B salt according to the manufacturer's instructions (sigma). Briefly, BMDM were seeded and grown on glass slides precoated with fibronectin or CH-PC and were stained at days 7 or 14 as follows; samples were fixed by an immersion in paraformaldehyde and the alkaline dye mixture was added and incubated at room temperature. The slides were washed and Mayer's hematoxylin solution was used as counterstaining. Pictures of cell cultures were taken with a light microscope (BX45 of Olympus) equipped with a camera (QIMAGING, QICAM, Olympus) to obtain a computer-digitized image.

Flow cytometry. BMDC were removed from culture plates and non specific binding sites were blocked with normal rat serum (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.). To characterize cell populations, cells were incubated consecutively with the following antibodies: for the hematopoietic markers monoclonal rat-anti-mouse CD117 allophycocyanin-conjugated (APC, Caltag Laboratories, Carlsbad, CA), monoclonal rat-anti-mouse CD31 fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC, BD pharmingen, San Jose, CA), monoclonal rat-anti-mouse CD34 biotin-conjugated (Bio, BD pharmingen), monoclonal rat-anti-mouse vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2) phycoerythrin-conjugated (PE, BD pharmingen), for the mesenchymal marker monoclonal rat-anti-mouse CD44 (hyaluronic acid receptor) FITC-conjugated (BD pharmingen). For the control isotypes: monoclonal rat-anti-mouse IgG2a APC-conjugated (Abcam Inc.), monoclonal rat-anti-mouse IgG2a FITC-conjugated (Abcam Inc.), monoclonal rat-anti-mouse IgG2a PE-conjugated, (BD pharmingen), monoclonal rat-anti-mouse IgG2a Bio-conjugated, (Abcam Inc.). To analyze the Bio-conjugated antibody, the secondary antibody streptavidine-ECD (Beckman coulter, Fullerton, CA) was used. Cells were analyzed with an Altra cytometer from Beckman using the Expo32 system.

Statistic analyses Data were expressed as mean \pm SEM of at least three independent experiments. Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) for multiple testing followed by a paired *t* test for flow cytometry analysis and with a Bonferroni correction for multiple comparisons for cell migratory assays. Probability values were considered significant at $P < 0.05$.

2.1.2.4 Results

Biocompatibility of CH-PC matrix

The CH-PC polymer was developed to favour the adhesion, survival and organization of progenitor cells derived from bone marrow. Cell adhesion and growth were evaluated in parallel on fibronectin and on CH-PC films during a 2-weeks period. Spreading adherent cells appeared first on fibronectin following cell seeding (data not shown). Morphological changes indicating progression in the adhesion process occurred faster on fibronectin with adhesion seen after 18 hours while on CH-PC, up to 24 hours were required (data not shown). The kinetic of cell growth on both matrixes was comparable, such that the number of colonies after 7 days in culture was similar for both matrixes (Figure 1A and B). Colonies formed over the entire matrix and were typically constituted of centrally located round cells and underlying sprouts of spindle-shape cells on the periphery. The number of colonies was not significantly different between cultures (data not shown). Cobblestone-shaped cells covered inter-colony spaces in fibronectin-supported cultures (Figure 1C white arrow), but not on CH-PC (Figure 1D). The adherent cells were of stromal phenotype, the major fraction of BMDC.

Specific organization of BMDC on CH-PC matrix

Although CH-PC and fibronectin matrixes support the adhesion and survival of BMDC, a specific impact of CH-PC polymer was suggested by the cell organization between the colonies. The development of spontaneous capillary-like structures was detected on CH-PC as early as day 7 (Figure 2B) but not on fibronectin (Figure 2A). These structures appeared at the same time as colony formations and were located at their periphery. Longer incubation time up to 14 days did not affect the differential phenotype

between fibronectine (Figure 2C) and CH-PC (Figure 2D) cultures which in the later case, still contained cells organized in capillary-like networks. This type of cell organization, usually associated with neovasculature, was investigated for the expression of the endothelial cell marker CD31. No CD31 positive cells were detected in the capillary-like networks. (Figure 2E). As pericytes were also reported to form this type of structures, the expression of α -SMA was evaluated in CH-PC cultures. Positive staining with polar distribution was detected in all cells part of networks (Figure 2E).

Migratory capacity of BMDC through CH-PC

Colony formation and organisation of capillary-like structures on CH-PC suggested that migratory potential is maintained on this matrix, at least in two-dimensions. For future applications in cell-based vascular therapy, it is necessary to determine if these cells can maintain their ability to sense and migrate toward chemoattractant signals through the CH-PC film. To assess BMDC functional activity with respect to their migratory capacity, a transwell system with matrix-coated membranes was used. After a 5-hours incubation period, the most effective migratory response was obtained with G-CSF. While the uncoated control wells presented a significant number of migrated cells (221.7 ± 6.9) which was reduced by 24% in fibronectin-coated wells (168.2 ± 9.2) and by 60% in CH-PC-coated wells (87.6 ± 6.7), the response to G-CSF was maintained in proportion to the control conditions (Figure 3A). When 10% FBS was used as the chemoattractant, the reduction in the number of migrated cells was of 29% with fibronectin (113.6 ± 4.6) and of 70% with CH-PC (48.4 ± 4.0) when compared with uncoated membrane (160.9 ± 7.8) (Figure 3B). These results suggest that even if the two matrixes reduced the number of migrated BMDC, the cells migratory responses to G-CSF and FBS stimulation were maintained.

CH-PC supports the heterogeneity of mixed BMDC cultures

As a primary approach to identify cell phenotype and distribution obtained from BMDC grown on CH-PC or fibronectin coated glass slides, cells were analysed by confocal microscopy after 7 and 14 days in culture for markers of hematopoietic and mesenchymal lineages. This included qualitative expression of endothelial cell markers CD31 (PECAM) and vWF, the myeloid marker CD14, the contractile cells marker alpha smooth muscle actin (α -SMA) and finally an osteogenic marker, the alkaline phosphatase activity (ALP).

Using this approach, CD31⁺ cells were detected in cultures on both matrixes for the two time points. Comparable numbers of CD31⁺ cells were detected mainly grouped together in the central region of small colonies (Figure 4A to D). The location of CD31⁺ cells in colonies changed at day 14. Colony morphology change over time, from a typical colony to a round structure with an empty centre, was observed only on fibronectin (Figure 4B). In contrast, at day 7, vWF⁺ cells were mostly isolated and located in the periphery of colonies for both matrixes (Figure 4E and G). The number of vWF⁺ cells and the intensity of the emission in the cell cultures decreased with time and only a few positive cells were detected at day 14 (Figure 4F and H) on either matrix, suggesting that cells of an endothelial phenotype were able to grow on both matrixes.

As EPC were suggested to be derived from a myeloid origin²², we evaluated if a CH-PC matrix could increase the survival or differentiation of CD14⁺ cells in mixed BMDC cultures. No CD14⁺ cell was detected on either matrix by day 7 (data not shown). The same result was obtained at day 14 on CH-PC while a few CD14⁺ cells were detected on fibronectin (Figure 4I and J). Identical results were obtained from cultures established from different mice.

The α -SMA protein is associated with a characteristic contractile cell phenotype, at least when expressed as long extensive stress fibers across the cell such as can be found in smooth muscle cells. At days 7 and 14, α -SMA⁺ cells (Figure 4K to N) were detected on CH-PC and on fibronectin, but with contrasting expression patterns. At day 7, the α -SMA⁺

signal originated from the cell extremities on fibronectine cultures (Figure 4K) whereas, on a CH-PC culture fewer positive cells were observed and the α -SMA⁺ signal was located on the cell membrane (Figure 4M). On day 14, the few cells which remained positive for α -SMA on fibronectin had a more typical SMC phenotype with elongated actin filaments. (Figure 4L). However, no typical SMC were detected on CH-PC, as α -SMA⁺ cells had only very scarce fibers or perinucleus staining (Figure 4N).

Fibronectin is an extracellular matrix protein known to promote the proliferation of mesenchymal progenitors and to restrain their spontaneous differentiation toward the osteoblast lineage.²³ Therefore, we compared osteogenic differentiation by determination of the ALP activity among BMDC maintained 7 or 14 days on fibronectin or CH-PC. At day 7, a comparable number of small, round and isolated cells positive for ALP activity was detected on both matrixes (Figure 4O and P). At day 14, cells positive for ALP activity took a flat spread-out shape on both matrixes but were more abundant on CH-PC (Figure 4Q and R). Therefore, osteoblasts survived on both matrixes, but their proliferation or enhanced differentiation over a two-week period was observed only on CH-PC.

Amplification of HSC and EPC on CH-PC

Our primary interest in CH-PC was to develop a matrix that could maintain the survival and proliferation of BMDC including hematopoietic progenitor cells and supporting mesenchymal cells. For vascular therapy applications, however, it is essential that the EPC population can be maintained, and possibly expanded, on this matrix. Therefore, to obtain a quantitative assessment of each cell population, cells from CH-PC or fibronectin-coated cultures were analysed by flow cytometry. The percentages of specific cell surface markers for mesenchymal, hematopoietic and EPC were compared after 7 and 14 days in culture. At day 7, a significant increase in the percentage CD117⁺ cells was detected on CH-PC, representing 20.7 ± 1.9 % of the gated cell population compared to only 9.99 ± 1.40 % on fibronectin (Figure 5A). This finding represents a 2 fold

amplification of the CD117⁺ cell fraction on CH-PC, an amplification which is also reflected among the progenitor population CD117⁺CD34⁺ cells composed 6.6±0.7 % of BMDC on CH-PC compared to only 2.3±0.5 % on fibronectin (figure 5B). For the EPC population, the CD117⁺CD34⁺CD31⁺VEGFR2⁺ cells composed 1.23 ± 0.10 % of the BMDC on fibronectin compared to 2.88 ± 0.30 % on CH-PC (Figure 5C). The proportion of mesenchymal CD44⁺ was also significantly different between the two matrixes with a 23% increase on CH-PC (55.0 ± 3.3 %) compared to fibronectin (31.0 ± 0.7 %) matrix (Figure 6A). At day 14, the positive effect of CH-PC on the amplification of the hematopoietic CD117⁺ cell population (24.7 ± 10.9 %) was still present when compared to fibronectin (10.9 ± 6.2 %) (Figure 5D). The proportion of CD117⁺CD34⁺ and EPC on CH-PC were maintained over time and was 5 times and 12 times higher than the percentage found on fibronectin (3.14 ± 0.7 % vs. 0.25 ± 0.1 % and 8.4±2.5 % vs. 1.6±0.9, respectively) (figure 5E and F). In the case of the CD44⁺ cell population, its proliferation was well supported on CH-PC (78.7 ± 4.2 %), but was even more markedly amplified after 14 days on fibronectin (92.7 ± 0.96 %) (Figure 6B) when compared to day 7. These results strongly suggest that CH-PC not only supports the growth of various bone marrow cell populations *in vitro*, but also, and more importantly, improves EPC amplification and survival, compared to fibronectin.

2.1.2.5 Discussion

Cell-based cardiovascular therapy has progressed considerably in the last few years, with first carried out clinical trials in myocardial infarction/ischemia and heart failure patients. (Review in ²⁴) Cells sources used for these therapies have also greatly diversified, including now embryonic and adult-derived stem, progenitor and mature cells. The capacity to amplify selective cell populations and, eventually, to improve their healing potential through drug treatment or gene transfer *in vitro* remains a preoccupation. Stem and progenitor cells differentiation potential and proliferation rate are under the control of various growth factors and are also influenced by cell-cell interaction with supporting stromal cells and matrix. In an ideal therapeutic approach, the artificial support used to amplify, recruit or deliver the selected cells should be reorganized and resorbed by growing cells and gradually replaced by the newly formed extracellular matrix and differentiated cells. (Review in ²⁵). In the case of vascular healing, this process would result in the recovery of a fully functional endothelium. Natural biodegradable polymers, such as chitosan, have emerged as novel therapeutic matrixes that could favour rapid vascular healing. ²⁶ Chitosan-based polymers provide an ideal platform for cell-cell and cell-matrix communications as they can be designed to promote cell attachment, viability, proliferation and organization. ²⁷

The CH-PC used in our experimental preparations present several enabling characteristics, such as biocompatibility, biodegradability or capability to form three-dimension structures. In this study, we demonstrated for the first time, that CH-PC also supports the survival and amplification of EPC among BMDC in a mixed culture system where hematopoietic (CD117⁺) and mesenchymal (CD44⁺) cells co-exist. Cell adhesion, spreading and proliferation are sequential reactions following cell seeding and are crucial steps to estimate the optimal survival on novel materials. ²⁸ The first step, adhesion, is

triggered by specific recognition of integrin receptors with the adhesive peptide domains. This takes place on fibronectin, but CH-PC does not provide such specific biological cues for the cells.^{29, 30} Nonetheless, after a delay of a few hours cell adhesion is recovered and CH-PC films offer an adequate binding surface for BMDC. Indeed, such a polymer can promote cell adhesion by electrostatic interactions between positive charges on the polymer and negative charges on cell surface

One of the major interests to use given types of polymer for stem cell growth or delivery is that physio-chemical properties of the supporting matrix impact on the three-dimensional microenvironment thought to influence/control genes and properties that define « stemness » of the stem cells, i.e. self-renewal or development to committed cells.³¹ As colony-forming units in progenitor cell cultures are an indirect measure of stem cell number, their presence and growth over the 2-weeks period suggest that CH-PC supports the survival and amplification of progenitors of the BMDC as well as fibronectin. Moreover it indicates that in addition to mature cells, a significant proportion of BMDC remain at their progenitor stage.

In addition to colony-forming units, on CH-PC matrix only, spontaneous capillary-like structures formed without addition of growth factors, suggesting that such cell organization is principally triggered by the polymer structure.³² It is known that mature endothelial cells go through morphological changes when exposed to sugar-modified chitosan, going from round to flat cobblestone-like shape. They can either proliferate or aggregate to form colony networks or, without the addition of growth factors, create circular structures resembling capillary sections.³³ Progenitor cells secrete angiogenic cytokines such as VEGF or G-CSF and exert paracrine effects on other types of cells, which might improve angiogenesis by favouring the proliferation of endothelial and other progenitor cells.^{34, 35} The presence of angiogenic factors and the three-dimension arrangement of the polymer can modulate cell organisation. As such, it may lead to morphological changes of mesenchymal cells which adopt a fibroblasts-like phenotype.³⁶ The presence on CH-PC of capillary networks of CD31⁺ elongated cells could suggest that

these structures may be of mesenchymal origin. Pericytes are mesenchymal-like cells associated with the wall of small blood vessels which contain a variety of proteins typical of contractile cells, such as α -SMA detected in the cultures examined here.³⁷⁻³⁹ Pericytes are involved in the earliest stages of neovascularization and contribute to endothelial cells recruitment in newly formed capillary sprouts.^{40, 41} Moreover, several observations indicate that angiogenesis involves also the recruitment of circulating bone marrow derived progenitor cells⁴².

This study also demonstrates that CH-PC provides a microenvironment suitable for the maintenance of various types of BMDC of mesenchymal and hematopoietic origins, including EPC. We investigated the capacity of CH-PC to sustain mixed cell populations including mature and progenitor cells to maintain the vascular healing potential. CH-PC cultures were shown to support the growth of a heterogeneous population of cells with different phenotypes including endothelial, contractile, and osteoblastic cells. CD31⁺ cells were centrally agglomerated in the colonies in the case of CH-PC cultures while they adopted a pericentric distribution inside the colonies on fibronectin, a difference easily detected at day 14. CD31 is mainly expressed at the contact junction of mature endothelial cells but can also be found on the cell surface of hematopoietic and immune cells including platelets, neutrophils, monocytes, megakaryocytes, natural killer cells, and some T cells.^{43, 44} As only a few CD14⁺ cells were detected in the cultures with none located in the colonies, it can be excluded that CD31⁺ cells are monocytes. Even if EPC can also be derived from a myeloid origin²² as supported by studies where transferred CD14⁺ cells improved vascularisation after hind-limb ischemia,⁴⁵ such myeloid precursors were not maintained in our culture conditions and this, on both matrixes. The presence of colony forming units with CD31⁺ cells is not by itself a proof of the presence of EPC, since other types of progenitors such as granulocytes and lymphocyte precursors also form these types of units. In the literature, cell organization and morphology in the colonies and analysis of cell surface markers are commonly measured by flow cytometry¹⁹ Remarkably, little is known on the identity and organization of cells inside the colony forming units visualized

by confocal microscopy, an approach that could bring some light on the collaboration between mature and progenitor cells to maintain their survival and to modulate their proliferation. In our cultures, vWF⁺ cells, a marker of mature endothelial cells, were found on both matrixes in periphery of colonies. This result suggests that mature endothelial cells are able to grow on both matrixes. The reduction in the number of vWF⁺ cells with time (day 14) could imply a gradual loss in mature endothelial cells *in vitro* that could be due to overgrowth by other cell types. However, this reduction could also be associated to the constitutive release of vWF in the culture media. Other cell types found on CH-PC as well as on fibronectin included contractile cells with a pericyte-like α -SMA⁺ labelling³⁹ and cells with alkaline phosphatase activity. Alkaline phosphatase activity is up-regulated during osteoblast differentiation⁴⁶ and is an indicator of osteogenic differentiation. The increase in the frequency of ALP⁺ cells over a 2-weeks period specifically on CH-PC indicated that on this matrix, mesenchymal stem cells can spontaneously differentiate, at least toward the osteogenic lineage. These results from contrast and confocal microscopy highlight the capacity of both matrixes to provide a microenvironment that maintains a heterogeneous population of cells but with significantly specific differences that could have an impact on the vascular healing potential of the amplified cells.

EPC are considered major players in the vascular healing process as their mobilization to lesion sites and their integration into the vascular wall contribute to the reendothelialization mechanism.^{17, 47, 48} EPC corresponded to a small proportion among CD117⁺ cells at tested times on both matrixes but represent a more mature endothelial progenitor cells than CD117⁺CD34⁺. Our analysis revealed that the progenitor proportion of CD117⁺CD34⁺ cells was a very small portion of CD117⁺ cells on fibronectin. However, on CH-PC this portion was more important for all tested times. The loss of EPC on fibronectin over time compared to CH-PC matrix was explained by the decreased expression of CD31 by EPC between day 7 and 14. Moreover, our results demonstrate that the CH-PC polymer not only allowed growth and survival of EPC but even seemed to favour them, compared to fibronectin.⁴⁹ The porous structure of CH-PC may lead to

optimal communication between stromal and haematopoietic cells, allowing cell migration, differentiation and proliferation as well as optimal paracrine exchanges determinant for progenitor cell behaviour. The nature of the matrix can influence cell survival, proliferation and differentiation through the control of the bioavailability of growth factors through the retention effect.⁵⁰ The biological consequences of the matrix-bound growth factors are related to their controlled release. Natural matrixes are able to limit the diffusion of soluble factors, and thus provide a local store of biologically active molecules that persists after growth factor production has ceased.⁵¹ Moreover, local concentration and biological activity of growth factors can be modulated by their interaction with the polymer.⁵² Growth factors bind to the negatively charge group of proteoglycan of the extracellular matrix by their basic amino acid clusters.⁵⁰ CH-PC, although globally positively charged, may interact with growth factors via the zwitterionic PC groups. The cell culture system with mixed cell populations formed on CH-PC matrixes may represent a favorable environment for EPC survival and amplification with combination of production of growth factors by BMDC and their retention into the matrix, a remarkable advantage towards vascular healing of *in vitro* amplified BMDC.

CH-PC matrixes also need to allow BMDC migration toward the targeted vascular bed so that they can contribute to the reendothelialization process. In our *in vitro* experiments, BMDC were able to sense and migrate through a CH-PC coated filter in response to two chemotactic signals, G-CSF and FBS. Electrostatic interactions between BMDC and CH-PC polymer could explain delayed migration through the polymer compared to fibronectin.²⁵

2.1.2.6 Conclusion

In this study, we demonstrate that the CH-PC biopolymer supports the adhesion and proliferation of BMDC in a mixed culture system maintaining the heterogeneity of the cell population. Most importantly, it is a matrix compatible with progenitor cells which allow a positive amplification and an improved survival of the EPC over two weeks when compared to fibronectin. In addition, the CH-PC coating did not hinder the capacity of BMDC to migrate toward chemoattractant signals. Thus CH-PC represents an attractive platform for the amplification of progenitor cells *in vitro*, with qualities that could be promising as a progenitor cell delivery system to promote vascular healing in future *in vivo* applications.

2.1.2.7 Acknowledgements

The authors wish to acknowledge Louis Villeneuve from the confocal microscopy service of the Montreal Heart Institute Research Centre, Marie-Élaine Clavet-Lanthier and Dominique Lauzier from the histopathology service to achieve alkaline phosphatase staining procedure.

2.1.2.8 References

1. Werner N, Priller J, Laufs U, et al. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1567-1572.
2. Leone AM, Rutella S, Bonanno G, et al. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. *Eur Heart J.* 2005;26:1196-1204.
3. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med.* 2005;353:999-1007.
4. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation.* 2002;106:2781-2786.
5. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001;89:E1-E7.
6. Seda Tigli R, Karakecili A, Gumusderelioglu M. In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18:1665-1674.
7. Kumar MN, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev.* 2004;104:6017-6084.
8. Mao JS, Cui YL, Wang XH, et al. A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. *Biomaterials.* 2004;25:3973-3981.

9. Huang M, Khor E, Lim LY. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm Res.* 2004;21:344-353.
10. Prabakaran M. Review paper: chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. *J Biomater Appl.* 2008;23:5-36.
11. Kumar G, Smith PJ, Payne GF. Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnol Bioeng.* 1999;63:154-165.
12. Tiera MJ, Qiu XP, Bechaouch S, et al. Synthesis and characterization of phosphorylcholine-substituted chitosans soluble in physiological pH conditions. *Biomacromolecules.* 2006;7:3151-3156.
13. Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF. Estrogen-induced gene expression in bone marrow c-kit⁺ stem cells and stromal cells: identification of specific biological processes involved in the functional organization of the stem cell niche. *Stem Cells Dev.* 2008;17:1153-1163.
14. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* 2003;9:702-712.
15. Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, et al. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development.* 1997;124:2039-2048.
16. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, et al. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1⁺VE-cadherin⁺ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development.* 1998;125:1747-1757.
17. Fazel S, Cimini M, Chen L, et al. Cardioprotective c-kit⁺ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest.* 2006;116:1865-1877.
18. Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, et al. Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:3760-3764.

19. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* 2004;95:343-353.
20. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells.* 2006;24:928-935.
21. Muioli EK, Clark PA, Chen M, et al. Synergistic actions of hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells in vascularizing bioengineered tissues. *PLoS ONE.* 2008;3:e3922.
22. Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, et al. CD14+CD34^{low} cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Circ Res.* 2005;97:314-322.
23. Chen XD, Dusevich V, Feng JQ, et al. Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2007;22:1943-1956.
24. Mollmann H, Nef H, Elsasser A, et al. Stem cells in myocardial infarction: from bench to bedside. *Heart.* 2009;95:508-514.
25. Bacakova L, Filova E, Rypacek F, et al. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res.* 2004;53 Suppl 1:S35-S45.
26. Babapulle MN, Eisenberg MJ. Coated stents for the prevention of restenosis: Part I. *Circulation.* 2002;106:2734-2740.
27. Yan XL, Khor E, Lim LY. Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights. *J Biomed Mater Res.* 2001;58:358-365.
28. Rainaldi G, Filippini P, Ferrante A, et al. Fibronectin facilitates adhesion of K562 leukemic cells normally growing in suspension to cationic surfaces. *J Biomed Mater Res.* 2001;55:104-113.
29. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 1987;238:491-497.

30. Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 2001;22:261-268.
31. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000;287:1427-1430.
32. Huang Y, Siewe M, Madhally SV. Effect of spatial architecture on cellular colonization. *Biotechnol Bioeng*. 2006;93:64-75.
33. Bettini R, Romani AA, Morganti MM, et al. Physicochemical and cell adhesion properties of chitosan films prepared from sugar and phosphate-containing solutions. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;68:74-81.
34. Rehman J, Li J, Orschell CM, et al. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003;107:1164-1169.
35. Scheubel RJ, Holtz J, Friedrich I, et al. Paracrine effects of CD34 progenitor cells on angiogenic endothelial sprouting. *Int J Cardiol*. 2008;doi:10.1016/j.ijcard.2008.10.009.
36. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:2282-2287.
37. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H, et al. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol*. 1991;6:269-286.
38. Herman IM, D'Amore PA. Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. *J Cell Biol*. 1985;101:43-52.
39. Skalli O, Pelte MF, Peclet MC, et al. Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem*. 1989;37:315-321.
40. Schlingemann RO, Rietveld FJ, Kwaspen F, et al. Differential expression of markers for endothelial cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation tissue. *Am J Pathol*. 1991;138:1335-1347.

41. Nehls V, Denzer K, Drenckhahn D. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res.* 1992;270:469-474.
42. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85:221-228
43. Nourshargh S, Krombach F, Dejana E. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J Leukoc Biol.* 2006;80:714-718.
44. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 2003;24:327-334.
45. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2003;108:2511-2516.
46. Risteli L, Risteli J. Biochemical markers of bone metabolism. *Ann Med.* 1993;25:385-393.
47. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-967
48. Gill M, Dias S, Hattori K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res.* 2001;88:167-174.
49. Tillman J, Ullm A, Madhally SV. Three-dimensional cell colonization in a sulfate rich environment. *Biomaterials.* 2006;27:5618-5626.
50. Huhtala MT, Pentikainen OT, Johnson MS. A dimeric ternary complex of FGFR [correction of FGFR1], heparin and FGF-1 leads to an 'electrostatic sandwich' model for heparin binding. *Structure.* 1999;7:699-709.
51. Moscatelli D. Metabolism of receptor-bound and matrix-bound basic fibroblast growth factor by bovine capillary endothelial cells. *J Cell Biol.* 1988;107:753-759.

52. Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech.* 2003;60:107-114.

2.1.2.9 Legends

Figure 1: Survival, adhesion and organization of BMDC. Colony formation observed after 7 days and 14 days on the fibronectin (A, C) and the CH-PC (B, D) matrixes. In fibronectin-supported cultures, cobblestone shape cells cover inter-colony spaces. (white arrows) (10X).

Figure 2: Capillary-like network organization of BMDC. Cell organization of BMDC was observed at days 7 and 14 on fibronectin (A, C) and on CH-PC (B, D). Spontaneous capillary-like network were observed only on the CH-PC (white arrows) and were stained for CD31 (E) and α -SMA (F) (10X).

Figure 3: Migratory activity of BMDC. Migration through uncoated membrane (UM), membrane coated with fibronectin (F) or CH-PC 0,5% (C) in a transwell system in response to GCSF (A) and FBS (B). Results of 3 experiences are presented. * $p < 0,05$ vs ctrl GSCF and HPGM respectively. ‡ $p < 0,05$ vs same stimulation on F and UM.

Figure 4: Evaluation of the heterogeneity of mixed BMDC cultures. Expression of markers for endothelial cells $CD31^+$ (A-D) and vWf^+ (E-H), cells of myeloid origin ($CD14^+$) (I-J), contractile cells (α -SMA⁺) (K-N) and osteoblasts (ALP activity) black arrows (40X) (O-R) were analyzed by confocal microscopy at days 7 and 14 on fibronectin and CH-PC.

Figure 5: Characterization of hematopoietic cell populations. Evaluation in flow cytometry of hematopoietic ($CD117^+$), progenitor cells ($CD117^+ CD34^+$) and EPC ($CD117^+ CD34^+ CD31^+ VEGFR-2^+$) respectively on fibronectin (FN) and on CH-PC at day

7 (A, B, C) and 14 (D, E, F). The results of 4 experiences are presented. * $p < 0,05$ compared to fibronectin.

Figure 6: Characterization of mesenchymal cell populations. Evaluation in flow cytometry of and stromal cells (CD44⁺) respectively on fibronectin (FN) and on CH-PC at day 7 (A) and 14 (B). The results of 4 experiences are presented. * $p < 0,05$ compared to fibronectin.

2.1.2.10 Figures

Figure 1

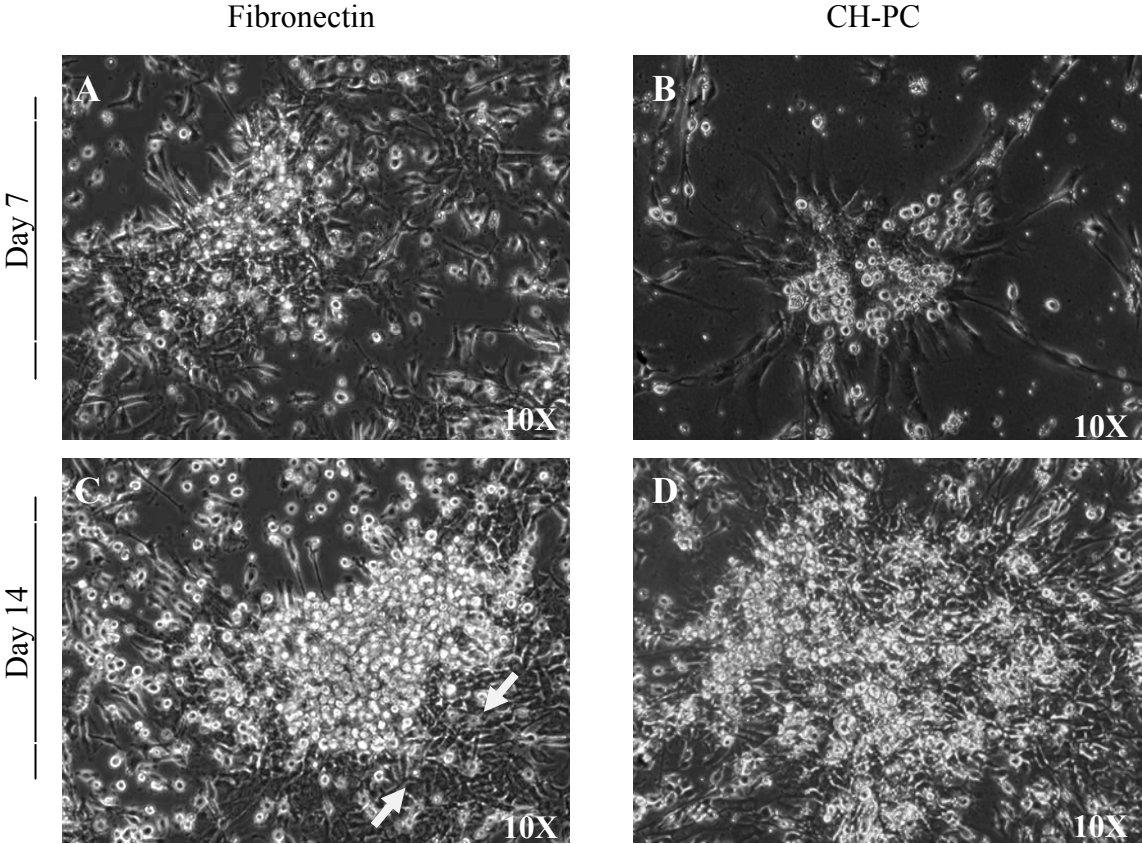


Figure 2

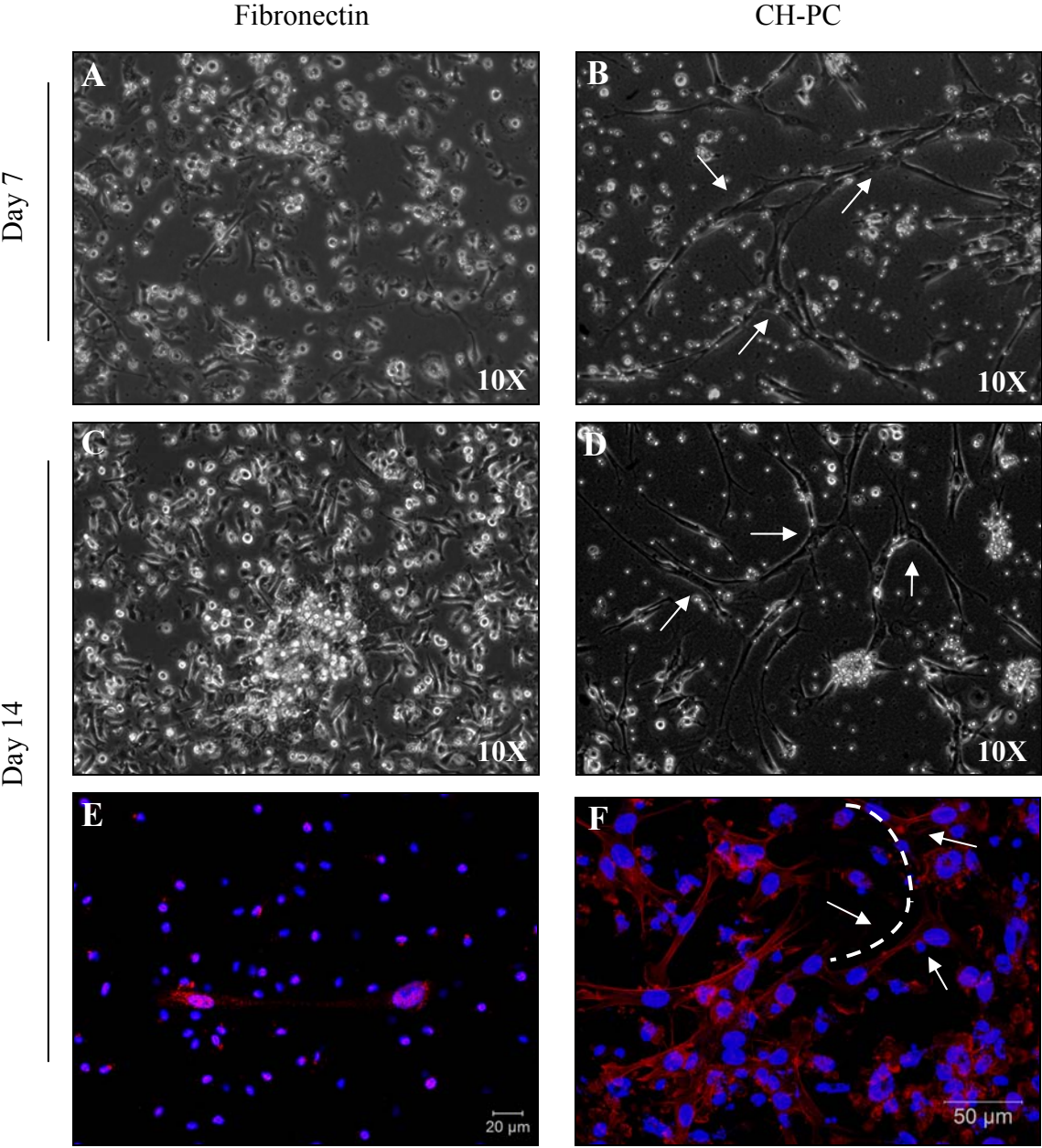


Figure 3

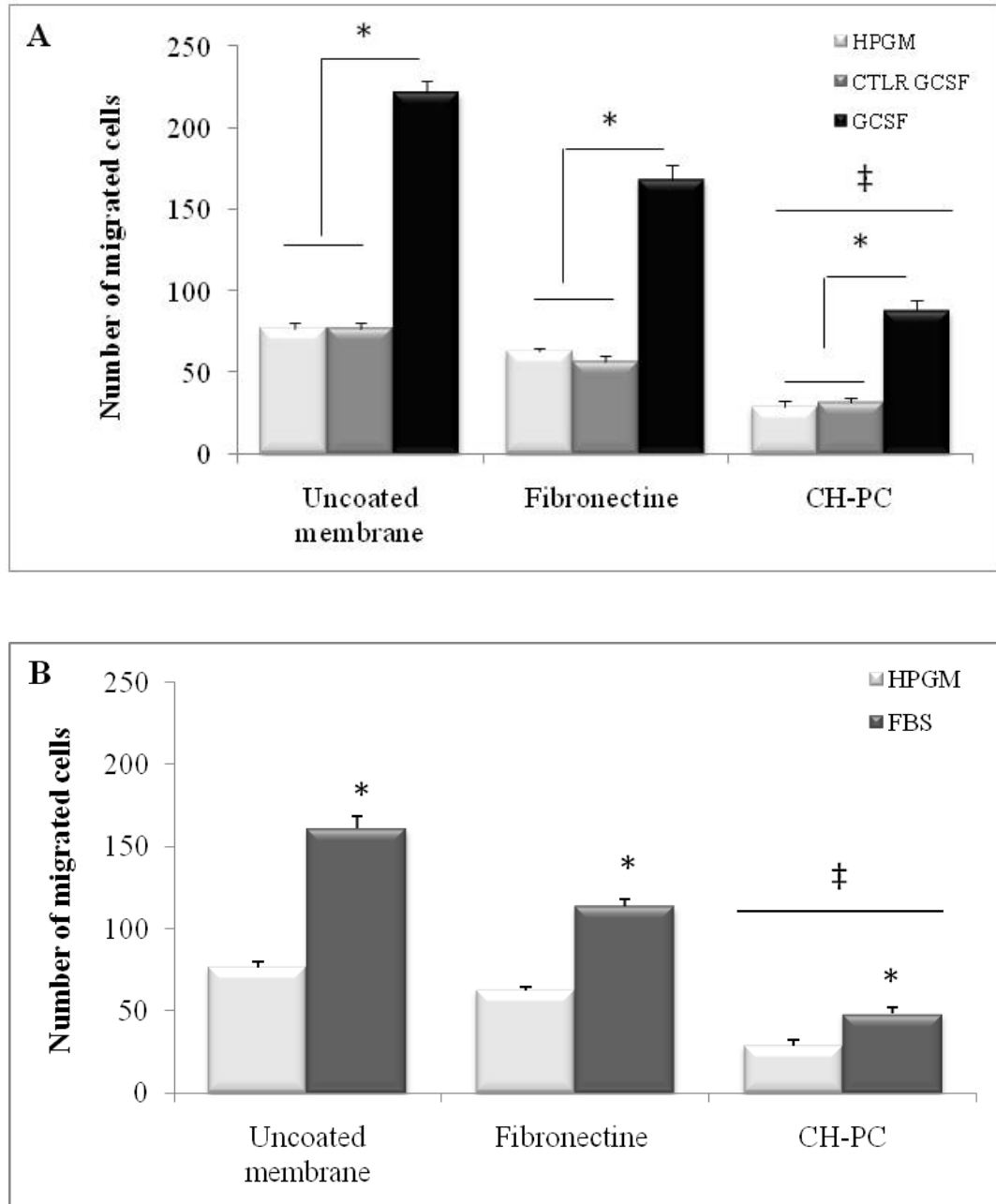


Figure 4

Fibronectin

CH-PC

Day 7

Day 14

Day 7

Day 14

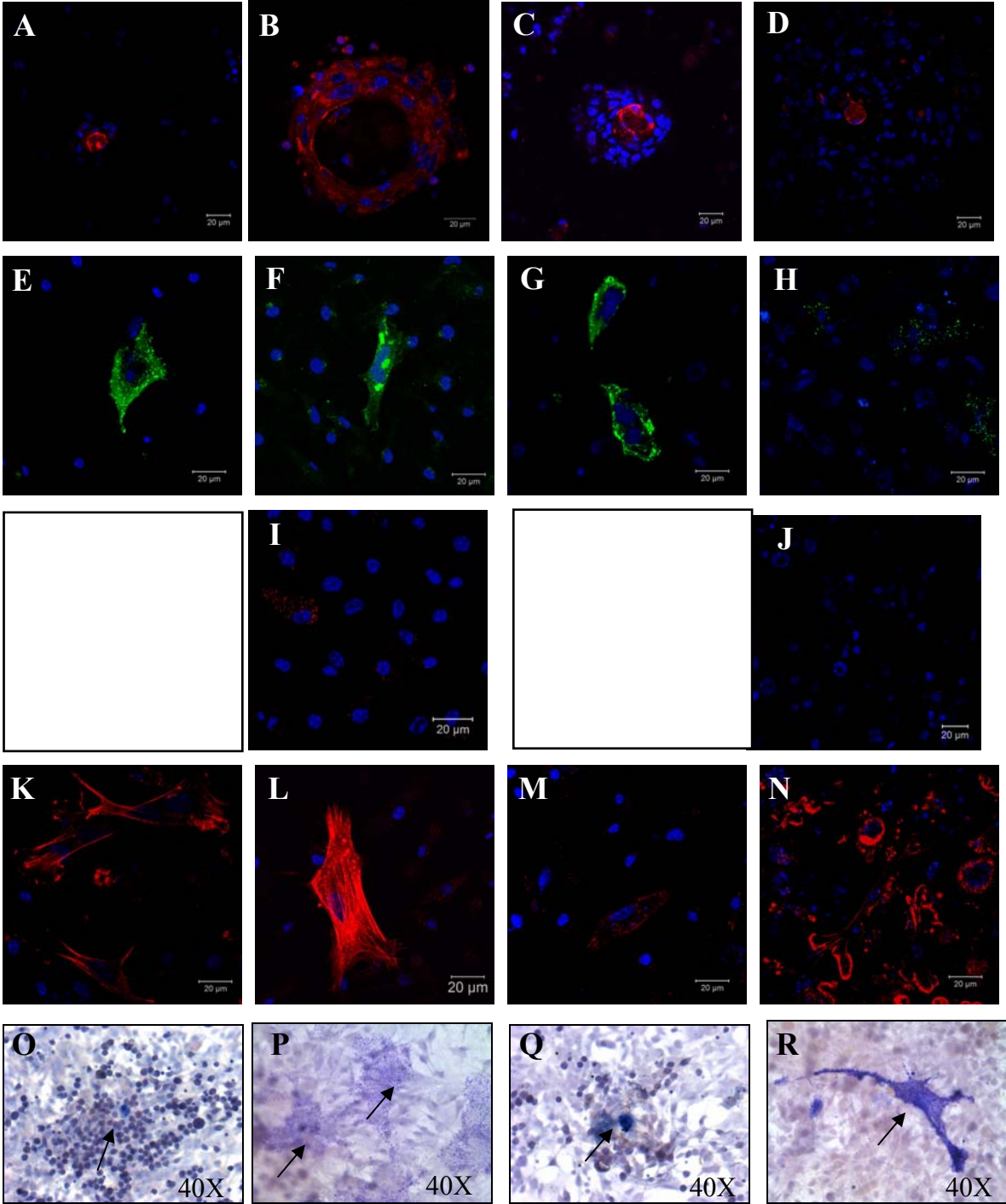


Figure 5

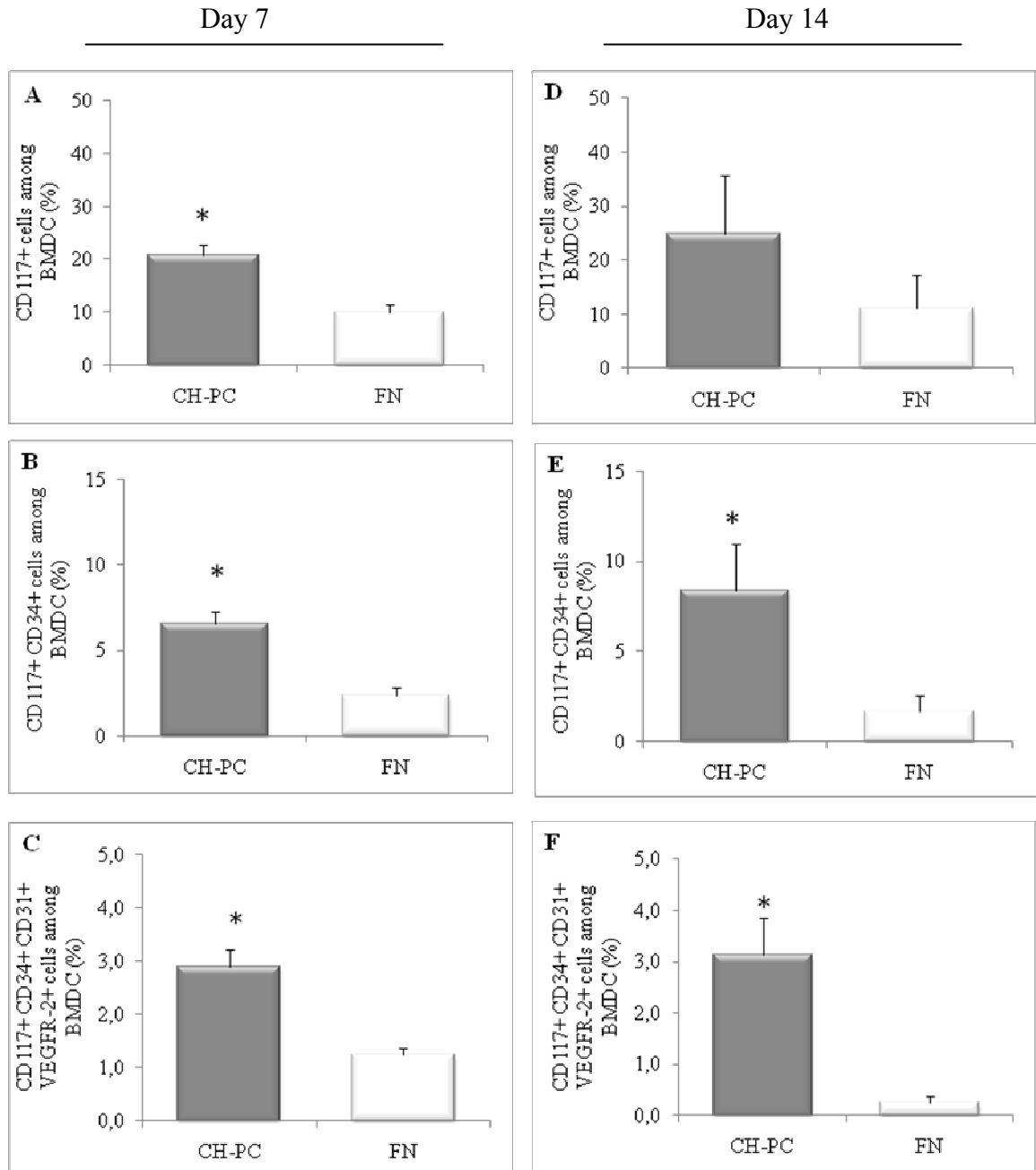
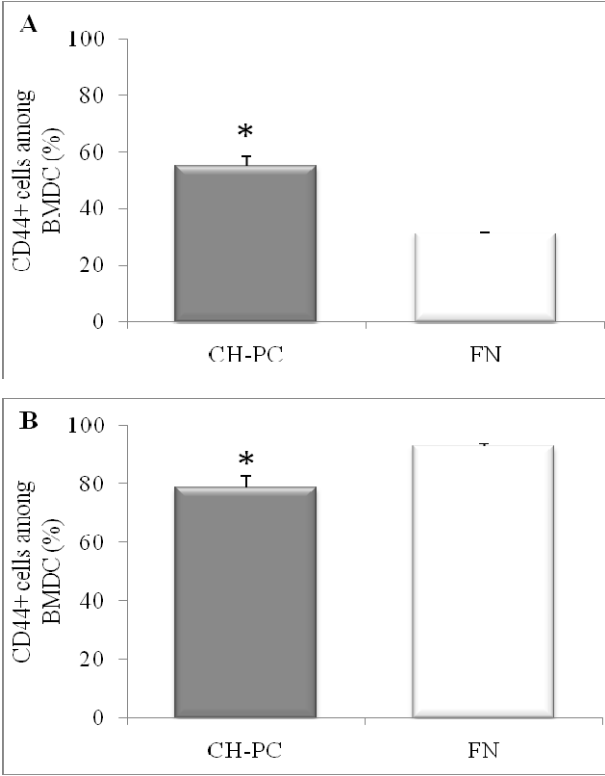


Figure 6



2.2 ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Kim Tardif, Maîtrise en Sciences Biomédicales option générale (2-484-1-0)

2. Description de l'article

Ordre des auteurs : Kim Tardif, Isabelle Cloutier, Zhimei Miao, Françoise M. Winnik, Caroline Lemieux et Jean-François Tanguay

Titre de l'article: 17beta-estradiol modified chitosan-Phosphorylcholine matrix improved progenerator cells amplification compared to the soluble form.

État actuel de l'article: En phase finale de préparation pour soumission dans la revue Biomaterials

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Kim Tardif inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Le 17B-Estradiol combiné à un biopolymère à base de chitosan accroît la biocompatibilité des cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse.

2.2.117 Beta-Estradiol Modified Chitosan- Phosphorylcholine Matrix Improved Prognitor Cells Amplification Compared to the Soluble Form.

Kim Tardif,^{1,2} Isabelle Cloutier,² Zhimei Miao,³ Françoise M. Winnik,³ Caroline Lemieux^{1,2}
and Jean-François Tanguay^{1,2,4}

¹Département des Sciences Biomédicales; ²Centre de Recherche, Institut de cardiologie de Montréal, Montréal, Québec, Canada, ³Faculté de Pharmacie and Département de chimie and ⁴Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author: Dr Jean-François Tanguay, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330 ext. 3250; Fax: (514) 593-2596; E-mail:

This project was supported financially by grants from the Canadian Institutes of Health Research, one (CIHR; # RMF-79023) for a team grant application for regenerative medicine and nanomedicine and one operating grant (CIHR #159684) to Dr Tanguay.

None of the authors has competing financial interest to declare.

2.2.1.1 Abstract

Purpose and objectives: Methodologies to favour vascular healing to prevent delayed reendothelialization following vascular injury are needed. Local delivery of 17β -estradiol and endothelial progenitor cells (EPC) using a biopolymer as phosphorylcholine modified chitosan (CH-PC) could enhance this process. This study was performed to evaluate the capacity of E2-conjugated CH-PC (CH-PC-E2) to favour EPC survival and amplification.

Methods and results: A murine whole bone marrow culture system was used to evaluate adhesion and amplification of bone marrow derived cells (BMDC) on CH-PC-E2 compared to CH-PC and fibronectin matrixes with soluble E2. Soluble E2 or conjugated to CH-PC did not induce toxic effects or improve cell proliferation. CH-PC-E2 was the most effective matrix to increase the proportion of hematopoietic ($7.7\pm 1.2\%$ compared to CH-PC $2.4\pm 0.65\%$ and fibronectin $0.98\pm 0.2\%$) and EPC fraction ($2.31\pm 0.3\%$ compared to CH-PC $0.2\pm 0.05\%$ and fibronectin 0.03 ± 0.01) while mesenchymal fraction was decreased ($82.4\pm 5.2\%$) when compared to CH-PC ($94.7\pm 1.2\%$) and fibronectin ($89.4\pm 3.0\%$). Moreover, all matrixes preserved the heterogeneous morphology of cell populations. The E2-conjugated CH-PC did not prevent cellular response to chemoattractant. Finally, the E2-induced migratory activity of BMDC in a transwell system was reduced by half but not abrogated on CH-based matrixes.

Conclusion: CH-PC-E2 provides biocompatible matrix to promote survival and amplification of EPC.

Keywords: phosphorylcholine, bone marrow, progenitor cells, biocompatibility, endothelialization, mesenchymal stem cells

2.2.1.2 Introduction

Cardiovascular diseases are a major cause of death in the western world and have led to many investigations to understand the progressive pathogenic event and to identify possible therapeutic approaches. On the side of pharmacological treatments, tissues and organ regeneration are viewed as predominant avenues. Based on the mobilization and recruitment of small population of self-renewing stem and progenitor cells, accumulating evidences suggest that bone marrow-derived circulating endothelial progenitor cells (EPC) contribute to the vascular repair and the reendothelialization processes. [1] Recruitment of EPC at the vascular bed was shown to counteract endothelial dysfunction and delayed reendothelialization, central events in the development of atherosclerotic lesions. [2] Numerous physiological and pathological stimuli can influence the number of EPC such as pro-inflammatory cytokines [3], estrogens [4], growth factors [5] and physical activity. [6]

As the number and mobilization of circulating EPC are lowering with age and decreased in patients with cardiovascular diseases, effectiveness of vascular repair is strongly influenced by aging and cardiovascular risk factors. [7, 8] Therefore, methodologies to favour EPC mobilization at the lesion site are needed. Local drug or progenitor cells delivery on scaffold at the lesion site could accelerate the reendothelialization process. A promising drug for this application is 17 β -estradiol (E2). We, and others, have demonstrated that local delivery of E2 improved reendothelialization and decreased neointima formation in a porcine model of coronary injury. [9, 10] We also

demonstrated *in vitro* that E2 had a positive influence on vascular cells. Indeed, estrogens mediate proliferation and migration of endothelial cells while it inhibits the same processes in smooth muscle cells. [11, 12] Positive influence of E2 has also been demonstrated on other cell type such as EPC by increasing their bone marrow-located production and their senescence or apoptosis inhibition. These phenomenons amplify the circulating level of these cells and perhaps increase cell recruitment at the lesion site. [4]

In a scenario of reduced endogenous EPC, direct delivery of exogenous progenitor cells combined with E2 at the vascular injury site may significantly improve vascular healing and function. An adequate delivery vehicle is a biodegradable biopolymer which allows simultaneously the bioavailability of E2 and a biocompatible matrix for progenitor cells. An interesting biopolymer for this application is chitosan (CH), a component of shellfish exoskeleton obtained by alkaline deacetylation of chitin. Presently, CH is used in tissue engineering for its intrinsic properties such as non-toxicity, biocompatibility and biodegradability and for its biological activities including promotion of wound healing process. As so, it is used in various fields for tissue engineering in bone, cartilage, vascular, nerve and skin repair but also as a drug delivery system. [13-18] Increasing its biocompatibility with cells and surrounding tissues at the delivery site is a central event for the vascular healing purpose. Linking phosphorylcholine (PC) groups to poor water soluble polymers, like chitosan, results in a significant enhancement of their solubility at physiological pH conditions. [19]

In previous work, we have demonstrated that CH-PC represents an attractive platform for the amplification of progenitor cells *in vitro*, with qualities that could be promising as a progenitor cell delivery system to promote vascular healing in future *in vivo* applications. In this study, we have demonstrated that CH-PC considerably increases the EPC fraction among BMDC compared to fibronectin. (In press) As the marker for hematopoietic stem cells c-kit (CD117) is expressed in adult bone marrow by hematopoietic stem cells (HSC), EPC and their believed common precursor, the hemangioblast. [20-22] Expression of c-kit have been shown to be critical for HSC mobilisation into peripheral circulation and those cells can be endogenously recruited into myocardium after infarction. [23, 24] In our experiments, EPC were further defined by the additional expression of three other markers CD34, CD31 and VEGFR2. [1] The mesenchymal fraction consisted of cells expressing CD44, encompass stromal cells such as adipocytes and fibroblasts as well as mesenchymal stem cells, able to generate various cell types including chondrocytes, osteoblasts and adipocytes. [25] CD44 is a cell-surface receptor known to be expressed by all mesenchymal cells and to be essential for cell structural organization by binding to extracellular matrix components such as hyaluronan and fibronectin. [25]

In the actual study, we hypothesized that E2 could further increase the positive effects of CH-PC on BMDC and more specifically on EPC. To address this hypothesis, we used a whole bone marrow culture system, developed by our laboratory, which allows the cohabitation of both hematopoietic stem cells and mesenchymal cells to mimic the bone

marrow environment. [26] In a previous study, it was shown that co-transplantation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells (MSCs) and HSCs subcutaneously in immunodeficient mice, was more effective than MSCs alone to generate neovascularisation.[27] Therefore, it was important that the whole bone marrow be maintained to recreate the bone marrow environment by maintaining mesenchymal and hematopoietic populations *in vitro*. We used this system to evaluate the cell behaviour on the CH-PC-E2 compared to soluble E2 on CH-PC or on fibronectin, the commonly used matrix for progenitor cell cultures.

2.2.1.3 Materials and Methods

CH-PC solution preparation. CH powder, originating from crab was obtained from Medipol (Lausanne, Switzerland). The polymer was prepared by further deacetylation from a commercial sample with a 96% degree of deacetylation (DDA). CH-PC was prepared following a previously reported procedure with slight modifications. [19] Briefly, a solution of PC-CHO (0.4 g, 1.64 mmol) in methanol (10 mL) was added drop wise to a solution of deacetylated chitosan (1 g, 6.2 mmol of monosaccharide residue) in aqueous acetic acid (50 mL, 1 wt %), kept at 0 °C. At the end of the addition, the solution was stirred for 30 min at 0 °C. The pH of the reaction mixture was then adjusted to 6.5 by adding aqueous NaOH (1.0 M). The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature, and then cooled to 0 °C; a solution of sodium cyanoborohydride (0.8 g, 12.7 mmol, excess) in water (15 mL) was added drop wise under stirring. Thereafter, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 20 h. The reaction mixture was dialyzed (membrane of MWCO 12000-14000) first against water for 2 days, then against aqueous NaOH (0.05 M) for 1 day, and finally against water for 2 days. The CH-PC polymer was isolated by lyophilization. PC content was determined from ¹H NMR data obtained in D₂O/35 wt% DCl (100/1, v/v) at 70 °C.

Synthesis of E2 modified chitosan-phosphorylcholine. E2-modified phosphorylcholine-substituted chitosan (denoted CH-PC-E2 with 1.9 mol %) was prepared by the reaction of the amine groups of CH-PC and the NHS-activated carboxylic acid groups of E2 17-hemisuccinate. The procedure is illustrated in the following for the synthesis of CH-PC-E2. CH-PC (200 mg, about 1.2 mmol of monosaccharide) was completely dissolved in aqueous acetic acid (20 mL, 1 wt %), and E2 -NHS ester in DMF was added dropwise. The reaction solution was stirred at room temperature for 24 h, and then precipitated in acetone (200 mL). The gel-like product was collected by centrifugation, washed with fresh acetone for 3 times, and then suspended in water and dialyzed against deionized water for further purification. Solid product was obtained by lyophilization.

CH-PC and CH-PC-E2 films preparation. The CH-PC and CH-PC-E2 flocculent powder was diluted in phosphate buffer (10mM) pH 7.4 at a final concentration of 0.5%. In the biological fume hood, the solution was filtered using a vacuum system and used to coat 6-well culture plates (15 $\mu\text{L}/10 \text{ mm}^2$) and dried for 24 hours to obtain a uniform chitosan-base polymer film.

Cell culture. Six weeks old C57BL/6 female mice (Jackson Laboratoires, Bar Harbor, MA) were used as bone marrow donors. The animals were deeply anesthetized using a mixture of ketamine hydrochloride (Bioniche, Belleville, On) and xylazine (Rompum, Bayer's Inc, Toronto, On). Euthanasia was performed by blood draining through cardiac puncture. Bone marrow cells were collected from the dissected femurs and tibias by

flushing with phosphate buffer saline (PBS, Invitrogen corp., Carlsbad, CA) contained 2% fetal bovine serum (FBS, Hyclone Laboratories, Logan, UT). BMDC were washed twice and plated in precoated CH-PC or fibronectin 6-well culture plates (Corning, Corning, NY). Cells were maintained in Hematopoietic Growth Medium (HPGM Lonza, Walkersville, MD) with FBS 2% and antibiotics (penicillin-streptomycin, Invitrogen corp.), platelet derived growth factor (10ng/ml) (PDGF, Peprotech Inc, Rocky Hill, NJ) and endothelial growth factor (10ng/ml) (EGF, Peprotech Inc.) during the first 7 days. Afterward, cells were maintained in HPGM 2% FBS without additional growth factors for another 7 days. The culture media was changed every 3 days for a total of 14 days. Cell survival, growth and organization were daily monitored over the 2 weeks period. Pictures of cell cultures at different time points were taken with an inverse light microscope (CKX41 of Olympus) equipped with a camera (QIMAGING, QICAM, Olympus) to obtain a computer-digitized image.

Cell proliferation and colony forming units count. BMDC were plated on fibronectin, CH-PC or on CH-PC-E2. Soluble E2 (Sigma, St. Louis, MO) was added in dose dependant manner (10^{-10} M to 10^{-8} M), for two-week treatment in CH-PC coated wells. After treatment, total colony forming units in each well were visualized with an inverse light microscope (CKX41 of Olympus) and were counted. Cells were removed from culture plates and total cell count was performed with a haemocytometer (Hausser Scientific, Horsham, PA). The toxicity assay at day 7 and 14 was achieved by cell count of necrosis

trypan blue (Invitrogen corp.) positive cells. Mortality rate was obtained by the ratio of trypan blue positive cells over total number and expressed in percentage.

Flow cytometry. To characterize cell populations obtained on each matrix, non specific binding sites on BMC were blocked with normal rat serum (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.) and after cells were consecutively incubated with the following antibodies: for the hematopoietic markers monoclonal rat-anti-mouse CD117 allophycocyanin-conjugated Ab (APC, Caltag Laboratories, Carlsbad, CA), monoclonal rat-anti-mouse CD31 Ab (platelet endothelial cell adhesion molecules-1, PECAM) fluorescein isothiocyanate-conjugated Ab (FITC, BD pharmingen, San Jose, CA), monoclonal rat-anti-mouse CD34 biotin-conjugated Ab (Bio, BD pharmingen), monoclonal rat-anti-mouse vascular endothelial growth factor receptor-2 Ab (VEGFR2) phycoerythrin-conjugated (PE, BD pharmingen), for the mesenchymal markers monoclonal rat-anti-mouse CD44 (hyaluronic acid receptor) FITC-conjugated Ab (BD pharmingen). For the control isotypes: monoclonal rat-anti-mouse IgG2a APC-conjugated Ab (Abcam Inc.), monoclonal rat-anti-mouse IgG2a FITC-conjugated Ab (Abcam Inc.), monoclonal rat-anti-mouse IgG2a PE-conjugated Ab (BD pharmingen), monoclonal rat-anti-mouse IgG2a Bio-conjugated Ab (Abcam Inc.). To analyze the Bio-conjugated Ab, the secondary Ab streptavidine-ECD (Beckman coulter, Fullerton, CA) was used. Cells were analyzed with an Altra cytometer from Beckman using the Expo32 system.

Cell migration assay. Cell migratory assays were performed using a transwell system according to the manufacturer's instructions (Millipore, Billerica, MA). Briefly, BMDC were plated for one week on fibronectin. After 7 days, cells were starved for 24 hours and removed from the 6-well culture plates with a solution of EDTA (Sigma). BMDC were washed twice and resuspended in HPGM (Lonza) containing 0,2% FBS and antibiotics. Transwell system with polycarbonate membrane chambers (8µm pore size) in 24-well plates was used. The membrane was coated or not with fibronectin or 0.5% solution of CH-PC or CH-PC-E2 and dried for 24 hours before the assay. The lower chambers were filled with HPGM alone or with different concentrations of E2 (10^{-10} M to 10^{-8} M). As a chemoattractant specificity control, E2 at 10^{-9} M was added in the upper and lower chamber of selected wells to abolish migration. The membrane chamber was repositioned into the feeder tray and BMDC (2.5×10^5) diluted in media were added in the top chamber. After 5 hours of incubation at 37°C, 5% CO₂, the non-migrated cells were scraped out from the upper side of the membrane with a plastic policeman, washed twice in PBS and fixed with methanol before staining with eosin and hematoxylin (Sigma). The membranes were cut out from the plate and mounted on a glass slide. Each condition was assessed in duplicate and all experiments were performed at least three times (bone marrow from different mice). Migrated cells were counted using a light microscope (BX45 of Olympus) equipped with a video camera (QIMAGING, QICAM, Olympus) to obtain a computer-digitized image. The count of migrated cells was obtained from the mean number of five representative fields on each membrane

ER- α protein expression. BMDC were plated in 6-well culture plates coated with fibronectin, CH-PC-E2 or on CH-PC in presence of a dose response curve of soluble E2 (10^{-10} M to 10^{-8} M) and were lysed 7 or 14 days later for western blot analysis. For this analysis, equal amount of total protein was loaded and migrated on 10% SDS-PAGE (Biorad) under reducing conditions and transblotted onto polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA). Membranes were incubated overnight with polyclonal rabbit anti-mouse estrogen receptor-alpha antibody (Ab) (ER α Santa Cruz Biotechnology Inc.). Visualization of protein bands was achieved with an anti-rabbit IgG horseradish peroxydase conjugated Ab (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and a chemoluminescence reagent (Pierce, Rockford, IL). Membranes were stripped with Re-Blot plus (International Chemicon) and total protein expression was determined with a monoclonal rabbit-anti-mouse Ab to glyceraldehydes-3-phosphate deshydrogenase (GAPDH, Applied Biosystems, Foster city, CA). Results are presented as the relative expression of ER α protein normalized with the expression of GAPDH using a digital image densitometry (Biorad). To compare different experiments all values are expressed in comparison with CH-PC normalized at 100%.

Statistical analyses. Data were expressed as mean \pm SEM of at least three independent experiments. Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) for multiple testing following by a paired *t* test for flow cytometry analysis on fibronectin and with a Dunnett multiple comparison tests were for proliferation assays, cell

migratory assays and flow cytometry analysis on CH-PC. Probability values were considered significant at $p < 0,05$.

2.2.1.4 Results

E2 effects on BMDC cultivated on fibronectin matrix

E2 was demonstrated to positively influence progenitor cells. Indeed, E2 increases the number of EPC *in vitro* and decreases their apoptosis rate. [4] At the beginning of this study, we first determined the effect of a dose range of soluble E2 on the proliferation rate of BMDC populations in a mixed culture system grown on fibronectin, the reference matrix in the literature for progenitor cells culture. [28] The range of E2 concentrations was selected to cover physiological levels, from 10^{-8} M to 10^{-10} M. [29] Total cell counts without cell populations discrimination were achieved after 14 days revealed no proliferative effects of E2 at the 3 tested doses, on fibronectin (Figure 1A) (10^{-8} M 192.0 ± 38.6 , 10^{-9} M 188.3 ± 34.7 , 10^{-10} M 188.8 ± 37.2 and HPGM 175.3 ± 37.0). In parallel, no toxic effect of E2 even at 10^{-8} M, was observed on BMDC after 14 days (Figure 1B) (E2 at 10^{-8} M 20.5 ± 3.9 , 10^{-9} M 20.9 ± 2.1 and 10^{-10} M 20.6 ± 1.0) when compared to fibronectin alone (HPGM 20.4 ± 3.9).

Amplification of mesenchymal and haematopoietic fraction by E2 on fibronectin matrix

A global analysis of a mixed cell culture may not allow discriminating E2 effects on the proliferation/inhibition of BMDC growth. Thus, we have investigated the capacity of soluble form of E2 to influence specifically defined populations among BMDC obtained on fibronectin coated plates. Using a more refined approach the percentage of cells expressing selected cell surface markers for mesenchymal, hematopoietic and EPC lineage was determined by flow cytometry analysis after one week treatment with E2 and for a total of two weeks in culture. E2 increased significantly by 12% the proportion of CD44⁺ cells (85.6±1.1%) compared to culture in media HPGM alone (75.6 ±2.1%) (Figure 2A). E2 increased also the proportion of CD117⁺ cells (0.54±0.08%) by 22% compared to HPGM alone (0.42±0.04%) (Figure 2B). However, when using an even more restricted and very scarce EPC population defined by positive expression of CD117, CD34, CD31 and VEGFR-2, the soluble E2 at 10⁻⁹M did not increase significantly their percentage (0.05±0.03% compared to HPGM 0.06±0.05%) (Figure 2C).

Biocompatibility and BMDC organization on CH-PC and CH-PC-E2 matrixes

We have determined that E2 promotes the amplification of CD44⁺ mesenchymal and CD117⁺ haematopoietic cells fractions on fibronectin. In a recent study, we have demonstrated that phosphorylcholine modified chitosan polymer can favour BMDC survival and amplification, an effect particularly effective on EPC. (In press) To further maximize progenitor amplification, we assessed the capacity of E2 in its soluble form or

conjugated directly to the polymer to improve cell BMDC survival and amplification on CH-PC matrix. Cell adhesion and growth were evaluated in parallel on fibronectin, the control matrix, and on CH-PC-based films for a two-week period. Morphological changes with cell spreading indicating progression in the adhesion process, occurred faster on fibronectin with adhesion seen after 18 hours while on CH-PC and CH-PC-E2, up to 24 and to 42 hours were required, respectively (data not shown). Cell organization and kinetic of growth were evaluated on CH-PC, CH-PC-E2, and fibronectin coated culture dishes. In all cases, colony forming units (CFU) rapidly develop by day 7 and expand in size by day 14 (Figure 3A to F) with comparable cellular organization. Colonies were found over each matrixes and were typically constituted of centrally located round cells and underlying sprouts of spindle-shape cells at the periphery after 14 days in culture (Figure 3D, E and F). We observed the development of spontaneous capillary-like structures located at the periphery of colonies on CH-PC-E2, on CH-PC but not on fibronectin (data not shown). In previous work we have determined that cells in the capillary-like network on CH-PC were CD31⁻ and α -SMA⁺. (In press) While in fibronectin-supported cultures only, cobblestone shaped cells covered inter-colony spaces (Figure 3F). As CFU are an indirect measure of stem cells number *in vitro*, colony counting was performed at day 14 to address the clonogenic potential of each type of culture (Figure 3G). The numbers of colonies were not different on CH-PC with the differents doses of soluble E2 (10^{-8} M 25.4 ± 3.4 , 10^{-9} M 26.2 ± 3.7 , 10^{-10} M 13.4 ± 2.4). On the contrary, the colony number on CH-PC with soluble E2 at 10^{-10} M was significantly lower than with CH-PC alone. CH-PC-E2 polymer

(18.2±2.5) led to a significantly lower number of colonies compared to CH-PC (26.4±1.3). Similar reduction in the number of colonies was obtained on CH-PC when soluble E2 at 10^{-10} M was added. Surprisingly, at other soluble E2 concentrations tested this effect was lost.

Effects of E2 on BMDC growth and mortality on CH-PC

As a next step in the evaluation of the biocompatibility of the CH-PC-E2 matrix with BMDC culture system, we evaluated its ability to stimulate cell proliferation and decrease mortality rate compared to CH-PC supplemented with soluble E2. The proliferation and mortality rate of BMDC were investigated at day 7 and 14. As the exact dose of bioavailable E2 released from the CH-PC-E2 has not been determined yet, a curve of soluble E2 was used to compare the pattern of cell response on CH-PC with CH-PC-E2. At day 7, the number of BMDC on CH-PC-E2 (181.8±16.5) was comparable to CH-PC (228.2±26.8) (Figure 3A). The addition of soluble E2 at 10^{-9} M in the CH-PC coated cultures increased the number of BMDC compared to CH-PC-E2 (283.6±15.3 vs 181.8±16.5). In contrast, there was no significant difference between CH-based matrix with soluble E2 and fibronectin (292.6±9.0) except for CH-PC with 10^{-10} M (198.8±8.9) and CH-PC-E2 which appeared lower. At day 14, total cell number was amplified at least two times compared to day 7 (Figure 3B) but no significant differences persisted in cell count between matrixes in presence or not of E2 (CH-PC-E2 580.5±119.7 CH-PC

554.5±143.87 or with soluble E2 at 10^{-8} M 789.0±60.1, 10^{-9} M 764.0±82.8, 10^{-10} M 614.0±121.5 and fibronectin 656.5±74.9)

In the same set of cultures, we assessed mortality rate to determine if the difference in the proliferation rate observed at day 7 between matrixes with or without E2 could be associated with an effect on the mortality rate. (Figure 3C) At day 7, mortality rate of BMDC on CH-based matrixes alone (CH-PC-E2 24.7±1.1%, CH-PC 27.6±2.9%) or with soluble E2 (10^{-8} M 28.5±2.3%, 10^{-9} M 22.7±1.9% and 10^{-10} M 25.1±2.0%) appeared not significantly different. However, CH-based polymer with or without E2, favoured significantly a higher mortality rate than fibronectin (13.8±1.1%). This corresponds to a reduction of approximately 2 times on fibronectin compared to other conditions with the striking exception of CH-PC with E2 at 10^{-9} M (18.9±1.3%). In this case only, E2 significantly reduced mortality rate of BMDC on CH-PC compared to the polymer alone. At day 14, mortality rate was globally reduced by half compared to day 7 (Figure 3D). CH-PC-E2 (13.3±1.1%) tends to reduce cell mortality rate compared to CH-PC (18.2±1.3%). CH-PC-E2 significantly reduced the cell mortality compared to CH-PC with soluble E2 (10^{-8} M 13.8±1.6%, 10^{-9} M 16.7±1.0%, and 10^{-10} M 17.9±2.2%) but not compared to fibronectin (16.0±1.2%). These results suggest that over the tested time frame, differences in kinetic of growth and mortality can be distinguished between matrixes but also in relation to the delivery form of E2.

Characterization of cell populations among BMDC on CH-PC

As demonstrated in our results on the effects of E2 on BMDC grown on fibronectin, the response of specific cell populations could be hidden when a global analysis approach is taken. To more selectively compare the BMDC amplification response to soluble and conjugated E2 in CH-PC, coated culture cells were analysed by flow cytometry. The percentages of specific cell surface markers for CD44⁺ mesenchymal, CD117⁺ haematopoietic and EPC among BMDC was addressed after 7 and 14 days. (Figure5). To compare the impact of CH-PC matrixes with soluble E2 to CH-PC-E2, a comparative curve of stimulation was performed with BMDC grown on CH-PC with a dose range of E2 from 10⁻⁸ to 10⁻¹⁰ M.

At day 7, no significant difference in the percentage of CD44⁺ cells was observed compared to CH-based matrixes alone or with soluble E2 at, 10⁻⁸ M (57.7±5.2%), 10⁻⁹M (62.2±1.9%) and 10⁻¹⁰M (60.6±4.2%) (Figure 5A). On the contrary, we obtained a significant difference between both CH-based matrixes as they represented 50.8±0.9% of the cell population on CH-PC-E2 vs. 61.4±6.4% on CH-PC alone. E2 conjugated form appeared to lead a lower number of CD44⁺ cells than the soluble form at the tested concentrations but this difference was not significant. Fibronectin (21.0±3.3%) lead to the lowest proportion of CD44⁺ cells. This corresponds to a 2 time amplification of the CD44⁺ cell fraction on CH-based matrixes compared to fibronectin. In the case of the CD117⁺ haematopoietic cells (Figure 5B), we observed a strong amplification on CH-based

matrixes (CH-PC $9.9\pm 2.3\%$ and CH-PC-E2 $19.5\pm 3.2\%$). Soluble E2 at 10^{-8} M ($14.2\pm 0.8\%$), 10^{-9} M ($14.8\pm 3.0\%$) and 10^{-10} M ($13.4\pm 2.2\%$) did not further increase the amplification of CD117⁺ cells on CH-PC alone or on CH-PC-E2. In opposition, CH-PC-E2 was capable of stimulating a significant higher proportion of CD117⁺ cells compared to CH-PC alone. Finally, fibronectin coated-condition also led a lower proportion of c-kit⁺ ($2.5\pm 0.8\%$) cells compared to CH-based matrixes alone or with E2.

At day 14, a strong amplification of the CD44⁺ cell population was observed on CH-PC-E2 ($82.4\pm 5.2\%$) that was even more marked on CH-PC ($94.7\pm 1.2\%$) (Figure 5C) when compared to day 7. This represents an increase of 35% and 39% between day 7 and day 14 of the proportion of CD44⁺ cells among BMDC in culture on CH-PC and CH-PC-E2 respectively. Globally, at day 14, CD44⁺ cell fraction reached comparable levels on the different matrixes with or without the presence of soluble E2. On fibronectin, CD44⁺ ($89.4\pm 3.0\%$) was also greatly amplified compared to day 7 and CD44⁺ cell proportion was similar to CH-based. As a result, haematopoietic CD117⁺ cell population was in proportion considerably reduced in all condition by 3.5 three times compared to day 7. However, in presence of soluble E2 at all three concentrations the percentage of CD117⁺ cells on CH-PC was enhanced compared to the matrix alone. The dilution effect was less important in CH-PC-E2 cultures which contained 3.2 times more CD117⁺ cells than CH-PC. Interestingly, a higher proportion of CD117 was obtained on CH-PC-E2 than on CH-PC supplemented with soluble E2 and this, at the three concentrations (Figure 5D). Fibronectin, as at day 7, led to a much lower proportion of CD117⁺ cells ($0.98 \pm 0.19\%$) compared to CH-based

matrixes (CH-PC-E2 7.7 ± 1.2 % and CH-PC 2.4 ± 0.7 %). This positive effect of E2 in its soluble or its conjugated form to CH-PC was even more striking at day 14. Soluble E2 at 10^{-9} M was the most effective dose of soluble E2 in maintaining a higher proportion of EPC compared to CH-PC-E2. E2 conjugated to CH-PC further promoted EPC survival or proliferation 2.9 times higher than CH-PC with soluble E2 at 10^{-9} M (0.8 ± 0.2 %). Fibronectin led to the lowest proportion of EPC (0.03 ± 0.01 %) compared to CH-based matrixes (CH-PC-E2 2.3 ± 0.3 % and CH-PC 0.2 ± 0.05 %)

Migratory capacity of BMDC through CH-PC

Cell migratory activity is an essential function for the healing potential of progenitor cells during the integration process into the tissue. When adhering to a polymer, progenitor cells should be able to migrate in response to chemoattractant such as E2. To assess their functional activity in respect to their migratory capacity in response to E2, a transwell system with matrix-coated membranes were used (Figure 6). We observed that soluble E2 at the tested concentrations induced BMDC migration. More importantly, we observed that after a 5-hour incubation period, the most effective migratory response was obtained with soluble E2 at 10^{-9} M. We also obtained a similar pattern of cell migration but with a reduction of the number of migrated cells on the CH-PC based matrixes compared to the uncoated membrane. The uncoated control wells presented the highest number of migrated cells (187.3 ± 13.2) reduced by 67% in CH-PC-E2 (62.4 ± 4.8), by 53% in CH-PC-coated

wells (86.9 ± 6.1) (Figure 6). E2 at 10^{-9} and 10^{-8} M (64.4 ± 5.5) on CH-PC allowed a significant higher number of migrated cell compared to CH-PC-E2 (10^{-10} M 50.7 ± 3.8) polymer. We also observed a reduction in the number of migrated cells on CH-based polymer compared to fibronectin-coated wells (154.8 ± 5.5). Even if the CH-based matrixes significantly reduced the number of migrating BMDC, they did not block the response to E2 stimulation. The E2 released by the CH-PC-E2 during the incubation time was not sufficient to compete the chemoattractant effect of soluble E2 in the lower chamber.

ER- α protein expression by BMDC on CH-PC and CH-PC-E2 matrixes

Activation of biological processes promoted by E2 such as cell adhesion [30], proliferation and migration following E2 stimulation was shown to be triggered by estrogens receptors (ER) mainly via the activation of the alpha (ER- α) isotype. [31] The dose of E2 but also the physicochemical properties of polymer can potentially modulate gene expression including ER- α . To determine if change in ER- α level could be at the origin of the differential response of BMDC in the different setting, the expression of ER by BMDC was analyzed by western blot at day 7 and 14 (Figure7). GAPDH protein was used as the reference control protein expression. At day 7, the expression of ER- α tended to increase in cells on CH-PC-E2 matrix with no significant difference in the other conditions (Figure 7B). Overall, ER- α expression increased over time (day 14) but more importantly with no significant differences between all the other conditions (Figure 7C).

2.2.1.5 Discussion

Recruitment and incorporation of EPC into the vascular endothelium or cardiac ischemic tissues have been shown to promote reendothelialization and to improve myocardial function post myocardial infarction. [32, 33] Several strategies were developed to promote vascular healing including the recruitment of EPC at the lesion site to accelerate the reendothelialization process. For example, with this objective in mind, stents made of non biodegradable biomaterials were coated with an integrin peptide binding motifs, with an anti-CD34 antibody or directly with EPC. [34-37] An other approach involves the development and the implantation of a drug-eluting stent (DES) loaded with E2. Recent studies have demonstrated the efficacy of this stent and it was associated with low restenosis and clinical recurrence. Nevertheless, level of restenosis obtained in this clinical evaluation was similar to bare metal stent. [38] This result was unexpected as local delivery of a single perfusion of E2 before stent implantation was demonstrated to reduce restenosis compared to control in a swine model of coronary injury. [10]

One of the recurrent problems with DES is the important effects of the coated polymer which in this case, could not be overcome by the anti-restenosis effect of E2. [38] Polymers currently in development for vascular application are aimed to be less inflammatory with a clear interest toward biodegradable biomaterials. Resorbed by growing cells and gradually replaced by the newly formed extracellular matrix and differentiated cells, the polymer would be eliminated without inducing an inflammatory response. These

polymers could prevent inducing inflammation and delaying vascular healing as was reported with permanent synthetic polymers. [39] In this context E2 combined to an appropriate polymer may significantly contribute to improve vascular healing.

This is the first study to compare the response of BMDC, including EPC, to two forms of E2; one soluble and one directly conjugated to the supporting matrix, the CH-PC. As soluble E2 is known to increase cell adhesiveness to a mature endothelial layer [30], we expected that adhesion of BMDC could occur more rapidly on CH-PC-E2 when compared to CH-PC and fibronectin. Cell adhesion on fibronectin is known to occur by specific recognition of integrin receptors while chitosan-based polymer can mediate cell adhesion through electrostatic interactions. [40, 41] E2 conjugated to the CH structure can modify its physical property. It was demonstrated that the porosity of CH structure can be modified when it was associated with other molecule. [42] Perhaps E2, a highly hydrophobic molecule when conjugated to the polymer can modify the global hydrophobicity of the complex or increased the charge repulsion impairing or reducing charge attraction with the cellular membrane. These changes in charges are certainly not extensive as cell adhesion was only delayed but not abrogated on CH-PC-E2 and no difference in global cell organisation in CFU over time between both CH-based matrixes was observed. As CFU in progenitor cell cultures are an indirect measure of stem cells number, their presence and growth over the 2 weeks period suggest that CH-PC based polymers support the survival and amplification of progenitors among the BMDC as well as fibronectin. Conversely, in our cell system, soluble E2 at the testing concentrations or

E2 conjugated polymer did not lead to a higher global cell proliferation nor increase colony formation compared to CH-PC polymer alone or to fibronectin. However the CH-PC-E2 promotes tubules formation in CFU interspace while fibronectin favor cobblestone shape cells, an observation that we have previously reported also in the case of CH-PC. By itself, the physico-chemical properties of a supporting matrix may impact on the three-dimensional microenvironment thought to influence/control genes and properties that define « stemness » of the stem cells, i.e. self-renewal or development to committed cells. [51] Indeed, cell organization/interaction could directly influence the production of several factors such as the presence of angiogenic factors. Progenitor cells secrete angiogenic cytokines such as VEGF and G-CSF which might favour angiogenesis and tubule formation. [43] Modification of cell organisation between CFU could also result from changes in the extracellular matrix mechanical properties. Indeed, variations of mechanical tension in the three-dimensional tissue pattern can define how neighbouring cells localize and differentiate. [46-50]

In a previous study, we have demonstrated in a whole bone marrow culture system developed by our laboratory, that E2 influenced physiologically, the dynamism of bone marrow stem cell niches by regulating gene expression in both CD117⁺ and mesenchymal cells. [44] This suggested that E2 action is executed through different biological processes including highly crucial ones known to influence the functional organization of stem cell niches like: the inflammatory response, regulation of cell cycle, apoptosis, cell proliferation, cell differentiation, cell growth and/or maintenance, cell adhesion and finally

chemotaxis. E2 is known to increase mitogenic activity of endothelial cells but on the contrary, it inhibits the proliferation of smooth muscle cells. [11] Thus, in a mixed population of cells, the mitogenic effects of E2 on specific cell types among BMDC could be compensated by its anti-proliferative effect on others giving an overall undetectable amplification by global cell count. Various studies have demonstrated that E2 increases the number of circulating EPC *in vivo* and cell proliferation *in vitro*. [4, 52] It also acts as a survival agent by reducing apoptosis rate of EPC *in vitro*. [52] We thus investigated its capacity to reduce cell mortality rate. In our cell culture system, soluble E2 at 10^{-9} M was the only effective dose to reduce the mortality rate from the one observed on CH-PC alone after a 7-days period. This reduced mortality rate contributes to the increased cell proliferation. Remarkably, at day 14, CH-PC-E2 was more effective to reduce mortality rate of BMDC compared to CH-PC with soluble E2 at 10^{-9} M and 10^{-10} M. The bioavailability of the active form of E2 could be different in time and concentration in a conjugated concept compared to a soluble added form. The constant E2 accessibility to BMDC resulting from the progressive degradation of the polymer could expose the cells to a more constant source of hormone especially when cells get confluent like in colonies. This could contribute to lower the mortality rate on CH-PC-E2 compared to the soluble form.

In this study, BMDC had different behaviour dependant on stimulation by soluble E2 or by the polymer E2-conjugated form. We demonstrated that E2 conjugated CH-PC biopolymer supported the survival and the amplification of EPC among BMDC in a mixed

cultured system were haematopoietic c-kit (CD117) and mesenchymal (CD44) cells co-existed. EPC are considered major players in the vascular healing process as their mobilization to lesion site and their integration into the vascular wall contribute to reendothelialization. [23, 32, 33] We demonstrate that soluble E2 increased the proportion of EPC compared to CH-PC alone but surprisingly was less effective to doing so at all tested doses than E2 conjugated CH-PC. It was reported that a gel of chitosan and a chitosan-polyester polymer can promote mesenchymal cells amplification. [60, 61] In our results, the higher proportion of EPC on CH-PC-based polymers compared to fibronectin suggests that this matrix was compatible with BMDC and can promote survival and amplification of mesenchymal cells as well as haematopoietic cells. Conjugated E2 directly on the CH-PC was more effective to promote EPC than soluble E2. Indeed, it was shown that FGF conjugated on polymer was more efficient to stimulate a fibroblast response compared to the polymer alone with added soluble FGF. [62] The three-dimension structure of the CH-PC-E2 polymer [63] and the continuous release of E2 can influence progenitor cells behaviour. However in previous work, E2 treatments have been shown to increase VEGF gene expression in c-kit⁺ cells which could also contribute to promote cell proliferation. [44, 45]

To contribute to the vascular healing and reendothelialization processes after their recruitment to the polymer, BMDC should be allowed to migrate through the matrix. Therefore, cell migration through the polymer is a key point for future therapeutic applications even if the chitosan-based polymer is a temporary and biodegradable cell

support. It was reported that chitosan polymer degradation occurred in few days. [56] It is a relatively short period to promote vascular repair but bioavailable E2 could accelerated wound healing process. Estrogens, by their capacity to promote EPC mobilization, represent a promising therapeutic agent to accelerate the reendothelialization process at the lesion site. [57, 58] In our system, BMDC migration induced by E2 was still effective through CH-PC and CH-PC-E2. It appeared that E2 concentration released by CH-PC-E2 polymer was not enough to prevent chemoattractant effect of soluble E2. Electrostatic interactions between cationic charges on polymer and cell surface anionic charges could slow down the kinetic of cell migration when compared with fibronectin. [59] These results indicated that CH-PC-E2 polymer could promote cell mobilisation and recruitment to improve reendothelialization process by circulating EPC in a drug delivery system.

Recently, it has been shown that estrogens accelerate recovery of the endothelium and attenuate medial thickening after carotid artery injury, in part by augmenting the mobilization and proliferation of bone-marrow-derived EPC and their incorporation into the recovering endothelium at the site of injury. [4, 52] It was established that ER- α and ER- β activation were responsible for tissue incorporation of EPC and preservation of cardiac function after myocardial infarction. [53] It was also reported in a vascular injury model in ER- $\alpha^{-/-}$ and ER- $\beta^{-/-}$ mice that estrogens effects on EPC activation was mediated prominently via ER- α rather than ER- β , even if the exact role of both receptors remain to be investigated. [31, 54, 55] To evaluate if the variation in cell response on the different matrixes could be linked to modulation of ER- α expression in BMDC, cells grown on CH-

PC-based polymers were analyzed by western blot. ER- α expression was transiently increased on CH-PC-E2 after one week to reach a level comparable in all cell culture conditions after two weeks. This result indicated that BMDC could be activated by a stimulation of E2 conjugated CH-PC and potentially be attracted by the polymer delivered at the lesion site. Moreover, distinctive cell responses following a treatment with soluble or polymer conjugated E2 could be explained by the different modulation of ER- α expression.

A remarkable advantage would be to improve BMDC survival and effectiveness in a vascular therapeutic cell deliver system. CH-based polymers were developed for their potential as vehicle for cell delivery or cell recruitment to favour the reendothelialization. CH-PC-E2 appears to possess important characteristics to improve efficacy of cell-based vascular therapy by promoting progenitor cell survival and amplification.

2.2.1.6 Conclusion

This study underlines the potential of CH-PC-E2 biopolymer to support the cell organization and the amplification of BMDC in a mixed culture system maintaining the heterogeneity of the cell populations. Most importantly, the haematopoietic and progenitor cells amplification was remarkably elevated on E2 associated CH-PC compared to CH-PC with the soluble E2 form. Moreover, CH-PC-E2 polymer did not abrogate the capacity of BMDC to migrate toward a chemoattractant signal from E2. This biopolymer was found to be compatible with progenitor cells and may become a promising drug delivery system for EPC recruitment *in vivo* to promote vascular healing.

2.2.1.7 Acknowledgements

The authors wish to acknowledge Louis Villeneuve from the confocal microscopy service of the Montreal Heart Institute and Julie Lebel for her dedicated work with the western blot analysis.

2.2.1.8 References

- [1] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* 2004 Aug 20;95(4):343-53.
- [2] Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, Kahler CM, Grunewald K, Stockhammer G, et al. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet.* 2000 May 13;355(9216):1688-91.
- [3] Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, et al. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res.* 2003 Nov 14;93(10):980-9.
- [4] Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation.* 2003 Jun 24;107(24):3059-65.
- [5] Kong D, Melo LG, Gneccchi M, Zhang L, Mostoslavsky G, Liew CC, et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation.* 2004 Oct 5;110(14):2039-46.
- [6] Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, et al. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2005 Aug;12(4):407-14.
- [7] Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation.* 2002 Nov 26;106(22):2781-6.

- [8] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001 Jul 6;89(1):E1-7.
- [9] Chandrasekar B, Sirois MG, Geoffroy P, Lauzier D, Nattel S, Tanguay JF. Local delivery of 17beta-estradiol improves reendothelialization and decreases inflammation after coronary stenting in a porcine model. *Thromb Haemost*. 2005 Nov;94(5):1042-7.
- [10] Chandrasekar B, Tanguay JF. Local delivery of 17-beta-estradiol decreases neointimal hyperplasia after coronary angioplasty in a porcine model. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Nov 15;36(6):1972-8.
- [11] Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF. Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Oct 1;22(10):1585-90.
- [12] Geraldes P, Sirois MG, Tanguay JF. Specific contribution of estrogen receptors on mitogen-activated protein kinase pathways and vascular cell activation. *Circ Res*. 2003 Sep 5;93(5):399-405.
- [13] Muzzarelli RA, Mattioli-Belmonte M, Tietz C, Biagini R, Ferioli G, Brunelli MA, et al. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials*. 1994 Oct;15(13):1075-81.
- [14] Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(24):2589-98.
- [15] Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, et al. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*. 2003 Nov;24(26):4833-41.
- [16] Zhang L, Ao Q, Wang A, Lu G, Kong L, Gong Y, et al. A sandwich tubular scaffold derived from chitosan for blood vessel tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2006 May;77(2):277-84.

- [17] Chandy T, Rao GH, Wilson RF, Das GS. Development of poly(Lactic acid)/chitosan co-matrix microspheres: controlled release of taxol-heparin for preventing restenosis. *Drug Deliv.* 2001 Apr-Jun;8(2):77-86.
- [18] Fujita M, Ishihara M, Morimoto Y, Simizu M, Saito Y, Yura H, et al. Efficacy of photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 in a rabbit model of chronic myocardial infarction. *J Surg Res.* 2005 Jun 1;126(1):27-33.
- [19] Tiera MJ, Qiu XP, Bechaouch S, Shi Q, Fernandes JC, Winnik FM. Synthesis and characterization of phosphorylcholine-substituted chitosans soluble in physiological pH conditions. *Biomacromolecules.* 2006 Nov;7(11):3151-6.
- [20] Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):702-12.
- [21] Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development.* 1997 May;124(10):2039-48.
- [22] Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development.* 1998 May;125(9):1747-57.
- [23] Fazel S, Cimini M, Chen L, Li S, Angoulvant D, Fedak P, et al. Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1865-77.
- [24] Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Weissman IL. Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90(8):3760-4.
- [25] Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells.* 2006 Apr;24(4):928-35.

- [26] Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF. Estrogen-induced gene expression in bone marrow c-kit⁺ stem cells and stromal cells: identification of specific biological processes involved in the functional organization of the stem cell niche. *Stem Cells Dev.* 2008 Dec;17(6):1153-63.
- [27] Moiola EK, Clark PA, Chen M, Dennis JE, Erickson HP, Gerson SL, et al. Synergistic actions of hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells in vascularizing bioengineered tissues. *PLoS One.* 2008;3(12):e3922.
- [28] Fadini GP, Baesso I, Albiero M, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis.* 2008 Apr;197(2):496-503.
- [29] Ling S, Komesaroff P, Sudhir K. Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens. *Clin Sci (Lond).* 2006 Aug;111(2):107-18.
- [30] Fadini GP, de Kreutzenberg S, Albiero M, Coracina A, Pagnin E, Baesso I, et al. Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 May;28(5):997-1004.
- [31] Foresta C, Zuccarello D, Biagioli A, De Toni L, Prana E, Nicoletti V, et al. Oestrogen stimulates endothelial progenitor cells via oestrogen receptor-alpha. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007 Oct;67(4):520-5.
- [32] 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 Feb 14;275(5302):964-7.
- [33] Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res.* 2001 Feb 2;88(2):167-74.
- [34] 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 2;47(9):1786-95.

- [35] Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, Ong AT, McFadden EP, Sianos G, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *J Am Coll Cardiol*. 2005 May 17;45(10):1574-9.
- [36] Rotmans JJ, Heyligers JM, Verhagen HJ, Velema E, Nagtegaal MM, de Kleijn DP, et al. In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation*. 2005 Jul 5;112(1):12-8.
- [37] 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.
- [38] Abizaid A, Albertal M, Costa MA, Abizaid AS, Staico R, Feres F, et al. First human experience with the 17-beta-estradiol-eluting stent: the Estrogen And Stents To Eliminate Restenosis (EASTER) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Mar 17;43(6):1118-21.
- [39] Babapulle MN, Eisenberg MJ. Coated stents for the prevention of restenosis: Part I. *Circulation*. 2002 Nov 19;106(21):2734-40.
- [40] Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 1987 Oct 23;238(4826):491-7.
- [41] Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 2001 Feb;22(3):261-8.
- [42] Arpornmaeklong P, Suwatwirote N, Pripatnanont P, Oungbho K. Growth and differentiation of mouse osteoblasts on chitosan-collagen sponges. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Apr;36(4):328-37.
- [43] Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003 Mar 4;107(8):1164-9.

- [44] Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF. Estrogen-Induced Gene Expression in Bone Marrow c-Kit⁺ Stem Cells and Stromal Cells: Identification of Specific Biological Processes Involved in the Functional Organization of the Stem Cell Niche. *Stem Cells Dev.* 2008 Nov 12.
- [45] Ruifrok WP, de Boer RA, Iwakura A, Silver M, Kusano K, Tio RA, et al. Estradiol-induced, endothelial progenitor cell-mediated neovascularization in male mice with hind-limb ischemia. *Vasc Med.* 2009 Feb;14(1):29-36.
- [46] Matthews BD, Overby DR, Mannix R, Ingber DE. Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *J Cell Sci.* 2006 Feb 1;119(Pt 3):508-18.
- [47] Kumar S, Maxwell IZ, Heisterkamp A, Polte TR, Lele TP, Salanga M, et al. Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics. *Biophys J.* 2006 May 15;90(10):3762-73.
- [48] Parker KK, Brock AL, Brangwynne C, Mannix RJ, Wang N, Ostuni E, et al. Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *FASEB J.* 2002 Aug;16(10):1195-204.
- [49] Huang S, Ingber DE. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol.* 1999 Sep;1(5):E131-8.
- [50] Ingber DE, Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J Cell Biol.* 1989 Jul;109(1):317-30.
- [51] Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science.* 2000 Feb 25;287(5457):1427-30.
- [52] Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation.* 2003 Dec 23;108(25):3115-21.

- [53] Hamada H, Kim MK, Iwakura A, Ii M, Thorne T, Qin G, et al. Estrogen receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction. *Circulation*. 2006 Nov 21;114(21):2261-70.
- [54] Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, et al. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res*. 2002 May 31;90(10):1087-92.
- [55] Masuda H, Kalka C, Takahashi T, Yoshida M, Wada M, Kobori M, et al. Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circ Res*. 2007 Sep 14;101(6):598-606.
- [56] Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *J Surg Res*. 2006 Jun 15;133(2):185-92.
- [57] Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, et al. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation*. 2006 Mar 28;113(12):1605-14.
- [58] Brouchet L, Krust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation*. 2001 Jan 23;103(3):423-8.
- [59] Mao JS, Cui YL, Wang XH, Sun Y, Yin YJ, Zhao HM, et al. A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(18):3973-81.
- [60] Costa-Pinto AR, Salgado AJ, Correlo VM, Sol P, Bhattacharya M, Charbord P, et al. Adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of a mouse mesenchymal stem cell line (BMC9) seeded on novel melt-based chitosan/polyester 3D porous scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2008 Jun;14(6):1049-57.

- [61] Cho MH, Kim KS, Ahn HH, Kim MS, Kim SH, Khang G, et al. Chitosan gel as an in situ-forming scaffold for rat bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Tissue Eng Part A*. 2008 Jun;14(6):1099-108.
- [62] Nur EKA, Ahmed I, Kamal J, Babu AN, Schindler M, Meiners S. Covalently attached FGF-2 to three-dimensional polyamide nanofibrillar surfaces demonstrates enhanced biological stability and activity. *Mol Cell Biochem*. 2008 Feb;309(1-2):157-66.
- [63] Tillman J, Ullm A, Madihally SV. Three-dimensional cell colonization in a sulfate rich environment. *Biomaterials*. 2006 Nov;27(32):5618-26.

2.2.1.9 Figures

Figure 1

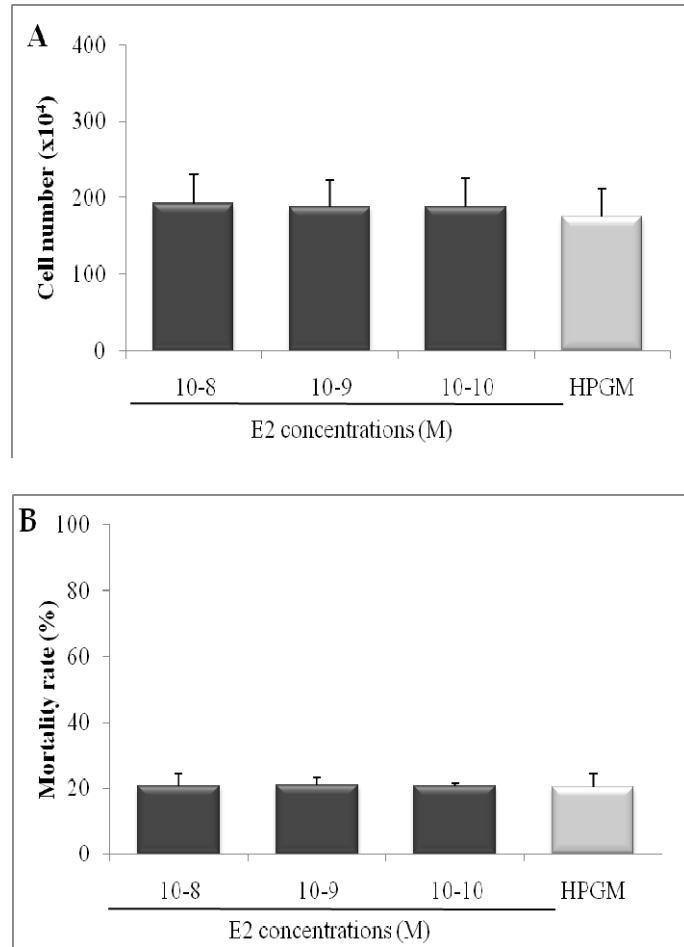


Figure 2

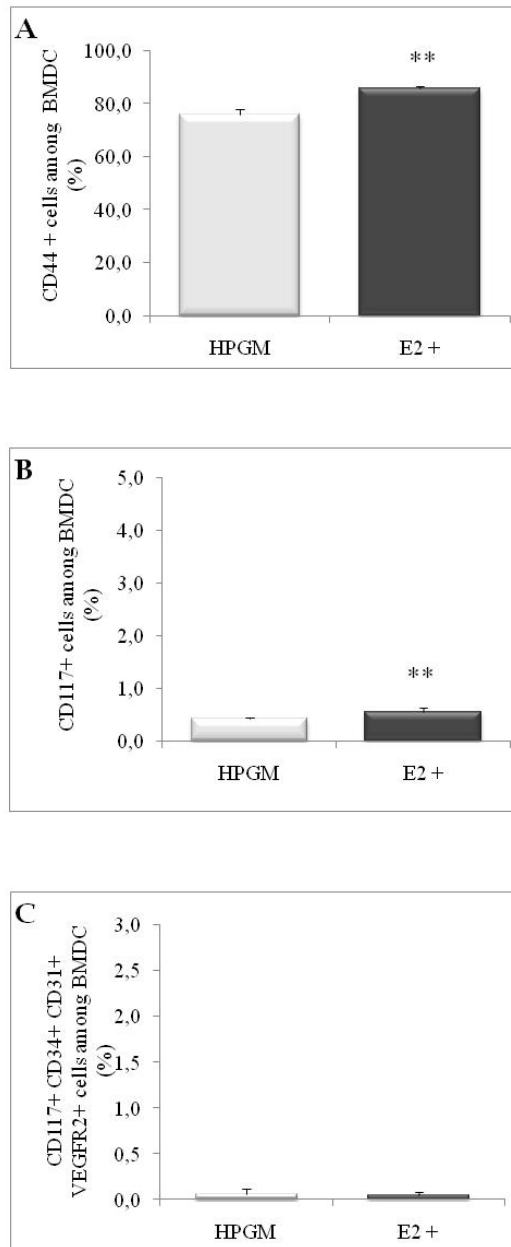


Figure 3

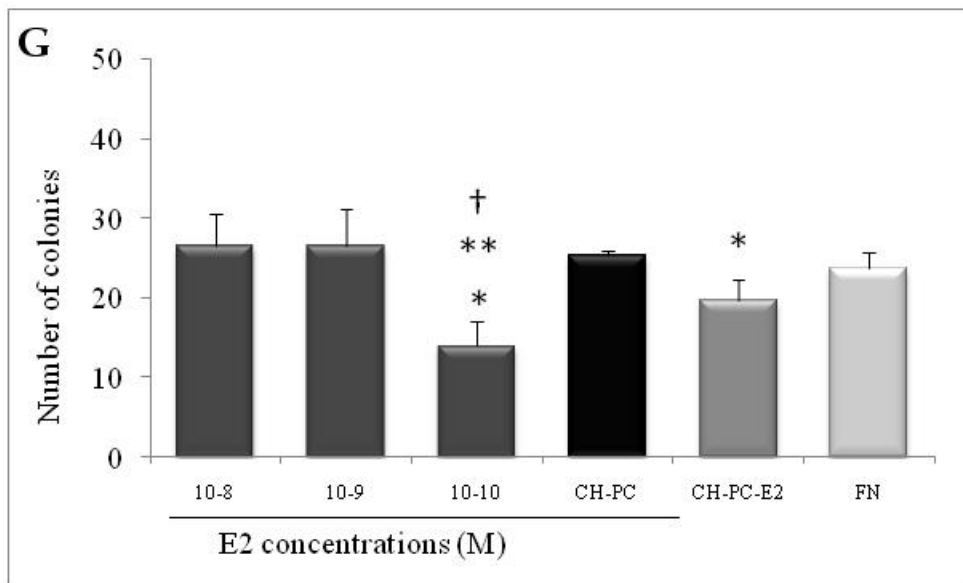
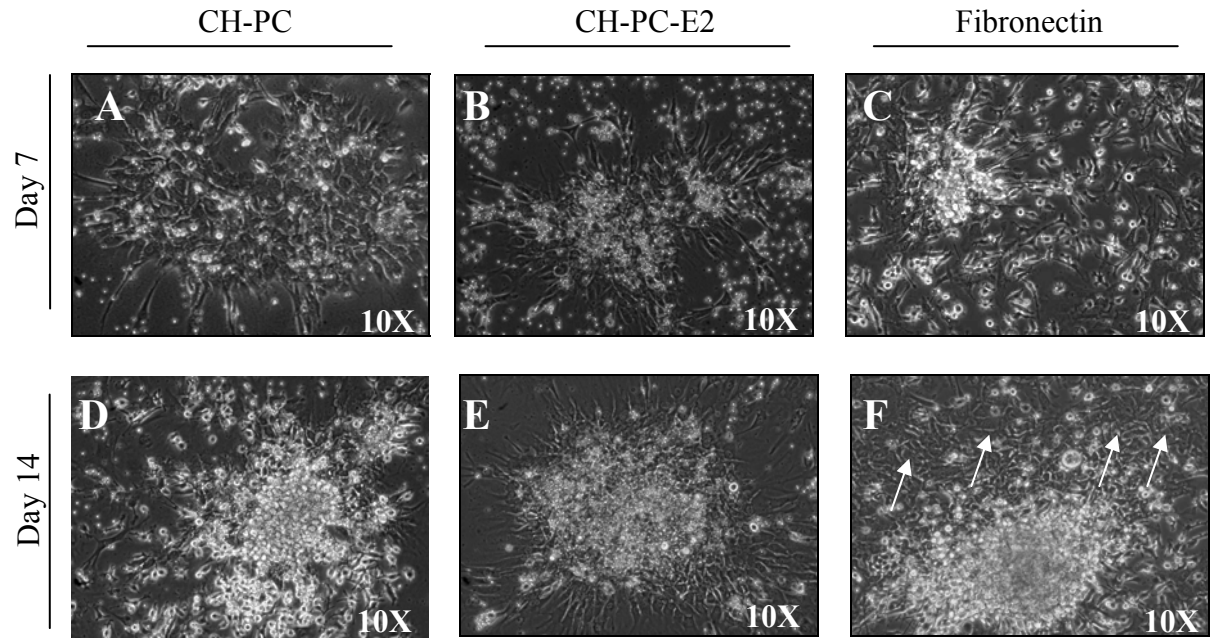
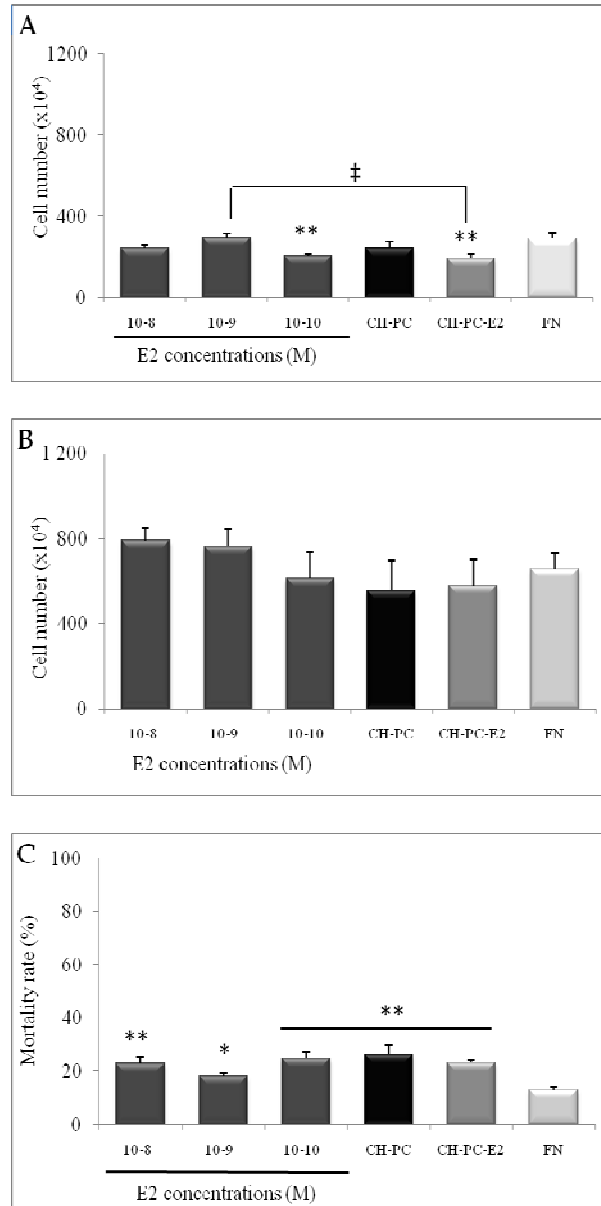


Figure 4



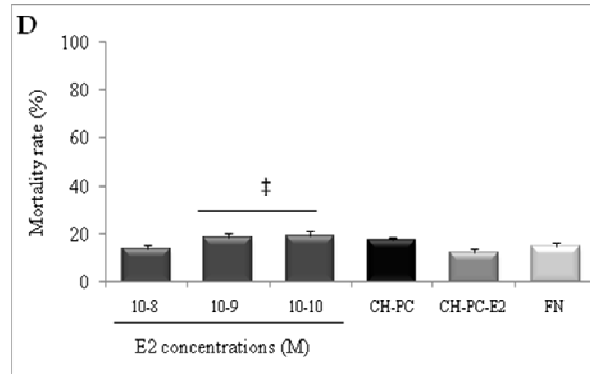
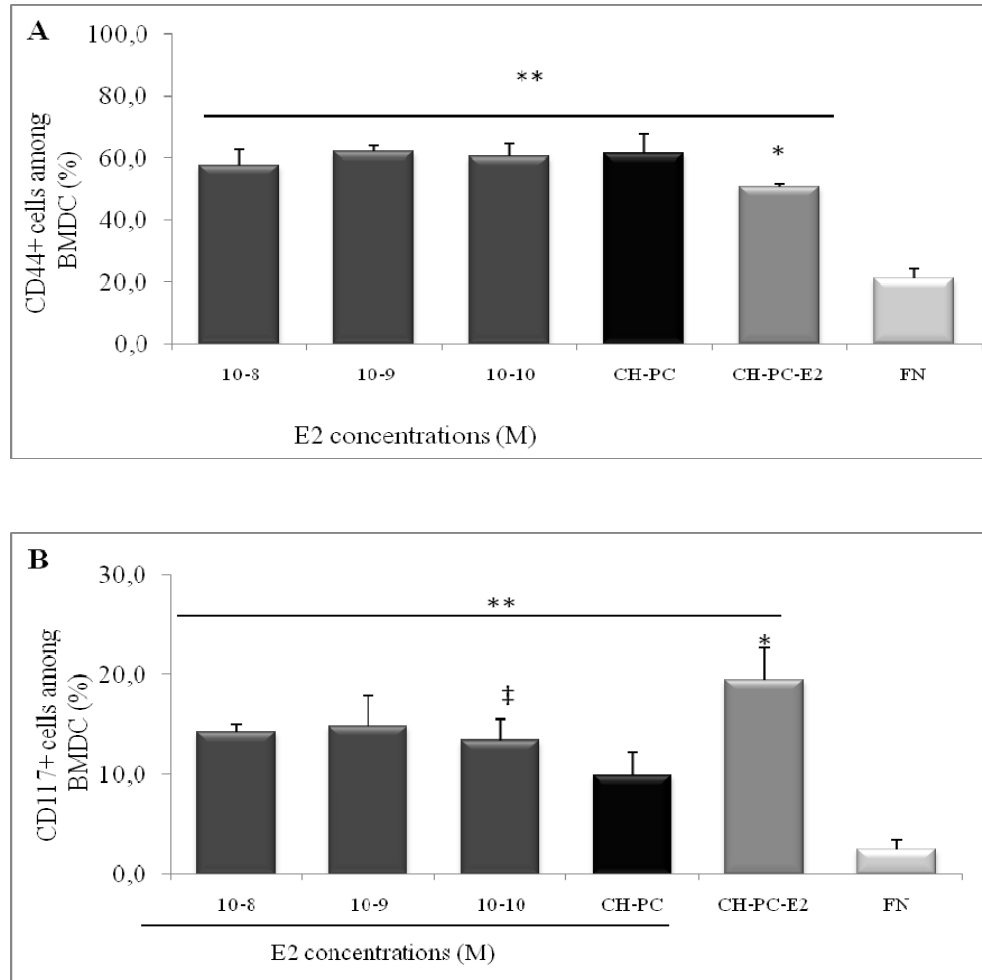


Figure 5



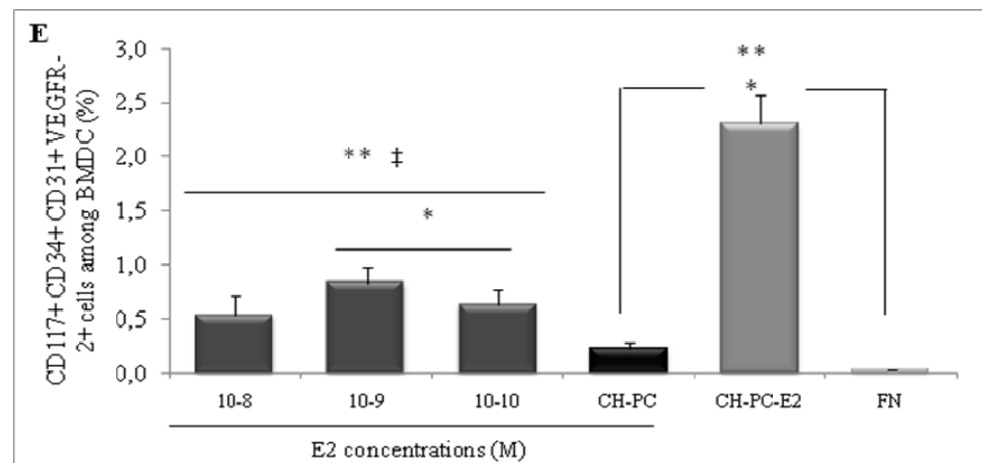
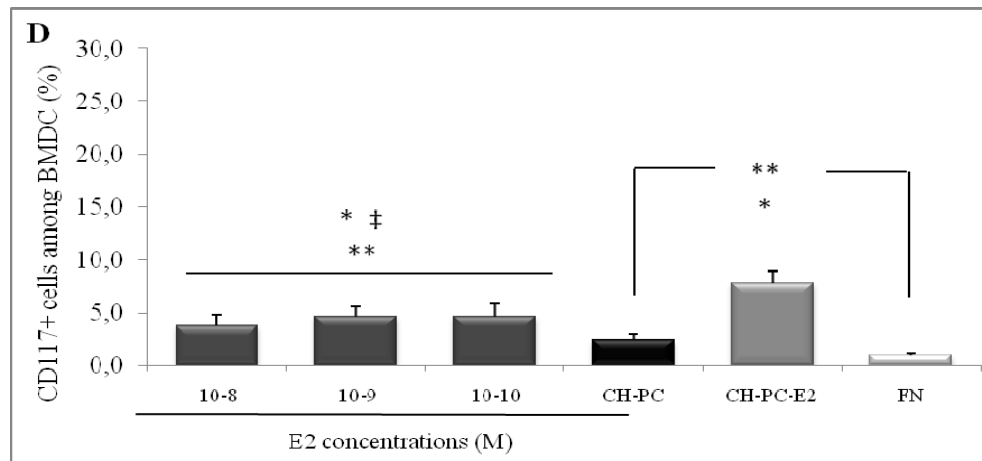
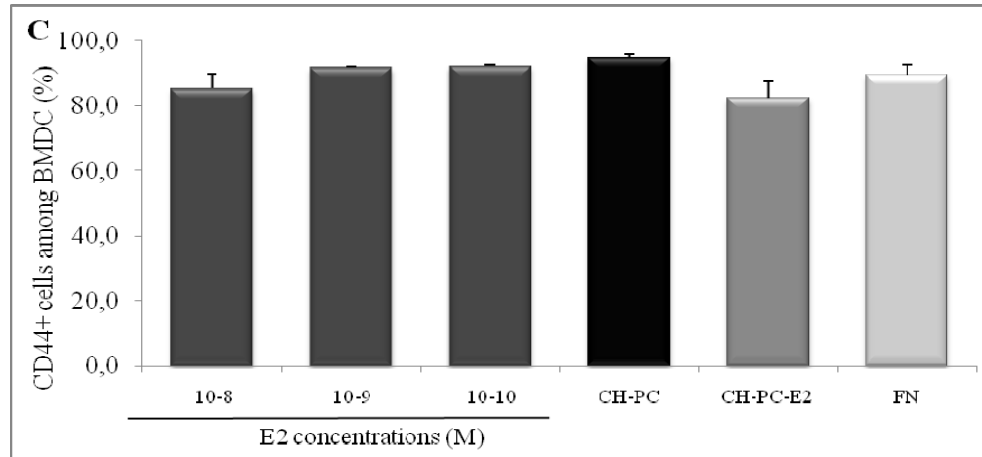


Figure 6

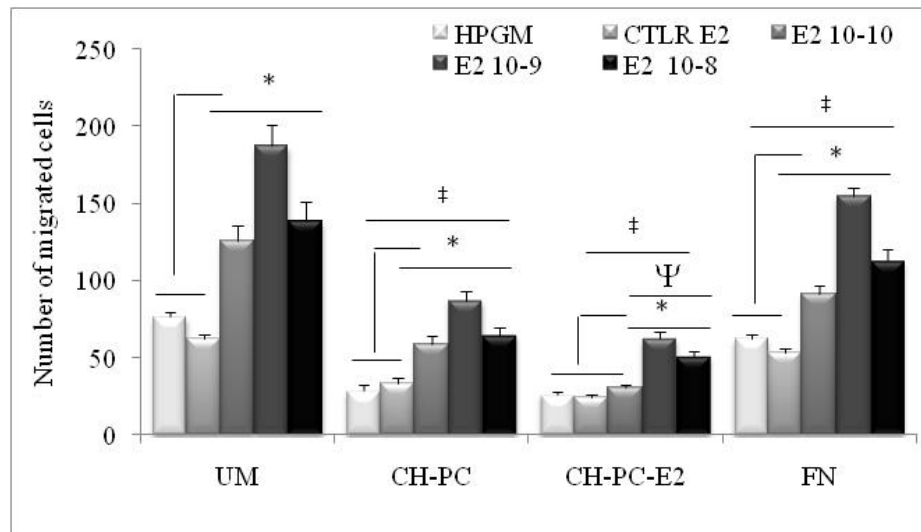
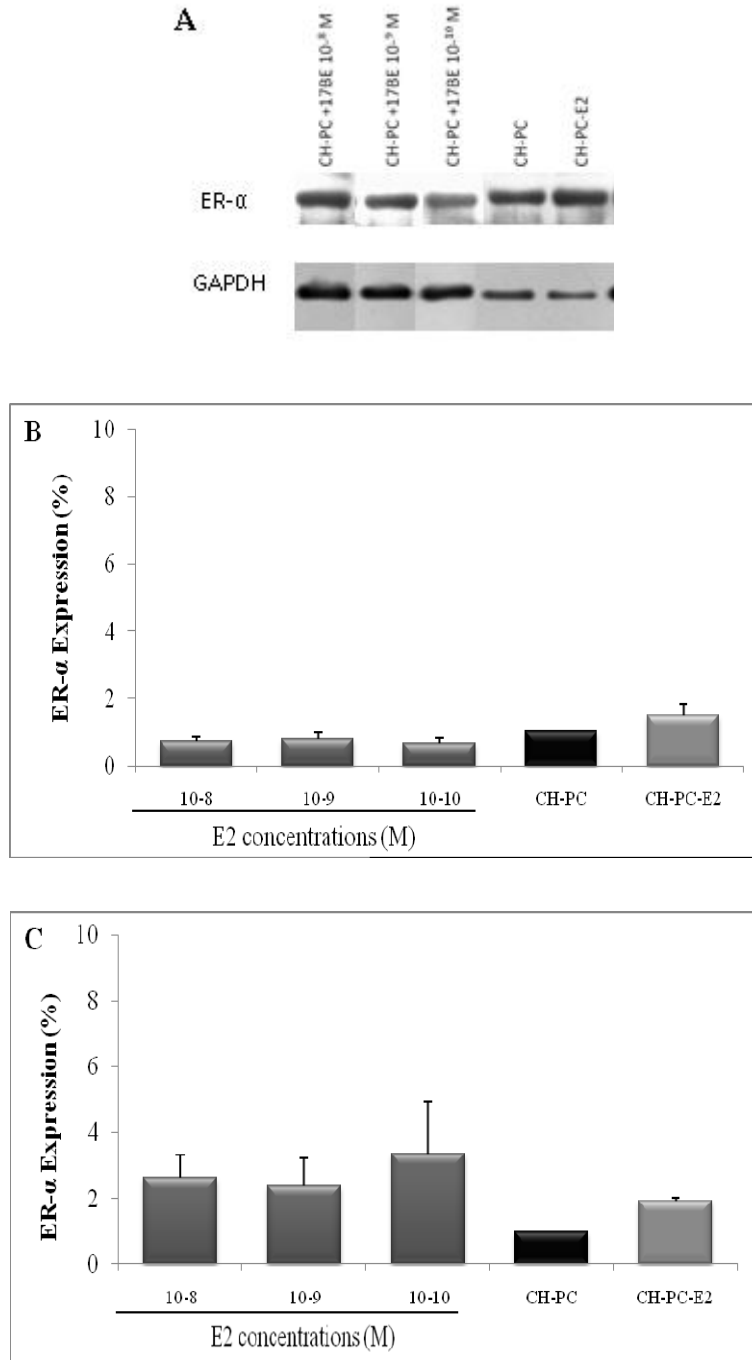


Figure 7



2.2.1.10 Legends

Figure 1. Dose-response curve effect of soluble E2 on BMDC cultivated on fibronectin. BMDC (A) proliferation and (B) mortality rate were evaluated after 14 days on fibronectin. Cell count was achieved after one week treatment with soluble E2. The representative results of 3 compiled experiences are presented.

Figure 2. Impact of E2 on the proportion define cell populations of BMDC grown on fibronectin.. Evaluation in flow cytometry following one week treatment with soluble E2 at 10^{-9} M of (A) mesenchymal cells (CD44⁺), (B) hematopoietic cells (CD117⁺) and (C) EPC (CD117⁺ CD34⁺ CD31⁺ VEGFR-2⁺) after a total period of 14 days in culture. The representative results of 3 experiences are presented. ** HPGM $p < 0.05$.

Figure 3: Survival, adhesion and organization of BMDC. Colony formation was observed after 7 and 14 days on (A-D) CH-PC, on (B-E) CH-PC-E2 and on (C-F) fibronectin (FN) matrixes. (10X). (G) Colony count was achieved after 14 days. The representative results of 4 compiled experiences are presented. ** FN $p < 0.05$, * CH-PC $p < 0.05$ and † CH-PC-with E2 at 10^{-9} M $p < 0.05$.

Figure 4. Dose-response curve effect of soluble E2 on BMDC cultivated on chitosan modified matrixes. BMDC (A-B) proliferation and (C-D) mortality rate were evaluated by cell count after 7 (A-C) and 14 (B-D) days with soluble E2. The representative results of 4 compiled experiences are presented. ** Fibronectin (FN) $p < 0.05$, * CH-PC $p < 0.05$ and ‡ CH-PC-E2 $p < 0.05$.

Figure 5. Analysis by flow cytometry of selected cell populations in CH-PC coated cultures. Evaluation in flow cytometry at day 7 and 14 of (A-C) mesenchymal (CD44⁺), (B-D) hematopoietic (CD117⁺) and (E) EPC (CD117⁺ CD34⁺ CD31⁺ VEGFR-2⁺) on fibronectin (FN), on CH-PC-E2 and on CH-PC with or without soluble E2. The results of 4 experiences are presented. ** FN $p < 0.05$, * CH-PC $p < 0.05$ and ‡ CH-PC-E2 $p < 0.05$.

Figure 6. Migratory activity of BMDC. Cell Migration through uncoated membrane (UM), membrane coated with fibronectin (FN), CH-PC or CH-PC -E2 in response to soluble E2. The representative results of 3 compiled

experiences are presented. * $p < 0,05$ vs ctr E2 10^{-9} M and HPGM., ‡ $p < 0,05$ vs same stimulation on FN and UM and Ψ $p < 0,05$ vs same stimulation on CH-PC.

Figure 7. ER- α protein expression. Western immunoblots probed with antibodies against (A) ER- α and GAPDH was performed. ER- α expression was evaluated after (B) 7 and (C) 14 days with soluble E2. The representative results of 3 compiled experiences are presented.

3.0 Discussion

L'objectif global de ces travaux de maîtrise était de déterminer le potentiel d'un polymère à base de CH à favoriser la survie ainsi que la fonctionnalité des cellules progénitrices dérivant de la MO murine. Les biopolymères de CH représentent des véhicules potentiellement forts intéressants pour effectuer la livraison de cellules ou d'agents thérapeutiques dans un vaisseau sanguin. En effet, les CEP de notre modèle de culture cellulaire de MO complète constituent une source prometteuse de cellules progénitrices pouvant être livrées à un site de lésion vasculaire. Ainsi, leur dépôt directement au site de lésion à l'aide d'un biopolymère assurerait la livraison d'un nombre élevé de cellules de même que leur maintien au site de réparation et ce, sans l'apposition d'une endoprothèse permanente.

Le premier objectif de ces travaux nous a permis de démontrer qu'une matrice de CH-PC est compatible avec les cellules progénitrices dérivées de la MO et qu'elle peut supporter leur croissance. L'organisation complexe de la MO est attribuable à l'interaction entre les divers types cellulaires ainsi qu'avec la matrice extracellulaire créant un microenvironnement adéquat au maintien des cellules souches. Dans notre modèle *in vitro*, l'hétérogénéité cellulaire ainsi que l'organisation fonctionnelle des CDMO sont maintenues sur le polymère CH-PC de façon similaire à la matrice de fibronectine. Le potentiel du CH-PC dans une approche de thérapie cellulaire basée sur les CEP a particulièrement été mis en évidence par nos travaux qui ont démontré une augmentation de la proportion des cellules hématopoïétiques c-kit⁺ ainsi que des CEP parmi les cellules en croissance sur cette matrice.

Dans le cadre du second objectif de nos recherches, nous avons démontré que l'E2 en particulier lorsqu'il est associé à un polymère de CH-PC, favorise encore d'avantage la population c-kit⁺ de laquelle sont issues les CEP. L'E2 augmente la proportion des cellules c-kit⁺ tout en ayant une influence mineure sur la proportion des cellules du stroma. Cependant, l'E2 influence le dynamisme des cellules de la MO en régulant à la fois, le profil d'expression génique des cellules c-kit⁺ et des cellules stromales.²¹³ Nous avons pu

faire ressortir par cette étude que la matrice de CH-PC en présence de l'E2 sous sa forme soluble ne reproduit pas le même microenvironnement que celui retrouvé lors de l'ensemencement des CDMO sur le CH-PC-E2.

3.1 Le chitosan: modulation de la réparation vasculaire par les cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse

Les biopolymères sont des outils thérapeutiques permettant l'accélération de la guérison de divers tissus. L'ingénierie tissulaire permet aujourd'hui la reconstruction de vaisseaux sanguins complets ainsi que la réendothélialisation des vaisseaux lésés par l'emploi de stratégies variées. De très nombreuses études de thérapies cellulaires sont menées afin de déterminer le potentiel régénérateur des CEP au niveau cardiaque. Au niveau de l'endothélium vasculaire, plusieurs stratégies sont également en développement. L'utilisation de biopolymère biodégradable semble une stratégie idéale puisqu'elle permet la réparation vasculaire tout en prévenant les complications liées à la présence de biomatériau permanent. Une issue clé dans la conception des interventions thérapeutiques afin de prévenir la dysfonction endothéliale est de comprendre comment l'endothélium dénudé est remplacé et d'identifier les sources cellulaires possibles qui participent à sa régénération.

3.1.1 L'inflammation et la thrombose

La dysfonction endothéliale joue un rôle déterminant dans l'apparition de plaques d'athérosclérose. Initialement l'activation de l'endothélium conduisant à l'expression des molécules d'adhésion ainsi qu'à l'augmentation de la perméabilité endothéliale. L'infiltration de monocytes résulte en l'instauration d'une réaction inflammatoire chronique pouvant mener à la rupture de la plaque et ultimement à la formation d'un thrombus. Les études récentes démontrent que l'inflammation et l'apoptose jouent des rôles très importants dans la rupture/érosion de la plaque athérosclérotique et dans sa

thrombogénicité. Ces étapes du développement de l'athérosclérose sont donc des cibles adéquates dans la prévention de l'athérosclérose ainsi que dans la promotion de la guérison vasculaire.

L'une des approches envisagées en thérapie vasculaire est l'application locale d'une matrice biodégradable qui permettrait de réduire le recrutement des cellules inflammatoires et de plaquettes en surface des lésions athérosclérotiques. En effet, l'application d'une microcouche de polymère comme le CH-PC pourrait limiter l'exposition des molécules d'adhésion et le recrutement des leucocytes à l'endothélium activé et de ce fait, la sécrétion de molécules pro-inflammatoires. L'utilisation de polymères adéquats permettrait ainsi de réduire l'inflammation sans empêcher le recrutement des cellules progénitrices.

L'utilisation de polymères pourrait contribuer également à relever d'autres défis auxquels les stratégies actuelles de thérapies cellulaires se heurtent incluant des difficultés de livraison, de rétention et d'intégration des cellules progénitrices aux sites visés.²¹⁴ Les sites de blessures offrent un environnement hostile pour les cellules saines qui s'y établissent en raison de la surveillance immunitaire intensifiée ainsi que de la grande concentration de cytokines inflammatoires. L'incorporation dans les biomatériaux de molécules permettrait de moduler la réaction immunitaire pour limiter le rejet de l'implant cellulaire ou favoriser le recrutement et le maintien au site des progéniteurs.

Ainsi, les stratégies les plus intéressantes pour favoriser la guérison vasculaire doivent préconiser la réduction de l'inflammation ainsi que la reconstruction d'un endothélium intact offrant une surface anti-thrombogénique. D'ailleurs, la pré-endothélialisation *in vitro* des implants fut suggérée pour créer une barrière anti-thrombogénique afin de prévenir l'obstruction par la formation d'un thrombus.^{215, 216} L'occlusion thrombogénique des microconduits ou des micropores dans les biomatériaux peut maintenant être évitée par l'incorporation de molécules anti-thrombogénique dans la structure de ces biomatériaux. Par exemple, certains matériaux comme le polytétrafluoroéthylène peuvent contenir de l'héparine ce qui favorise la

réendothélialisation et empêche la formation de thrombus.²¹⁷ De plus, pour faciliter ces processus, l'application d'un biopolymère auquel un chemoattractant aurait été incorporé comme dans le cas du CH-PC-E2, permettrait de favoriser la mobilisation et le recrutement des CEP circulantes et d'accélérer la réendothélialisation. La synergie entre les effets induits par le polymère et le ou les agents thérapeutiques incorporés doit être maximisée pour favoriser leur potentiel thérapeutique dans la réparation vasculaire.

3.1.2 Les processus de réendothélialisation

La surface des biopolymères doit présenter une texture idéale afin de promouvoir l'attachement cellulaire sans être thrombogénique. Les biopolymères sont sélectionnés dans le but de reproduire les propriétés viscoélastiques des vaisseaux naturels autant que pour favoriser la croissance des CEP et des CML afin de générer une greffe biomimétique. Pour ce faire, de récentes techniques de fabrication des biopolymères ont été employées. Par exemple, l'électrospinning qui est une technique permettant la production de micro- et nanofibres à partir de solutions de polymères. Elle génère un intérêt croissant grâce aux multiples applications éventuelles de ces fibres dans des domaines variés tels que la livraison de médicaments, les membranes "intelligentes" et les nanocomposites²¹⁸

L'utilisation des polymères à base de CH en particulier de CH-PC comme véhicule cellulaire pour favoriser la réendothélialisation est très intéressante. En effet, les biopolymères de CH-PC représentent une matrice idéale afin de soutenir autant la livraison que l'ancrage de cellules comme les CEP. D'ailleurs, ils pourraient faciliter la réendothélialisation par les CEP chez les personnes âgées et celles atteintes de maladies cardiovasculaires. En effet, il fut observé que les CEP des patients à risque de développer une maladie cardiovasculaire présentaient une capacité diminuée à former des colonies et donc un potentiel prolifératif limité.¹¹⁷ Les CEP de ces mêmes patients sont retrouvées en nombre restreint comparativement aux personnes saines ce qui peut contribuer à une réparation vasculaire moins efficace.^{112, 122} De plus, chez les personnes âgées ou atteintes

de maladies cardiovasculaires, les CEP ne sont plus aussi efficacement mobilisées et incorporées au site de lésion. L'amplification *in vitro* de CDMO constituant un réservoir de CEP et leur livraison à l'aide d'un polymère biodégradable seraient des façons de contourner ces problèmes et d'accélérer la réendothélialisation vasculaire. En effet, la réendothélialisation avec une monocouche de CEP s'avère posséder les mêmes propriétés anti-thrombogéniques que celle de CE matures.²¹⁹

Un autre point important à considérer dans une approche de thérapie cellulaire basée sur les cellules progénitrices est le processus de différenciation. Une étude a récemment démontré que l'environnement physique influence la différenciation des cellules mésenchymales.²²⁰ Il est donc nécessaire d'avoir un polymère guidant adéquatement la différenciation des cellules en un type cellulaire spécifique. Les signaux mécaniques comme les stress locaux (extensibilité, compression, cisaillement), la topographie ainsi que le contact cellule-cellule ont une influence directe sur les cellules mésenchymales.²²⁰ De plus, les groupes fonctionnels à la surface des biopolymères sont suffisants pour induire une modulation de la différenciation cellulaire. Par exemple, les surfaces modifiées avec les groupes CH₃ supportent le maintien des cellules mésenchymales. D'autre part, des modifications avec les groupes NH₂ et SH favorisent la différenciation ostéogénique alors que les surfaces modifiées avec les groupes COOH et OH favorisent la différenciation chondrogénique.²²¹ L'exploration des interactions des cellules progénitrices avec leur microenvironnement est nécessaire pour comprendre comment les biopolymères peuvent reproduire le contrôle de la délicate régulation de la différenciation des cellules progénitrices.

3.1.3 Polymères biodégradables

Dernièrement, le développement de biomatériaux a permis la création de supports intelligents pouvant répondre à des stimuli spécifiques comme la température²²², le pH²²³, les signaux électriques²²⁴, la lumière²²⁵ et certains métabolites comme le glucose²²⁶.

Ceux-ci pourraient être employés dans le contrôle de la relâche de drogue, de l'adhérence cellulaire et de leurs paramètres mécaniques comme la perméabilité, le volume et la conductivité électrique. Dans l'ingénierie tissulaire de la peau, des os aussi bien que des nerfs ou des vaisseaux sanguins, la structure en trois dimensions des polymères confère une meilleure colonisation des supports rigides. Certains polymères comme le CH, sont utilisés dans la composition d'hydrogel permettant la livraison progressive d'agents thérapeutiques. Bien qu'ils possèdent une flexibilité ainsi qu'une composition les rendant naturellement compatibles avec les tissus, ces hydrogels sont comparables aux endoprothèses vasculaires permanentes et demeurent dans les vaisseaux. Les endoprothèses vasculaires biodégradables, bien que nouvellement préconisées sont en développement depuis près de deux décennies. La première endoprothèse vasculaire biodégradable était composée d'acide polylactique. Ce polymère, dans certaines des études initiales *in vivo*, a révélé l'induction d'une réponse inflammatoire et thrombotique minimale ainsi qu'une croissance néointimale modérée.^{227, 228} Par la suite, d'autres polymères furent utilisés comme l'acide D-polylactique qui, lorsque testé dans un modèle porcin, a induit une prolifération néointimale moyenne.²²⁹ Certains polymères biodégradables ont malheureusement entraîné des effets néfastes parfois reliés au type de polymère ou à sa préparation. Par exemple, l'acide polyglycolique utilisé dans un modèle canin démontra la formation de thrombus.²³⁰ Le CH fut également utilisé sous forme d'endoprothèse vasculaire biodégradable et permis de réduire efficacement la formation de la néointima ainsi que la prolifération cellulaire dans un modèle de lapin.²³¹ Cependant, ces études ne mentionnent pas si la réendothélialisation des vaisseaux était adéquate.

3.1.4 Recrutement ou livraison cellulaire au site de lésion

Dans la réparation vasculaire avec les biopolymères à base de CH deux options sont offertes soit la livraison cellulaire ou encore l'induction du recrutement de CEP au site de lésion. L'utilisation des cellules progénitrices dans la réparation tissulaire a permis l'élaboration de différentes stratégies de livraison cellulaire. Premièrement, l'amplification

ex vivo des cellules, leur différenciation en un type cellulaire spécifique puis leur ensemencement sur un biopolymère implanté au site cible. Deuxièmement, la différenciation cellulaire directement sur le polymère puis leur implantation dans un vaisseau. Troisièmement, les cellules souches partiellement différenciées *in vitro* pourraient être implantées avec le polymère. Par la suite, ces cellules migreraient dans les régions environnantes de l'implant pour terminer leur différenciation *in vivo* et contribuer à la réparation d'une région lésée étendue. Finalement, l'injection d'hydrogel ou de polymère biodégradable sous forme liquide contenant les cellules est très attrayante puisqu'elle s'appliquerait aussi bien à la réparation de tissus mous qu'au traitement de tissus durs souvent trop fragiles pour supporter une intervention chirurgicale.²¹⁴ D'ailleurs, les polymères à base de CH-PC évalués durant cette étude, pourraient être utilisés pour cette dernière application puisqu'ils sont solubles à pH physiologique contrairement à la plupart des polymères utilisés pour recouvrir les endoprothèses.

De plus, les polymères à base de CH pourraient permettre le recrutement cellulaire au site de lésion par la relâche de molécules bioactives solubles comme les facteurs de croissance ou les hormones et pourraient agir de façon paracrine. Les nanotechnologies permettent de nouvelles conceptions de biopolymères dans l'ingénierie tissulaire fonctionnelle avec des facteurs bioactifs (agents thérapeutiques, protéines, ou les acides nucléiques). Plutôt que d'intégrer directement les facteurs dans la structure du polymère lors de sa fabrication, ces facteurs peuvent être encapsulés dans des nanoparticules qui seront formées de couches multiples de polymères complémentaires par exemple de CH et de HA. Ce type de système de livraison de drogues offre plusieurs avantages comme 1) la sélection spécifique des nanoparticules afin de réguler la relâche des facteurs puisque celle-ci dépend de la vitesse de dégradation du polymère, de la grosseur, de la densité ainsi que de la nature des nanoparticules, 2) les facteurs peuvent être protégés de la dégradation externe, un critère important en particulier pour les agents labiles comme les facteurs de croissance; 3) l'encapsulation dans les nanoparticules peut également résoudre le problème de l'incompatibilité des solvants dans lesquels les agents doivent être solubilisés.²¹⁴ Les

différents polymères à base de CH évalués dans cette étude, principalement le CH-PC-E2, pourraient être utilisés pour la livraison cellulaire ou d'agent thérapeutique puisqu'il permet de résoudre le problème de l'insolubilité de l'E2 utilisé seul. En effet, l'E2 retrouvé complexé au polymère serait relâché lors de sa dégradation et pourrait promouvoir la survie des cellules déposées en plus de recruter des nouvelles cellules en circulation. D'ailleurs, avec ce projet, il est envisageable d'étudier l'utilisation de CH-PC en alternance avec le HA pour former soit des nanoparticules dans lesquelles l'E2 serait encapsulé en son centre et relâché lors de la dégradation des nanoparticules ou encore, l'emploi de micelles formées de CH-PC-E2 et de HA et ce afin d'effectuer une livraison locale d'E2 dans un vaisseau. Ces micelles formeraient une monocouche sur la paroi vasculaire et faciliteraient le recrutement des CEP circulantes par une mobilisation induite par l'E2.

3.2 Le chitosan: une matrice biocompatible avec les cellules dérivées de la moelle osseuse.

Au début de ces travaux de maîtrise, nous cherchions à déterminer la capacité d'un biopolymère de CH associé à la PC pour favoriser la survie et l'organisation des CDMO *in vitro* dans un modèle murin de MO complète. À la lumière des résultats obtenus, nous pouvons proposer le CH-PC comme un biopolymère compatible avec les CDMO et représentant une matrice d'intérêt dans le développement de stratégies pour la promotion de la réendothélialisation vasculaire à l'aide de cellules progénitrices.

3.2.1 Influence sur les processus biologiques

De nos jours, les biopolymères sont conçus afin de permettre et de promouvoir l'attachement, la prolifération ainsi que l'organisation cellulaire, en plus d'agir comme véhicule pour la livraison de molécules bioactives dans la réparation tissulaire. Ces biopolymères fournissent une plateforme idéale favorisant l'interaction cellule-cellule ou cellule-matrice et leurs propriétés varient afin de soutenir la différenciation des cellules souches en un type cellulaire spécifique.²³² Les matériaux naturels stimulant la réparation des tissus sont principalement des composants de la matrice extracellulaire comme le collagène, le fibrinogène, les glycosaminoglycans ou l'acide hyaluronique. Ces biopolymères naturels représentent de nouveaux outils thérapeutiques pouvant favoriser la réparation vasculaire. Ils permettraient alors de prévenir les délais rencontrés lors de la réparation des vaisseaux suite à l'implantation d'endoprothèses vasculaires permanentes constituées de polyuréthane ou de silicone.²³³ Ainsi, la dégradation à long terme de tels polymères peut contribuer à l'apparition de réactions inflammatoires ainsi qu'à un risque accru de thrombose.²³⁴ Toutefois, ces effets peuvent être prévenus par l'utilisation des biopolymères naturels comme le CH qui est non toxique et biodégradable. Ces

caractéristiques sont considérablement recherchées lors de la conception d'un véhicule de livraison cellulaire ou d'agents thérapeutiques participant à la guérison vasculaire.

Notre étude de la biocompatibilité avec les CDMO nous a donc amenés à évaluer la capacité du polymère de CH-PC à soutenir les processus biologiques des CDMO comme l'adhésion cellulaire, l'angiogénèse, ainsi que le potentiel de mobilisation et de recrutement des cellules par l'étude de leur activité migratoire afin d'évaluer éventuellement leur capacité d'intégration au site de lésion.

3.2.1.1 Toxicité du biopolymère de chitosan

Le CH-PC fut développé et étudié au cours de ce projet afin d'améliorer la biocompatibilité du chitosan et d'en évaluer dans un premier temps, le potentiel en tant que matrice de soutien pour la survie, la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices, en particulier les CEP. Les propriétés physico-chimiques du CH sont influencées par deux principaux paramètres soit le degré de désacétylation (DDA) et le poids moléculaire. Au cours de ce projet, deux polymères de CH-PC ayant un même poids moléculaire entre 55 et 100 kDa et des DDA différents soit de 85% et de 96% furent initialement testés. Il fut observé que le biopolymère de CH-PC ayant un DDA de 96% induisait une adhésion cellulaire plus rapide comparativement au CH-PC ayant un DDA de 85%. Des études précédentes ont permis d'établir que plus le DDA est élevé, plus la compatibilité cellulaire sera grande.²⁰⁰ De plus, le poids moléculaire ainsi que le DDA influencent la dégradation des polymères de CH. Sous l'action des lysozymes, les enzymes responsables de la dégradation *in vivo*, il y a hydrolyse des résidus acétylés du polymère. Ainsi, le taux de dégradation est inversement corrélé au DDA. Il fut également observé que les polymères de CH ayant un poids moléculaire faible présentent des taux de dégradation plus rapide.²³⁵ L'utilisation du CH-PC ayant un DDA de 96% fut favorisée pour la suite de l'étude des processus biologiques des CDMO.

Différentes études réalisées avec le CH ont démontré que ce biopolymère peut promouvoir la survie de divers types cellulaires. Cependant, lors de nos expériences préliminaires, au cours desquelles une matrice de CH fut évaluée pour sa capacité à soutenir notre système de culture mixte de CDMO, il a été observé que les cellules ne pouvaient pas survivre sur une matrice de CH n'ayant pas subi de modifications chimiques. D'ailleurs, même une mise en culture préalable sur fibronectine afin d'accroître le nombre de cellules progénitrices et stromales adaptées aux conditions de culture *in vitro* n'a pas permis d'améliorer leur survie après transfert sur la matrice de CH. Même si au cours des premiers 24 à 48 heures en culture les CDMO pouvaient adhérer et former des colonies, une survie à plus long terme n'a pu être obtenue sur le CH. Ainsi après quelques jours, un changement morphologique suivi d'une désorganisation des colonies et d'une réduction rapide du nombre de cellules furent observés. (Figure 9)

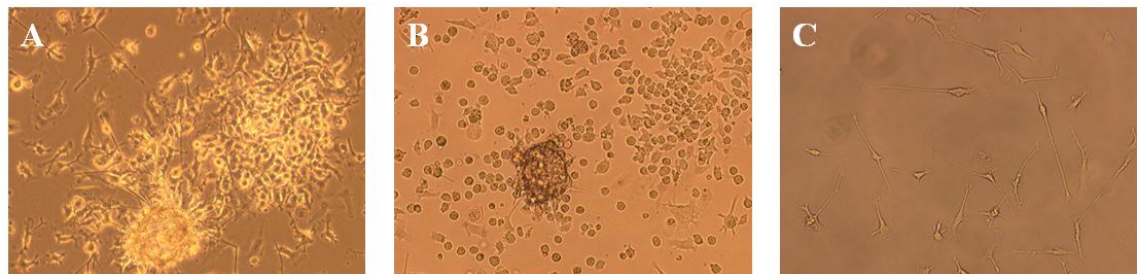


Figure 9. Observation des CDMO en culture sur une matrice de CH. Les cellules sont d'abord ensemencées sur la fibronectine durant une semaine puis sont transférées sur un film de CH (0,5%) de 1,5 mm d'épaisseur. Les CDMO sont observées au jour 1 (A), au jour 2 (B) et au jour 7 (C). Un changement morphologique, une désorganisation des colonies et une réduction rapide du nombre de cellules sont observés.

Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer cette mort cellulaire. Tout d'abord, une dégradation trop rapide de la matrice aurait pu contribuer à ce phénomène. Cependant, des études de dégradation *in vitro* ont démontré que la vitesse de dégradation du CH diminuait en fonction de son degré de désacétylation.²³⁵ Ainsi pour une désacétylation de 93,5%, le CH a une demi-vie (pour un CH de poids moyen) de plus de 84 jours en tampon PBS. Lors d'une étude de cinétique de dégradation de CH couplé à de la

rhodamine (Rh), notre collaboratrice (Dr. F. Winnik) a démontré que bien qu'une dégradation de 50% du CH-Rh se produisait dans les 48 premières heures, la dégradation complète nécessitait au moins 14 jours. Nous avons pris soin d'incorporer du sérum de veau fœtal au tampon afin de mimer de façon plus exacte les conditions de cultures habituelles.

Notre seconde hypothèse est en lien avec le processus de préparation du film de CH qui recouvre les plaques pour la culture cellulaire. Puisque le CH est un biopolymère soluble en condition acide, il doit être mis en solution à un pH inférieur à 6. Cette solution acide est utilisée pour faire le film de CH qui doit par la suite être neutralisé par des lavages successifs à l'éthanol puis avec du PBS à pH 7,4 avant l'ajout des cellules. Il est possible que la neutralisation du polymère ne se fasse pas sur toute l'épaisseur de la microcouche de CH. Les cellules, une fois adhérentes, contribuent au processus de dégradation du polymère et permettent l'exposition des zones sous-jacentes de plus en plus acides du film ce qui résulte en l'acidification du milieu qui devient toxique pour les cellules. L'augmentation du nombre d'étapes de neutralisation n'a pas permis de réduire cette toxicité. Cette observation remet en doute l'utilisation d'endoprothèses vasculaires qui seraient enduites de CH non modifié pour leur impact négatif possible sur les cellules vasculaires en contact ou à proximité de l'implant. Il est fort probable que la dégradation du CH composant l'endoprothèse vasculaire entraînerait le même effet sur les cellules du vaisseau. Il est donc nécessaire de développer des matrices à base de CH pouvant vraiment soutenir la croissance et la survie à plus long terme des cellules tout en prévenant des effets négatifs dus à la dégradation du polymère.

Ainsi, afin de favoriser une plus grande compatibilité des CDMO avec le biopolymère de CH, il s'est avéré nécessaire de modifier sa structure chimique. (Voir annexe II : structure du polymère de CH-PC) L'incorporation de groupe de PC permet d'accroître la solubilité du polymère en solution aqueuse à pH physiologiques évitant le passage en solution acide ainsi que la neutralisation du polymère avant l'ensemencement

cellulaire. De ce fait, l'utilisation de polymère de CH-PC soluble dans un tampon phosphate en conditions physiologiques, soit à un pH de 7,4, n'est pas susceptible d'entraîner l'acidification du milieu de culture. De plus, il fut démontré qu'une combinaison du CH avec d'autres composés telle la coralline ou le polyester pouvait améliorer l'adhésion, la prolifération et la différenciation ostéogénique des cellules mésenchymales en comparaison avec un polymère de CH seul.^{236, 237} L'ajout de groupements PC au CH a permis d'augmenter la survie cellulaire ainsi qu'une colonisation plus efficace du polymère par les cellules *in vitro*. Ainsi dans les mêmes conditions de culture cellulaire qu'auparavant aucune désorganisation des colonies ou de perte cellulaire importante ne furent observées sur le CH-PC comparativement au CH seul.

3.2.1.2 Adhésion cellulaire

L'adhésion, les changements morphologiques ainsi que la prolifération cellulaire constituent une séquence d'évènements se produisant suite à l'ensemencement des cellules et sont des étapes cruciales dans l'estimation de la survie cellulaire sur une nouvelle surface synthétique.¹⁸¹ Il fut constaté que les CDMO adhéraient à la fibronectine plus rapidement que sur le polymère de CH-PC. Ceci est attribuable aux différents mécanismes d'adhésion cellulaire se produisant sur ces deux matrices. L'adhésion cellulaire est dirigée par la reconnaissance spécifique des intégrines avec les séquences peptidiques d'adhésion sur la fibronectine. Bien que le CH n'offre pas ces signaux biologiques d'adhésion cellulaire, il peut quand même induire l'adhésion des CDMO par des interactions électrostatiques. Ce polymère associé à la PC pourrait promouvoir l'adhérence des cellules par des interactions entre les charges positives du polymère et les charges négatives présentes naturellement sur la membrane cellulaire.^{180, 199} De plus, la structure du polymère peut affecter l'adhésion cellulaire et pourrait également être impliquée dans la distribution cellulaire sur le polymère. En effet, la structure en trois dimensions ainsi que la grosseur des pores du polymère affectent l'expansion des cellules à la surface de même qu'à l'intérieur des polymères.^{238, 239} D'ailleurs, l'interaction entre les charges ainsi que la structure du

polymère pourraient s'avérer suffisantes pour le recrutement des CDMO sur le polymère afin de les maintenir au site de lésion en servant d'intermédiaire entre la paroi vasculaire et les cellules.

3.2.1.3 Populations cellulaires

Comme mentionné précédemment, une organisation cellulaire complexe est retrouvée dans la MO, c'est-à-dire que les cellules s'organisent en niches cellulaires. Ces niches consistent en un ensemble de molécules signalétiques, de communications intercellulaires et d'interactions entre les cellules souches ainsi que les cellules du stroma avoisinant. Cet environnement en trois dimensions est considéré comme influençant/contrôlant l'expression génique et les propriétés définissant la « stemness » des cellules, c'est-à-dire leur capacité d'autorenouvellement ou leur capacité à générer différents types cellulaires.²⁴⁰ Les deux principales populations présentes dans la MO et composant les niches de cellules souches sont les cellules hématopoïétiques et les cellules stromales. Par conséquent, il est important de conserver ces populations cellulaires afin de recréer un microenvironnement similaire *in vitro*. Dans notre étude, le marqueur cellulaire c-kit (CD117) fut choisi afin de caractériser les cellules hématopoïétiques. En effet, il s'agit d'un marqueur de cellules souches retrouvé dans la MO adulte et qui est exprimé à la surface des CSH, les CEP ainsi que leur précurseur commun l'hémangioblaste.²⁴¹⁻²⁴³ Ce marqueur est également critique dans la mobilisation des CSH dans la circulation²⁴⁴, un mécanisme aussi impliqué dans la mobilisation des CEP en réponse aux tissus ischémiques.^{107, 245} De plus, les cellules c-kit provenant de la MO peuvent être recrutées au myocarde après un infarctus.²⁴⁶ Dans notre système de culture de cellules mixtes de la MO, les CEP provenant des cellules c-kit sont définies par la co-expression de CD34, un marqueur de cellules progénitrices ainsi que par deux marqueurs de cellules endothéliales VEGFR-2 et CD31. Les cellules stromales sont quant à elles, sélectionnées par l'expression de CD44 qui est un marqueur de surface cellulaire connu pour être exprimé par les cellules stromales ainsi que par les CSM. Ce marqueur est également essentiel à l'organisation structurelle des

cellules par sa liaison à la matrice extracellulaire composée d'acide hyaluronique et de fibronectine.²⁴⁷ Il fut déterminé que le polymère de CH-PC, de façon similaire au polymère de CH, supporte la croissance des cellules stromales et favorise l'organisation adéquate en colonies.^{248, 249} Plus important encore, nos travaux ont permis de démontrer que le polymère de CH-PC permet la croissance ainsi que la survie des cellules hématopoïétiques et des CEP parmi les CDMO et ce, en plus grande proportion que sur la fibronectine. Certaines études sur les cellules progénitrices en croissance sur les glycosaminoglycans, des composants de la matrice extracellulaire, ont démontré qu'ils permettaient la croissance des cellules CD34⁺ ainsi que le maintien au stade de progéniteur.²⁵⁰⁻²⁵² Le CH est un polymère dont la structure chimique et les caractéristiques sont semblables à celle des glycosaminoglycans. Il fut établi au cours de ce projet que le CH-PC permettait également le maintien des cellules CD34⁺ parmi les CDMO. Ce résultat indique qu'une certaine proportion des CDMO sur le polymère de CH-PC demeure au stade de cellules progénitrices comme cela fut observé sur les glycosaminoglycans.

3.2.1.4 Capacité migratoire

La mobilisation des cellules progénitrices en circulation ainsi que leur recrutement au site de lésion constitue un moyen naturel de réparation du système cardiovasculaire. Les cellules ainsi recrutées s'incorporent dans l'endothélium vasculaire lésé afin de promouvoir le rétablissement d'un endothélium intact et fonctionnel. Les tissus ischémiques ou lésés sécrètent spontanément différents facteurs induisant la mobilisation des CEP en circulation et permettent l'activation des processus de réparation vasculaire.¹⁴⁵ L'apposition d'endoprothèses vasculaires bien qu'elles réduisent les risques de formation de resténose peut contribuer à ralentir ou altérer la réendothélialisation vasculaire. De plus, ces endoprothèses permanentes provoquent des réactions inflammatoires qui contribuent également à retarder les processus de guérison vasculaires.²³⁴ L'apposition d'une endoprothèse vasculaire biocompatible et biodégradable pourrait assurer la guérison vasculaire à long terme puisque la résorption complète de la matrice préviendrait

l'activation de l'inflammation chronique, un phénomène souvent rapporté avec les endoprothèses permanentes. L'application de polymère directement sur la paroi vasculaire est aussi une avenue envisagée. Le polymère (avec ou sans agent thérapeutique) induirait la chimiotaxie des CEP en circulation tout en couvrant la région activée de la paroi vasculaire ce qui aiderait à réduire l'adhésion de cellules du système immunitaire responsables de l'inflammation. Une fois recrutées au polymère les cellules pourraient transiter vers la paroi vasculaire afin de remplacer l'endothélium endommagé. Pour ce faire, les CEP doivent migrer à travers le polymère. D'ailleurs, la migration cellulaire rapide à travers le polymère jusqu'à la paroi vasculaire est un événement clé dans la réparation vasculaire puisque le CH-PC est une matrice temporaire et biodégradable qui sera résorbée par les cellules. Notre étude a révélé une capacité migratoire retardée, mais non compromise à travers le polymère de CH-PC en comparaison avec la fibronectine. Les interactions électrostatiques se produisant entre les biopolymères tel le CH-PC et les cellules pourraient être responsables de ce délai.²⁵³

3.2.1.5 Induction de l'angiogénèse

Dans un contexte de guérison vasculaire, l'induction de l'angiogénèse *in vivo* ou la formation de néovaisseaux *in vitro* est très importante. En effet, au cours d'essais d'angiogénèse *in vitro*, la fonctionnalité et la capacité des CE et des CEP à s'incorporer à un endothélium peuvent être évaluées. Au cours de ce projet, la formation spontanée d'enlignements cellulaires analogues à celles obtenues lors d'essais de formation de tubules fut observée. La présence de facteurs angiogéniques, mais également les propriétés physico-chimiques du polymère sont des facteurs pouvant influencer l'organisation cellulaire. Il a déjà été démontré que les cellules progénitrices sécrètent des cytokines pro-angiogéniques comme le VEGF ou le G-CSF et exercent des effets paracrines sur les CE matures pouvant améliorer l'angiogénèse.^{163, 254} Il fut observé, en plus de l'organisation cellulaire en colonies, la formation de tubules, et ce, exclusivement sur les matrices de CH-PC alors que l'adhésion cellulaire était plus rapide sur la fibronectine. Ce résultat suggère

que le profil de sécrétion induit des facteurs angiogéniques pourrait être différent et pourrait expliquer cette distinction dans l'organisation cellulaire. D'ailleurs, de récentes études ont démontré l'influence du support cellulaire tridimensionnel sur la culture et le profil de sécrétion du VEGF par les CE humaines et les cellules progénitrices extraites du tissu adipeux dans un modèle murin.^{255, 256} Néanmoins, puisque la formation spontanée de tubule est observée sur la matrice de CH-PC ainsi que sur celle de CH-PC-E2, elle est donc probablement influencée par la structure même du polymère ainsi que par les forces de tension s'exerçant sur les cellules.²³⁸ D'ailleurs, il fut démontré *in vitro* que les CE matures en contact avec une surface de CH modifiée par des sucres changeaient de morphologie. En effet, les CE adoptent tout d'abord une forme allongée en pavées puis prolifèrent et s'agrègent pour former des colonies. Les CE peuvent également s'organiser en structure circulaire ressemblant à des sections de néovaisseaux.²⁵⁷ Donc, même si le développement de tubules est principalement dirigé par des facteurs angiogéniques, la sensibilité cellulaire à ces signaux peut toutefois être modulée par les interactions physiques entre les cellules et la matrice extracellulaire. Conséquemment, ceci changera la structure du cytosquelette ainsi que la morphologie cellulaire. Ces changements morphologiques et fonctionnels des cellules résultent de la modification de l'élasticité ou de l'adhérence de la matrice extracellulaire induisant des stress mécaniques qui altèrent les forces de traction générées par les cellules. Ces tensions mécaniques peuvent stimuler la formation de tubules ainsi que le remodelage *in vivo*. Les variations de la matrice extracellulaire ainsi que de la morphologie cellulaire influencent la croissance et la différenciation des cellules environnantes dirigées par la structure tridimensionnelle du tissu.²⁵⁸⁻²⁶² Ceci est également supporté par le fait que dans notre étude, les cellules composant ces tubules n'expriment pas CD31, un marqueur de CE mature, mais expriment la chaîne alpha de l'actine, un marqueur des cellules contractiles. Ce marqueur se retrouve chez les CML mais également chez les péricytes qui contiennent une variété de protéines contractiles comme la chaîne alpha de l'actine, la myosine et la tropomyosine²⁶³⁻²⁶⁵ Ces cellules sont impliquées dans les premières phases de la néovascularisation qui précède l'arrivée des CE dans la formation de

nouvelles extensions des vaisseaux.^{266, 267} Ceci suggère que dans notre modèle de culture cellulaire, la structure du polymère dirigerait l'organisation cellulaire en tubule et que les cellules impliquées seraient davantage de nature contractile qu'endothéliale. Cependant, puisque les péricytes précèdent les CE lors de la formation de néovaisseaux, est-il possible que le temps d'induction soit trop court dans notre système pour voir l'implantation des CE dans cette organisation cellulaire ?

3.3 Impact de l'estradiol sur les CDMO

Par la suite, la capacité de l'E2 à influencer la croissance des CDMO sur un biopolymère de CH-PC fut étudiée. L'E2 conjugué au biopolymère fut comparé à sa forme soluble afin de déterminer la capacité de cette nouvelle combinaison à modifier le comportement des CDMO *in vitro*. Ainsi, il fut démontré que les cellules progénitrices ne sont pas influencées de la même façon par les deux formes d'E2.

3.3.1 L'estradiol dans les processus biologiques

Le biopolymère de CH-PC-E2 fut étudié afin de déterminer s'il permettait de favoriser les populations progénitrices, en particulier les CEP, sur le polymère de CH-PC. Notre étude nous a donc amené à évaluer la capacité de l'E2 à moduler les différents processus biologiques des CDMO tels l'adhésion cellulaire, la formation de capillaire ainsi que l'activité migratoire sur une matrice de CH-PC et de CH-PC-E2.

3.3.1.1 Adhésion, survie et prolifération cellulaire

Tout d'abord, l'effet de l'E2 sur les processus d'adhésion des CDMO ensemencées sur le polymère de CH-PC fut évalué. De précédentes études ont mis en évidence la capacité de l'E2 à accroître les propriétés adhésives des CEP.¹²¹ Cependant lors de nos travaux, nous n'avons pas observé d'accélération dans la vitesse d'adhésion cellulaire sur le polymère en absence ou en présence d'E2 qu'il soit soluble ou complexé au polymère de CH-PC. Au contraire, il s'est avéré que les CDMO sur CH-PC-E2 démontraient un certain délai dans leur adhésion comparativement à ce qui se produit sur le CH-PC ou sur la fibronectine. Comme mentionné précédemment, le CH-PC interagit avec les cellules par des interactions électrostatiques afin d'en promouvoir l'adhésion. Il est possible que les mécanismes d'adhésion cellulaire soient semblables entre le CH-PC et le CH-PC-E2. Toutefois, une influence de l'E2 complexé au polymère sur la densité des charges portées

par la structure du polymère de CH-PC est possible, mais n'a pas été étudié jusqu'à maintenant. Ainsi, l'E2, lorsque complexé au CH-PC, pourrait modifier la texture de surface telles sa rugosité ou sa porosité pouvant influencer l'adhésion des CDMO. Comme c'est le cas lorsque le chitosan est complexé au collagène, et ce, dépendamment des proportions de chaque polymère, la taille des pores se trouve modifiée.²⁶⁸ Il est également concevable que l'association de molécules d'E2 à la structure du polymère de CH-PC modifie l'interaction du polymère avec les molécules d'eau. (Voir annexe II : structure du polymère de CH-PC-E2) D'ailleurs, le polymère de CH-PC-E2 est plus difficile à dissoudre à pH neutre que le CH-PC. L'E2 étant très hydrophobe, il influence probablement la conformation adoptée par le polymère de CH-PC. Le polymère de CH-PC-E2 possède peut-être une structure plus compacte ainsi qu'une porosité qui diffère du CH-PC. De plus, la répulsion des charges en relation avec l'hydrophobicité de l'E2 contenu dans le polymère contribue à ralentir l'adhésion cellulaire. Des analyses plus poussées de la structure entre autres par microscopie électronique à balayage ainsi qu'une évaluation de la densité des charges présentes sur le CH-PC et sur le CH-PC-E2 sont planifiées. Elles permettront de mieux comprendre la nature des différentes interactions entre les cellules et les polymères.

Par la suite, la capacité des cellules à adhérer aux différents polymères de CH-PC ayant été établi, il fallut déterminer si l'E2 entraînait une croissance plus rapide des CDMO *in vitro*. Effectivement, l'E2 est reconnu pour augmenter le nombre de CEP circulantes *in vivo* et accroître la prolifération cellulaire *in vitro*.^{82, 83} Au cours de cette étude, les CDMO ayant subi des traitements à l'E2 soluble alors qu'elles étaient en culture sur le polymère de CH-PC ont été utilisées comme contrôles comparatifs aux cellulesensemencées sur le polymère de CH-PC-E2. Une large échelle de concentrations fut investiguée, car malgré les tests de cinétique de dégradation du CH-PC-E2 ainsi que l'estimation de la concentration d'E2 relâchée par le polymère effectués par nos collaborateurs, la présence des cellules pouvait accélérer la dégradation du polymère augmentant de ce fait la relâche d'E2. Toutefois, dans les conditions testées sur la fibronectine et sur les différents polymères de CH-PC, aucun effet pro-prolifératif de la population globale des CDMO n'a pu être

démontré suite à un traitement à l'E2 soluble. Aucune modification de la cinétique de prolifération cellulaire de la population globale entre les différentes concentrations d'E2 soluble et celui relâché par le polymère de CH-PC-E2 ne fut observée. Cependant, il est possible que le temps de traitement choisi soit trop long pour observer des différences dans les effets mitogéniques induits par les différentes formes d'E2. D'autre part, bien que l'E2 soit mitogénique pour les CE, il est anti-mitogénique pour les CML.⁸⁰ Il était donc possible que l'E2 favorisait uniquement la prolifération de certaines populations cellulaires parmi les CDMO. Finalement, il est également envisageable que les effets prolifératifs de l'E2 ne soient pas observables en condition non inflammatoire. En effet, l'E2 est connu pour réduire la réponse aux signaux inflammatoires en condition pathologique comme lors des maladies cardiovasculaires et du développement des plaques d'athérosclérose.⁶⁶⁻⁷⁰

Une autre façon de déterminer le taux de prolifération cellulaire est d'effectuer des décomptes de colonies, car elles représentent une mesure indirecte du nombre de cellules progénitrices ainsi que de leur capacité proliférative.²⁶⁹ Le décompte des colonies sur la fibronectine et sur les polymères de CH-PC-E2 et CH-PC avec ou sans E2 soluble indique que les cellules semblent se comporter de la même façon dans les différentes conditions. Cependant, la taille des colonies difficilement évaluables de façon satisfaisante n'a pas été adressée. Toutefois, un nombre plus élevé de colonies est obtenu sur le CH-PC seul comparativement à celui retrouvé suite à un traitement avec certaines concentrations d'E2 soluble. Un effet qui ne se reflète pas dans les essais de prolifération cellulaire (compte cellulaire total). De plus, cette observation supporte l'hypothèse selon laquelle l'E2 pourrait favoriser la prolifération uniquement de certaines populations de CDMO dans les conditions testées au cours de cette étude.

Afin de compléter l'analyse générale de l'effet de l'E2 sur la survie des CDMO, nous avons déterminé le taux de mortalité cellulaire en présence de l'E2 soluble ou complexé au polymère de CH-PC. Ces analyses s'avèrent importantes puisque l'E2 est reconnu comme un agent de survie cellulaire de par son action anti-apoptotique.⁸². Au

début de ce projet, la quantité d'E2 relâchée par le polymère fut estimée à partir de la structure du polymère de CH-PC-E2 soit à savoir que 2,4 % des groupes amines est occupés par une molécule d'E2. Ainsi il fut extrapolé que la concentration d'E2 potentiellement contenue et relâchée par le polymère de CH-PC-E2 en fonction de la cinétique de dégradation est approximativement de 10^{-5} M, une concentration très élevée puisque la concentration physiologique se situe à 10^{-9} M. Cependant, nos résultats suggèrent que la quantité d'E2 relâchée lors de la dégradation du polymère n'est pas aussi élevée que notre estimation initial ou encore que l'E2 ne se retrouve pas sous une forme utilisable pour les cellules. Pourtant, les résultats obtenus tendent à confirmer l'effet bénéfique de l'E2 sur la survie des CDMO *in vitro*. En effet, les résultats indiquent qu'après 14 jours en culture, l'E2 complexé au polymère est plus efficace que le CH-PC seul à réduire le taux de mortalité. Un effet qui n'est pas retrouvé dans les CDMO en culture sur le CH-PC en présence ou non d'E2 soluble.

Les processus biologiques tels l'adhésion ou la prolifération cellulaire découlant d'une stimulation à l'E2 sont dirigées par l'activation des récepteurs estrogéniques (RE) α et β . Ces deux récepteurs sont impliqués dans les mécanismes de signalisation qui contrôlent l'incorporation des CEP dans le tissu cardiaque afin d'en améliorer les fonctions après un infarctus du myocarde. Cette action est principalement dirigée par le RE α qui joue un rôle prédominant dans ce processus de guérison.²⁷⁰ Récemment, des études de blessure vasculaire dans des modèles murins où les RE étaient inactivés, ont rapporté que l'effet de l'estrogène sur la guérison vasculaire ainsi que sur l'activation des CEP étaient principalement dirigé par le RE α plutôt que par le RE β même si les rôles exacts de ces deux récepteurs restent à être clarifiés.^{271, 272} Nos résultats démontrent que les polymères à base de CH-PC sont capables de promouvoir l'expression de RE α par les CDMO *in vitro*. Après 7 jours en culture sur le CH-PC-E2, l'expression de RE α est augmentée comparativement au CH-PC et des différentes concentrations d'E2 soluble. Cette induction est transitoire puisqu'après deux semaines de culture les CDMO maintiennent une expression de RE α comparable sur les différentes matrices avec ou sans l'E2 soluble. Néanmoins, un résultat

très intéressant fut obtenu lorsque, dans un premier temps, l'expression de RE α a été évaluée avec l'actine comme protéine de référence. Ainsi, il fut observé par immunobuvardage de type Western que l'expression de l'actine était modulée par la stimulation d'E2 et ce, de façon dose-dépendante (Figure 10). Il est important de noter que la liaison des intégrines à leurs récepteurs active une variété de voies de signalisation qui ont comme fonction entre autres, la médiation de l'attachement cellulaire, la prolifération, l'organisation du cytosquelette d'actine ainsi que la formation du complexe d'adhésion focale.^{273, 274} Ceci suggère que l'E2 permet d'accroître l'adhésion cellulaire par la modulation de l'actine et la réorganisation de cytosquelette favorisant une meilleure adhésion cellulaire au polymère.

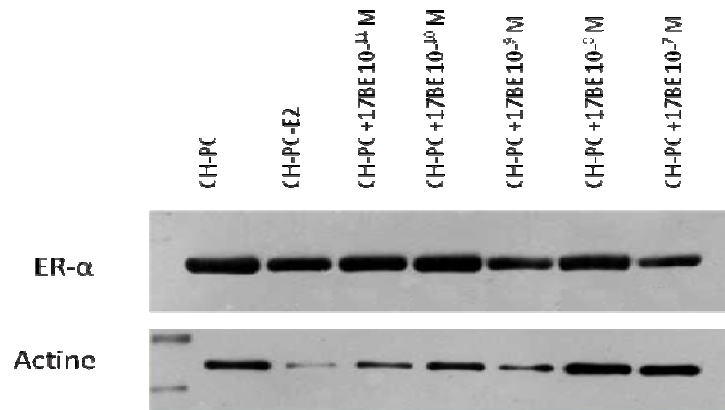


Figure 10. Expression du RE- α ainsi que de l'actine. Les CDMO sont ensemencées sur le biopolymère de CH-PC-E2 ainsi que sur le CH-PC en présence d'E2 soluble. L'expression du RE- α ainsi que de l'actine sont quantifiés par immunobuvardage de type western. La modulation de l'expression de l'actine, la protéine de référence, est observée après une semaine de traitement avec différentes concentrations d'E2.

3.3.1.2 Populations cellulaires

Notre laboratoire a récemment démontré que l'E2 est capable d'influencer physiologiquement le dynamisme des niches de cellules souches dans la MO par la

modulation de l'expression de divers gènes chez les cellules souches c-kit⁺ et les cellules stromales.²¹³ L'E2 module les processus biologiques capables d'influencer l'organisation fonctionnelle des niches comme la réponse inflammatoire, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération, la différenciation, la croissance cellulaire ainsi que la quiescence, l'adhésion cellulaire et finalement la chimiotactie. Par exemple, suite à un traitement à l'E2, l'expression de VEGF-A dans la portion cellulaire c-kit⁺ est accrue. Ce facteur de croissance est vital pour les CSH et de façon autocrine exerce une fonction de survie cellulaire. Il supporte également la mobilisation et induit la relâche de facteurs de croissance par les cellules comme le facteur granulocytaire des macrophages stimulant la formation de colonies. L'E2 augmente également l'expression de la cycline D2 dans les cellules c-kit⁺. Les cyclines de type D entraînent une transition de la phase G1 du cycle cellulaire et lorsque surexprimées dans les cellules c-kit⁺, entraîne leur prolifération. Dans notre système de culture de MO complète, l'E2 influence l'expression de diverses molécules d'adhésion qui sont des modulateurs des interactions entre les cellules souches de la niche et la matrice extracellulaire ou avec les cellules stromales qui sont cruciales pour les fonctions des cellules souches. Les molécules d'adhésion, comme VLA-4 et VCAM, sont impliquées dans la quiescence, l'auto-renouvellement, la prolifération, la mobilisation et le recrutement des cellules.²¹³

Cette présente étude se veut un premier pas dans l'exploitation du potentiel de l'E2 à influencer le comportement cellulaire sur les polymères à base de CH. Il a donc fallu déterminer l'influence de l'E2 sur les différentes populations cellulaires parmi les CDMO cultivées sur les polymères à base de CH-PC. Suite aux analyses par cytométrie, une proportion plus importante de cellules c-kit⁺ a été obtenue sur le polymère de CH-PC-E2 comparativement au CH-PC seul. Cette augmentation de la population c-kit⁺ a également été mesurée sur le polymère de CH-PC suite à un traitement à l'E2 soluble, mais dans une moindre mesure. Ces résultats sont en partie en accord avec les précédentes études qui ont démontré que l'E2 augmente la proportion de cellules c-kit⁺ positives tout en n'affectant pas la proportion de cellules stromales en culture sur la fibronectine.²¹³ Cependant, au

cours de nos analyses de caractérisation cellulaire, le CH-PC seul ou en présence d'E2 avait, dans notre préparation expérimentale, une influence sur la population stromale. Il est possible que différentes populations cellulaires soient favorisées sur les différentes matrices ou encore que certaines matrices parviennent à stimuler une plus grande adhésion cellulaire. Effectivement, une étude a démontré que certains polymères couplés à des facteurs de croissance comme le facteur de croissance des fibroblastes sont plus efficaces à induire une réponse cellulaire que le polymère seul en présence du facteur sous sa forme soluble.²⁷⁵ De plus, la présence de l'E2 dans le milieu de culture influence grandement le comportement cellulaire. Suite à la dégradation du polymère de CH-PC-E2, l'E2 qu'il contient est relâché continuellement dans le milieu de culture normalement suite à la coupure du lien ester. L'E2 sous une forme bioactive se retrouve alors constamment en contact avec les cellules en comparaison avec une stimulation plus ponctuelle entraînée par l'E2 soluble, puisque ce dernier est ajouté lors des changements de milieu à tous les 3 jours. Il est envisageable que la période de temps durant laquelle on retrouve l'E2 bioactif ne soit donc pas la même selon dans les deux conditions. Il ne peut pas être exclu que lors de la dégradation du CH-PC-E2, une partie du E2 reste ancrée à une molécule de CH ou que la conformation de l'E2 soit modifiée. Ces modifications altèrent l'affinité de l'E2 pour son récepteur cellulaire.²⁷⁶ Des études de conformation de l'E2 relâché par le polymère auraient permis de mieux comprendre l'effet du polymère sur les CDMO et sur l'E2. En particulier, en fonction de la concentration d'E2 réellement contenu et relâché par le polymère. Dans ces analyses, la conformation de l'E2 nous renseignera sur sa biodisponibilité et sa possible utilisation par les cellules afin d'en stimuler les processus biologiques. D'ailleurs, des essais de prolifération cellulaire dans lesquelles des cellules endothéliales matures sont mises en contact avec les surnageants provenant de la dégradation du polymère seul seront réalisés afin d'évaluer la biodisponibilité de l'E2. De plus, afin de mieux documenter les propriétés des polymères à base de CH-PC, des études sur l'épaisseur exacte des films, de l'organisation tridimensionnelle ainsi que des propriétés

telles l'élasticité et la porosité des polymères et de la fibronectine seront prochainement réalisées.

3.3.1.3 Capacité migratoire

Les cellules progénitrices peuvent être mobilisées par divers signaux moléculaires comme nous l'avons déjà discuté. Les hormones, principalement l'estrogène, modulent l'expression d'une série de gènes impliqués dans la mobilité cellulaire.²¹³ Des études *in vivo* dans un modèle porcin ont démontré que la mobilisation cellulaire est accrue suite à un traitement à l'E2 et résulte en une accélération de la réendothélialisation vasculaire.¹⁷¹ Comme l'E2 exerce un effet bénéfique sur la guérison vasculaire, il serait intéressant d'étudier la capacité du polymère de CH-PC-E2 à promouvoir la mobilisation des CDMO. Pour ce faire, il s'avère nécessaire d'évaluer la capacité des CDMO à migrer à travers un film de CH-PC-E2 afin de déterminer si les cellules, une fois recrutées au polymère, seraient capables de le traverser pour atteindre la paroi vasculaire et potentiellement s'incorporer à l'endothélium. La capacité de l'E2 à promouvoir la migration des CDMO à travers un filtre recouvert d'un microfilm de CH-PC et CH-PC-E2 a donc été investiguée. Au cours de cette étude, l'activité migratoire des CDMO a été évaluée de façon dose dépendante puisque la migration *in vitro* des CEP est corrélée avec la concentration d'E2.⁸² Les résultats obtenus ont permis de déterminer que les polymères à base de CH-PC permettent la migration cellulaire même si cette dernière est réduite et/ou retardée sur le CH-PC-E2. Nos résultats suggèrent également que l'E2 soluble n'entre pas en compétition avec celui contenu dans le polymère puisque les cellules sont encore capables de migrer. Ceci suggère que sur la durée de l'essai, soit 5 heures, la quantité d'E2 relâchée par le polymère de CH-PC-E2 ainsi que sa biodisponibilité est insuffisante pour bloquer l'effet chimioattractant de l'E2 soluble situé dans la chambre inférieure du système de migration. Afin de déterminer lequel des polymères seraient un meilleur choix pour effectuer une livraison cellulaire dans un

vaisseau lésé, il est nécessaire d'effectuer d'autres études. Par exemple, il faut considérer que les CDMO représentent une population hétérogène de cellules et de ce fait il est envisageable que les populations progénitrices ne migrent pas toutes à la même vitesse. Des essais de migration avec différents temps ainsi qu'un marquage des cellules qui ont migrées permettraient de les identifier et de déterminer si les différents polymères retardent simplement l'activité migratoire des CDMO ou la réduisent.

3.3.1.4 Induction de l'angiogénèse

La capacité des cellules progénitrices à s'intégrer à un néovaisseau ou à la paroi vasculaire lors d'une thérapie cellulaire est cruciale. Dans notre étude, l'organisation cellulaire en colonies ainsi que la formation de structures pouvant être associées à des tubules sur le polymère de CH-PC-E2 fut étudiée. Il a été démontré que l'E2 est lié à l'augmentation de l'angiogénèse dans des modèles murins d'ischémie des membres inférieurs.²⁷⁷ D'ailleurs dans de précédentes études, notre laboratoire a pu établir qu'un traitement à l'E2 accroît l'expression du facteur pro-angiogénique VEGF par les cellules c-kit⁺.²¹³ Ce facteur de croissance est un des plus spécifiques régulateurs de l'angiogénèse. Il agit sur le contrôle des voies de signalisation angiogénique et de la relâche de facteurs de croissance par les CE.²⁷⁸ Il est responsable de l'augmentation de la migration ainsi que de la formation de capillaires par les CE de la microvasculature des coronaires.^{279, 280} L'effet pro-angiogénique de l'estrogène est exercé de façon dose-dépendante et même à forte dose, il induit toujours une activité pro-angiogénique.^{281, 282} De plus, l'angiogénèse est observée lors de la néovascularisation des tumeurs ou de l'endomètre de l'utérus en association avec les fluctuations des taux circulants d'estrogène. L'effet de l'estrogène peut être direct ou indirect, c'est-à-dire dirigé par le VEGF. Ceci suggère que l'estrogène peut augmenter la cinétique de prolifération et de mobilisation des CEP par une interaction directe avec celles-ci ou avec les cellules associées comme les cellules stromales présentes dans le microenvironnement de la MO.^{119, 283} Pourtant, l'observation de la formation de structures

similaires aux capillaires sur le polymère de CH-PC-E2 mais également sur le CH-PC sans E2 suggèrent que la structure et/ou la composition du polymère seraient suffisantes pour favoriser la formation de ces structures. Cependant, il est possible que la formation de capillaires sur le CH-PC-E2 résulte de l'effet combiné de la structure du polymère de CH-PC ainsi que de l'action pro-angiogénique qu'exerce l'E2 sur les CDMO.

4.0 Conclusion

En conclusion, nos travaux démontrent que les biopolymères à base de CH représentent une matrice d'intérêt pour l'amplification des progéniteurs *in vitro*, mais également comme intermédiaire possible de livraison cellulaire dans la guérison vasculaire. Les biopolymères de CH-PC et de CH-PC-E2 se sont avérés biocompatibles avec les cellules d'un système de culture *ex vivo* de MO complète. La survie ainsi que la prolifération des CDMO furent observées sur les biopolymères de façon comparable à celle de la matrice contrôle. En plus, nos résultats suggèrent que les polymères de CH-PC et de CH-PC-E2 permettaient l'organisation en colonies révélant la nature progénitrice des cellules ainsi que la formation de capillaire démontrant leur potentiel angiogénique. Finalement, nous pouvons proposer que les polymères, en particulier le CH-PC-E2, induisent une amplification marquée des populations cibles soit les CSH ainsi que les CEP.

Pour des expérimentations futures, il appert envisageable d'utiliser ces biopolymères afin d'effectuer une livraison cellulaire ainsi que d'agents thérapeutiques tout en évitant l'utilisation d'endoprothèse vasculaire permanente. Cette stratégie de réendothélialisation serait très utile chez les personnes âgées ainsi que chez celles atteintes de maladies cardiovasculaires afin d'augmenter la disponibilité de CEP fonctionnelles. D'ailleurs, la livraison de cellules directement au site de lésion pourrait permettre d'améliorer la réparation vasculaire. Afin de poursuivre cette étude, il serait intéressant d'utiliser ces polymères dans une étude *in vivo* dans un modèle animal d'athérosclérose ou de blessure vasculaire afin de déterminer leur efficacité à promouvoir la guérison vasculaire. Les différents polymères seraient alors comparés pour déterminer lesquels seraient les plus appropriés pour effectuer une livraison cellulaire ou pour induire le recrutement des CEP circulantes.

5.0 Bibliographie

1. Libby P, Aikawa M, Schonbeck U. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1529:299-309.
2. Rea P. Statins: From Fungus to Pharma. *American Scientist*. 2008;96:408.
3. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138:S419-420.
4. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, et al. The role of vascular cell senescence in atherosclerosis: antisenesescence as a novel therapeutic strategy for vascular aging. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004;2:141-148.
5. Subbiah MT. Mechanisms of cardioprotection by estrogens. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998;217:23-29.
6. Steinberg D, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*. 1997;95:1062-1071.
7. Laufs U, Wassmann S, Czech T, et al. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:809-814.
8. Laufs U, Werner N, Link A, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004;109:220-226.
9. Ferri C, Bellini C, Desideri G, et al. Circulating endothelin-1 levels in obese patients with the metabolic syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1997;105 Suppl 2:38-40.
10. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, et al. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999;48:1856-1862.
11. Bragulat E, de la Sierra A, Antonio MT, et al. Endothelial dysfunction in salt-sensitive essential hypertension. *Hypertension*. 2001;37:444-448.
12. Rahman MM, Laher I. Structural and functional alteration of blood vessels caused by cigarette smoking: an overview of molecular mechanisms. *Curr Vasc Pharmacol*. 2007;5:276-292.
13. alliance ich. what is a cardiovascular disease ? Available at: <http://www.hearthealthinternational.org/index.php?page=what-is-cardiovascular-disease>.
14. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241.
15. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol*. 2008;103:398-406.
16. Korkmaz H, Onalan O. Evaluation of endothelial dysfunction: flow-mediated dilation. *Endothelium*. 2008;15:157-163.
17. Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol*. 1999;155:1-5.
18. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:631-638.

19. Sako D, Chang XJ, Barone KM, et al. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell*. 1993;75:1179-1186.
20. Matheny HE, Deem TL, Cook-Mills JM. Lymphocyte migration through monolayers of endothelial cell lines involves VCAM-1 signaling via endothelial cell NADPH oxidase. *J Immunol*. 2000;164:6550-6559.
21. Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, et al. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*. 1998;54:628-640.
22. Stemme S, Faber B, Holm J, et al. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:3893-3897.
23. Giuriato L, Scatena M, Chiavegato A, et al. Localization and smooth muscle cell composition of atherosclerotic lesions in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:347-359.
24. Loree HM, Tobias BJ, Gibson LJ, et al. Mechanical properties of model atherosclerotic lesion lipid pools. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:230-234.
25. Newby AC. Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends Cardiovasc Med*. 2007;17:253-258.
26. Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol*. 1994;100:51-54.
27. Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:52.
28. Ling S, Komesaroff P, Sudhir K. Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens. *Clin Sci (Lond)*. 2006;111:107-118.
29. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, et al. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*. 2002;346:340-352.
30. Czubryt MP, Espira L, Lamoureux L, et al. The role of sex in cardiac function and disease. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84:93-109.
31. Green S, Walter P, Kumar V, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 1986;320:134-139.
32. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:5925-5930.
33. McInerney EM, Katzenellenbogen BS. Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation. *J Biol Chem*. 1996;271:24172-24178.
34. Nilsson S, Makela S, Treuter E, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 2001;81:1535-1565.
35. Witkowska HE, Carlquist M, Engstrom O, et al. Characterization of bacterially expressed rat estrogen receptor beta ligand binding domain by mass spectrometry: structural comparison with estrogen receptor alpha. *Steroids*. 1997;62:621-631.

36. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med.* 2006;27:299-402.
37. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, et al. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2005;161:307-320.
38. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, et al. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;243:122-126.
39. Karas RH, Patterson BL, Mendelsohn ME. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation.* 1994;89:1943-1950.
40. Bland R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin Sci (Lond).* 2000;98:217-240.
41. Christiansen C, Christensen MS, Transbol I. Bone mass in postmenopausal women after withdrawal of oestrogen/gestagen replacement therapy. *Lancet.* 1981;1:459-461.
42. Smith DF, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol.* 1993;7:4-11.
43. Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen BS, et al. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ERalpha. *J Biol Chem.* 1999;274:33551-33556.
44. Webb P, Lopez GN, Uht RM, et al. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol.* 1995;9:443-456.
45. Watson CS, Norfleet AM, Pappas TC, et al. Rapid actions of estrogens in GH3/B6 pituitary tumor cells via a plasma membrane version of estrogen receptor-alpha. *Steroids.* 1999;64:5-13.
46. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 2005;307:1625-1630.
47. Lu Q, Pallas DC, Surks HK, et al. Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:17126-17131.
48. Shao D, Lazar MA. Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J Clin Invest.* 1999;103:1617-1618.
49. Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC, et al. Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:4658-4662.
50. Patrone C, Ma ZQ, Pollio G, et al. Cross-coupling between insulin and estrogen receptor in human neuroblastoma cells. *Mol Endocrinol.* 1996;10:499-507.
51. Ignar-Trowbridge DM, Pimentel M, Parker MG, et al. Peptide growth factor cross-talk with the estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology.* 1996;137:1735-1744.

52. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:8517-8521.
53. Le Mellay V, Grosse B, Lieberherr M. Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J Biol Chem*. 1997;272:11902-11907.
54. Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, et al. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J*. 1996;15:1292-1300.
55. Razandi M, Pedram A, Greene GL, et al. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*. 1999;13:307-319.
56. Russell KS, Haynes MP, Sinha D, et al. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:5930-5935.
57. Simoncini T, Rabkin E, Liao JK. Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:198-203.
58. Bulayeva NN, Gametchu B, Watson CS. Quantitative measurement of estrogen-induced ERK 1 and 2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Steroids*. 2004;69:181-192.
59. Paganini-Hill A, Dworsky R, Krauss RM. Hormone replacement therapy, hormone levels, and lipoprotein cholesterol concentrations in elderly women. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;174:897-902.
60. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 1999;340:1801-1811.
61. Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*. 2005;308:1583-1587.
62. Bourassa PA, Milos PM, Gaynor BJ, et al. Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:10022-10027.
63. Florian M, Magder S. Estrogen decreases TNF-alpha and oxidized LDL induced apoptosis in endothelial cells. *Steroids*. 2008;73:47-58.
64. Arnal JF, Clamens S, Pechet C, et al. Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:4108-4113.
65. Egan KM, Lawson JA, Fries S, et al. COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science*. 2004;306:1954-1957.
66. Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, et al. Effects of 17beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest*. 1996;98:36-42.

67. Suzuki A, Mizuno K, Asada Y, et al. Effects of 17beta-estradiol and progesterone on the adhesion of human monocytic THP-1 cells to human female endothelial cells exposed to minimally oxidized LDL. *Gynecol Obstet Invest.* 1997;44:47-52.
68. Wakatsuki A, Ikenoue N, Shinohara K, et al. Effect of lower dosage of oral conjugated equine estrogen on inflammatory markers and endothelial function in healthy postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:571-576.
69. Pervin S, Singh R, Rosenfeld ME, et al. Estradiol suppresses MCP-1 expression In vivo : implications for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1575-1582.
70. Geraldes P, Gagnon S, Hadjadj S, et al. Estradiol blocks the induction of CD40 and CD40L expression on endothelial cells and prevents neutrophil adhesion: an ERalpha-mediated pathway. *Cardiovasc Res.* 2006;71:566-573.
71. Kim HP, Lee JY, Jeong JK, et al. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263:257-262.
72. David FL, Montezano AC, Reboucas NA, et al. Gender differences in vascular expression of endothelin and ET(A)/ET(B) receptors, but not in calcium handling mechanisms, in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35:1061-1068.
73. Pendaries C, Darblade B, Rochaix P, et al. The AF-1 activation-function of ERalpha may be dispensable to mediate the effect of estradiol on endothelial NO production in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:2205-2210.
74. Gilligan DM, Quyyumi AA, Cannon RO, 3rd. Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women. *Circulation.* 1994;89:2545-2551.
75. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, et al. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest.* 1999;103:401-406.
76. Binko J, Majewski H. 17 beta-Estradiol reduces vasoconstriction in endothelium-denuded rat aortas through inducible NOS. *Am J Physiol.* 1998;274:H853-859.
77. Haynes MP, Sinha D, Russell KS, et al. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res.* 2000;87:677-682.
78. Wagner AH, Schroeter MR, Hecker M. 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *FASEB J.* 2001;15:2121-2130.
79. Dantas AP, Tostes RC, Fortes ZB, et al. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2002;39:405-411.
80. Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, et al. Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1585-1590.

81. Spyridopoulos I, Sullivan AB, Kearney M, et al. Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor. *Circulation*. 1997;95:1505-1514.
82. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation*. 2003;108:3115-3121.
83. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*. 2003;107:3059-3065.
84. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Hypertens*. 2005;23:1699-1706.
85. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens*. 2005;23:97-104.
86. Imanishi T, Kobayashi K, Hano T, et al. Effect of estrogen on differentiation and senescence in endothelial progenitor cells derived from bone marrow in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2005;28:763-772.
87. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967.
88. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85:221-228.
89. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, et al. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 2008;2:169-183.
90. Rafii S, Lyden D, Benezra R, et al. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer*. 2002;2:826-835.
91. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*. 2004;8:498-508.
92. Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, et al. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood*. 2002;100:3203-3208.
93. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95:343-353.
94. Iwami Y, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J Cell Mol Med*. 2004;8:488-497.
95. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2003;108:2511-2516.
96. Li TS, Hamano K, Nishida M, et al. CD117+ stem cells play a key role in therapeutic angiogenesis induced by bone marrow cell implantation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H931-937.

97. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:11474-11479.
98. Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:288-293.
99. Lord BI, Testa NG, Hendry JH. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood*. 1975;46:65-72.
100. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4:7-25.
101. Valtieri M, Sorrentino A. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *J Cell Physiol*. 2008;217:296-300.
102. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, et al. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res*. 2003;34:565-571.
103. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:605-631.
104. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 2006;116:1195-1201.
105. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 2005;106:1901-1910.
106. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, et al. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:349-356.
107. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109:625-637.
108. Kinashi T, Springer TA. Steel factor and c-kit regulate cell-matrix adhesion. *Blood*. 1994;83:1033-1038.
109. Kovach NL, Lin N, Yednock T, et al. Stem cell factor modulates avidity of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins expressed on hematopoietic cell lines. *Blood*. 1995;85:159-167.
110. Dimitroff CJ, Lee JY, Rafii S, et al. CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. *J Cell Biol*. 2001;153:1277-1286.
111. Kortessidis A, Zannettino A, Isenmann S, et al. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood*. 2005;105:3793-3801.
112. Katayama Y, Hidalgo A, Furie BC, et al. PSGL-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow: evidence for cooperation between E-selectin ligands and alpha4 integrin. *Blood*. 2003;102:2060-2067.
113. Schweitzer KM, Drager AM, van der Valk P, et al. Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am J Pathol*. 1996;148:165-175.
114. Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in

- transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*. 2000;95:3289-3296.
115. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001;89:E1-7.
 116. Chironi G, Walch L, Pernollet MG, et al. Decreased number of circulating CD34+KDR+ cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2007;191:115-120.
 117. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348:593-600.
 118. Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF. Menstrual cycle influences endothelial progenitor cell regulation: A link to gender differences in vascular protection? *Int J Cardiol*. 2008.
 119. Masuda H, Kalka C, Takahashi T, et al. Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circ Res*. 2007;101:598-606.
 120. Robb AO, Mills NL, Newby DE, et al. Endothelial progenitor cells in pregnancy. *Reproduction*. 2007;133:1-9.
 121. Fadini GP, de Kreutzenberg S, Albiero M, et al. Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:997-1004.
 122. Heiss C, Keymel S, Niesler U, et al. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1441-1448.
 123. Rivard A, Fabre JE, Silver M, et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*. 1999;99:111-120.
 124. Zhu S, Liu X, Li Y, et al. Aging in the atherosclerosis milieu may accelerate the consumption of bone marrow endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:113-119.
 125. Zhang W, Zhang G, Jin H, et al. Characteristics of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in aged mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;348:1018-1023.
 126. Edelberg JM, Tang L, Hattori K, et al. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res*. 2002;90:E89-93.
 127. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation*. 2003;108:457-463.
 128. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*. 2001;108:391-397.
 129. Ma FX, Zhou B, Chen Z, et al. Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Lipid Res*. 2006;47:1227-1237.

130. Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Coracina A, et al. Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2006;27:2247-2255.
131. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation.* 2002;106:2781-2786.
132. Krankel N, Adams V, Linke A, et al. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:698-703.
133. Segal MS, Shah R, Afzal A, et al. Nitric oxide cytoskeletal-induced alterations reverse the endothelial progenitor cell migratory defect associated with diabetes. *Diabetes.* 2006;55:102-109.
134. Tamarat R, Silvestre JS, Le Ricousse-Roussanne S, et al. Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am J Pathol.* 2004;164:457-466.
135. Li M, Takenaka H, Asai J, et al. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res.* 2006;98:697-704.
136. Muller-Ehmsen J, Braun D, Schneider T, et al. Decreased number of circulating progenitor cells in obesity: beneficial effects of weight reduction. *Eur Heart J.* 2008;29:1560-1568.
137. Sandri M, Adams V, Gielen S, et al. Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies. *Circulation.* 2005;111:3391-3399.
138. Laufs U, Urhausen A, Werner N, et al. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2005;12:407-414.
139. Steiner S, Niessner A, Ziegler S, et al. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2005;181:305-310.
140. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced proliferation and network formation of endothelial progenitor cells. *Hypertens Res.* 2004;27:101-108.
141. Dimmeler S, Zeiher AM. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept.* 2000;90:19-25.
142. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, et al. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1442-1447.
143. Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a

- mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation*. 2004;109:2058-2067.
144. Hirsch EZ, Chisolm GM, 3rd, White HM. Reendothelialization and maintenance of endothelial integrity in longitudinal denuded tracks in the thoracic aorta of rats. *Atherosclerosis*. 1983;46:287-307.
 145. Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, et al. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet*. 2000;355:1688-1691.
 146. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*. 2005;115:572-583.
 147. Gill M, Dias S, Hattori K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001;88:167-174.
 148. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*. 2005;45:321-325.
 149. Werner N, Priller J, Laufs U, et al. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1567-1572.
 150. Hattori K, Dias S, Heissig B, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2001;193:1005-1014.
 151. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*. 2003;102:1340-1346.
 152. Fujiyama S, Amano K, Uehira K, et al. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res*. 2003;93:980-989.
 153. Kong D, Melo LG, Gneccchi M, et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation*. 2004;110:2039-2046.
 154. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*. 2006;203:1221-1233.
 155. Zernecke A, Schober A, Bot I, et al. SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res*. 2005;96:784-791.
 156. de Boer HC, Verseyden C, Ulfman LH, et al. Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1653-1659.

157. Lev EI, Estrov Z, Aboufatova K, et al. Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix. *Thromb Haemost.* 2006;96:498-504.
158. Duan H, Cheng L, Sun X, et al. LFA-1 and VLA-4 involved in human high proliferative potential-endothelial progenitor cells homing to ischemic tissue. *Thromb Haemost.* 2006;96:807-815.
159. Dentelli P, Rosso A, Balsamo A, et al. C-KIT, by interacting with the membrane-bound ligand, recruits endothelial progenitor cells to inflamed endothelium. *Blood.* 2007;109:4264-4271.
160. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:3422-3427.
161. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation.* 2003;107:1322-1328.
162. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999;18:3964-3972.
163. Scheubel RJ, Holtz J, Friedrich I, et al. Paracrine effects of CD34 progenitor cells on angiogenic endothelial sprouting. *Int J Cardiol.* 2008.
164. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:733-742.
165. Sata M, Nagai R. Inflammation, angiogenesis, and endothelial progenitor cells: how do endothelial progenitor cells find their place? *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36:459-463.
166. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1185-1189.
167. Iafrafi MD, Karas RH, Aronovitz M, et al. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. *Nat Med.* 1997;3:545-548.
168. Brouchet L, Krust A, Dupont S, et al. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation.* 2001;103:423-428.
169. Chandrasekar B, Tanguay JF. Local delivery of 17-beta-estradiol decreases neointimal hyperplasia after coronary angioplasty in a porcine model. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:1972-1978.
170. Chandrasekar B, Nattel S, Tanguay JF. Coronary artery endothelial protection after local delivery of 17beta-estradiol during balloon angioplasty in a porcine model: a potential new pharmacologic approach to improve endothelial function. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:1570-1576.

171. Chandrasekar B, Sirois MG, Geoffroy P, et al. Local delivery of 17beta-estradiol improves reendothelialization and decreases inflammation after coronary stenting in a porcine model. *Thromb Haemost*. 2005;94:1042-1047.
172. Abizaid A, Albertal M, Costa MA, et al. First human experience with the 17-beta-estradiol-eluting stent: the Estrogen And Stents To Eliminate Restenosis (EASTER) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1118-1121.
173. Gruntzig AR, Senning A, Siegenthaler WE. Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med*. 1979;301:61-68.
174. Landau C, Lange RA, Hillis LD. Percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med*. 1994;330:981-993.
175. Serruys PW, Strauss BH, van Beusekom HM, et al. Stenting of coronary arteries: has a modern Pandora's box been opened? *J Am Coll Cardiol*. 1991;17:143B-154B.
176. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med*. 2002;346:1773-1780.
177. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med*. 2003;349:1315-1323.
178. Finn AV, Kolodgie FD, Harnek J, et al. Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation*. 2005;112:270-278.
179. Revell PA, Braden M, Freeman MA. Review of the biological response to a novel bone cement containing poly(ethyl methacrylate) and n-butyl methacrylate. *Biomaterials*. 1998;19:1579-1586.
180. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 1987;238:491-497.
181. Rainaldi G, Filippini P, Ferrante A, et al. Fibronectin facilitates adhesion of K562 leukemic cells normally growing in suspension to cationic surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2001;55:104-113.
182. Bacakova L, Filova E, Rypacek F, et al. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res*. 2004;53 Suppl 1:S35-45.
183. de Mel A, Jell G, Stevens MM, et al. Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review. *Biomacromolecules*. 2008;9:2969-2979.
184. Blindt R, Vogt F, Astafieva I, 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;47:1786-1795.
185. Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1574-1579.

186. Rotmans JJ, Heyligers JM, Verhagen HJ, et al. In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation*. 2005;112:12-18.
187. Shirota T, Yasui H, Shimokawa H, et al. Fabrication of endothelial progenitor cell (EPC)-seeded intravascular stent devices and in vitro endothelialization on hybrid vascular tissue. *Biomaterials*. 2003;24:2295-2302.
188. Garreta E, Gasset D, Semino C, et al. Fabrication of a three-dimensional nanostructured biomaterial for tissue engineering of bone. *Biomol Eng*. 2007;24:75-80.
189. Metcalfe AD, Ferguson MW. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface*. 2007;4:413-437.
190. Chitkara D, Shikanov A, Kumar N, et al. Biodegradable injectable in situ depot-forming drug delivery systems. *Macromol Biosci*. 2006;6:977-990.
191. Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, et al. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*. 2003;24:1121-1131.
192. Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60:1638-1649.
193. Zhang L, Ao Q, Wang A, et al. A sandwich tubular scaffold derived from chitosan for blood vessel tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2006;77:277-284.
194. Chandy T, Rao GH, Wilson RF, et al. Development of poly(Lactic acid)/chitosan co-matrix microspheres: controlled release of taxol-heparin for preventing restenosis. *Drug Deliv*. 2001;8:77-86.
195. Fujita M, Ishihara M, Morimoto Y, et al. Efficacy of photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 in a rabbit model of chronic myocardial infarction. *J Surg Res*. 2005;126:27-33.
196. Cho SW, Park HJ, Ryu JH, et al. Vascular patches tissue-engineered with autologous bone marrow-derived cells and decellularized tissue matrices. *Biomaterials*. 2005;26:1915-1924.
197. Izume M, Nagae S, Kawagishi H, et al. Action pattern of *Bacillus* sp. no. 7-M chitosanase on partially N-acetylated chitosan. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1992;56:448-453.
198. Tiera MJ, Qiu XP, Bechaouch S, et al. Synthesis and characterization of phosphorylcholine-substituted chitosans soluble in physiological pH conditions. *Biomacromolecules*. 2006;7:3151-3156.
199. Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 2001;22:261-268.
200. Huang M, Khor E, Lim LY. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm Res*. 2004;21:344-353.

201. Kumar MN, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev.* 2004;104:6017-6084.
202. Roller S, Covill N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int J Food Microbiol.* 1999;47:67-77.
203. No HK, Meyers SP, Prinyawiwatkul W, et al. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *J Food Sci.* 2007;72:R87-100.
204. Hoekstra A, Struszczyk H, Kivekas O. Percutaneous microcrystalline chitosan application for sealing arterial puncture sites. *Biomaterials.* 1998;19:1467-1471.
205. Chung YC, Chen CY. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresour Technol.* 2008;99:2806-2814.
206. Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, et al. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1988;36:784-790.
207. Muzzarelli RA, Mattioli-Belmonte M, Tietz C, et al. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials.* 1994;15:1075-1081.
208. Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials.* 2000;21:2589-2598.
209. Ma L, Gao C, Mao Z, et al. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials.* 2003;24:4833-4841.
210. Lauto A, Ohebshalom M, Esposito M, et al. Self-expandable chitosan stent: design and preparation. *Biomaterials.* 2001;22:1869-1874.
211. Steendam R, van der Laan A, Hissink D. Bioresorbable drug-eluting stent coating formulations based on SynBiosys biodegradable multi-block copolymers. *J Control Release.* 2006;116:e94-95.
212. Whelan DM, van der Giessen WJ, Krabbendam SC, et al. Biocompatibility of phosphorylcholine coated stents in normal porcine coronary arteries. *Heart.* 2000;83:338-345.
213. Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF. Estrogen-Induced Gene Expression in Bone Marrow c-Kit⁺ Stem Cells and Stromal Cells: Identification of Specific Biological Processes Involved in the Functional Organization of the Stem Cell Niche. *Stem Cells Dev.* 2008.
214. Chai C, Leong KW. Biomaterials approach to expand and direct differentiation of stem cells. *Mol Ther.* 2007;15:467-480.
215. He W, Yong T, Teo WE, et al. Fabrication and endothelialization of collagen-blended biodegradable polymer nanofibers: potential vascular graft for blood vessel tissue engineering. *Tissue Eng.* 2005;11:1574-1588.
216. Yu H, Dai W, Yang Z, et al. Smooth muscle cells improve endothelial cell retention on polytetrafluoroethylene grafts in vivo. *J Vasc Surg.* 2003;38:557-563.
217. Zhou M, Liu Z, Wei Z, et al. Development and validation of small-diameter vascular tissue from a decellularized scaffold coated with heparin and vascular endothelial growth factor. *Artif Organs.* 2009;33:230-239.

218. Pellerin YLHAC. Characterization of the Stable and Metastable Poly(ethylene oxide)-Urea Complexes in Electrospun Fibers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2008;46:1903-1913
219. He H, Shirota T, Yasui H, et al. Canine endothelial progenitor cell-lined hybrid vascular graft with nonthrombogenic potential. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126:455-464.
220. Estes BT, Gimble JM, Guilak F. Mechanical signals as regulators of stem cell fate. *Curr Top Dev Biol*. 2004;60:91-126.
221. Curran JM, Chen R, Hunt JA. The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate. *Biomaterials*. 2006;27:4783-4793.
222. Jeong B, Kim SW, Bae YH. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54:37-51.
223. Murthy N, Xu M, Schuck S, et al. A macromolecular delivery vehicle for protein-based vaccines: acid-degradable protein-loaded microgels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:4995-5000.
224. Li Y, Neoh KG, Kang ET. Controlled release of heparin from polypyrrole-poly(vinyl alcohol) assembly by electrical stimulation. *J Biomed Mater Res A*. 2005;73:171-181.
225. Shimoboji T, Larenas E, Fowler T, et al. Photoresponsive polymer-enzyme switches. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:16592-16596.
226. Cheng SY, Constantinidis I, Sambanis A. Use of glucose-responsive material to regulate insulin release from constitutively secreting cells. *Biotechnol Bioeng*. 2006;93:1079-1088.
227. Zidar J LA, Stack R., ed. *Biodegradable stents*. 3rd ed ed. Philadelphia:: EJ Topol; 1999.
228. Stack RS, Califf RM, Phillips HR, et al. Interventional cardiac catheterization at Duke Medical Center. *Am J Cardiol*. 1988;62:3F-24F.
229. Gao R SR, Qiao S, Song L, Li Y. A novel polymeric local heparin delivery stent: initial experimental study. *J. Am. Coll. Cardiol*. 1996;27:85A.
230. Yamawaki T, Shimokawa H, Kozai T, et al. Intramural delivery of a specific tyrosine kinase inhibitor with biodegradable stent suppresses the restenotic changes of the coronary artery in pigs in vivo. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:780-786.
231. Yang B, Wu QY, Li DY, et al. [Effect of the biodegradable chitosan external stent on the early changes in the rabbit vein grafts]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2003;41:688-690.
232. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126:677-689.
233. van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, et al. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation*. 1996;94:1690-1697.

234. Babapulle MN, Eisenberg MJ. Coated stents for the prevention of restenosis: Part I. *Circulation*. 2002;106:2734-2740.
235. Shi C, Zhu Y, Ran X, et al. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *J Surg Res*. 2006;133:185-192.
236. Gravel M, Gross T, Vago R, et al. Responses of mesenchymal stem cell to chitosan-coraline composites microstructured using coraline as gas forming agent. *Biomaterials*. 2006;27:1899-1906.
237. Costa-Pinto AR, Salgado AJ, Correlo VM, et al. Adhesion, Proliferation, and Osteogenic Differentiation of a Mouse Mesenchymal Stem Cell Line (BMC9) Seeded on Novel Melt-Based Chitosan/Polyester 3D Porous Scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2008.
238. Huang Y, Siewe M, Madihally SV. Effect of spatial architecture on cellular colonization. *Biotechnol Bioeng*. 2006;93:64-75.
239. Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, et al. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue Eng*. 2001;7:557-572.
240. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000;287:1427-1430.
241. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 2003;9:702-712.
242. Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, et al. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development*. 1997;124:2039-2048.
243. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, et al. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*. 1998;125:1747-1757.
244. Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, et al. Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:3760-3764.
245. Heissig B, Werb Z, Rafii S, et al. Role of c-kit/Kit ligand signaling in regulating vasculogenesis. *Thromb Haemost*. 2003;90:570-576.
246. Fazel S, Cimini M, Chen L, et al. Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest*. 2006;116:1865-1877.
247. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells*. 2006;24:928-935.
248. Costa-Pinto AR, Salgado AJ, Correlo VM, et al. Adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of a mouse mesenchymal stem cell line (BMC9) seeded on novel melt-based chitosan/polyester 3D porous scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2008;14:1049-1057.

249. Cho MH, Kim KS, Ahn HH, et al. Chitosan gel as an in situ-forming scaffold for rat bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Tissue Eng Part A*. 2008;14:1099-1108.
250. Sechriest VF, Miao YJ, Niyibizi C, et al. GAG-augmented polysaccharide hydrogel: a novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis. *J Biomed Mater Res*. 2000;49:534-541.
251. Cho CH, Eliason JF, Matthew HW. Application of porous glycosaminoglycan-based scaffolds for expansion of human cord blood stem cells in perfusion culture. *J Biomed Mater Res A*. 2008;86:98-107.
252. Madihally SV, Flake AW, Matthew HW. Maintenance of CD34 expression during proliferation of CD34+ cord blood cells on glycosaminoglycan surfaces. *Stem Cells*. 1999;17:295-305.
253. Mao JS, Cui YL, Wang XH, et al. A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. *Biomaterials*. 2004;25:3973-3981.
254. Rehman J, Li J, Orschell CM, et al. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003;107:1164-1169.
255. Lin J, Lindsey ML, Zhu B, et al. Effects of surface-modified scaffolds on the growth and differentiation of mouse adipose-derived stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1:211-217.
256. Polan JL, Morse B, Wetherold S, et al. VEGF analysis induced by endothelialized gas-plasma treated D,L-PLA scaffolds. *Cardiovasc Radiat Med*. 2002;3:176-182.
257. Bettini R, Romani AA, Morganti MM, et al. Physicochemical and cell adhesion properties of chitosan films prepared from sugar and phosphate-containing solutions. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;68:74-81.
258. Matthews BD, Overby DR, Mannix R, et al. Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *J Cell Sci*. 2006;119:508-518.
259. Kumar S, Maxwell IZ, Heisterkamp A, et al. Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics. *Biophys J*. 2006;90:3762-3773.
260. Parker KK, Brock AL, Brangwynne C, et al. Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *FASEB J*. 2002;16:1195-1204.
261. Huang S, Ingber DE. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol*. 1999;1:E131-138.
262. Ingber DE, Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J Cell Biol*. 1989;109:317-330.
263. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:2282-2287.

264. Herman IM, D'Amore PA. Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. *J Cell Biol.* 1985;101:43-52.
265. Skalli O, Pelte MF, Peclet MC, et al. Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem.* 1989;37:315-321.
266. Schlingemann RO, Rietveld FJ, Kwaspen F, et al. Differential expression of markers for endothelial cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation tissue. *Am J Pathol.* 1991;138:1335-1347.
267. Nehls V, Denzer K, Drenckhahn D. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res.* 1992;270:469-474.
268. Arpornmaeklong P, Suwatwirote N, Pripatnanont P, et al. Growth and differentiation of mouse osteoblasts on chitosan-collagen sponges. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36:328-337.
269. Staszkievicz J, Frazier TP, Rowan BG, et al. Cell Growth Characteristics, Differentiation Frequency and Immunophenotype of Adult Ear Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 2009.
270. Hamada H, Kim MK, Iwakura A, et al. Estrogen receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction. *Circulation.* 2006;114:2261-2270.
271. Pare G, Krust A, Karas RH, et al. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res.* 2002;90:1087-1092.
272. Foresta C, Zuccarello D, Biagioli A, et al. Oestrogen stimulates endothelial progenitor cells via oestrogen receptor-alpha. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;67:520-525.
273. Cheng S, Craig WS, Mullen D, et al. Design and synthesis of novel cyclic RGD-containing peptides as highly potent and selective integrin alpha IIb beta 3 antagonists. *J Med Chem.* 1994;37:1-8.
274. Xiao Y, Truskey GA. Effect of receptor-ligand affinity on the strength of endothelial cell adhesion. *Biophys J.* 1996;71:2869-2884.
275. Nur EKA, Ahmed I, Kamal J, et al. Covalently attached FGF-2 to three-dimensional polyamide nanofibrillar surfaces demonstrates enhanced biological stability and activity. *Mol Cell Biochem.* 2008;309:157-166.
276. Anstead GM, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids.* 1997;62:268-303.
277. Ruifrok WP, de Boer RA, Iwakura A, et al. Estradiol-induced, endothelial progenitor cell-mediated neovascularization in male mice with hind-limb ischemia. *Vasc Med.* 2009;14:29-36.
278. Regitz-Zagrosek V, Wintermantel TM, Schubert C. Estrogens and SERMs in coronary heart disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7:130-139.

279. Zheng W, Seftor EA, Meininger CJ, et al. Mechanisms of coronary angiogenesis in response to stretch: role of VEGF and TGF-beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H909-917.
280. Albrecht ED, Babischkin JS, Lidor Y, et al. Effect of estrogen on angiogenesis in co-cultures of human endometrial cells and microvascular endothelial cells. *Hum Reprod.* 2003;18:2039-2047.
281. Lamping KG, Christensen LP, Tomanek RJ. Estrogen therapy induces collateral and microvascular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H2039-2044.
282. Rubanyi GM, Johns A, Dole WP. Increased collateral blood flow to ischemic myocardium by estrogen replacement therapy may contribute to reduced incidence of fatal and non-fatal acute myocardial infarction in postmenopausal women. *Endothelium.* 1997;5:139-141.
283. Losordo DW, Isner JM. Estrogen and angiogenesis: A review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:6-12.

Annexe I : Réaction de désacétylation du polymère de chitosan

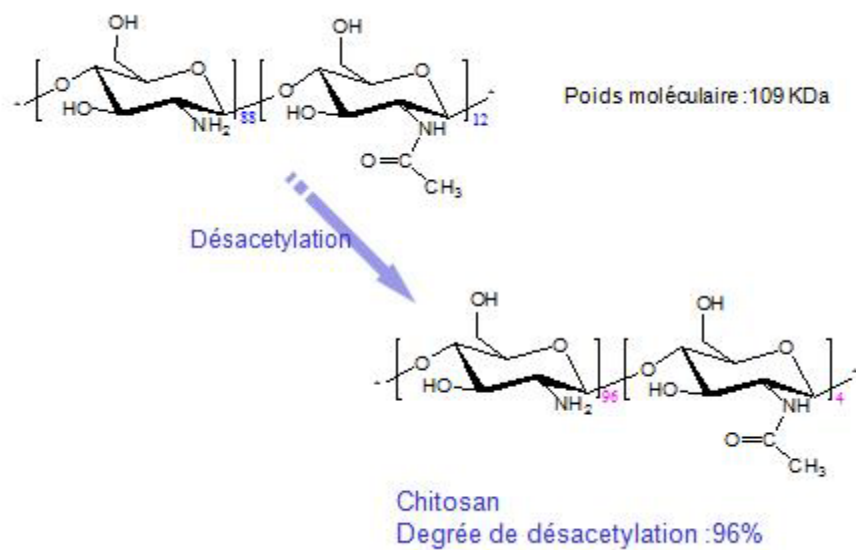


Figure 11 : Réaction de désacétylation du polymère de CH.

Annexe II : Structure des polymères à base de chitosan- phosphorylcholine.

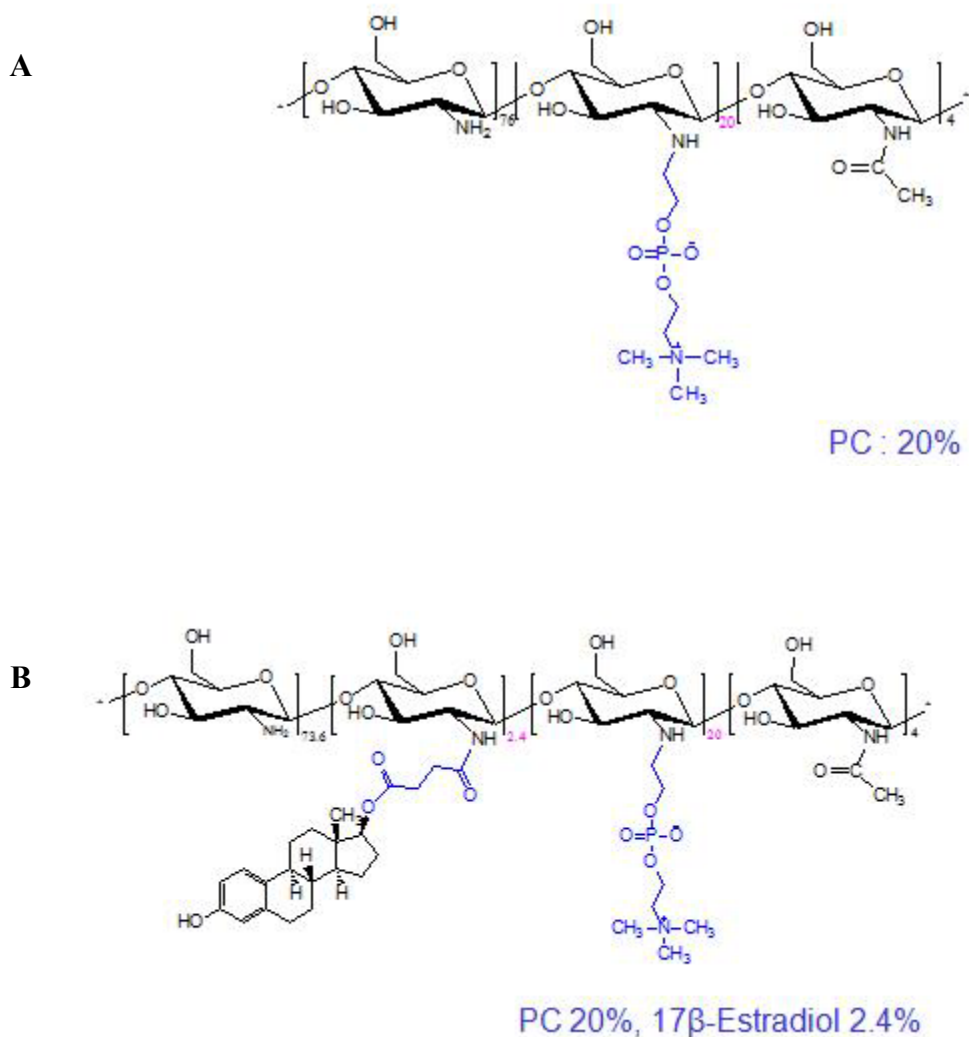


Figure 12 : Structure des polymères à base de chitosan-phosphorylcholine. A) Structure du polymère de CH-PC, B) structure du polymère de CH-PC-E2