



HAL
open science

**Les glycosaminoglycannes : implication dans la
régénération tissulaire après ischémie et utilisation de
mimétiques comme agents potentialisateurs des
progéniteurs endothéliaux humains pour la régénération
vasculaire**

Fabien Chevalier

► **To cite this version:**

Fabien Chevalier. Les glycosaminoglycannes : implication dans la régénération tissulaire après ischémie et utilisation de mimétiques comme agents potentialisateurs des progéniteurs endothéliaux humains pour la régénération vasculaire. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2013. Français. NNT : 2013PEST0104 . tel-01162398

HAL Id: tel-01162398

<https://theses.hal.science/tel-01162398v1>

Submitted on 10 Jun 2015

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

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

UNIVERSITE PARIS EST CRETEIL VAL DE MARNE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS EST

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Fabien CHEVALIER

Le 30 septembre 2013

**Les glycosaminoglycannes : implication dans la régénération
tissulaire après ischémie et utilisation de mimétiques
comme agents potentialisateurs des progéniteurs
endothéliaux humains pour la régénération vasculaire**

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

JURY

Pr. Florence SABATIER, Faculté de Pharmacie de Marseille	Rapporteur
Pr. Fabrice ALLAIN, Université Lille 1	Rapporteur
Pr. Laurence BORDENAVE, Université Bordeaux Segalen	Examineur
Pr. Jérôme LARGHERO, Unité Thérapie Cellulaire Saint Louis	Examineur
Dr. Georges UZAN, Université Paris Sud	Examineur
Dr. Patricia ALBANESE-UZAN, Université Paris Est Créteil	Directrice de thèse

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE

Index (abréviations, figures et tableaux)	1
Avant-propos	7
Synthèse bibliographique	10
I L'ischémie des membres inférieurs	11
I.1 Le muscle squelettique	11
I.1.a Les maladies artérielles périphériques : définitions et épidémiologie.....	11
I.1.b Niveau d'organisation du muscle squelettique	12
I.1.c Composition de la matrice extracellulaire du muscle	13
I.1.d Myogenèse embryonnaire.....	14
I.1.e Homéostasie musculaire : rôle des cellules satellites	16
I.2 Physiopathologie de l'ischémie.....	17
I.2.a Dégénérescence musculaire suite à l'ischémie	17
I.2.b Phase inflammatoire.....	18
I.2.c Régénération et remodelage	20
I.3 Thérapeutique conventionnelle de l'ischémie.....	24
I.3.a Traitement médicamenteux	24
I.3.b Intervention chirurgicale	25
I.4 Biothérapie de l'ischémie : les défis à relever	26
I.4.a Thérapie génique	26
I.4.b Thérapie à base de facteurs de croissance.....	29
I.4.c Thérapie cellulaire	31
II Les glycosaminoglycannes : des polysaccharides polyvalents	33
II.1 La matrice extracellulaire (MEC)	33
II.1.a Les macromolécules composant la MEC	33
II.1.b Régulation de la MEC.....	35
II.1.c Introduction aux glycosaminoglycannes (GAG).....	36
II.2 Les GAG : une structure complexe liée à leur biosynthèse	39
II.2.a Les Héparanes Sulfates et l'Héparine	39
II.2.b Les Chondroïtines et Dermatanes Sulfates.....	43
II.2.c Les Kératanes Sulfates	46
II.2.d L'Acide Hyaluronique	46
II.2.e Recyclage des GAG.....	47
II.3 Fonctions biologiques des GAG.....	49
II.3.a Généralités.....	49

II.3.b	Régulation de la réponse inflammatoire	51
II.3.c	Régulation de l'angiogenèse	53
II.3.d	Régulation de la myogenèse	57
II.4	Des analogues de GAG en thérapie de l'ischémie	59
II.4.a	Chitosan	59
II.4.b	Fucoïdan.....	60
II.4.c	Mimétiques de synthèse.....	61
III	Les progéniteurs endothéliaux : des cellules souches orientées	63
III.1	Régulation du système vasculaire	63
III.1.a	Rôle physiologique de l'endothélium	63
III.1.b	Développement du système vasculaire.....	64
III.1.c	Acteurs moléculaires modulant l'angiogenèse.....	66
III.2	Les Progéniteurs Endothéliaux Circulants (PEC).....	68
III.2.a	Mise en évidence et définition <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	68
III.2.b	Les PEC précoces.....	70
III.2.c	Les PEC tardifs.....	70
III.3	Rôle physiologique des PEC.....	73
III.3.a	Mobilisation de la moelle vers le sang circulant.....	73
III.3.b	Tropisme vers les sites de néoangiogenèse	74
III.3.c	Dérégulation de l'homéostasie des PEC	76
III.4	Intérêt des PEC en thérapie cellulaire de l'ischémie	79
III.4.a	Les PEC dans le remodelage vasculaire	79
III.4.b	Les essais cliniques de première génération	81
III.4.c	Les limites actuelles à l'utilisation des PEC.....	83
III.4.d	Les stratégies alternatives	83
	Objectifs de la Thèse	86
	Résultats & Discussions	88
I	Potentialisation des propriétés de PEC <i>in vitro</i> par les GAG	89
I.1	Introduction.....	89
I.2	Article 1 : en révision pour <i>Stem Cell Research</i>	91
I.3	Résultats complémentaires.....	116
I.3.a	Effet de l'[OTR ₄₁₂₀] sur l'adhérence des PEC.....	116
I.3.b	Effet de l'[OTR ₄₁₂₀], des HS et des CS B sur la prolifération des PEC	117
I.3.c	Effet de l'[OTR ₄₁₂₀] sur la clonogénicité secondaire des PEC.....	118
I.3.d	Effet de l'[OTR ₄₁₂₀] sur la migration des PEC	118
I.3.e	Effet de l'[OTR ₄₁₂₀] sur la formation de tubes par les PEC <i>in vitro</i>	119

I.3.f	Suivi cinétique du devenir cellulaire de l'[OTR ₄₁₃₁]	120
I.4	Discussion	122
II	Remodelage glycanique dans le muscle ischémié	124
II.1	Introduction	124
II.2	Article 2 : en préparation pour <i>Circulation Research</i>	126
II.3	Résultats complémentaires	154
II.3.a	Dosage des GAG endogènes dans l'EDL ischémié de souris immunodéficientes	154
II.3.b	Importance du degré de sulfatation sur la liaison aux facteurs de croissance	155
II.3.c	Influence de l'hydrophobicité des GAG sur leur liaison aux facteurs de croissance	156
II.3.d	Affinité de différents GAG naturels commerciaux pour le FGF-2	158
II.4	Discussion	160
	Conclusion & Perspectives	162
	Annexe	167
	Références	170

INDEX

Index des abbréviations

ADN :	acide désoxyribonucléique
Ang :	angiopoïétine
ATP :	adénosine tri phosphate
bHLH :	basic helix-loop-helix
BMP :	bone morphogenic protein
C(X)ST :	CS (X)-O-sulfotransférase
CD :	cluster of differentiation
CFU-EC :	colony forming unit endothelial cell
ChPF :	chondroïtin polymerizing factor
CHST :	carbohydrate sulfotransferase
COX-1 :	cyclooxygenase-1
CS :	chondroïtine sulfate
CSH :	cellule souche hématopoïétique
CSS :	chondroïtine sulfate synthase
D4ST :	dermatan-4-sulfotransferase 1
DS :	dermatane sulfate
DSE :	dermatan sulfate epimerase
ECFC :	endothelial cell colony forming cell
EGF :	epidermal growth factor
eNOS :	endothelial nitric oxide synthase
EPO :	érythropoïétine
ES :	embryonnaires souches
EXT :	exostosin glycosyltransferase
FGF :	fibroblast growth factor
FGFR :	FGF receptor
GAG :	glycosaminoglycane
Gal :	galactose
GalNac :	N-acétyl-galactosamine
G-CSF :	granulocyte colony stimulating factor
GlcA :	acide glucuronique
GLCE :	glucurononic acid epimerase
GlcNac :	N-acétyl-glucosamine

GRO-1 : growth related oncogene
HA : acide hyaluronique
HAS : hyaluronan synthase
HGF : hepatocyte growth factor
HIF-1 : hypoxia inducible factor
HLA : human leukocyte antigen
HS : héparane sulfate
HS(X)ST : HS-(X)-O-sulfotransférase
HUVEC : human umbilical vein endothelial cell
ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1
IdoA : acide iduronique
IGF : insulin-like growth factor
IGF-BP : insulin-like growth factor binding protein
Ihh : indian hedgehog
IL : interleukine
iNOS : NO synthase inductible
KDR : kinase insert domain
KS : kératane sulfate
LDL : low density lipoprotein
LIF : leukemia inhibitory factor
MAP : maladies artérielles périphériques
MAPK : mitogen activated protein kinases
MEC : matrice extracellulaire
MEF : myocyte enhancer factor
MHC : myosin heavy chain
MIP : macrophage inflammatory protein
MLC : myosin light chain
MMP: matrix metallo proteinases
MRF : myogenic regulatory factors
Myf-5 : myogenic factor
MyoD : myogenic differentiation
NA : N-acétylé
NCAM : neural cell adhesion molecule

NDST : *N*-d'acetylase/*N*-sulfotransférase
NF-κB : nuclear factor kappa–light-chain enhancer of activated B cells
NO : monoxyde d'azote
NS : *N*-sulfaté
PAF : platelet activating factor
PAPS : 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate
Pax: paired box
PCR : polymerase chain reaction
PDGF : platelet derived growth factor
PEC : progéniteurs endothéliaux circulants
PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule
PG : protéoglycannes
RANTES : regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted
RHAMM : receptor for hyaluronan-mediated motility
SCF: stem cell factor
SDF-1 : stromal cell derived factor 1
SERCA: sarco/endo-plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase
Shh : sonic hedgehog
STAT3 : signal transducer and activator of transcription 3
TGF-β : transforming growth factor
TIMP-1 : tissue inhibitor of metallo-proteinases
TLR : toll like receptor
TNF-α : tumor necrosis factor
UDP : uridine di phosphate
UST : uronyl-2-sulfotransferase
VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule
VEGF : vascular endothelial growth factor
VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor
VLA-4 : very late antigen 4
vWF : von Willebrand factor
Wnt : wingless-int

Index des figures

Figure 1 : Organisation du muscle squelettique	12
Figure 2 : Facteurs de signalisation et évènements cellulaires lors de la myogenèse embryonnaire ..	15
Figure 3 : Evolution des cellules inflammatoires et des marqueurs musculaires après ischémie	19
Figure 4 : Activation des cellules satellites	21
Figure 5 : Les quatres phases chronologiques interdépendantes de la régénération musculaire	22
Figure 6 : Approches de la thérapie génique	26
Figure 7 : Représentation schématique des vecteurs de délivrance des facteurs thérapeutiques	30
Figure 8 : Modulation du comportement cellulaire par la MEC	36
Figure 9 : Les différents domaines d'une chaîne de HS	41
Figure 10 : Initiation de la biosynthèse des HS et des CS	42
Figure 11 : Modifications des unités disaccharidiques de HS ou CS	45
Figure 12 : Recyclage des GAG	48
Figure 13 : Organisation de l'architecture matricielle	49
Figure 14 : Les différentes fonctions des GAG	50
Figure 15 : Structure d'un mimétique de GAG de la famille des RGTA	62
Figure 16 : Interactions leucocytaires avec l'endothélium	64
Figure 17 : Vasculogenèse embryonnaire	65
Figure 18 : Conséquences de la dérégulation de la balance angiogénique	66
Figure 19 : Méthodes d'isolement des PEC	69
Figure 20 : Recrutement des PEC vers les sites de néoangiogenèse	74
Figure 21 : Perfusion des membres inférieurs ischémiés de souris après injection de PEC	80
Figure 22 : Effet des GAG sur l'adhérence des PEC tardifs	116
Figure 23 : Effet des GAG sur la prolifération des PEC tardifs	117
Figure 24 : Effet des GAG sur la clonogénicité secondaire des PEC tardifs	118
Figure 25 : Effet des GAG sur la migration des PEC tardifs	118
Figure 26 : Effet des GAG sur la formation de tubes par les PEC tardifs	119
Figure 27 : Localisation de l'[OTR ₄₁₃₁] ajouté dans le milieu de culture de fibroblastes	120
Figure 28 : Localisation de l'[OTR ₄₁₃₁] ajouté dans le milieu de culture de PEC	121
Figure 29 : Dosage des GAG dans le muscle ischémié de souris immunodéficiente	154
Figure 30 : Effet du degré de sulfatation de l'[OTR ₄₁₂₀] sur sa liaison au FGF-2	155
Figure 31 : Effet du degré d'hydrophobicité sur la liaison aux facteurs de croissance	157
Figure 32: Affinités de GAG naturels et mimétiques pour le FGF-2	158

Index des tableaux

Tableau 1 : Structure des différentes familles de glycosaminoglycannes.....	37
Tableau 2 : Exemples de protéoglycannes	38
Tableau 3 : Différences structurales majeures entre HS et Héparine	41
Tableau 4 : Unités disaccharidiques des différents types de CS.....	44
Tableau 5: Caractéristiques des PEC précoces et des PEC tardifs	72
Tableau 6: Facteurs de mobilisation et de recrutement des PEC de la moelle au site lésé	76
Tableau 7 : Affinité des différentes molécules "[OTR ₄₂₁₀]-like" pour le FGF-2.....	156
Tableau 8 : Comparatif des affinités de l'[OTR ₄₁₂₀] et de l'[OTR ₄₁₃₁] pour différents facteurs	156
Tableau 9 : Comparatif des affinités des GAG naturels et mimétiques pour le FGF-2.....	159

AVANT-PROPOS

Ces travaux de recherche ont été menés sous la direction conjointe du Dr Patricia ALBANESE-UZAN, Maître de Conférences de l'Université Paris Est Créteil (UPEC), et du Dr Georges UZAN, Directeur de recherche CNRS. Les études ont eu lieu dans le laboratoire CRRET (Croissance, Réparation et Régénération Tissulaire), unité EAC-CNRS 7149 dirigée par le Dr José COURTY, à la Faculté des Sciences et Technologies de l'UPEC à Créteil, ainsi que dans l'unité INSERM U972 : Les cellules souches : de leurs niches à leurs applications thérapeutiques, dirigée par le Dr Georges UZAN, à l'hôpital Paul Brousse de Villejuif.

Au sein du laboratoire CRRET j'ai intégré l'équipe "Glycannes, chimie et biologie dans l'homéostasie tissulaire" dirigée par le Pr Dulce PAPY-GARCIA, dont l'axe de recherche est centré sur l'étude des glycosaminoglycannes (GAG) sulfatés dans la régulation des processus physiologiques et pathologiques. Dans ce contexte, l'équipe développe en partenariat avec la société OTR3 (Organe, Tissu, Régénération, Réparation et Remplacement), des GAG de synthèse, biomimétiques structuraux et fonctionnels des GAG sulfatés, permettant d'étudier les relations structure – fonction des GAG naturels et de développer des produits utilisables en thérapeutique. Au sein de cette équipe, le Dr Patricia ALBANESE-UZAN dirige des projets focalisés sur la régulation du comportement des cellules souches par les GAG.

Au sein de l'unité INSERM U972 j'ai intégré l'équipe « Cellules souches endothéliales et hépatiques : applications thérapeutiques » dirigée par le Dr Georges UZAN, dont un des axes de recherche porte sur l'étude des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) et leur développement en vue d'une utilisation clinique pour le traitement des maladies ischémiques.

Pendant mes trois années de thèse j'ai développé deux projets à l'interface entre les thématiques de recherche développées par les deux équipes : j'ai étudié l'effet de mimétiques de GAG sur les propriétés des PEC (article 1) et j'ai caractérisé la structure et la fonctionnalité des GAG évoluant au cours d'un processus d'ischémie-régénération chez le rat (article 2).

La réalisation de ces travaux de recherche a été rendue possible grâce à l'attribution d'une allocation doctorale financée par la région Ile-de-France pour trois ans, dans le cadre du programme de recherche du domaine d'intérêt majeur (DIM) « biothérapies : médecine régénérative, cellules souches et transplantation ».

Le manuscrit est organisé en trois parties principales.

La première partie est une introduction au travail de thèse permettant de fixer l'état actuel des connaissances dans les domaines explorés à partir d'une synthèse bibliographique. Cette introduction est partagée en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à la description des processus cellulaires et moléculaires impliqués dans l'ischémie des membres inférieurs, à la régénération musculaire innée et aux traitements actuels et envisageables à l'avenir pour la thérapie de l'ischémie musculaire. Le deuxième chapitre est dédié aux glycosaminoglycannes (GAG), leur biosynthèse, leur structure et leurs fonctions biologiques plus spécifiquement développées lors de l'inflammation, l'angiogenèse et la myogenèse, ainsi qu'à leur potentiel thérapeutique. Le troisième chapitre s'intéresse aux progéniteurs endothéliaux circulants (PEC), leur définition sujette à controverse, leur implication et leur régulation dans l'angiogenèse et leur intérêt en thérapie cellulaire des pathologies ischémiques.

La seconde partie du manuscrit est consacrée aux résultats, présentés sous forme de deux publications générées par les travaux de la thèse et complétés par une série de résultats complémentaires non associés à des publications scientifiques. La première publication intitulée "Glycosaminoglycan mimetic improves enrichment and cell functions of human endothelial progenitor cell colonies" est actuellement en révision pour le journal à comité de lecture *Stem Cell Research*. Dans cet article, nous démontrons que l'ajout d'un GAG mimétique dans le milieu de culture permet d'enrichir le nombre de colonies de PEC obtenues à partir du sang de cordon humain et de potentialiser leurs propriétés d'adhérence, de prolifération, de migration et d'auto-renouvellement. La seconde publication intitulée "New insight on glycosaminoglycan mimetic to accelerate tissue healing: Ischemic muscle regeneration is associated to glycosaminoglycan structural modifications" est en cours de préparation pour le journal *Circulation Research*. Dans cet article, nous montrons que la structure des GAG est modifiée au cours d'un processus d'ischémie et régénération dans le muscle de rat et que ces modifications structurales sont associées à des évolutions d'affinité des GAG envers des facteurs de croissance ainsi qu'à une modulation de leur fonctionnalité sur des cellules en culture. De plus, le traitement par un mimétique de GAG accélère le processus de régénération musculaire.

La troisième partie du manuscrit est consacrée à une conclusion générale et au développement des perspectives de ces travaux.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I L'ischémie des membres inférieurs

I.1 Le muscle squelettique

I.1.a Les maladies artérielles périphériques : définitions et épidémiologie

Les maladies artérielles périphériques (MAP) font référence à une ischémie des membres inférieurs suite à une occlusion vasculaire par la formation d'une plaque d'athérome (dépôt de lipides le long de l'endothélium). Elles affectent 12 à 14% de la population globale et jusqu'à 20% des personnes âgées de plus de 75 ans [1]. Les principaux facteurs de risques identifiés sont le tabagisme, l'hypertension artérielle, le diabète et l'hyperlipidémie [1, 2]. Les MAP peuvent être un temps asymptomatiques, le premier signal étant l'apparition de douleurs lors de la marche nécessitant l'arrêt de l'effort physique : la claudication intermittente [1]. L'ischémie chronique des membres inférieurs est l'évolution clinique la plus critique des MAP, dont l'incidence dans la population globale est estimée autour de 500 à 1000 individus par million [3]. Les patients atteints d'ischémie chronique des membres inférieurs présentent trois fois plus de risques d'infarctus du myocarde, d'arrêt vasculaire cérébral et/ou de décès d'origine vasculaire [4]. L'ischémie chronique des membres inférieurs provoque une douleur persistante et conduit au développement d'ulcères, de gangrènes (nécrose tissulaire) ou d'infections nécessitant dans 30% des cas une première amputation, et dans 20% des cas conduit au décès au bout d'un an [3]. Parmi les patients ayant subi une première amputation, 30% d'entre eux vont devoir subir de nouvelles interventions chirurgicales (dont une seconde amputation) sur le même membre ou le membre controlatéral dans les deux ans suivant la primo-amputation [3]. Ainsi, la prise en charge des patients atteints d'ischémie chronique des membres inférieurs nécessite plusieurs années de suivis réguliers. Le coût annuel de prise en charge par patient a été estimé autour de 47 000 dollars (environ 36 000 euros) [3, 5]. Les MAP, et plus particulièrement l'ischémie chronique des membres inférieurs, représentent donc un vrai problème de santé publique.

I.1.b Niveau d'organisation du muscle squelettique

Le muscle squelettique est un tissu constitué d'unités contractiles appelées fibres musculaires. Les fibres musculaires, regroupées en faisceaux, sont assemblées par trois gaines de tissu conjonctif, interconnectées entre elles : l'endomysium, le périmysium et l'épimysium. L'endomysium entoure chaque fibre musculaire, le périmysium assemble les différents faisceaux des fibres et l'épimysium entoure l'ensemble de chaque muscle. Chaque fibre musculaire est une cellule géante multinucléée, ou syncytium, qui contient dans son cytoplasme des structures hautement différenciés, les myofibrilles (Figure 1).

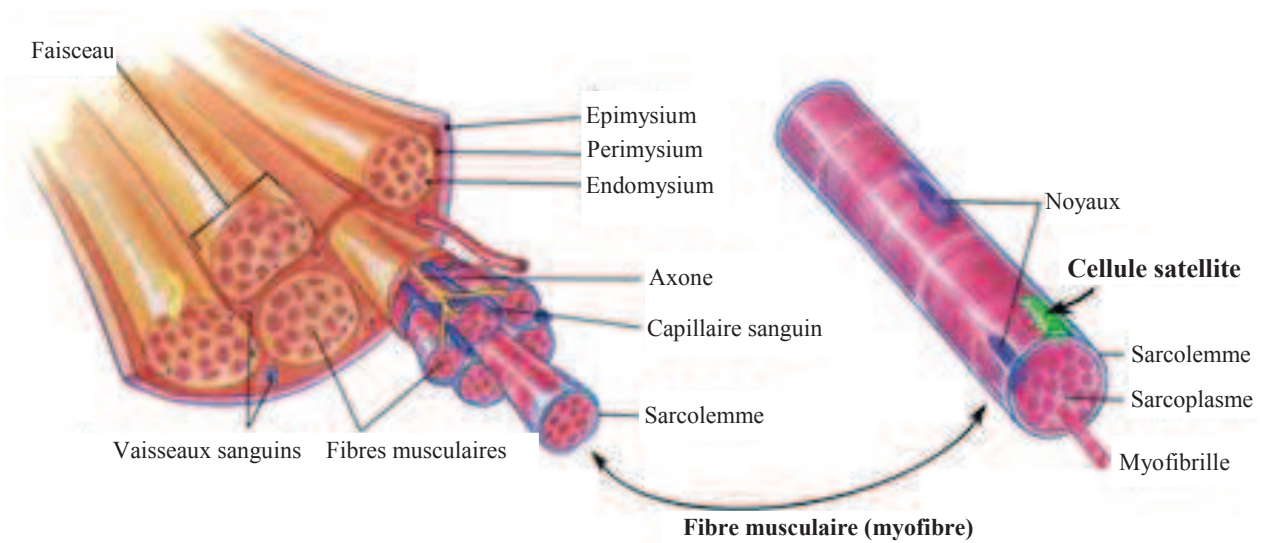


Figure 1 : Organisation du muscle squelettique

(d'après : [6])

Les vaisseaux sanguins sont localisés entre les faisceaux. Des capillaires (bleu) sont présents au sein de chaque fibre musculaire. Les axones (jaune) sont connectés aux différentes fibres musculaires d'un même faisceau. Les cellules satellites quiescentes (vert) sont localisées entre la lame basale et la membrane plasmique des fibres musculaires.

Les myofibrilles sont organisées en unités fonctionnelles répétitives : les sarcomères, eux-mêmes constitués d'un assemblage de filaments fins et épais glissant l'un contre l'autre, permettant ainsi la contraction. Chaque filament fin est formé par deux brins d'actine polymérique associés à d'autres protéines comme la tropomyosine et les troponines. Les filaments épais sont eux composés essentiellement par les myosines de classe II et sont formés par l'association de deux chaînes lourdes de myosine (MHC pour Myosin Heavy Chain) et de quatre chaînes légères (MLC pour Myosin Light Chain) [7]. Les régions C-terminales des deux chaînes lourdes s'associent en formant une structure en hélice alpha alors que chaque région N-terminale forme une structure globulaire (tête de myosine) sur laquelle viennent s'associer deux chaînes légères. Les têtes de myosine interagissent avec l'actine pour permettre la contraction et contiennent également le site catalytique pour l'hydrolyse de l'ATP en ADP fournissant l'énergie nécessaire pour la contraction musculaire. On distingue deux types de fibres musculaires. Les fibres de type I sont des fibres oxydatives qui présentent une vitesse de contraction lente et une forte endurance. Elles étaient originellement appelées fibres « rouges » pour leur taux élevé de myoglobine, mitochondries et capillaires. Les fibres de type II sont des fibres glycolytiques à contraction rapide et sensibles à la fatigue. Elles contiennent peu de myoglobine, de mitochondries et de capillaires et sont appelées fibres « blanches ».

I.1.c Composition de la matrice extracellulaire du muscle

Les collagènes sont les protéines structurales majoritaires de la matrice extracellulaire (MEC), elles représentent jusqu'à 10% de la masse sèche musculaire. Au cours du développement musculaire les collagènes de type I, III, IV, V, VI, XI, XII, XIV, XV, et XVIII sont exprimés [8], bien qu'uniquement les collagènes I et III prédominent dans le muscle adulte [9].

Les protéoglycannes (PG) sont également présents dans le muscle et interagissent avec les collagènes à des sites bien spécifiques [10] permettant d'organiser l'architecture tissulaire (voir II.1 et II.3.a). Les PG les plus abondants du muscle sont la décorine et le biglycan, des PG portant des chaînes de chondroïtines sulfates et dermatanes sulfates (voir II.2.b). Les PG à chaînes d'héparanes sulfates (voir II.2.a) dans le muscle sont le collagène XVIII, le perlécan et l'agrine, ils représentent environ 30% des PG de la MEC du muscle [11]. En plus de leur rôle structural, les PG interviennent également dans la régulation des voies de signalisation lors de la myogenèse (voir II.3.d). Enfin, les glycoprotéines de structure telles que les laminines et la fibronectine vont permettre de relier les collagènes à la membrane basale [8]. La composition de la MEC est cruciale puisqu'elle permet de

répondre spécifiquement aux contraintes mécaniques liées à l'activité musculaire et maintient ainsi la fonction du tissu.

I.1.d Myogenèse embryonnaire

Chez les vertébrés supérieurs la musculature dérive du dermomyotome, le domaine dorsal des somites [12]. La spécification des précurseurs mésodermiques du somite dans la voie myogénique est contrôlée par des interactions très fines entre les facteurs de transcription MRF (Myogenic Regulatory Factors), MEF2 (Myocyte Enhancer Factor), Pax (Paired box) et des signaux modulateurs (inhibiteurs ou activateurs) sécrétés par les tissus environnants (Figure 2).

Quatre MRF ont été identifiés : MyoD (myogenic differentiation), Myogénine, Myf-5 (myogenic factor) et MRF-4. Ils appartiennent à la superfamille des facteurs de transcription à domaine « bHLH » (basic helix-loop-helix) qui permet leur dimérisation et leur liaison à des séquences spécifiques de l'ADN appelées « boîte E », dont la séquence consensus CANNTG est présente dans de nombreux gènes de différenciation musculaire [13]. Les MRF sont exprimés selon une séquence spatio-temporelle précise : Myf-5 est le premier à être exprimé, avant MyoD. Ces deux facteurs sont indispensables à la myogenèse [14]. Myogénine puis MRF-4 sont exprimés plus tardivement et sont impliqués dans la différenciation terminale des précurseurs myogéniques. Ces facteurs induisent la fusion des myoblastes en myotubes plurinucléés et l'activation transcriptionnelle de gènes codant pour des protéines spécifiquement musculaires, dont les protéines de l'appareil contractile [15]. Les facteurs MEF2 agissent en synergie avec les MRF pour activer la différenciation musculaire. Les protéines MEF2 contiennent aussi une séquence de vingt-neuf acides aminés responsable de la dimérisation et de la fixation spécifique à l'ADN sur des séquences riches en A/T présentes dans la région régulatrice d'un grand nombre de gènes musculaires comme la créatine kinase musculaire, les chaînes lourdes de myosine, la desmine et certains MRF [16].

Les protéines Pax3 et Pax7, deux facteurs de transcription à homéodomaine, jouent également un rôle décisif au cours de la myogenèse [17, 18]. Pax3 induit l'expression de c-met, un récepteur à tyrosine kinase (le récepteur au HGF, Hepatocyte Growth Factor) impliqué dans la délamination et la migration des progéniteurs musculaires [19, 20]. D'autre part, en absence d'expression de Pax3 et de Pax7, les cellules progénitrices musculaires ne sont pas spécifiées vers la différenciation musculaire squelettique et adoptent d'autres voies [21].

Les facteurs modulateurs sécrétés par les tissus environnants incluent Shh (sonic hedgehog), les membres de la famille Wnt (Wingless-int), les molécules de la famille du TGF- β (Transforming Growth Factor) et des BMP (Bone Morphogenic Proteins).

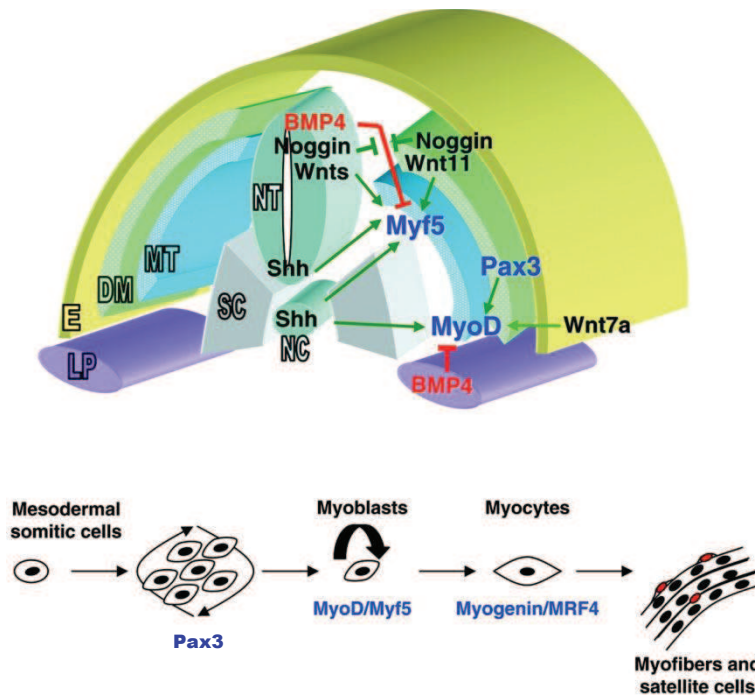


Figure 2 : Facteurs de signalisation et évènements cellulaires lors de la myogenèse embryonnaire
(d'après : [22])

Les précurseurs mésodermiques localisés dans la partie dorsale du somite (DM : dermomyotome) reçoivent des signaux des tissus environnants qui induisent (Wnt, Shh, Noggin) ou répriment (BMP4) l'expression des MRF (Myf5 et MyoD) et la spécification vers le lignage myogénique. Les myoblastes induits vont pouvoir migrer et former le myotome (MT) qui donnera lieu à l'ensemble des muscles squelettiques. Pax3 potentialise la myogenèse dans le myotome. L'augmentation de l'expression de myogénine et MRF4 induit la différenciation terminale des myoblastes en myocytes. Finalement, les myocytes vont fusionner afin de former une myofibre multinucléée. Durant la phase finale de myogenèse, des myoblastes spécifiques issus des cellules satellites (dont l'origine embryonnaire reste à déterminer) fusionnent avec les myofibres et permettent leur croissance. Quelques cellules satellites demeurent étroitement associées aux myofibres dans un état indifférencié. (E : ectoderme ; LP : plaque latérale ; SC : sclérotome ; NC : notochorde ; NT : tube neural).

I.1.e Homéostasie musculaire : rôle des cellules satellites

Le muscle squelettique adulte est un tissu stable, composé de fibres musculaires dont les noyaux sont post-mitotiques. Cependant, la croissance et la réparation du muscle squelettique sont assurées par une population de cellules mononuclées maintenues en réserve et en quiescence dans le muscle mature : les cellules satellites. Pour la majeure partie des vertébrés, ces cellules souches unipotentes sont retrouvées dans des dépressions de la fibre musculaire, entre la lame basale et la membrane plasmique (Figure 1) [23]. Dans le muscle adulte, les cellules satellites sont normalement quiescentes [24] : elles présentent un cytoplasme très réduit, de rares organelles et un rapport élevé hétérochromatine/euchromatine, caractéristiques qui reflètent bien leur état de quiescence et leur faible activité transcriptionnelle. Suite à une lésion musculaire, elles sortent rapidement de cet état de quiescence. Cette activation est caractérisée par une augmentation du volume cytoplasmique et du nombre d'organelles intracellulaires, ainsi que par la réduction de l'hétérochromatine nucléaire et une augmentation du ratio cytoplasme/noyau [25]. Les cellules satellites ne sont pas distribuées régulièrement, elles sont préférentiellement localisées à proximité des myonuclei, des jonctions neuromusculaires à proximité des cellules de Schwann et plus de la moitié d'entre elles dans des niches juxtavasculaires [26]. Par ailleurs, leur nombre pourrait être directement proportionnel au contenu en capillaires de la fibre musculaire [27]. Ainsi, il semble que la vascularisation soit un élément central de la régulation des cellules satellites, et donc, de l'homéostasie musculaire. D'un point de vue macroscopique, lors de la régénération musculaire, l'augmentation du nombre de myofibres est associée à une augmentation de la microvascularisation [28]. Finalement, la myogenèse et l'angiogenèse sont deux processus physiologiques se déroulant de façon concomitante [29], suggérant une coordination et une étroite communication entre les cellules satellites et les cellules endothéliales [30, 31], dont les mécanismes sont encore inconnus.

Ainsi, toute pathologie affectant la composante vasculaire, telle que l'ischémie, va entraîner un déficit dans le programme de régénération musculaire.

1.2 Physiopathologie de l'ischémie

1.2.a Dégénérescence musculaire suite à l'ischémie

Un tissu entre en ischémie au moment où le flux sanguin est insuffisant pour subvenir à ses besoins nutritifs. Cette chute drastique de la pression sanguine entraîne une baisse de l'oxygénation du tissu (hypoxie), et la perturbation, voire l'arrêt de sa fonction. La tolérance à l'ischémie est variable selon le tissu. Avec une tolérance limite de quatre heures, le muscle squelettique présente, après le cerveau, une des plus grandes vulnérabilités à l'ischémie. Pour comparaison, les seuils de tolérance à l'ischémie du tissu adipeux, de la peau et de l'os sont respectivement de treize heures, vingt-quatre heures et quatre jours [32]. Par ailleurs, les fibres musculaires de type 1, tirant essentiellement leur source énergétique du métabolisme oxydatif des triglycérides, vont être beaucoup plus vulnérables à l'hypoxie (manque d'oxygène) que les fibres de type 2, tirant leur énergie de la glycolyse anaérobie. Ainsi, le degré de dommage musculaire suite à une ischémie va directement dépendre du temps d'hypoxie et de la nature des fibres composant le muscle [33].

Suite à une ischémie, la pression partielle d'oxygène chute dans les cellules conduisant à une perte de la phosphorylation oxydative. Au bout de six heures d'ischémie musculaire, une forte déplétion énergétique, correspondant à une réduction de 80% des niveaux d'ATP avant ischémie, entraîne un dysfonctionnement des pompes ioniques ATP-dépendantes, une dépolarisation membranaire, et un afflux intracellulaire de calcium, de sodium et d'eau faisant gonfler les cellules. L'élévation du calcium intracellulaire entraîne une cascade d'événements délétères dont un dysfonctionnement des mitochondries (déficit énergétique et synthèse de radicaux libres), la dérégulation d'enzymes dégradant les macromolécules (lipases, endonucléases et protéases), l'activation de l'eNOS (endothelial nitric oxide synthase) de type I (production de radicaux libres) ou encore l'activation de protéases telles que les MMP (matrix metallo-proteinases) [34-37]. L'accumulation des produits du métabolisme anaérobie va s'ajouter à ces modifications et toutes ces dérégulations initiées dans les premières minutes suivant l'hypoxie vont conduire à l'autolyse des composants cellulaires. La dégradation des fibres musculaires s'accompagne également de changements dans la microvascularisation : les cellules endothéliales gonflent, leur membrane cellulaire développe des protusions vers la lumière du capillaire associées à des invaginations cytoplasmiques, le nombre de vésicules augmente et une disjonction entre les cellules adjacentes apparaît, créant des espaces lacunaires à la surface du microvaisseau [38]. Ces changements dans l'ultrastructure des capillaires conduisent à une augmentation de la perméabilité vasculaire aux

protéines plasmatiques et à la formation progressive d'un œdème [39-41]. L'ensemble de ces processus déclenchés dès les premiers instants qui suivent l'ischémie correspondent à la phase de dégénérescence dite intrinsèque. Cette phase va progressivement prendre fin au moment de l'entrée en jeu des cellules sanguines inflammatoires à l'intérieur du muscle lésé, annonçant alors le début de la deuxième phase de la dégénérescence appelée dégénérescence extrinsèque [42].

1.2.b Phase inflammatoire

Les mécanismes initiateurs de la réponse inflammatoire sont encore mal identifiés. L'hypoxie et l'élévation des taux de calcium intracellulaire et de radicaux libres déclenchent l'activation de facteurs de transcription pro-inflammatoires comme HIF-1 (hypoxia inducible factor) [43]. L'activation de ces facteurs de transcription permet l'expression de nombreux médiateurs de l'inflammation tels que le facteur d'activation plaquettaire ou le TNF- α (tumor necrosis factor) et l'IL-1 β . Dans un deuxième temps, ces médiateurs permettent l'expression de molécules d'adhérence à la surface de l'endothélium comme ICAM-1 (intercellular adhesion molecule), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule), P-sélectine et E-sélectine [44-46]. Ces molécules d'adhérence interagissent avec des récepteurs situés à la surface des leucocytes afin de favoriser leur adhérence à l'endothélium, puis leur migration au sein du tissu ischémié (diapédèse). La vitesse avec laquelle est déclenchée la réaction inflammatoire après la lésion écarte toutefois l'hypothèse d'une induction transcriptionnelle de molécules de signalisation. La desmine, une protéine de filament intermédiaire spécifique du muscle, est un candidat à cette initiation inflammatoire car elle est rapidement perdue dans les fibres musculaires après lésion et est capable d'activer le système du complément, qui lui-même déclenche très rapidement la réponse immunitaire innée [47-49].

Les neutrophiles apparaissent dans le tissu musculaire dans les premières heures après la lésion et vont être la population immunitaire majoritaire pendant les premières vingt-quatre heures. Bien que leur rôle ne soit pas clairement établi, ils vont permettre de nettoyer les débris cellulaires et les cellules nécrotiques à la fois par un phénomène de phagocytose mais aussi par la production de radicaux libres et de protéases [50, 51]. La production excessive de radicaux libres va également affecter le tissu sain et aggraver les dommages post-ischémiques [47, 52-55]. Au bout de trente-six à quarante-huit heures suivant l'ischémie, la population de neutrophiles disparaît, laissant progressivement place aux macrophages, qui vont persister dans le tissu pendant la phase de régénération et ne disparaîtront qu'une fois la fusion des nouvelles fibres musculaires achevées [56, 57] (Figure 3).

Deux populations de macrophages vont se succéder au cours de la phase inflammatoire [58, 59]. Les macrophages de type I (M1) présentent un phénotype pro-inflammatoire (Th1) et vont produire des cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α , des radicaux libres et du NO (nitric oxide). La production de niveaux élevés de radicaux libres et de NO va, là aussi, conduire à une aggravation des dommages tissulaires [57, 60, 61]. Le TNF α et l'IL-1 β vont réduire la synthèse des collagènes en favorisant l'activité des MMP sécrétées par les fibroblastes [62] et l'IL-6 va protéger les neutrophiles de l'apoptose, augmentant ainsi leur durée de vie dans le tissu lésé [63]. Sous l'effet de la sécrétion de différentes interleukines, IL-4, -10 et -13, les macrophages M1 vont se convertir en macrophage de type II (M2), vers un phénotype anti-inflammatoire (Th2) deux à quatre jours après la lésion initiale [64]. Les macrophages M2 vont sécréter des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et des facteurs favorisant la prolifération et la différenciation des précurseurs myogéniques [65-67]. Le changement d'état pro-inflammatoire, caractérisé par une activité phagocytaire et la clairance des débris cellulaires et matriciels, vers un état anti-inflammatoire est une étape essentielle pour permettre la régénération du muscle. L'IL-10 et le TGF- β joueraient un rôle central dans cette transition en inhibant la production d'IL-1, IL-6 et TNF- α , supprimant ainsi la réponse pro-inflammatoire. Ils activent également la production de TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases) permettant de stabiliser la matrice [68-70].

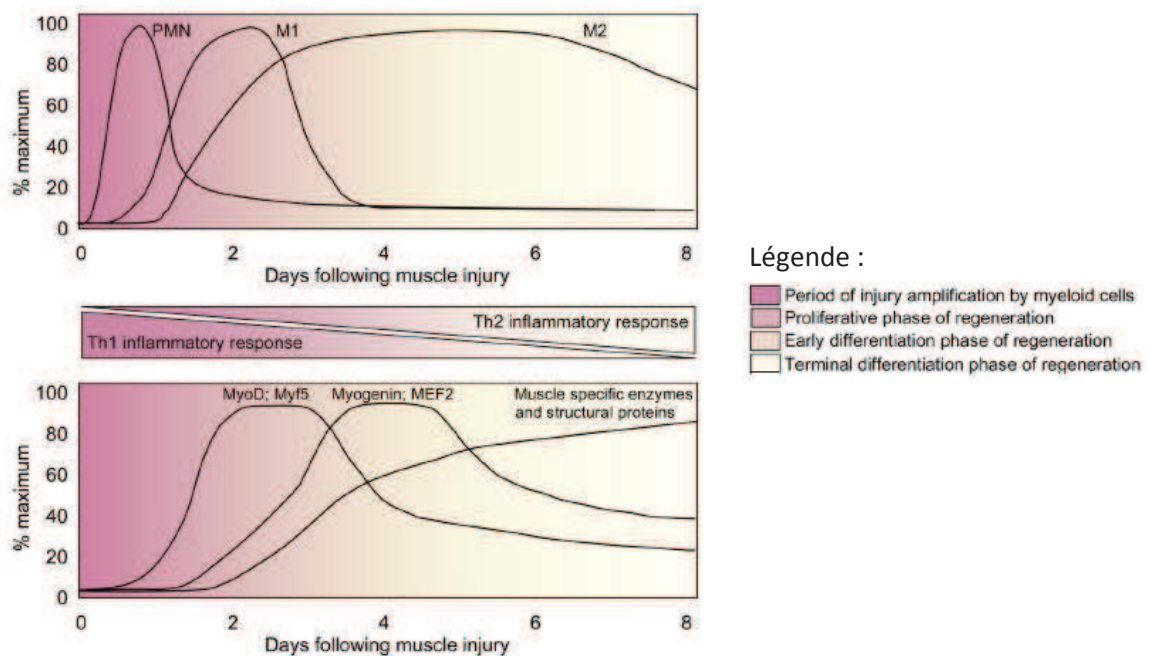


Figure 3 : Evolution des cellules inflammatoires et des marqueurs musculaires après ischémie
(d'après : [59])

La transition entre la réponse pro-inflammatoire (type Th1) et anti-inflammatoire (type Th2) coïncide avec la transition de la phase proliférative et la phase de différenciation terminale de la myogenèse (PMN : neutrophiles polymorphonucléaires ; M1 : macrophages M1 ; M2 : macrophages M2).

I.2.c Régénération et remodelage

Le processus de régénération prend place assez rapidement, alors que la phase pro-inflammatoire n'est pas terminée. Certains médiateurs de l'inflammation, comme le NO, vont permettre l'activation des cellules satellites dès le deuxième jour suivant l'ischémie, probablement par l'activation de MMP qui vont favoriser le relargage matriciel de facteurs de croissance tel que le HGF [71]. Ainsi, au fur et à mesure que les débris issus de la nécrose tissulaire sont éliminés par les cellules pro-inflammatoires, le processus de régénération s'enclenche progressivement afin que de nouvelles fibres musculaires se forment [72]. L'activation des cellules satellites quiescentes est un élément important qui permet d'assurer la formation de nouvelles fibres musculaires. Elle est déclenchée par plusieurs facteurs provenant des fibres lésées (FGF-2 : fibroblast growth factor, PDGF : platelet derived growth factor, HGF) ou des macrophages qui envahissent le site (PDGF, TGF- β , FGF-2, LIF : leukemia inhibitory factor) [73]. Une fois activées, les cellules satellites vont exprimer des facteurs de régulation de la myogenèse selon un processus qui rappelle le développement embryonnaire [25, 74, 75]. Dans un premier temps, elles vont se diviser de façon asymétrique afin de remplacer à la fois les fibres détruites mais aussi les stocks de cellules satellites quiescentes (Figure 4). Les cellules satellites participant à la régénération peuvent provenir du muscle lésé ou de muscles adjacents [25, 75]. Elles vont s'activer et se différencier en myoblastes capables d'exprimer un phénotype musculaire et donc de produire des protéines contractiles telles que la myosine, l'actine, la tropomyosine et la troponine. Les myoblastes vont fusionner entre eux ou avec des fibres survivantes, formant ainsi des myotubes qui donneront, après maturation, des fibres musculaires fonctionnelles [76, 77].

Au cours de la maturation des fibres musculaires régénérées, différentes isoformes de myosine vont se succéder. La séquence de transition des différentes isoformes lors de la régénération est identique à celle observée lors du développement. Les myotubes en formation expriment en premier la myosine embryonnaire (2-3ème jour), suivie de la myosine néonatale (3-4ème jour), puis la myosine « fast » (4-5ème jour) et enfin la myosine « slow » (6-7ème jour) [78]. La transition entre les isoformes immatures (embryonnaires et néonatales) et les isoformes adultes (« fast » et « slow ») se fait toutefois plus rapidement lors de la régénération que lors du développement [79].

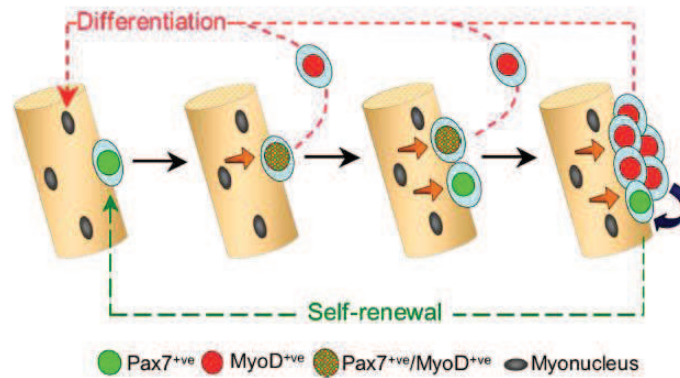


Figure 4 : Activation des cellules satellites

(d'après [80])

Les cellules satellites quiescentes (en vert) deviennent activées et co-expriment Pax7 et MyoD (vert+rouge). Après prolifération, elles donnent naissance à deux types de populations : 1) une population (rouge) qui réprime l'expression de Pax7, maintient celle de MyoD et se différencie, 2) l'autre population (verte) qui perd l'expression de MyoD en maintenant celle de Pax7 et rentre en quiescence permettant le renouvellement du pool de cellules quiescentes.

Par ailleurs, l'innervation du muscle est un paramètre essentiel induisant et maintenant l'expression de la myosine « slow » [81, 82]. A la suite de la dégénérescence d'un muscle, les terminaisons des axones se rétractent puis forment des bourgeons. Ces bourgeons vont se mettre en contact avec les fibres en cours de régénération et établir de nouvelles jonctions neuromusculaires, à l'emplacement des jonctions précédentes [83]. Bien que la lame basale entourant les fibres musculaires ainsi que certaines protéines (NCAM : neural cell adhesion molecule, tenascine) semblent jouer un rôle important dans l'orientation et la formation de l'arborescence finale des axones, les facteurs attracteurs et les mécanismes impliqués ne sont pas encore connus [84]. Même si les premières étapes de la régénération musculaire se font en absence d'innervation fonctionnelle, les connexions neuromusculaires, établies dès trois jours suivant la lésion, sont indispensables à la croissance et la maturation des fibres musculaires [85, 86].

En même temps que la régénération du muscle, le réseau vasculaire doit également se reformer au niveau du site lésé. Il a été montré que les niveaux transcriptionnels et traductionnels de VEGF (vascular endothelial growth factor) et VEGFR-2 (VEGF receptor), sous le contrôle de HIF1- α , augmentaient immédiatement au moment de l'hypoxie. L'augmentation de la production de VEGF se poursuit au moins pendant trois semaines suivant l'accident ischémique et s'accompagne d'une prolifération des cellules endothéliales et d'une augmentation de la capillarité. Le FGF-2 est également fortement exprimé après ischémie mais cette surexpression disparaît au bout d'une semaine [30, 87-89]. Une des particularités du processus de revascularisation est de progresser de

manière centripète au sein du muscle : on observe un gradient de vascularisation de la périphérie vers le centre du muscle. La progression de cette vascularisation va de pair avec l'invasion des cellules phagocytaires, permettant ainsi l'élimination des débris cellulaires et le remodelage tissulaire. Il est courant que le centre du muscle ne soit pas revascularisé et soit remplacé alors par du tissu conjonctif [90]. Contrairement à la ré-innervation, il semble que la revascularisation se fasse à partir de plusieurs vaisseaux sans rapport avec l'ancienne vascularisation [42], bien que les mécanismes de revascularisation soient également mal définis.

Enfin, le retour à l'homéostasie calcique est aussi un point clé de la régénération musculaire. Le réticulum sarcoplasmique est capable de capturer le calcium via une pompe Ca^{2+} -ATPase appelée SERCA (sarco/endo-plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase). Il existe peu d'études sur l'expression des différentes isoformes de SERCA dans le muscle squelettique au cours de la régénération. Les niveaux d'expression protéique des SERCA 1A/B et 2A diminuent suite à la lésion pour atteindre un minimum vers le troisième jour. Puis, l'expression des deux isoformes revient progressivement à un niveau basal au bout de trois à cinq jours pour SERCA 1A/B et au bout de dix à vingt-et-un jours pour SERCA 2A [91]. Par ailleurs, l'activité électrique du muscle va moduler l'expression des différentes isoformes de SERCA [92, 93].

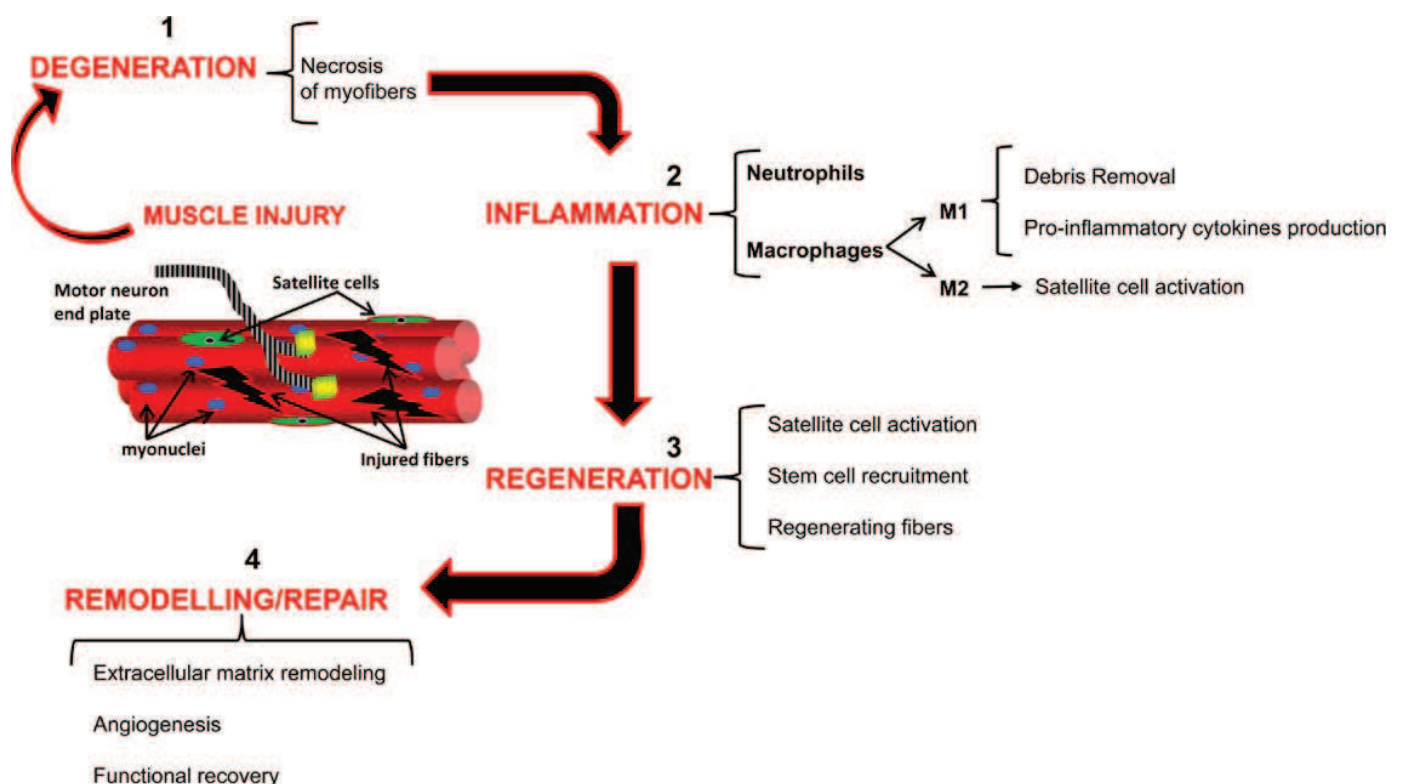


Figure 5 : Les quatre phases chronologiques interdépendantes de la régénération musculaire (d'après :[94])

Ainsi, la régénération musculaire se déroule en quatre phases chronologiques interdépendantes : dégénération, inflammation, régénération et remodelage. Chacune de ses phases implique des populations cellulaires différentes, avec des besoins distincts tant en terme de facteurs solubles qu'en terme d'interactions physiques pour la migration ou la prolifération cellulaires. Ces besoins spécifiques nécessitent donc un remodelage matriciel dynamique accompagnant la progression du processus de régénération [95, 96]. Ainsi, au cours de la régénération musculaire dans deux modèles chez la souris et le rat, il a été démontré (zymographie, hybridation *in situ*, western blot et PCR quantitative) que l'activité de la MMP-9 est corrélée avec la réponse inflammatoire et l'activation des cellules satellites alors que l'activité de la MMP-2 est corrélée avec la formation de nouvelles fibres musculaires [97, 98]. Ces résultats sont confortés par une étude très récente chez la souris montrant que l'injection intramusculaire d'un inhibiteur des MMP (composé GM6001) réduit la régénération musculaire, avec une fibrose plus importante, et au cours de laquelle aucune cellule Pax7 n'est retrouvée alors qu'elles sont présentes dans le muscle non traité. *In vitro*, cet inhibiteur n'affecte pas les capacités prolifératives des myoblastes ou des cellules satellites mais diminue fortement leur capacité migratoire et leur fusion en myotubes [99]. De plus, une étude également très récente a démontré que l'expression et l'activité de la MMP-13 étaient transitoirement augmentées au cours de la régénération musculaire chez la souris. *In vitro*, l'expression de la MMP-13 augmente après la fusion des myoblastes, et l'inhibition spécifique de cette enzyme réduit leur capacité de migration et ralentit leur différenciation en myotubes [100]. Les MMP vont dégrader les collagènes mais aussi et surtout les PG de la MEC, dont le perlécan et le biglycan, et induire la libération de facteurs de croissance ou de fragments protéiques modulant l'inflammation, l'angiogenèse ou la myogenèse (voir : II.3).

Toutefois, le programme complet de régénération est affecté avec l'âge, les lésions étendues ou chroniques ou dans tout autre contexte pathologique. Cette dysfonction du processus de réparation, probablement à cause de la diminution du pool des cellules souches ou de l'altération de signaux environnementaux, conduit à un dépôt de tissu fibrotique et à une perte fonctionnelle du muscle. Il est donc nécessaire de développer des protocoles thérapeutiques favorisant la réparation musculaire.

I.3 Thérapeutique conventionnelle de l'ischémie

I.3.a Traitement médicamenteux

Plusieurs drogues sont prescrites pour prévenir et limiter les accidents vasculaires : l'aspirine, le clopidogrel ou encore le dipyridamole. Ces trois molécules ont des voies d'action différentes mais ont toutes pour but d'empêcher l'agrégation plaquettaire et donc la formation de caillots menant à un nouvel épisode ischémique. Il s'agit de traitements prophylactiques, qui n'ont aucun effet sur la réparation tissulaire.

L'aspirine (acide acétylsalicylique) inhibe la cyclooxygénase-1 (COX-1), par acétylation irréversible de la serine 530, une enzyme plaquettaire permettant la synthèse des prostaglandines G_2/H_2 . La production de prostaglandines est la première étape du processus de transformation de l'acide arachidonique en thromboxane A_2 , un puissant activateur de l'agrégation plaquettaire [101, 102].

Le clopidogrel est métabolisé dans le foie par les cytochromes P450 en un métabolite actif présentant un groupement thiol libre. Le métabolite du clopidogrel va inhiber l'agrégation plaquettaire en inactivant le récepteur de l'adénosine diphosphate $P2Y_{12}$ via la formation d'un pont disulfure entre son groupement thiol et les cystéines extracellulaires du récepteur [103].

Le dipyridamole bloque la capture de l'adénosine par différents types cellulaires, incluant les globules rouges, les plaquettes et les cellules endothéliales, par inhibition des transporteurs de nucléosides [104]. L'inhibition de la capture de l'adénosine conduit à une élévation des taux extracellulaires d'adénosine inhibant la fonction plaquettaire et favorisant la vasodilatation. L'inhibition de certaines phosphodiésterases par le dipyridamole renforce également cet effet vasodilatateur [105]. De plus, le dipyridamole présente des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires qui vont protéger les microvaisseaux. Il favorise également la plasticité des globules rouges, réduisant ainsi la viscosité sanguine [106, 107].

I.3.b Intervention chirurgicale

La revascularisation chirurgicale des membres inférieurs suite à une ischémie peut se faire selon deux méthodes : les greffes vasculaires ou l'angioplastie. Les greffes consistent à détourner le flux sanguin en amont de la zone lésée et à l'acheminer en aval de cette zone. Pour cela, les chirurgiens posent soit un composant de synthèse biocompatible (polyester, polytetrafluoroéthylène), soit un prélèvement de veine ou d'artère autologue ou allogénique. Le principe de l'angioplastie est tout autre et consiste à introduire un ballon gonflable dans la lumière du vaisseau présentant une plaque d'athérome. Le gonflement du ballon à cet endroit, où le diamètre luminal est rétréci, va permettre de dilater le vaisseau et ainsi rétablir le flux sanguin initial. La pose d'une endoprothèse métallique (stent) suit cette manipulation et permet de conserver l'ouverture luminale. L'angioplastie est une intervention nettement moins invasive et permet de réduire la durée d'hospitalisation et les coûts associés comparée à la greffe vasculaire, mais le bénéfice est plus limité dans le temps [108]. Par ailleurs, la prolifération de cellules musculaires lisses autour du stent peut conduire à une nouvelle obstruction du vaisseau (resténose) [109]. La greffe vasculaire présente cependant de nombreux risques liés à l'intervention en elle-même et ne peut pas être réalisée sur tous les patients. D'une manière générale, ces interventions chirurgicales nécessitent dans près de la moitié des cas une seconde intervention dans les trois à six mois suivants (pour revue : [110, 111]). Enfin, des études ont montré que parmi les patients pour qui aucune stratégie de revascularisation n'est envisageable, un an après leur ischémie la moitié d'entre eux continuent leur vie sans amputation, 25% ont par la suite eu recours à une amputation majeure et 25% sont décédés [112].

I.4 Biothérapie de l'ischémie : les défis à relever

L'échec fréquent des techniques de revascularisation reflète la nécessité d'aller au-delà du simple apport d'oxygène et de nutriments. Le réseau vasculaire doit pouvoir répondre aux stimuli environnementaux lui permettant d'adapter la micro-vascularisation autour de l'organe en fonction des efforts physiques mais aussi sa capacité de vasodilatation/vasoconstriction modulant le flux sanguin [113]. La nécessité de développer des nouvelles stratégies de revascularisation s'est également posée face aux complications suite à l'intervention chirurgicale (resténose) ainsi que pour les patients présentant des lésions vasculaires systémiques. Ainsi, il a été envisagé d'induire une vascularisation endogène par biothérapie, par des stratégies par transfert de gènes, injection de protéines ou de cellules souches.

I.4.a Thérapie génique

La thérapie génique est définie comme l'introduction de matériel génétique dans une cellule somatique afin de traiter une pathologie. Ce transfert de gène peut se faire selon différentes méthodes : physiques, chimiques ou biologiques (Figure 6). On utilise préférentiellement le terme de transfection lorsque le transfert de gène est réalisé par des méthodes physiques ou chimiques alors que la transduction est un terme propre aux méthodes biologiques, c'est-à-dire l'utilisation de vecteurs viraux. Le traitement de l'ischémie par thérapie génique inclut le transfert de gènes impliqués dans l'angiogenèse et en particulier : FGF-1 et -2, VEGF-A et HGF [114] (voir III.1.c).

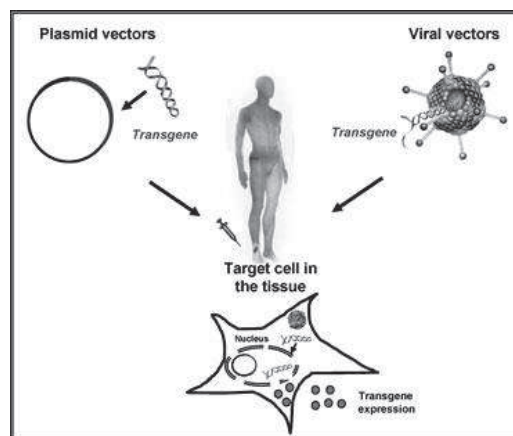


Figure 6 : Approches de la thérapie génique

(d'après : [115])

La thérapie génique est basée sur l'introduction d'un gène dans une cellule cible afin de permettre l'expression de la protéine thérapeutique dans un environnement ciblé. Le transgène peut être transfecté dans une cellule via un simple plasmique ou transduit à l'aide de vecteurs viraux.

L'injection directe de plasmide « nu » dans le muscle squelettique permet de maintenir l'expression du transgène pendant plusieurs mois, sans intégration dans le génome de la cellule hôte [116, 117]. Malgré une faible efficacité de transfection (absence de transport actif), cette méthode induit un effet biologique significatif. En effet, une étude chez le lapin a montré que l'injection intramusculaire d'un plasmide portant le gène du VEGF augmente la vascularisation et le flux sanguin dans les muscles ischémiés [118]. Une autre étude chez le rat montre que l'injection du gène de SDF-1 est aussi efficace et suggère que la sécrétion de cytokines pro-angiogéniques par le muscle ischémique traité favorise le recrutement des cellules endothéliales régénératrices [119]. Toutefois, le plasmide « nu » présente une demi-vie très courte à cause de sa vulnérabilité à l'activité des nucléases cellulaires et il induit une réaction inflammatoire qui réduit considérablement son expression à long terme [120], nécessitant alors des injections répétées pour avoir un effet durable [121]. Ainsi, des essais cliniques de phase I ont été menés sur des patients présentant une ischémie chronique des membres inférieurs et ont montré, après une double injection de plasmides (deux à quatre semaines entre chaque injection) portant le gène du VEGF ou de l'HGF, une amélioration de la vascularisation collatérale et un meilleur flux sanguin dans le muscle traité, ainsi qu'une diminution de la douleur [122, 123]. Ces résultats ont été obtenus lors d'un suivi à trois mois après le traitement et peu de données sont disponibles sur l'effet à plus long terme.

Ainsi, afin d'augmenter l'efficacité de transfection et accroître l'expression à long terme, le transgène peut être associé à un vecteur. Les vecteurs vont protéger l'ADN de sa dégradation avant et après entrée dans la cellule receveuse et faciliter son transport jusqu'au noyau. On distingue les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux.

Les vecteurs non-viraux les plus étudiés sont les liposomes : des particules de bicouches lipidiques qui forment spontanément une couche lipophile autour du plasmide. Le complexe liposome-gène ainsi formé pénètre dans la cellule hôte par fusion avec la membrane plasmique [124]. Les liposomes ont l'avantage de pouvoir contenir de larges séquences d'ADN et n'induisent pas de réaction immunitaire. Par ailleurs, leur préparation technique est facile et sans danger. Cette approche a, par exemple, été testée dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez la souris, où un plasmide comportant le gène du FGF-2 a été encapsulé dans un liposome. Le muscle cible a été stimulé par des ultra-sons afin de favoriser la transfection. Ce protocole a permis d'induire une vascularisation et de rétablir le flux sanguin dans le muscle ischémié [125]. Toutefois, la transfection par les liposomes reste beaucoup moins efficace que les vecteurs viraux. D'autres

approches non-virales continuent de se développer, comme les complexes peptides-ADN ou les polymères cationiques, associés ou non à des liposomes [126, 127].

Parmi les vecteurs viraux, les vecteurs préparés à partir d'adénovirus sont les plus communs. Ils permettent une production de vecteurs à grande échelle et une transduction efficace dans des cellules différenciées en division ou post-mitotiques. De plus, le transgène ne s'intègre pas à l'ADN ce qui exclut toute altération permanente du génome de la cellule hôte [124], mais limite aussi l'expression transgénique dans le temps. Une étude réalisée chez le rat montre que l'injection du gène du VEGF par un vecteur adénoviral augmente la vascularisation et le flux sanguin dans le muscle ischémié traité [128]. Ces résultats sont confirmés chez la souris dans une étude utilisant comme vecteur un cytomégalovirus modifié, montrant en plus que l'association de deux gènes, ici le VEGF et l'HGF, améliore d'autant plus la densité vasculaire comparé au transfert d'un seul des deux gènes [129]. Cependant, les analyses fonctionnelles des muscles traités dans ces études sont réalisées entre trois et six semaines après transfert génique, ne reflétant pas un bénéfice à long terme. D'autre part, les adénovirus présentent un tropisme très large ne permettant pas de cibler un tissu spécifique et induisent une réaction immunitaire très forte empêchant une seconde injection [130]. Les rétrovirus sont également une voie prometteuse car ils permettent un transfert intégratif, donc stable dans le temps, mais ces virus n'infectent que les cellules mitotiques et l'insertion du transgène, encore non contrôlée, pourrait activer un oncogène. La construction de vecteurs à partir d'autres virus reste à l'étude.

Enfin, la sélection du vecteur le plus adapté est la première étape de la thérapie génique qui implique également de déterminer par la suite la meilleure voie de délivrance : injection intra ou extra vasculaire, intramusculaire ou transfert *ex vivo*.

I.4.b Thérapie à base de facteurs de croissance

La thérapie à base de facteurs de croissance consiste en la délivrance de solutions homogènes ou de cocktails de protéines recombinantes. Parmi les protéines utilisées, on retrouve les FGF-1 et -2, le VEGF-A et le HGF cités précédemment, mais aussi d'autres facteurs pro-angiogéniques comme les angiopoïétines, le PDGF, l'IGF (insulin-like growth factor), l'EPO (erythropoïétin), le G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), le SCF (stem cell factor) ou encore les morphogènes comme Shh, Wnt et Notch [131, 132]. La production de protéine recombinante de grade clinique à large échelle est un processus maintenant bien maîtrisé. Néanmoins, maintenir un effet pro-angiogénique sur un site spécifique à l'aide de facteurs de croissance demeure un vrai challenge. En effet, bien que l'injection systémique soit une voie de délivrance facile, elle ne permet pas de cibler la zone lésée et entraîne une forte dilution du bolus initial. Par ailleurs, les protéines exogènes injectées sont très rapidement éliminées par phagocytose. Dans ces conditions, il est nécessaire de répéter des injections à forte dose, représentant un coût thérapeutique très élevé. Par exemple, l'étude clinique TRAFFIC (Therapeutic Angiogenesis with recombinant Fibroblast Growth Factor-2 for Intermittent Claudication) menée avec des patients atteints de claudication intermittente a montré que l'injection de FGF-2 par voie intra-artérielle augmentait le temps de marche maximum des patients lors du suivi à trois mois, mais cet effet bénéfique disparaissait lors du suivi à six mois [133].

En conséquence, de nouvelles approches se sont développées afin de permettre un contrôle localisé du relargage des protéines thérapeutiques. Les vecteurs de délivrance auxquels sont associés les facteurs angiogéniques peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Les matériaux naturels sont hautement biocompatibles et dégradés dans le temps, ne laissant alors aucune trace du traitement à long terme. Cependant, la qualité et la pureté des produits naturels sont encore difficiles à contrôler pour une production massive. D'autre part, les produits de synthèse sont fabriqués selon des procédés à haut contrôle qualité, mais ils présentent une moins grande biocompatibilité. Le champ de recherche dans cette discipline évolue vers une association des deux approches : les produits naturels apportant la biocompatibilité et les produits synthétiques renforçant la durée de vie et le panel d'utilisation possible du dispositif mixte. Parmi les vecteurs développés pour le contrôle du relargage des protéines thérapeutiques, on peut citer l'alginate [134], les collagènes [135, 136], la fibrine [137], le chitosan [138] (voir II.4.a), le poly-ethylene glycol (PEG) [139], ... (pour revue : [140]). Ces vecteurs pouvant se présenter sous forme de patches, microparticules ou nanosphères (Figure 7).

Par exemple, dans une étude *in vivo* les auteurs ont préparé différents types de matrices de collagènes : collagène seul, collagène et héparine, collagène-héparine et FGF-2, collagène-héparine et VEGF et enfin collagène-héparine-FGF-2 et VEGF. Vingt-et-un jours après implantation ectopique chez le rat, seule la combinaison complète, avec l'héparine et les deux facteurs de croissance, se démarque des autres en potentialisant la formation de vaisseaux caractérisée par la détection de collagène de type IV et le nombre de cellules exprimant l'actine musculaire lisse (SMA). De plus, cette matrice ne renferme quasiment aucune cellule hypoxique, déterminé par la détection d'HIF-1 α , alors que la matrice de collagène seul présente plus de 20% de cellules hypoxiques. La présence d'un seul facteur avec l'héparine réduit ce taux autour de 5% tandis que l'héparine seule n'a pas d'effet [136].

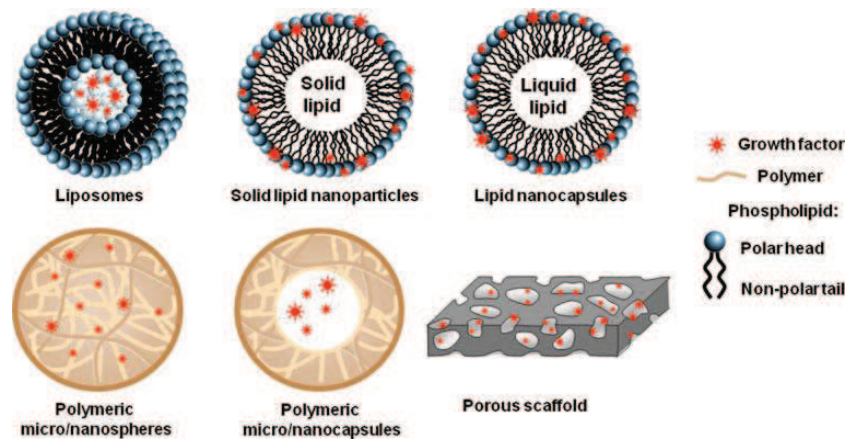


Figure 7 : Représentation schématique des vecteurs de délivrance des facteurs thérapeutiques
(d'après : [132])

Ces différents systèmes de délivrance permettent de protéger et de concentrer les protéines recombinantes dans le site ciblé et facilitent leur entrée dans la cellule le cas échéant.

I.4.c Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire représente la troisième et dernière approche de biothérapie vasculaire actuellement envisagée. Elle est un peu différente des deux précédentes dans la mesure où l'on vise ici à régénérer le tissu par intégration physique de cellules thérapeutiques dans le tissu lésé. La nature des cellules utilisées s'étend des cellules embryonnaires ES aux cellules spécialisées telles que les myoblastes squelettiques ou les progéniteurs endothéliaux. En plus des considérations éthiques, les cellules ES présentent un fort risque de formation de tératomes [141]. Les cellules iPS sont des cellules somatiques différenciées reconditionnées vers un état pluripotent transitoire par transfection des gènes Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4 [142]. Durant cette période déterminée de pluripotence, l'ajustement des conditions de culture permet d'engager les iPS vers une voie de différenciation précise, telle que les différenciations musculaire ou vasculaire. Cette technique permet de s'affranchir des obstacles éthiques liés à l'utilisation des cellules ES mais pas du risque de formation de tératomes. De plus, ce processus reste contraignant tant au niveau de sa mise en œuvre technique que par son coût thérapeutique. L'utilisation de cellules stromales mésenchymateuses a également été envisagée pour leurs propriétés immuno-modulatrices [143] et pro-angiogéniques [144], essentiellement par la forte sécrétion de facteurs solubles [145]. Restent les progéniteurs autologues, myoblastes squelettiques ou endothéliaux circulants (voir : III.4), ne présentant aucun risque de rejet immunitaire, déjà spécifiés, et donc « prêts à l'emploi » pour peu que l'on isole suffisamment de cellules afin d'avoir un effet bénéfique. Toutefois, même si dans de nombreux modèles animaux la thérapie cellulaire, quelque soit le type de cellule utilisé, a engendré de grands espoirs, les résultats cliniques chez l'homme se sont toujours révélés décevants. Le constat est que les cellules thérapeutiques n'ont pas d'effet, ou un effet bénéfique transitoire qui passe par la sécrétion de facteurs solubles [146]. Plusieurs causes de cet échec ont été identifiées. Premièrement, après injection une grande partie des cellules est disséminée dans l'organisme [147], et ce quelque soit le mode d'injection. Cette dissémination systémique pose également la question du devenir des cellules, conditionnées pour une fonction précise, dans les sites ectopiques. Deuxièmement, parmi les cellules retenues sur le site ciblé, la grande majorité d'entre elles (jusqu'à 90%) meurent dans les quelques jours qui suivent l'injection [148]. Cette mort cellulaire fait suite à un phénomène multifactoriel comprenant la réponse inflammatoire du tissu à la lésion initiale justifiant l'intervention et à l'injection elle-même, l'apoptose liée à l'ischémie locale et enfin à la perte des rapports normaux des cellules avec la MEC. Troisièmement, les capacités fonctionnelles des cellules qui survivent dans le tissu cible sont altérées, probablement à cause de la perturbation de l'environnement physico-chimique : pH, déstructuration matricielle, signaux inflammatoires, etc...

En conclusion, les différentes approches de biothérapies, thérapie génique, thérapie par facteurs de croissance et thérapie cellulaire, ont montré leur faisabilité technique mais restent limitées dans leur effet biologique. Plusieurs tentatives d'association de ces différentes approches ont été menées : transfert de gènes dans des cellules progénitrices, pré-conditionnement ou co-injection de facteurs de croissance avec des cellules, etc... (voir : III.4.d). Bien que ces doubles approches présentent des améliorations comparées à une approche unique, les effets restent et demeurent marginaux. Ainsi, quelque soit l'approche envisagée, il semble aujourd'hui absolument indispensable de prendre en compte le microenvironnement dans lequel les produits thérapeutiques sont délivrés. Ce n'est que par la compréhension fondamentale des processus matriciels engagés après dégénération tissulaire et par la reconstitution d'une MEC apportant un microenvironnement tridimensionnel physiologique stable que l'on pourra optimiser les biothérapies.

II Les glycosaminoglycannes : des polysaccharides polyvalents

II.1 La matrice extracellulaire (MEC)

II.1.a Les macromolécules composant la MEC

La matrice extracellulaire (MEC) est un assemblage défini et structuré de plusieurs macromolécules qui lie les cellules et organise spécifiquement chaque tissu. Selon le tissu considéré, la proportion entre compartiment cellulaire et compartiment matriciel varie. La MEC entoure les cellules qui la synthétisent et module en retour leur phénotype. Les macromolécules de la MEC sont regroupées en quatre grandes familles : les collagènes, les glycoprotéines de structure, l'élastine et les protéoglycannes.

Les collagènes sont les protéines majoritaires dans l'organisme humain [149]. Ils forment une famille de vingt-sept membres distincts (I à XXVII) regroupés en deux grandes sous-familles : les collagènes fibrillaires et les collagènes non-fibrillaires. Chaque molécule de collagène est un homotrimère ou un hétérotrimère composé de trois chaînes α , ayant un ou plusieurs domaines en triple hélice. La fonction principale des collagènes est de conférer une résistance mécanique aux tissus.

Les glycoprotéines de structure sont des protéines sur lesquelles sont greffées de courtes chaînes glucidiques [150]. Certaines sont ubiquitaires comme la fibronectine, d'autres ont des localisations plus spécifiques comme les laminines des membranes basales. Bien qu'hétérogènes en taille, structure et distribution tissulaire, ces glycoprotéines ont plusieurs points communs : elles contiennent plusieurs domaines structuraux et fonctionnels, plusieurs sites de fixation aux cellules via les intégrines ou autre récepteur (dont le plus fréquent contient la séquence Arg-Gly-Asp : RGD) et plusieurs sites d'interactions avec les autres macromolécules extracellulaires. La plupart de ces glycoprotéines sont des multimères. La fibronectine joue un rôle essentiel dans la fixation des cellules à la MEC et l'organisation du cytosquelette. Les laminines participent à la structure des membranes basales dans lesquelles elles interagissent avec les collagènes et les protéoglycannes.

Les autres glycoprotéines de structure sont la vitronectine, l'entactine, les ténascines, les thrombospondines, l'ostéonectine et les glycoprotéines associées à l'élastine.

L'élastine est une protéine de 72 kDa, riche en glycine (un tiers des acides aminés), lysine et acides aminés hydrophobes dont la proline [151-153]. Elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme de monomères de tropoélastine qui vont s'aggréger entre eux grâce aux résidus lysine afin de former une fibre. Cette fibre d'élastine est ensuite recouverte par un maillage de protéines microfibrillaires (dont la famille des fibrillines) formant ainsi la fibre élastique. Les fibres élastiques sont associées aux collagènes et peuvent subir des milliards de cycles de compression – relâchement sans se rompre, protégeant ainsi les tissus à propriété élastique tels que le poumon, la peau ou les vaisseaux sanguins de gros calibres.

Les protéoglycannes (PG) sont des protéines sur lesquelles sont greffées de façon covalente une à plusieurs dizaines de chaînes de glycosaminoglycannes (GAG), autrefois nommés mucopolysaccharides [154]. Les GAG sont des polysaccharides chargés négativement ce qui leur permet de fixer de nombreuses molécules d'eau. Les PG confèrent ainsi au tissu sa propriété d'hydratation, essentielle pour résister à de fortes variations de pression (cartilage, vaisseaux sanguins). Par ailleurs, les PG, via les chaînes de GAG, sont capables de fixer certains facteurs de croissance ou cytokines (dits « liant l'héparine » ou heparin binding growth factor) et jouent le rôle de co-récepteurs, contrôlent la biodisponibilité et/ou la fonction de ces facteurs.

Ces quatre grandes familles de macromolécules de la MEC vont toutes interagir entre elles et ainsi participer à la mise en place et au maintien de la cohésion tissulaire.

II.1.b Régulation de la MEC

Dans les différents tissus, la plupart des macromolécules protéiques de la MEC, hormis les PG, sont synthétisées dans la période périnatale et dans l'enfance. Au-delà de la phase de croissance, leurs synthèses sont très faibles et leurs vitesses de renouvellement très lentes : pour les collagènes et l'élastine, de l'ordre de plusieurs dizaines d'années, voire d'une centaine d'année, en l'absence de toute pathologie [155, 156]. Suite à une lésion, le métabolisme de ces macromolécules protéiques peut être réactivé grâce à l'action de protéases particulières : les MMP. Les MMP sont membres d'une famille d'enzymes dont l'activité catalytique dépend de la présence d'un ion zinc dans le site actif. Afin de répondre rapidement aux besoins physiologiques, elles sont pour la plupart synthétisées et relarguées dans le milieu extracellulaire sous forme inactive (pro-MMP), car actives à pH physiologique, permettant une disponibilité immédiate après activation contrôlée. La régulation des MMP se fait à deux niveaux : un premier signal activateur qui va convertir l'enzyme sous forme pro-MMP en MMP active, et en second, une modulation de l'activité par un groupe de protéines spécifiques, les TIMP, qui se fixent au site actif ou à un site allostérique de l'enzyme activée [157]. Ainsi, le métabolisme de la MEC est contrôlé par une balance entre les enzymes responsables de la dégradation des composants matriciels, les MMP et leurs inhibiteurs tissulaires, les TIMP. Alors qu'elle a longtemps été considérée pour son rôle de soutien physique, de nombreuses données montrent que la matrice joue un rôle actif et complexe dans la régulation du comportement des cellules à son contact, influant sur leur développement, leur migration, leur prolifération, leur survie, leur forme et leurs fonctions métaboliques (Figure 8) [158].

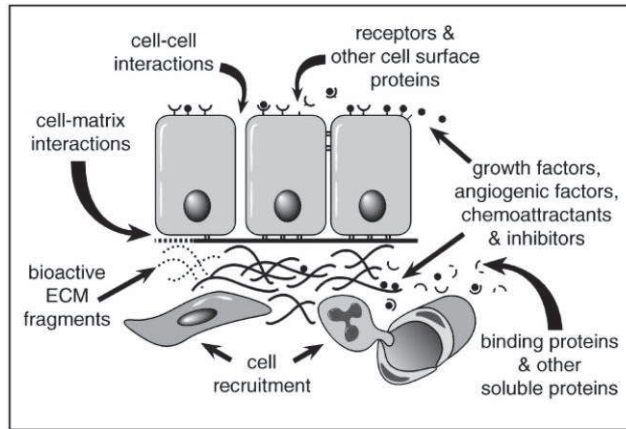


Figure 8 : Modulation du comportement cellulaire par la MEC

(d'après : [157])

La MEC constitue un support d'adhérence cellulaire stable et permet de faciliter la migration cellulaire. Elle constitue également un réservoir important de facteurs de croissance et enzymes impliqués dans le fonctionnement cellulaire. Lors de la dégradation des composants matriciels par les MMP, ces facteurs sont libérés et permettent d'induire un remodelage tissulaire en modulant le comportement des cellules à proximité. La dégradation de la MEC génère également des fragments protéiques et polysaccharidiques ayant un effet direct ou indirect sur le fonctionnement cellulaire.

II.1.c Introduction aux glycosaminoglycannes (GAG)

Constituants majeurs de la MEC, les PG, comme leur nom l'indique, ont une double nature biochimique. Le core protéique va déterminer la localisation cellulaire, et parfois participer à l'induction de la signalisation cellulaire, même si cette dernière va être essentiellement déterminée par la composante polysaccharidique : les chaînes de GAG. Les GAG sont des polymères complexes composés d'une succession d'unités disaccharidiques répétées. Chaque unité disaccharidique est constituée d'un résidu acide uronique, acide glucuronique (GlcA) ou acide iduronique (IdoA), ou d'un galactose (Gal), suivit d'un résidu hexosamine, *N*-acétyl-glucosamine (GlcNAc) ou *N*-acétyl-galactosamine (GalNAc). Ce sont la nature des résidus glucidiques formant l'unité disaccharidique et la liaison entre eux qui vont permettre de distinguer quatre grandes familles de GAG : l'héparine et les héparanes sulfates (HS), les chondroïtines et dermatanes sulfates (CS et DS), les kératanes sulfates (KS) et l'acide hyaluronique (AH) (Tableau 1). Les PG portent une à plusieurs chaînes de GAG sulfatés de nature homogène ou hétérogène. Ainsi, il existe des PG à chaînes de HS, des PG à chaînes d'héparine, des PG à chaînes de CS/DS, des PG à chaînes de KS et des PG à chaînes mixtes. De plus, un même core protéique peut se présenter sous différentes combinaisons de chaînes de GAG en fonction de la nature de la cellule qui le synthétise (Tableau 2).

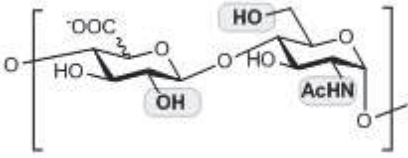
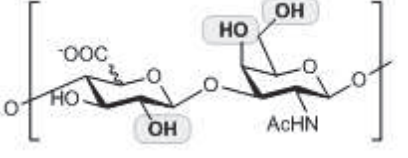
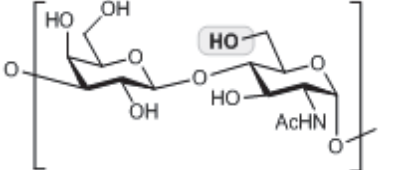
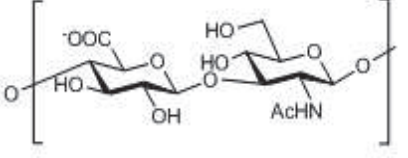
GAG	acide uronique/ galactose	hexosamine	disaccharide
Héparine Héparane Sulfate (HS)	acide D-glucuronique ou acide L-iduronique	D-glucosamine	 <p>GlcAβ(1-4) GlcNAcα(1-4) IdoAα(1-4) GlcNAcα(1-4)</p>
Chondroïtine Sulfate (CS) Dermatane Sulfate (DS)	acide D-glucuronique ou acide L-iduronique	D-galactosamine	 <p>GlcAβ(1-3) GalNAcα(1-4) IdoAα(1-3) GalNAcα(1-4)</p>
Kératane Sulfate (KS)	D-galactose	D-glucosamine	 <p>Galβ(1-4) GlcNAcα(1-3)</p>
Acide Hyaluronique (AH)	acide D-glucuronique	D-glucosamine	 <p>GlcAβ(1-3) GlcNAcα(1-4)</p>

Tableau 1 : Structure des différentes familles de glycosaminoglycannes

(d'après [159])

Les GAG sont fortement chargés négativement par la présence de groupements sulfates et/ou carboxylates et sont de fait, très hydrophiles. Les premières études consacrées aux GAG datent de 1861 avec les travaux de Fischer et Boedeker qui permirent l'isolement des CS à partir de tissus cartilagineux [160]. Au début du vingtième siècle, le développement de la chimie des sucres a permis la découverte progressive des autres GAG, l'héparine en 1927 [161], l'AH en 1934 [162], les DS en 1941 [163] et les KS en 1953 [164]. Toutefois, après cette caractérisation structurale de base des

GAG et devant l'abondance et la maîtrise des techniques liées à l'étude des protéines, les études portant sur la fonctionnalité des PG ont été menées sur la partie protéique. Ce n'est que depuis une trentaine d'années que les techniques d'études sur les sucres se sont mises en place et que l'attention se porte plus particulièrement sur les chaînes de GAG. En effet, ce sont des motifs saccharidiques bien définis au sein des chaînes de GAG qui vont permettre une reconnaissance spécifique des partenaires protéiques. Le premier motif découvert fût un pentasaccharide rare, retrouvé dans un tiers des chaînes d'héparine, et responsable de sa liaison à l'antithrombine III [165, 166]. Or, cette petite séquence de cinq résidus est responsable de l'activité anti-coagulante de l'héparine [167]. La structure fine des GAG est donc en relation directe avec leur fonctionnalité.

Ainsi, par analogie avec les termes «génomome/génomique» et «protéome/protéomique», celui de «glycome/glycomique» est apparu pour répertorier les différents GAG d'un organisme et caractériser leurs structures et fonctions [168].

Protéoglycannes	Core protéique (kD)	Chaînes de GAG
Perlécane	400	1-3 HS
Agrine	200	1-3 HS
Collagène de type XVIII	150	2-3 HS
Syndécans 1-4	30-45	1-3 HS 1-2 CS
Bétaglycan	110	1 HS 1 CS
Glypicans 1-6	60	1-3 HS
Serglycine	10-20	10-15 héparine / CS
Aggrécan	208-220	100 CS
Versican	265	12-15 CS
Neurocan	145	1-2 CS
Brévican	96	0-4 CS
Décorine	36	1 CS
Biglycan	38	1-2 CS

Tableau 2 : Exemples de protéoglycannes

(d'après [169])

II.2 Les GAG : une structure complexe liée à leur biosynthèse

Les GAG, hormis pour l'AH, étant greffés à des cores protéiques pour former les PG, leur biosynthèse est assurée dans les compartiments cellulaires dédiés aux modifications post-traductionnelles, à savoir dans le réticulum endoplasmique et essentiellement dans l'appareil de Golgi.

II.2.a Les Héparanes Sulfates et l'Héparine

Les chaînes de HS sont constituées d'une succession de cinquante à deux-cents unités disaccharidiques plus ou moins sulfatées et composées d'acide glucuronique (GlcA) ou iduronique (IdoA) associé par une liaison de type β 1-4 (si GlcA) ou α 1-4 (si IdoA) à une *N*-acétyl-glucosamine (GlcNAc) (Tableau 1).

Le début du processus de biosynthèse des HS et de l'héparine est commun à celui des CS/DS et débute par la formation d'un tétrasaccharide de liaison à partir d'une sérine ou thréonine portée par le core protéique (Figure 10). Cette sérine/thréonine est incluse à un motif particulier comprenant le dipeptide Ser-Gly et des acides aminés acides [170]. Le tétrasaccharide de liaison est formé par l'addition successive de β -xylose, de deux galactoses et d'un acide glucuronique. Les sucres du tétrasaccharide peuvent être modifiés, on retrouve notamment une phosphorylation sur le xylose dans la moitié des chaînes, mais l'intérêt de cette modification commune aux HS et CS n'est pas encore établi. Tous les sucres ajoutés lors de la biosynthèse des GAG doivent préalablement être activés par un couplage à l'UDP, seul le complexe nucléotide-sucré est utilisable par les enzymes. Après la formation du tétrasaccharide de liaison, les deux voies de biosynthèse des familles des HS ou des CS vont se séparer. L'ajout d'un *N*-acétyl-galactosamine au tétrasaccharide va engager la biosynthèse des CS alors que l'ajout d'un *N*-acétyl-glucosamine va engager la biosynthèse des HS. A partir de là, l'élongation de la chaîne de HS se poursuit en ajoutant alternativement un GlcA par une liaison β 1-4 puis un GlcNAc par une liaison α 1-4 [169]. Cette polymérisation est assurée par les enzymes EXT-1 et EXT-2 (*exostosin glycosyltransferase*) [171] agissant sous forme de complexe hétérodimérique [172]. L'inactivation de l'une ou l'autre isoforme conduit à un arrêt de la synthèse des HS [172]. La chaîne en cours d'élongation se trouve d'abord sous une forme précurseur constituée uniquement de GlcA et GlcNAc et non sulfatée. Cette séquence précurseur est progressivement modifiée par une série de réactions enzymatiques quasi-simultanées (Figure 11),

initiées par la dé-acétylation de la glucosamine et le transfert d'un groupement sulfate sur cette même position (*N*-sulfatation : NS) par les enzymes NDST (*N*-déacetylase/*N*-sulfotransférase). Toutes les isoformes (4 identifiées à ce jour) de NDST présentent deux sites catalytiques indépendants responsables de la dé-acétylation ou de la sulfatation. Toutefois, chaque isoforme a une activité dé-acétylase ou sulfo-transférase propre : la NDST-2 induit un niveau de *N*-sulfatation plus élevé que la NDST-1 [173] et la NDST-3 possède une forte activité dé-acétylase et une activité sulfo-transférase très faible [174]. Cette première modification de dé-acétylation/*N*-sulfatation est un pré-requis nécessaire aux modifications suivantes [175] incluant l'épimérisation en C5 de GlcA en IdoA par l'épimérase GLCE (glucuronic acid epimerase), la sulfatation en C2 de GlcA ou IdoA (2-*O*-sulfatation par HS2ST pour HS-2-O-sulfotransférase), la sulfatation en C6 de GlcNS (6-*O*-sulfatation par HS6ST pour HS-6-O-sulfotransférase) ou de façon beaucoup moins fréquente la sulfatation en C3 sur moins de 1% des GlcNS (3-*O*-sulfatation par HS3ST pour HS-3-O-sulfotransférase) [176]. Les modifications qui se produisent à chaque étape entraînent la formation d'un substrat reconnu par l'enzyme responsable de la modification suivante [177]. Par exemple, l'enzyme GLCE ne peut épimériser les GlcA en IdoA uniquement si ceux-ci sont adjacents à un résidu GlcNS [178]. Les enzymes HS6ST vont préférentiellement modifier des séquences richement sulfatées en C2 de l'acide uronique [179]. La sulfatation en C3 des hexosamines (HS3ST) n'est possible que si elles sont déjà sulfatées en position *N* [180]. Enfin, la HS2ST présente une affinité 5 fois plus forte pour les résidus IdoA comparés aux résidus GlcA [181]. Cependant, il semble que chacune des modifications n'ait pas lieu de façon processive mais que les enzymes forment différents complexes dans l'appareil de Golgi, par exemple GLCE/HS2ST, et agissent simultanément au sein d'un même complexe [182]. Ce système permet une synthèse extrêmement rapide des HS. Toutefois, l'interdépendance des activités enzymatiques, avec des réactions plus ou moins rapides selon les isoformes enzymatiques, la maturation de la chaîne en même temps que le processus d'élongation et la compétition pour les substrats tels que le PAPS (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate), le donneur de sulfate, empêchent l'accomplissement de toutes les modifications.

Ainsi, la structure des HS est polymorphique et présente une alternance de 3 régions particulières : les domaines NS (*N*-sulfaté) hautement sulfatés, les domaines NA (*N*-acétylé) peu ou pas sulfatés et les domaines mixtes NA/NS (Figure 9). Les domaines NS sont plus courts et contiennent entre deux et dix unités disaccharidiques alors que les domaines NA ou NA/NS sont plus longs et contiennent entre seize et dix-huit unités [183, 184]. Par ailleurs, l'héparine est singulièrement plus modifiée que les HS, en conséquence sa structure est enrichie en unités disaccharidiques de type IdoA2S-GlcNS6S. On peut donc assimiler l'héparine à un domaine NS des

HS. L'héparine est probablement le GAG le plus populaire : du fait de ses propriétés anti-coagulantes, elle est utilisée en clinique depuis les années 1930. L'origine du nom de la famille des HS vient du tissu à partir duquel ils ont été initialement isolés : le tissu hépatique. Comme les structures de l'héparine et des HS sont très proches (l'héparine est un variant hypersulfaté des HS), leur activités sont similaires. Toutefois, la présence enrichie d'IdoA au sein de l'héparine lui confère une meilleure flexibilité [185], et alors que les HS sont ubiquitaires et greffés à différents cores protéiques, l'héparine est exclusivement synthétisée par les mastocytes et uniquement greffée à la serglycine [169] (Tableau 3).

Caractéristiques	HS	Héparine
Taille de la chaîne	10-70 kDa	7-20 kDa
ratio sulfate/hexosamine	0,8-1,8	1,8-2,6
GlcNSO ₃	40-60%	≥80%
IdoA	30-50%	≥70%
Lieu de synthèse	pratiquement toutes les cellules	mastocytes
Cores protéiques	perlécane, agrine, syndécans, glypicans, ...	serglycine

Tableau 3 : Différences structurales majeures entre HS et Héparine
(d'après [169])

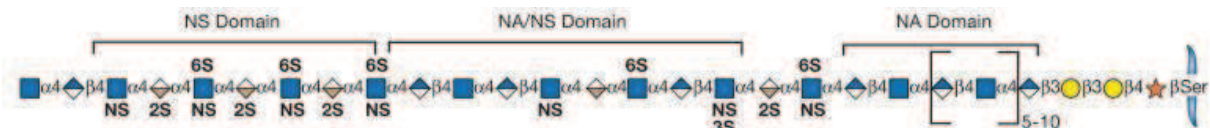
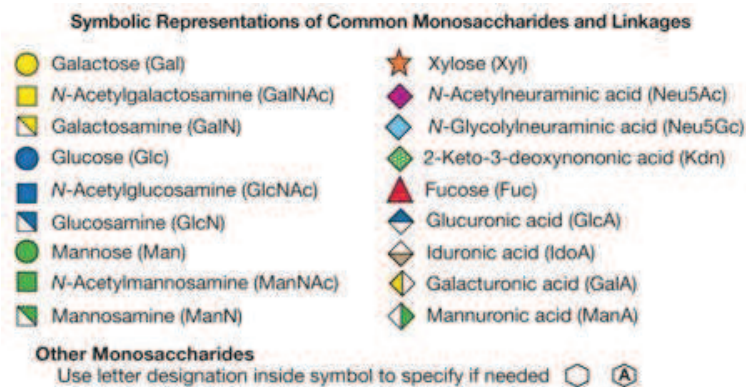


Figure 9 : Les différents domaines d'une chaîne de HS

Légende :



(d'après [169])

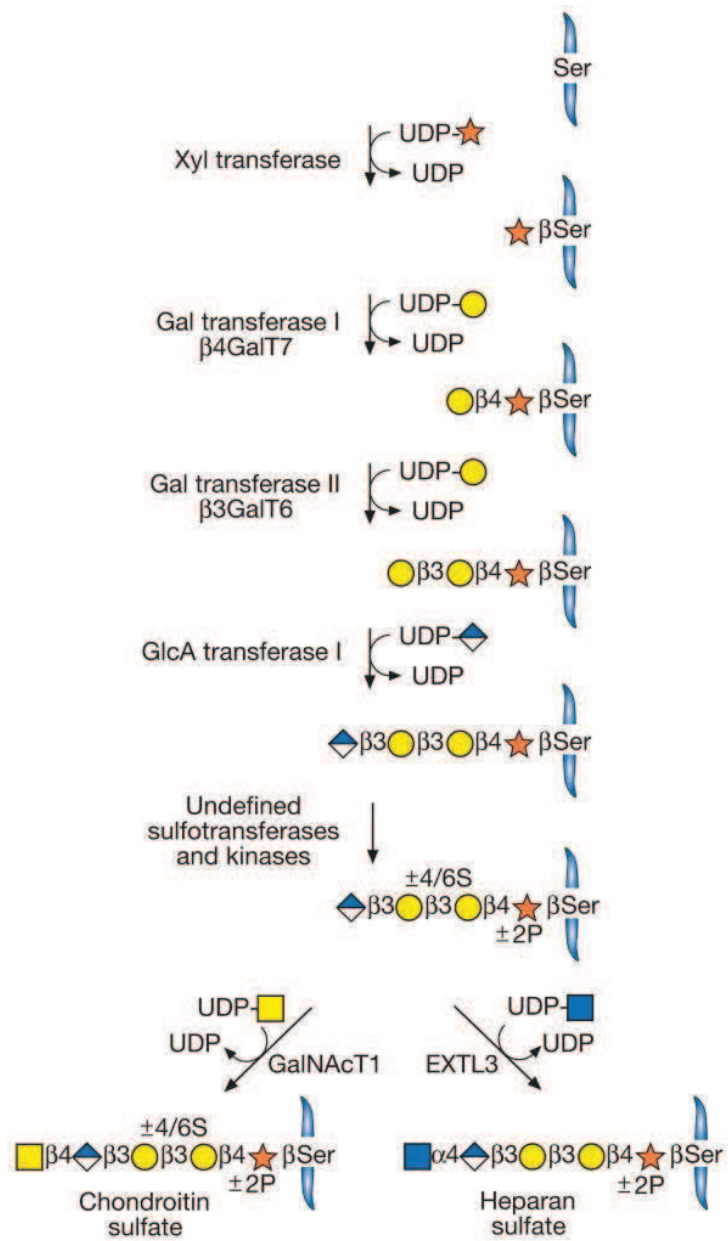
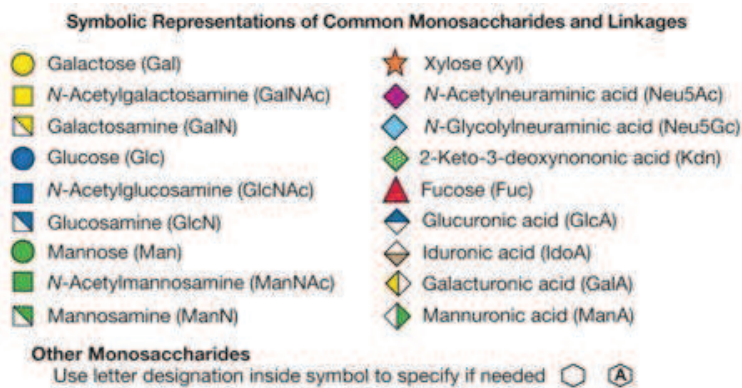


Figure 10 : Initiation de la biosynthèse des HS et des CS

Légende :



(d'après [169])

II.2.b Les Chondroïtines et Dermatanes Sulfates

Les chaînes de CS/DS sont constituées d'une succession de quarante à plus de cent unités disaccharidiques composées d'acide glucuronique (GlcA) ou iduronique (IdoA) associé par une liaison de type β 1-3 (si GlcA) ou α 1-3 (si IdoA) à une N-acétyl-galactosamine (GalNAc) (Tableau 1).

Comme décrit précédemment, le début du processus de biosynthèse des CS/DS est identique à celui des HS jusqu'à l'incorporation du premier résidu GalNAc au tétrasaccharide de liaison (Figure 10). Contrairement à la phosphorylation non spécifique du xylose, la sulfatation en C4 du premier galactose du tétrasaccharide de liaison n'est retrouvée que dans les chaînes de CS/DS et semble donc être un élément clé dans le déterminisme de la voie de synthèse des CS/DS [186]. L'élongation de la chaîne se fait sous le contrôle des enzymes CSS (chondroïtine sulfate synthase ou ChSy). L'isoforme CSS-1 présente une double activité β 1–3 glucuronosyltransférase et β 1–4 N-acétylgalactosaminyltransférase [187-189]. L'isoforme CSS-2 (aussi appelée ChPF pour chondroitin polymerizing factor) est dépourvue d'activité glycosyltransférase propre mais potentialise la polymérisation de la chaîne de CS en présence de CSS-1 [190]. Comme décrit pour les enzymes EXT-1 et EXT-2 lors de l'élongation des chaînes de HS, il semble que l'élongation des chaînes de CS requiert la formation d'un complexe multienzymatique entre les enzymes CSS-1 et CSS-2 [191]. L'épimérisation de GlcA en IdoA fait intervenir une autre enzyme que pour les HS : la DSE (dermatan sulfate epimerase) [192]. La sulfatation des disaccharides de CS est un processus complexe assuré par de multiples sulfotransférases (Figure 11). Les résidus GalNAc peuvent être sulfatés en position 4, 6 ou les deux et les résidus GlcA ou IdoA en position 2. La sulfatation des résidus GalNAc est assurée par une famille d'enzymes nommées CHST (carbohhydrate sulfotransferase) et la sulfatation des résidus GlcA ou IdoA par l'enzyme UST (uronyl-2-sulfotransferase). Plus d'une dizaine de CHST a été identifiée à ce jour. Elles présentent des activités 4-O-sulfotransférase ou 6-O-sulfotransférase, voire les deux, sur les résidus N-acétylgalactosamines. La dénomination des enzymes CHST n'est pas claire car au sein de cette famille les enzymes présentent également des activités sulfotransférase sur des résidus N-acétylglucosamines présents sur les KS. Comme pour les HS, il existe une interdépendance des modifications enzymatiques le long de la chaîne en cours de synthèse. Par exemple, la sulfatation en C4 de la galactosamine empêche la sulfatation en C6 par les enzymes 6-O-sulfotransférases CHST3 (ou C6ST-1 pour CS 6-O-sulfotransferase 1) et CHST7 (ou C6ST-2). Seule l'enzyme CHST15 (N-acétylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase) est capable de reconnaître le substrat GalNAc4S et de transférer un groupement sulfate en C6 sur ce même résidu [193]. L'épimérisation de GlcA en IdoA prévient tout transfert de groupement sulfate en position 4 sur les

galactosamines adjacentes par les CHST11, CHST12 et CHST13 (ou respectivement C4ST-1, 2 et 3 pour CS 4-O-sulfotransferase), nécessitant alors l'intervient d'une enzyme 4-O-sulfotransférase spécifique, la CHST14 (ou D4ST-1 pour dermatan-4-sulfotransferase 1) [194]. Dans la plupart des cas et contrairement aux HS, une même chaîne de CS ne comporte pas toutes les modifications possibles et les modifications qu'elle présente se font de façon régulière tout au long de la chaîne. Ainsi, la structure des CS n'est pas aussi hétérogène que celle des HS et permet de distinguer 5 types de CS, identifiées de A à E (Tableau 4).

Seules les chaînes de DS possèdent une structure plus hétérogène bien que contenant 70 à 99% d'unités saccharidiques de type IdoA α 1-3GalNAc4S, proches de la CS B mais sans sulfatation au niveau d'IdoA, les autres unités disacchariques composant la chaîne étant de type IdoA2S-GalNAc4S (CS B) et GlcAGalNAc6S (CS C) [195]. Tout comme pour l'héparine, la forte proportion de résidus IdoA au sein des chaînes de DS leur confère une plus grande flexibilité [185].

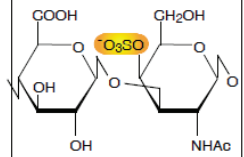
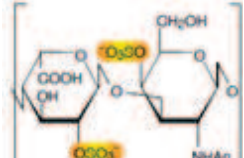
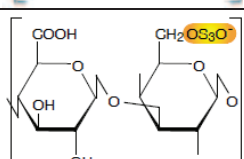
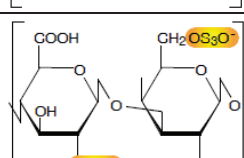
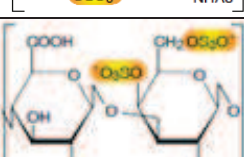
Type de CS	Structure	Unité disaccharidique
CS A		[GlcA β 1-3GalNAc4S]
CS B		[IdoA2S α 1-3GalNAc4S]
CS C		[GlcA β 1-3GalNAc6S]
CS D		[GlcA2S β 1-3GalNAc6S]
CS E		[GlcA β 1-3GalNAc4S,6S]

Tableau 4 : Unités disaccharidiques des différents types de CS

(d'après : [196])

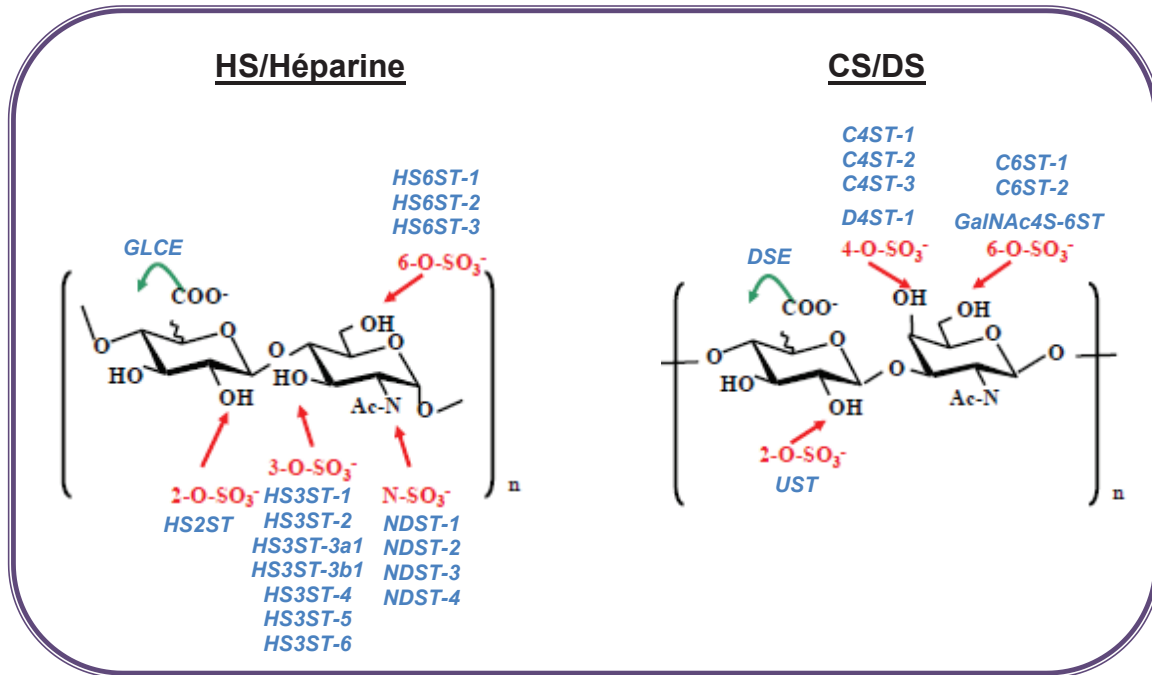


Figure 11 : Modifications des unités disaccharidiques de HS ou CS

(d'après : [197])

Les positions pouvant être sulfatées sont nommées et indiquées en rouge et les groupements pouvant être épimérisés sont repérés par une flèche verte. Les enzymes intervenants dans ces modifications sont indiquées en bleu.

II.2.c Les Kératanes Sulfates

Les chaînes de KS sont constituées de cinquante à quatre-vingts unités disaccharidiques formées par l'association de galactose (Gal) avec une *N*-acétyl-glucosamine (GlcNAc) par une liaison β 1-4. On distingue deux types de KS, KS I et KS II, en fonction de la liaison qui relie la chaîne polysaccharidique au core protéique [198]. Les KS I sont *N*-liés via un résidu asparagine alors que les KS II sont, comme les HS et les CS, *O*-liés via un résidu sérine ou thréonine. Les chaînes de KS contiennent un mélange d'unités disaccharidiques non sulfatées, monosulfatées (Gal-GlcNAc6S) et disulfatées (Gal6S-GlcNAc6S). Une seule enzyme sulfotransférase a été identifiée pour le galactose alors que plusieurs sulfotransférases catalysent la sulfatation de GlcNAc (les CHST1, 2, 4, 5 et 6 sont des KS GlcNAc-6-*O*-sulfotransférases) [169, 198]. Contrairement aux HS ou aux CS qui ont une expression ubiquitaire, l'expression des KS est restreinte à la cornée et au cartilage [169, 198].

II.2.d L'Acide Hyaluronique

L'acide hyaluronique (AH) est le seul GAG non sulfaté et non lié à un core protéique. Sa structure est également beaucoup plus simple et tout à fait homogène, l'AH est constitué de la répétition d'un acide glucuronique (GlcA) suivi d'une *N*-acétyl-glucosamine (GlcNAc) par une liaison β 1-3. Le processus de biosynthèse de l'AH est différent de celui des GAG sulfatés puisqu'il a lieu dans le cytoplasme et à la membrane plasmique [199]. L'AH est synthétisé par les enzymes HAS (hyaluronan synthases) présentant une double activité catalytique permettant aussi bien le transfert de GlcA que de GlcNAc [199, 200]. Les enzymes HAS sont transmembranaires et capturent les résidus glucidiques activés par l'UDP (comme lors de la synthèse des GAG sulfatés) présents dans le cytoplasme [199]. Des études *in vitro* ont montrés que les isoformes HAS-1 et HAS-2 étaient plutôt responsables de la production de chaînes de haut poids moléculaire alors que l'isoforme HAS-3 produirait des chaînes de bas poids moléculaire [201]. La croissance du polymère d'AH se fait en extracellulaire, permettant ainsi un degré de polymérisation extrêmement élevé, de deux-cent-cinquante à vingt-cinq-mille unités disaccharidiques. En moyenne, le polymère d'AH est de l'ordre de dix-mille disaccharides, représentant une chaîne de 10 μ m de longueur et une masse de 3,7.10⁶ Da une fois hydratée [169]. Ainsi, une seule molécule d'AH peut entourer la moitié d'une cellule eucaryote. Les groupes carboxyles portés par l'AH sont chargés négativement au pH cellulaire, faisant de l'AH un polyanion de grande taille. Cette structure polyanionique et les restrictions spatiales autour des liaisons osidiques confèrent à l'AH une structure en bobine relativement rigide [169].

II.2.e Recyclage des GAG

Contrairement aux autres composants de la MEC (II.1.b), le renouvellement des GAG est un processus quasi quotidien [169]. La dégradation des GAG sulfatés se fait dans le compartiment lysosomal après internalisation des PG [202]. Les lysosomes renferment une cinquantaine d'hydrolases permettant de recycler les macromolécules. Des protéases vont se charger de cliver la partie protéique du PG. Les hydrolases ciblant les GAG comprennent les endoglycosidases (dont l'héparanase), les exoglycosidases, les estérases et les sulfatases. Les endoglycosidases clivent à l'intérieur de la chaîne, générant ainsi des oligomères, et sont tolérantes aux modifications chimiques des résidus saccharidiques. Les exoglycosidases vont couper les oligomères polysaccharidiques résidu par résidu à partir de l'extrémité non réductrice. Ces enzymes reconnaissent généralement un seul type de monosaccharide associé à une liaison particulière. De plus, les exoglycosidases ne reconnaissent leur substrat uniquement si les groupements hydroxyles du monosaccharide ne sont pas modifiés. Ainsi, les substitutions en groupement acétates ou sulfates doivent être enlevés, grâce à l'action d'estérases et de sulfatases, avant la poursuite de la dégradation [169]. La dégradation de l'acide hyaluronique suit le même schéma mais implique des enzymes plus spécifiques : les hyaluronidases (Hyal), qui toutefois, ont également une affinité pour les CS [203]. L'AH peut se fixer à un récepteur membranaire, le CD44, et ainsi activer la formation d'un complexe ternaire AH/CD44/Hyal (Hyal-2) résultant de la dégradation de l'AH en oligomères d'une cinquantaine de disaccharides [204]. Ces oligomères vont ensuite être internalisés dans les lysosomes et subir une deuxième étape de dépolymérisation en tétrasaccharide par une autre isoforme de Hyal (Hyal-1) [205]. Puis, l'activité d'exoglucosidases va permettre d'hydrolyser de façon séquentielle ces tétrasaccharides à partir de l'extrémité non réductrice pour obtenir des monomères [206].

Ainsi, les monomères de sucre et les sulfates inorganiques quittent les lysosomes pour être réutilisés par la cellule pour de nouvelles synthèses [207]. La dégradation des GAG permet de renouveler les chaînes polysaccharidiques mais elle intervient également dans la physiologie cellulaire, en réponse aux signaux de l'environnement. En effet, des études plus ciblées sur l'activité de l'héparanase ont montrés que la dégradation des HS permettait de libérer des facteurs solubles initialement séquestrés au sein de la MEC, comme le FGF-2 [208] l'HGF [209], MIP-1 β ou RANTES [210], permettant alors de moduler des processus complexes tels que la réponse inflammatoire [211], l'angiogenèse [208, 212] ou la myogenèse [213] (voir II.3). La dégradation de l'AH est également finement régulée puisque les fonctions de l'AH sont en relation directe avec la longueur de sa chaîne (voir II.3.b).

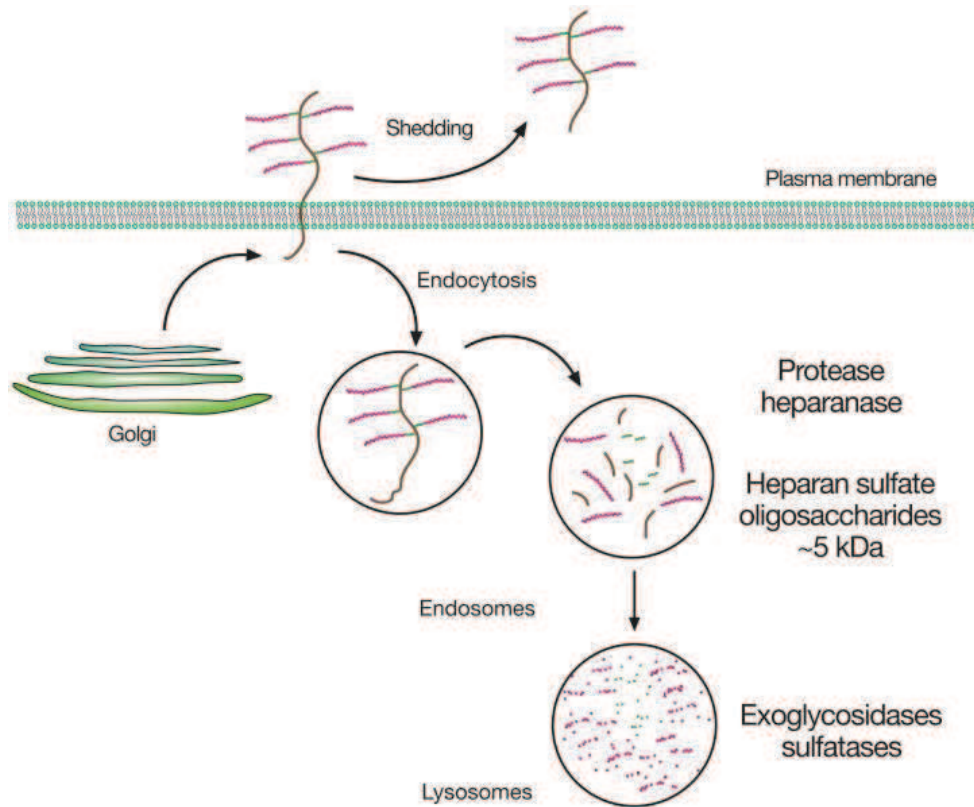


Figure 12 : Recyclage des GAG

(d'après : [169])

Les protéoglycannes sont internalisés par endocytose puis dirigés vers les lysosomes où les protéases vont dégrader le core protéique (marron) et les endoglycosidases génèrent des oligosaccharides à partir de la chaîne de GAG (rose). Les oligosaccharides sont ensuite digérés à l'état de monomères par les exoglycosidases et les modifications chimiques telles que la sulfatation sont éliminées.

II.3 Fonctions biologiques des GAG

II.3.a Généralités

Les GAG, au travers des PG, sont localisés à la membrane plasmique ou au sein de la MEC. Du fait de la viscosité qu'ils confèrent au milieu, ils limitent les forces de compression et servent d'agent lubrifiant. Leurs nombreuses interactions avec les autres composants matriciels permettent de structurer et d'assurer un maintien de l'architecture tissulaire (Figure 13). Par ailleurs, l'arrangement tridimensionnel de l'AH en bobine rigide permet la diffusion des petites molécules mais limite fortement le passage des molécules de haut poids moléculaires. L'AH confère aux tissus des propriétés viscoélastiques [169]. De plus, il constitue un support d'interaction multivalent permettant d'assembler les PG et d'autres macromolécules de la MEC [214].

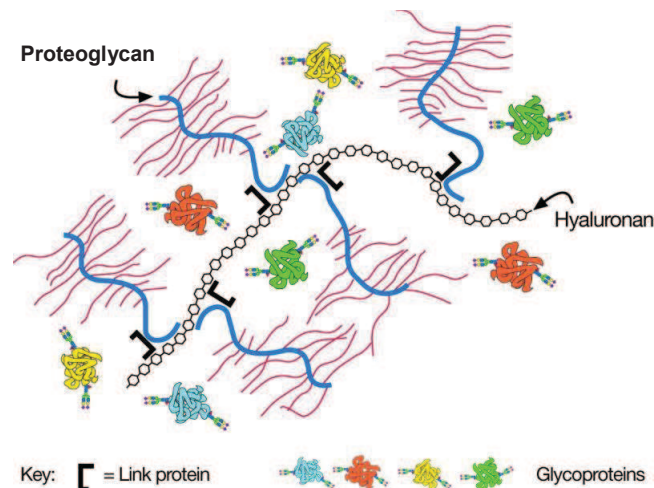


Figure 13 : Organisation de l'architecture matricielle

(d'après : [169])

Chaque chaîne d'AH sert de support d'ancrage à de nombreux PG via des protéines de liaison, permettant ainsi de constituer un réseau matriciel stable et bien organisé auquel s'ajoutent les glycoprotéines de structure.

Outre leurs rôles structuraux, les GAG modulent la signalisation cellulaire en interagissant avec des facteurs de croissance. Par exemple, les HS sont impliqués dans le développement en régulant la diffusion spatio-temporelle de morphogènes tels que Wnt et Shh [215] (Figure 14). La création de gradients morphogéniques par les HS passe par la rétention physique des facteurs au sein de la matrice, l'augmentation de la demi-vie de ces facteurs et leur concentration en une zone bien définie [213]. De plus, en protégeant les facteurs solubles de la dégradation protéolytique, ils assurent une réserve matricielle mobilisée lors des processus de remodelage. En effet, l'activation

des enzymes de dégradation des GAG après une lésion assure un relargage de facteurs favorisant la régénération (II.2.e). De plus, les interactions des facteurs de croissance avec les PG, considérés comme récepteurs de basse affinité, favorisent considérablement leur liaison aux récepteurs de haute affinité.

Le schéma de sulfatation des HS apparaît comme essentiel à la potentialisation des voies de signalisation des facteurs de croissance. La plupart des sites de liaison avec les protéines se trouvent dans les domaines NS ou NA/NS, suggérant l'importance de la sulfatation pour les activités biologiques des HS. En effet, la liaison entre l'héparine et les facteurs de croissance se fait très majoritairement par des interactions ioniques [216]. Sur une protéine les zones riches en acides aminés basiques (chargés positivement) vont pouvoir interagir avec les zones riches en groupements sulfates et/ou carboxylates (chargés négativement) de la chaîne d'héparine. Dans certains cas il existe également une contribution non négligeable des liaisons hydrogènes. Les interactions hydrophobes semblent quant à elles jouer un rôle mineur [216]. Ainsi, les PG, par l'effet des GAG, interviennent dans l'homéostasie tissulaire en modulant la biodisponibilité des facteurs de croissance agissant sur l'adhérence, la migration, la prolifération ou la différenciation cellulaires.

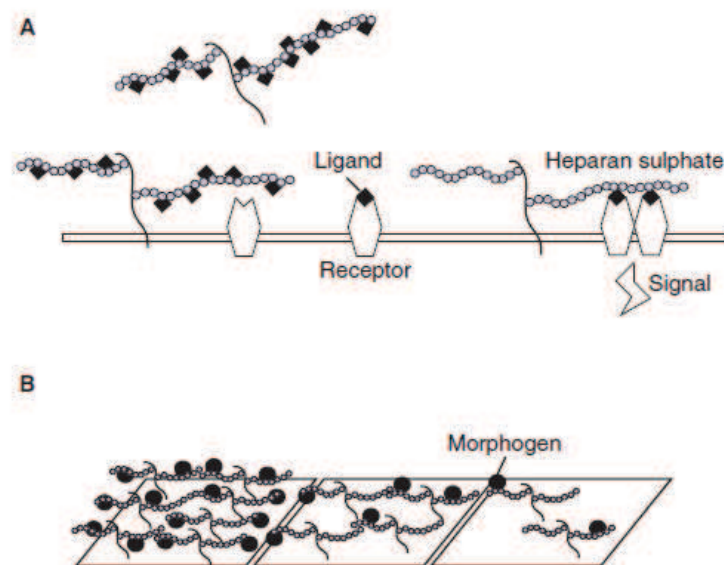


Figure 14 : Les différentes fonctions des GAG

(d'après: [217])

Les PG constituent des réservoirs de facteurs de croissance au sein de la matrice ou à la membrane plasmique et servent de co-récepteurs permettant ou favorisant la liaison du ligand à son récepteur (A). De plus, la distribution spatio-temporelle des PG matriciels permet de générer des gradients de morphogènes ou de chemokines guidant ainsi le comportement cellulaire (B).

II.3.b Régulation de la réponse inflammatoire

Les HS ont la capacité de lier de nombreuses cytokines inflammatoires comme MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein ; CCL3) [218], RANTES (Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted ; CCL5) [219], l'IL-2 [220], l'IL-8 [221] et l'IL-10 [222]. Si peu d'études mécanistiques existent, il a toutefois été démontré que les HS exprimés à la surface des cellules endothéliales interagissent avec les molécules d'adhérence des leucocytes circulants permettant ainsi le recrutement jusqu'au site de la lésion [223, 224]. Ce sont les PG à chaîne de HS syndécans 1 et 2 qui sont impliqués dans la création d'un gradient d'IL-8, sécrété par les cellules endothéliales, permettant de guider la migration des neutrophiles [225, 226]. Une étude a montré, par inactivation du gène NDST-1 chez la souris, que la sulfatation des HS était essentielle afin de permettre le recrutement des neutrophiles par les cellules endothéliales via la L-sélectine et la présentation de l'IL-8 à la surface cellulaire [227]. Au contraire, l'inactivation de l'enzyme HS2ST induit la perte de la 2-O-sulfatation des HS mais provoque une augmentation de la N- et 6-O-sulfatation, conduisant à une meilleure liaison de l'IL-8 et de MIP-2 (CXCL2) et une infiltration plus importante des neutrophiles *in vivo* [228]. De façon intéressante, les cytokines MCP-1, MIP-1 β (CCL4) et RANTES portant une mutation dans leur site de liaison aux GAG conservent une activité chemotactique *in vitro* mais sont incapables de recruter des cellules après injection *in vivo* [229]. Ces résultats suggèrent que la structure quaternaire des cytokines et leur présentation sous forme d'oligomères sont médiées par les GAG et sont essentielles à leur fonction *in vivo* [229-231].

Lors d'une lésion tissulaire l'activation de protéases telles que les MMP va conduire, entre autre, à la libération de biglycan et de décorine (des PG à chaînes de CS) dans le milieu [232], qui vont alors se fixer à différents partenaires membranaires. En effet, le biglycan sous sa forme libre interagit avec les récepteurs TLR2 et TLR4 (Toll Like Receptor) exprimés par les macrophages et déclenche une cascade de signalisation dépendante de NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells) conduisant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α et de chemokines impliquées dans le recrutement des macrophages et des neutrophiles telles que MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein, CCL-2), MIP-1 α et RANTES [233-236]. De la même façon, la décorine libre va lier les récepteurs TLR2/TLR4 et induire ainsi une activation rapide des voies de signalisation dépendantes de p38, des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) et de NF- κ B déclenchant la synthèse des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-12 [237]. Par ailleurs, la décorine lie le TGF- β bloquant ainsi la liaison à son récepteur et la voie de signalisation associée, résultant d'une inhibition de la synthèse de l'IL-10, la cytokine majeure de

l'engagement dans la voie anti-inflammatoire [237]. Le biglycan et la décorine sont également capables de lier le TNF- α [238] et le TGF- β [239], modulant ainsi leur biodisponibilité. Le versican, un autre PG à chaîne de CS, favorise la formation d'un complexe hétérotrimérique TLR2/TLR6/CD14 conduisant à la production de TNF- α et d'IL-6 [240]. Le lumican, un PG à chaîne de KS, induit la sécrétion de TNF- α et IL-1 β [241] et est impliqué dans le recrutement des neutrophiles via un mécanisme dépendant de GRO-1 (Growth Related Oncogene, CXCL-1) [242].

L'AH, le seul GAG non sulfaté, va également largement participer à la progression de la réponse inflammatoire. L'AH natif est un polymère de haut poids moléculaire qui va être dégradé lors d'un processus inflammatoire par l'activation des hyaluronidases et l'action des espèces réactives de l'oxygène [243]. Les fragments de bas poids moléculaire d'AH vont eux aussi interagir avec les récepteurs TLR2/TLR4 et induire via l'activation de NF- κ B la production de cytokines pro-inflammatoires (GRO-1, MIP-1 α , MIP-1 β (CCL4) RANTES, MCP-1, CXCL10, IL-1 β et TNF- α) [244-246] et des MMP-9 et -13 [247] par les macrophages, mais aussi la sécrétion d'IL-8 et de la NO synthase inducible (iNOS) par les cellules endothéliales [248]. A l'opposé, l'AH natif de haut poids moléculaire a démontré un effet inhibiteur de la signalisation induite par TLR2 [249] et forme une barrière physique sur laquelle les leucocytes adhèrent et sont séquestrés, les maintenant ainsi dans un état inactif [250]. Enfin, l'AH de haut poids moléculaire, via son récepteur membranaire CD44, induit l'expression de l'IL-2 et de Foxp3 par les lymphocytes T4 s'orientant alors vers un phénotype T régulateur aux fonctions immunosuppressives. Les auteurs de ces travaux stipulent qu'une fois la reconstruction matricielle achevée suite à une lésion, la proportion d'AH de haut poids moléculaire augmente par rapport aux oligosaccharides et permet ainsi de boucler la réaction inflammatoire [251].

II.3.c Régulation de l'angiogenèse

L'importance des HS dans la présentation des cytokines lors de l'inflammation se retrouve également lors de l'angiogenèse. Des travaux chez la drosophile mutée n'exprimant qu'une isoforme du VEGF-A dépourvue de site de liaison aux HS ont montré que la localisation extracellulaire de ce facteur de croissance était perturbé. En conséquence, les cellules endothéliales au cours du développement se répartissent différemment et se concentrent au niveau des vaisseaux pré-existants, grossissant alors le diamètre luminal et négligeant le développement de branches collatérales. Ces résultats suggèrent que les HS permettent de restreindre les zones de stimulation par le VEGF et ainsi guider la colonisation des cellules endothéliales permettant de complexifier le réseau vasculaire [252].

En plus de la disposition des HS au sein du tissu, l'importance du schéma de sulfatation des HS a particulièrement bien été étudié dans les voies de signalisation dépendantes des facteurs de la famille du FGF où la formation d'un complexe ternaire HS/FGF-2/FGF-R, au travers des PG qui portent les chaînes de GAG, est indispensable à la transduction du signal [253-255]. La formation d'un tel complexe a également été mise en évidence pour la signalisation induite par le VEGF [256, 257]. Ainsi, le FGF-2 et le VEGF, deux cytokines majeures potentialisant l'angiogenèse requièrent la présence des HS pour se lier à leurs récepteurs et induire une réponse cellulaire. Plus précisément, plusieurs études portant sur l'enzyme HS 6-O-endosulfatase, ou Sulf, qui va spécifiquement désulfater en position 6-O les unités disacchariques de HS, montrent que la liaison des cytokines avec les GAG, la formation du complexe ternaire et la signalisation pro-angiogénique dépendante du FGF-1, FGF-2, VEGF, SDF-1 (Stromal Cell derived Factor, CXCL12) et de l'HGF requièrent la présence de cette sulfatation en position 6-O [258, 259]. L'effet inhibiteur de cette enzyme Sulf sur l'angiogenèse a été confirmé *in vivo* [258]. Cette importance de la 6-O-sulfatation dans l'angiogenèse rejoint d'autres travaux chez la drosophile montrant qu'une extinction des gènes HS6ST-1 et -2, qui catalysent la sulfatation des HS en position 6-O, conduit à un développement anormal du système vasculaire [260]. D'autres études orientées spécifiquement sur l'héparine vont dans ce sens et apportent d'autres éléments de réponse : la N- et la 2-O-sulfatation sont nécessaires à l'interaction entre le FGF-2 et l'héparine alors que la 6-O-sulfatation est requise pour la stimulation du récepteur FGF-R [261]. L'implication de la N- et de la 2-O-sulfatation est retrouvée dans les conditions d'hypoxie qui induit, sous l'effet de HIF1- α , une surexpression des enzymes HS2ST et NDST-1 et -2, résultant d'une plus forte sensibilité des cellules endothéliales aux signaux induits par le FGF-2 et donc à une prolifération accrue [262]. Enfin, l'extinction de NDST-1 dans des cellules ES engagées

vers une différenciation endothéliale réduit significativement l'expression des marqueurs endothéliaux Tie-2, vWF et Ang-2 et conduit à la formation d'un réseau vasculaire aberrant lors du développement du poisson zèbre [263].

Toutes ces données montrent clairement l'implication des HS dans l'angiogenèse. Des études se sont intéressées à l'identification des PG à chaînes de HS impliqués dans la régulation de l'angiogenèse tumorale et lors de processus lésionnels mais peu ont clairement identifié le rôle des PG dans l'angiogenèse physiologique. Par exemple, une forte expression du perlécan est observée autour des vaisseaux néoformés dans de nombreuses tumeurs (seins, foie, ovaires, colon et prostate) [264]. Cet effet pro-angiogénique du perlécan semble passer au moins par une potentialisation de la voie FGF-2 [265]. De plus, la répression de l'expression du perlécan par interférence via l'ARN dans des cellules en culture conduit à une diminution drastique de la réponse cellulaire aux facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, le FGF-2 ou l'HGF [266, 267]. Un modèle de souris déficiente en perlécan a permis de montrer que ce PG était également requis pour la régénération vasculaire car après lésion, les animaux présentent une cicatrisation tardive et une vascularisation amoindrie du tissu lésé [268]. Par ailleurs, le perlécan maintient les cellules musculaires lisses en quiescence en activant la voie PTEN qui conduit à une inhibition de la prolifération cellulaire [269]. Enfin, l'expression du perlécan au cours de l'embryogenèse coïncide avec le développement du système cardiovasculaire [270]. Toutefois, l'inactivation du gène du perlécan chez la souris conduit à une malformation cardiaque, sans effet sur la composante vasculaire [271].

Concernant les autres PG à chaînes de HS, l'inhibition de l'expression de syndécan-2 (par interférence via l'ARN) conduit à une plus faible capacité d'adhérence et de formation de tubes *in vitro* des cellules endothéliales [272]. Le syndécan-4 potentialise la prolifération, la migration et la formation de tubes *in vitro* des cellules endothéliales en présence de FGF-2, et induit une meilleure vascularisation des muscles ischémiés *in vivo* [273]. De plus, il est spécifiquement impliqué dans la transduction du signal généré par SDF-1 [274], une chemokine centrale dans le recrutement des progéniteurs endothéliaux circulants aux sites de néo-angiogenèse (voir III.3.b). Ces résultats sont confortés par une étude *in vivo* chez la souris montrant qu'une mutation de SDF-1, empêchant toute liaison aux PG mais conservant le site d'interaction avec son récepteur CXCR4, diminue considérablement la revascularisation après ischémie, bien qu'une expression massive de SDF-1 soit retrouvée dans le tissu lésé [275]. Par ailleurs, le glypican-1, la seule isoforme de glypican exprimée

dans le système vasculaire, potentialise la liaison du VEGF-A₁₆₅ à son récepteur (VEGF-R2/KDR/Flk-1). Plus particulièrement, il sert de molécule chaperonne et permet de restaurer l'interaction avec son récepteur quand le VEGF est oxydé, par exemple au cours des processus de cicatrisation à cause des fortes concentrations en espèces réactives de l'oxygène [276].

Bien que la quasi-totalité des recherches soient portées sur les HS, une étude montre que la décorine, un PG à chaînes de CS/DS, induit une surexpression de VEGF par l'activation des facteurs de transcription Sp1, HIF1- α et Stat3 via le récepteur à l'EGF. De plus, l'expression de décorine par transfection dans des cellules endothéliales murines augmente considérablement leur capacité à former des tubes *in vitro* [277]. Par ailleurs, l'endocan, un autre PG à chaînes de CS/DS sécrété exclusivement par les cellules endothéliales, potentialise de façon dose-dépendante l'activité mitogénique de l'HGF *in vitro* [278]. L'expression de l'endocan est également corrélée avec l'activité angiogénique et le potentiel invasif des tumeurs [279, 280].

Les GAG non sulfatés modulent également l'angiogenèse par des mécanismes indépendants des facteurs de croissance. L'AH natif de haut poids moléculaire présente des effets anti-angiogéniques en inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales et la formation de capillaires, alors que les fragments issus de la dégradation de l'AH ont des effets totalement opposés. En effet, les fragments d'AH de deux à seize disaccharides stimulent l'angiogenèse *in vivo* dans un modèle de développement de la cornée chez le poulet et potentialisent la prolifération et la formation de tubes des cellules endothéliales *in vitro* [281, 282]. Cet effet est spécifique du type cellulaire puisque qu'il n'a aucune incidence sur la prolifération des fibroblastes ou des cellules musculaires lisses dans les mêmes conditions [282]. A l'inverse, l'AH natif de haut poids moléculaire inhibe la prolifération des cellules endothéliales et perturbe la formation d'une monocouche cellulaire *in vitro*. Dans cette même étude il a été montré que les cellules endothéliales sont capables d'incorporer par endocytose l'AH tandis que très peu d'endocytose d'AH est observée dans les fibroblastes ou les cellules musculaires lisses [282]. Par ailleurs, une autre étude montre que des dodécasaccharides d'AH induisent la formation de tubes *in vitro* dans un gel de collagène par les cellules endothéliales via un mécanisme dépendant de GRO-1 [283]. Tous ces effets induits par l'AH sont médiés par les récepteurs membranaires CD44 et RHAMM (Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility) [283-285]. Le récepteur CD44 est lui-même un PG exprimé de façon ubiquitaire et présente un domaine extracellulaire hétérogène pouvant être modifié par N-ou O-glycosylation. L'hétérogénéité de ce domaine extracellulaire pourrait expliquer les différentes réponses en fonction

du type cellulaire. L'interaction d'oligosaccharides d'AH avec le CD44 active des voies de signalisation dépendantes de la protéine kinase C (PKC) et des kinases ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase) conduisant à l'activation rapide de gènes contrôlant la prolifération cellulaire [284]. Le récepteur RHAMM présente différentes isoformes issues de l'épissage alternatif et se trouve à la surface cellulaire ou en intracellulaire, dans le cytoplasme, les mitochondries, le noyau et le nucléole et également associé au cytosquelette [285]. RHAMM est capable de lier l'AH à la surface cellulaire et induit des signaux modulant la prolifération et la migration cellulaires. Il interagit en intracellulaire avec la protéine Src [286], l'actine et les microtubules [287] et régule l'activité des kinases ERK [288]. Ainsi, une extinction de l'expression de CD44 ou de RHAMM par interférence via l'ARN inhibe la formation de tubes dépendante des oligosaccharides d'AH par les cellules endothéliales *in vitro* mais reste sans effet sur l'induction par l'EGF. L'extinction de l'expression de CD44 abolit l'activité de la PKC et réduit l'activité de la MMP-9 [289], soulignant l'implication de cette enzyme dans l'angiogenèse. De plus, l'extinction de l'expression de CD44 ou de RHAMM conduit dans les deux cas à une diminution de la phosphorylation de Cdk-1 (Cyclin dépendant kinase 1), suggérant un contrôle du cycle cellulaire par les oligosaccharides d'AH [289].

II.3.d Régulation de la myogenèse

Comme décrit pour l'angiogenèse, la formation d'un complexe ternaire HS/FGF-2/FGF-R est nécessaire pour la transduction du signal [290]. Le FGF-2 est un puissant agent mitogène sur les myoblastes et prévient leur différenciation en myotubes. Des expériences *in vitro* ont montré qu'un traitement enzymatique à l'héparitinase (qui va dépolymériser les HS) ou un traitement chimique par le chlorate (inhibiteur du PAPS, qui va donc empêcher la sulfatation des GAG) empêche la liaison du FGF-2 à son récepteur et bloque la prolifération des fibroblastes induite par le FGF-2 mais pas par l'EGF (un facteur ne se liant pas aux GAG). L'ajout d'héparine en présence de l'un ou l'autre traitement restaure l'activité mitogénique du FGF-2. Le traitement chlorate induit également la différenciation des myoblastes *in vitro* en présence de FGF-2. L'ajout de sulfate en même temps que le chlorate permet de restaurer la signalisation FGF-2 et de prévenir la différenciation des myoblastes [291]. Les HS pourraient également moduler d'autres voies de signalisation impliquées dans la myogenèse puisqu'ils sont capables de lier d'autres facteurs tels que l'HGF [292], les IGF-BP [293] et le TGF- β [294].

Parmi les PG impliqués, l'agrine joue un rôle essentiel au niveau des jonctions neuromusculaires en organisant le regroupement des récepteurs cholinergiques à l'acétylcholine, un neurotransmetteur impliqué dans l'activité musculaire [295]. Par cette voie, l'agrine a aussi été très récemment impliqué dans la maturation des chaînes lourdes de la myosine et dans le couplage excitation-contraction [296]. Des travaux *in vivo* chez le rat ont montré que les GAG (un mélange de différentes chaînes) potentialisaient la ré-innervation musculaire après lésion par une interaction avec les IGF-BP [297, 298]. D'autre part, le perlécan permet l'ancrage de l'acétylcholinestérase aux collagènes, une enzyme permettant aux récepteurs cholinergiques de revenir à leur état de repos après activation [299]. Il intervient également dans la régulation de la composition des fibres musculaires [300]. De plus, le perlécan ainsi que le syndécan-1 potentialisent la signalisation dépendante du FGF-2, résultant d'une inhibition de la différenciation des myoblastes [301, 302]. Ainsi, l'expression de ces deux PG est diminuée durant la phase terminale de différenciation des myoblastes [302, 303]. Les syndécans-3 et -4, dont la co-expression est restreinte aux seules cellules satellites, sont impliqués dans la régénération musculaire en contrôlant l'activité des cellules satellites [304]. Le syndécan-3 est également particulièrement impliqué dans la fusion des myoblastes permettant de générer de nouvelles fibres musculaires [305]. En plus de ces modulations par l'expression de différents PG, la transition de l'état prolifératif des cellules satellites vers la différenciation est aussi régulée par des enzymes, les Sulfs (ou HS 6-O-endosulfatases) qui vont

spécifiquement désulfater en position 6-O les unités disacchariques de HS et ainsi réprimer la signalisation du FGF-2 [306]. Ces mêmes enzymes ont récemment été impliquées dans la coordination de la voie Wnt menant à la fusion des myoblastes au cours de la régénération musculaire [307].

Deux autres PG majeurs du muscle sont le biglycan et la décorine, des PG à chaîne de CS/DS dont les cores protéiques présentent près de 60% d'homologie. Des études ont démontré que la décorine était impliquée dans la réponse des myoblastes au TGF- β , un puissant inhibiteur de la différenciation musculaire [308], et que son absence (par interférence via l'ARN) conduisait à une perte de sensibilité au signal TGF- β , résultant d'une augmentation de l'expression de myogénine et une différenciation musculaire accélérée [309]. A l'inverse, une augmentation de l'expression du biglycan se fait parallèlement à la formation de nouveaux myotubes. Dans un modèle de souris inactivée pour le gène du biglycan, le muscle présente une régénération plus lente avec une croissance des fibres ralentie et une expression plus faible de la myosine embryonnaire [310]. Il semblerait que le biglycan diminue considérablement la liaison du TGF- β à ses récepteurs, mais dans cette même étude, des résultats similaires ont été trouvés avec la décorine et sont contradictoires avec les travaux décrits précédemment [311]. Une augmentation de l'expression de la décorine est également décrite dans d'autres études de différenciation musculaire [312]. Le biglycan et la décorine semblent avoir tantôt des rôles opposés, tantôt des rôles identiques. Il pourrait s'agir d'un mécanisme complexe de régulation par boucles de rétroaction qui reste à éclaircir ou bien de mécanismes dépendants du stade de développement. En effet, contrairement à la décorine, les niveaux de biglycan diminuent progressivement au cours du développement et sont très faibles dans le muscle adulte, excepté après un dommage musculaire qui induit une surexpression transitoire [310]. Un consensus se dégage toutefois sur le rôle de ces PG à chaînes de CS/DS dans la régulation de la myogenèse au travers de la modulation de la signalisation induite par le TGF- β . D'autre part, une étude *in vitro* a également montré que des chaînes de DS isolées potentialisent la prolifération de myoblastes induite par le FGF-2 ou l'HGF et leur migration sous l'effet de l'HGF [313].

II.4 Des analogues de GAG en thérapie de l'ischémie

Puisque les GAG sont de puissants régulateurs de l'angiogenèse et de la myogenèse, ils présentent de forts potentiels d'applications en thérapie de l'ischémie où ces deux processus majeurs sont requis. Actuellement, les analogues de GAG les plus étudiés dans ce contexte thérapeutique sont le chitosan, le fucoïdan, des polysaccharides naturels, et les mimétiques de synthèse des GAG.

II.4.a Chitosan

Le chitosan est un analogue structural des GAG obtenu par *N*-déacétylation de la chitine, composant majeur de l'exosquelette des arthropodes et crustacés ou de la paroi de champignons. C'est un biopolymère linéaire à base de *D*-glucosamine et *N*-acétyl-*D*-glucosamine associées par des liaisons β 1-4 (unités distribuées de façon aléatoire) compatible et non toxique avec les tissus vivants [314]. En fonction de la source et de la technique de préparation, le poids moléculaire du chitosan varie entre 300 et 1000 kDa avec un degré d'acétylation finale entre 5 et 70% [315]. Il présente une activité anti-fongique et anti-microbienne intrinsèque [316] dont les mécanismes d'action sont encore mal identifiés. Enfin, sa nature anionique lui permet d'établir des interactions électrostatiques, tout comme les GAG, avec toute autre molécule chargée positivement. Ainsi, ce composé a été étudié comme agent potentialisateur de la régénération tissulaire et notamment après ischémie.

Lors d'une ischémie, la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène conduit à une altération des molécules d'adhérence cellulaire telles que les intégrines α V et β 1 et ICAM-1 et VCAM-1. L'injection d'un hydrogel de chitosan dans un modèle d'ischémie du myocarde chez le rat permet de rétablir l'intégrité de ces molécules d'adhérence et d'attirer des cytokines impliquées dans le recrutement des cellules souches, telle que SDF-1. Par ailleurs, le chitosan réduit l'apoptose induite par l'ischémie [317]. Ces données sont confortées par une étude montrant que, suite à un stress oxydatif, les oligosaccharides de chitosan préviennent la formation d'espèces réactives de l'oxygène et l'apoptose des cellules endothéliales [318]. Ainsi, l'hydrogel de chitosan permet de réduire la taille de l'infarctus et favorise l'angiogenèse. Ces effets bénéfiques de l'hydrogel de chitosan sont potentialisés lorsqu'il est associé à des cellules mésenchymateuses [317]. Le chitosan est également utilisé comme vecteur de délivrance de facteurs de croissance pro-angiogéniques, tel

que le FGF-2. Ainsi, dans un modèle d'ischémie du myocarde chez le rat, la fonction cardiaque et la densité vasculaire sont augmentées alors que la zone fibrotique diminue comparé à l'injection de FGF-2 seul [319]. Des résultats comparables sont retrouvés dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez le rat où l'association FGF-2 et chitosan améliore considérablement la vascularisation du tissu [320]. Enfin, le chitosan inhibe la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires induite par l'hypoxie, tels que l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α [321].

II.4.b Fucoïdan

Le fucoïdan est polysaccharide complexe extrait d'algues brunes, composé d'unités L-fucose 4-O-sulfatées reliées entre elles par des liaisons α 1-2 ou α 1-3 [322]. La dépolymérisation du fucoïdan permet d'obtenir des fragments de bas poids moléculaire ayant les mêmes propriétés anti-thrombotiques que l'héparine mais une activité anticoagulante plus faible et donc un risque hémorragique moindre [323].

Le fucoïdan potentialise l'activité mitogénique et chémotactique du FGF-1 sur des cellules endothéliales de type HUVEC, mais au contraire n'a pas d'effet ou inhibe ces mêmes propriétés induites par le FGF-2 [324-326]. Toutefois, il potentialise la formation de tubes *in vitro* en présence de FGF-2 aussi bien par les HUVEC que par les progéniteurs endothéliaux circulants (PEC, voir III.2), des cellules endothéliales plus immatures, probablement par une augmentation de l'expression de la sous-unité α 6 des intégrines [325-327]. Le fucoïdan favorise également l'adhérence des HUVEC mais pas des PEC sur une matrice de laminine [327]. Par ailleurs, le fucoïdan potentialise la liaison du VEGF à son récepteur VEGFR-2, mais pas VEGFR-1 [328]. Le fucoïdan améliore également la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF mais n'a aucun effet sur son activité mitogénique [324, 327, 328].

Le fucoïdan a aussi été testé dans des modèles animaux d'ischémie du myocarde ou des membres inférieurs. Ainsi, l'injection de fucoïdan seul améliore le flux sanguin au même niveau qu'une injection de FGF-2. L'association des deux est synergique et permet d'améliorer encore plus ce paramètre, conduisant à une meilleure régénération musculaire, confirmée par une analyse de l'activité phosphorylase [329]. Une stratégie sans facteurs de croissance, consistant en un pré-traitement un jour avant l'ischémie puis un mois durant, permet d'améliorer de 40% la vascularisation et est associée à de plus fortes concentrations en SDF-1 et VEGF dans le tissu ischémié et à une réduction de 30% de la fibrose [330]. Ces résultats sont confortés par d'autres

études montrant qu'un traitement au fucoïdan induit un déplacement de la chimiokine SDF-1 de la moelle vers la circulation, qui s'accompagne d'une mobilisation des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques [329, 331]. De plus, le fucoïdan permet d'améliorer la fonction cardiaque et de réduire la taille de la zone infarctée en modulant la réponse inflammatoire. En effet, une injection de fucoïdan entraîne une diminution des niveaux de TNF- α et d'IL-6, ainsi qu'une baisse de l'activité des enzymes oxydatives, et augmente les niveaux d'IL-10, le tout associé à une diminution de l'infiltration leucocytaire [332]. L'efficacité du fucoïdan a également été confirmée dans des modèles d'ischémie-reperfusion rénale par une diminution de la réponse oxydative et de l'apoptose [333, 334]. Toutefois, dans un objectif de régénération tissulaire après ischémie incluant la régénération vasculaire et la régénération musculaire, il est important de noter que le fucoïdan inhibe de façon dose dépendante l'expression des marqueurs myogénine et MRF4 par des myoblastes *in vitro*, deux marqueurs impliqués dans la différenciation myogénique [335].

II.4.c Mimétiques de synthèse

L'idée de développer des mimétiques structuraux et fonctionnels de GAG a émergé afin de remplacer les GAG naturels par des produits mieux caractérisés et plus stables. En effet, le laboratoire CRRET en collaboration avec la société OTR3 a synthétisé une famille de biopolymères polysaccharidiques rassemblés sous le nom de RGTA (pour Regenerating Agent). Il s'agit de mimétiques de GAG obtenus à partir de dextran de deux-cent-cinquante unités glucosidiques reliées entre elles par des liaisons α 1-6 et dont les groupements hydroxyles ont été substitués en groupements carboxyméthyles et sulfates [336] (Figure 15). Cette structure confère aux mimétiques une grande analogie avec celle des GAG naturels, tout en les protégeant d'une reconnaissance enzymatique de type glycanase.

Des études ont montré que ces mimétiques étaient capables de potentialiser l'effet des facteurs de croissance pro-angiogéniques FGF-2 et VEGF [337-339]. Ainsi, le mimétique [OTR₄₁₂₀] présente une forte affinité pour le VEGF comparé à l'héparine (K_d : 2,2 nM et 15 nM respectivement) et potentialise la liaison du VEGF au récepteur VEGFR-2 [337]. *In vitro*, il favorise la prolifération et la migration induites par le VEGF et accroît considérablement l'angiogenèse *in vivo* [337]. Cet effet pro-angiogénique des mimétiques rejoint des résultats obtenus avec un autre composé associé au FGF-2 dans un modèle de vascularisation de prothèse [338]. De plus, les mimétiques potentialisent également la prolifération de cellules satellites *in vitro* dépendante du FGF-2 et de l'HGF [339], ainsi que la fusion des myoblastes en myotubes *in vitro* par un mécanisme calcium-dépendant [340].

In vivo, l'injection d'un de ces mimétiques dans un muscle après écrasement favorise la régénération en accélérant la transition entre l'expression de la myosine néonatale et l'expression de la myosine adulte, et en favorisant l'innervation [341, 342]. Enfin, l'injection de ce mimétique a également été testée dans un modèle d'ischémie du myocarde chez le porc et montre que le mimétique permet de retrouver près de 80% de la fonction cardiaque contre 55% sans traitement et de diminuer de moitié la taille de l'infarctus, associé à une réduction du tissu fibrotique et une augmentation de la vascularisation [343].

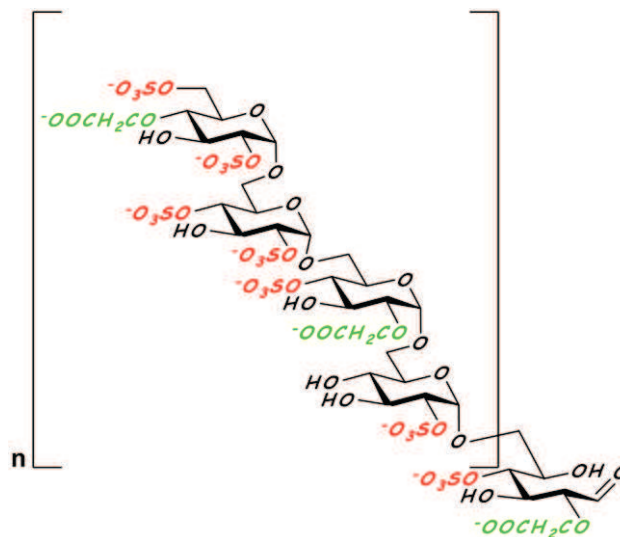


Figure 15 : Structure d'un mimétique de GAG de la famille des RGTA

III Les progéniteurs endothéliaux : des cellules souches orientées

III.1 Régulation du système vasculaire

III.1.a Rôle physiologique de l'endothélium

L'endothélium est formé par une monocouche de cellules endothéliales qui tapissent la surface de l'ensemble des vaisseaux. Il est en contact direct avec le sang et représente une surface d'échange autour de 300 m² [344]. L'endothélium est un système dynamique, stratégiquement situé à l'interface entre le flux sanguin et les tissus, qui régule de nombreux processus physiologiques majeurs. D'une manière générale, l'endothélium sécrète des molécules pro- ou anti-coagulantes afin de moduler la fluidité sanguine. Il intervient également dans la modulation du tonus vasculaire, en sécrétant des molécules vasodilatatrices, telles que le monoxyde d'azote (NO) ou la prostacycline, ou au contraire des molécules vasoconstrictrices, telles que l'endothéline ou le PAF (Platelet Activating Factor). Lors d'une lésion, l'endothélium produit des facteurs de la coagulation (facteur tissulaire) et participe à l'activation plaquettaire conduisant à l'arrêt de l'hémorragie [345]. Les cellules endothéliales ont également un rôle stratégique dans le déroulement de la réponse inflammatoire [345] en permettant l'adhérence et la diapédèse des leucocytes grâce à une interaction cellule-cellule au travers de récepteurs tels que la P-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1 exprimés après activation par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , et PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) (Figure 16). Enfin, l'endothélium constitue une barrière perméable assurant les échanges gazeux et nutritifs entre le sang et les tissus.

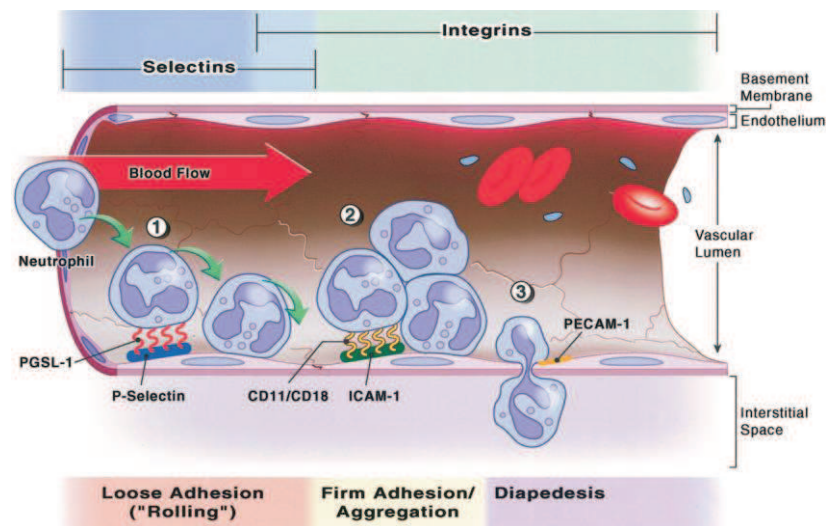


Figure 16 : Interactions leucocytaires avec l'endothélium

(d'après : [346])

Les leucocytes activés interagissent avec l'endothélium via une série d'étapes distinctes : (1) L'ischémie induit une expression de la P-sélectine par les cellules endothéliales permettant aux leucocytes d'interagir par leur récepteur PSGL-1 (P-sélectine glycoprotéine-1). (2) Les intégrines leucocytaires β_2 , CD11a/CD18 et CD11b/CD18, interagissent avec ICAM-1 exprimé par les cellules endothéliales et permettent ainsi l'adhérence et l'agrégation des leucocytes. (3) La diapédèse des leucocytes au travers de l'endothélium vers le compartiment interstitiel est facilité par des interactions avec PECAM-1.

III.1.b Développement du système vasculaire

Chez l'embryon, le développement du système vasculaire débute par la vasculogénèse (Figure 17), une étape au cours de laquelle les cellules mésodermiques des îlots de l'aire extra-embryonnaire et de la paroi ventrale de l'aorte se spécifient sous l'effet de FGF-2, BMP-4 et Ihh (Indian hedgehog) en hémangioblastes, progéniteurs communs des cellules endothéliales et hématopoïétiques [347]. Les cellules situées au centre des îlots sanguins constitueront les progéniteurs hématopoïétiques tandis que celles situées en périphérie, sous l'effet d'une signalisation dépendante de Notch, donneront naissance aux angioblastes (progéniteurs endothéliaux). Les angioblastes vont migrer et s'assembler en un réseau vasculaire primitif (plexus) [348]. Sous l'effet de signalisations dépendantes de VEGF, Shh et Nocth [349], ce plexus vasculaire primitif est remodelé en un réseau plus complexe comprenant des vaisseaux sanguins de différents calibres ainsi qu'une spécification des angioblastes vers la voie artérielle ou veineuse en réponse à une combinaison de stimuli hémodynamiques et de facteurs comme les éphrines B4 (voie veineuse) et B2 (voie artérielle), qui vont activer des programmes transcriptionnels favorisant l'une ou l'autre voie [350]. Ce remodelage artério-veineux est associé à une intense expansion du réseau et au

recrutement des cellules murales (ou péricytes) sous le contrôle des facteurs PDGF, TGF- β et des angiopoïétines, conduisant à la formation d'un système vasculaire mature stable et fonctionnel [348, 351].

Plus tardivement au cours du développement, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins va se produire par prolifération des cellules endothéliales déjà intégrées au réseau existant, on parle alors d'angiogenèse. L'angiogenèse est un processus complexe qui requiert un juste contrôle des cellules endothéliales. Dans un vaisseau stable, les cellules endothéliales sont quiescentes jusqu'à ce qu'elles détectent des signaux pro-angiogéniques induisant un changement fondamental dans leur comportement. En réponse à ces signaux pro-angiogéniques, les cellules endothéliales perdent leurs jonctions intercellulaires, sécrètent des MMP qui vont dégrader la lame basale et libérer des facteurs (FGF, VEGF) séquestrés dans la matrice alentour [352] et acquièrent un comportement invasif leur permettant de migrer et de s'étendre afin de former un nouveau vaisseau [348].

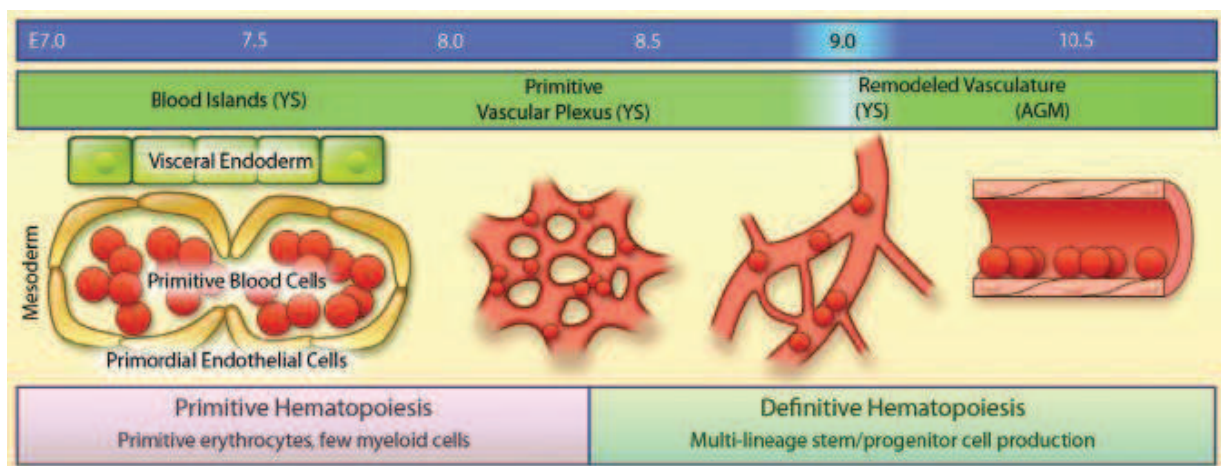


Figure 17 : Vasculogenèse embryonnaire

(d'après : [347])

Au cours de la vie adulte la plupart des vaisseaux sanguins restent quiescents : seulement 0,01% des cellules endothéliales sont en division. Toutefois, certains processus physiologiques, comme la cicatrisation, le cycle menstruel ou la gestation [353], et pathologiques, suite à une ischémie ou lors d'un cancer [354], déclenchent l'angiogenèse. Finalement, le réseau vasculaire est extrêmement plastique et son intégrité est sous le contrôle d'une balance fine entre signaux pro- et anti-angiogéniques. La dérégulation de cette balance va entraîner un excès ou un défaut de vascularisation, conduisant dans chaque cas à la progression de nombreuses pathologies (Figure 18).

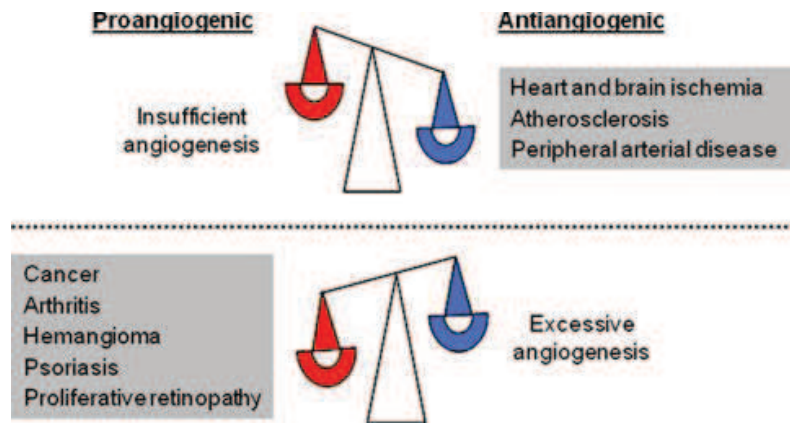


Figure 18 : Conséquences de la dérégulation de la balance angiogénique

(d'après : [132])

Un défaut d'angiogénèse conduit au développement de pathologies ischémiques pouvant affecter le cœur, le cerveau, les muscles et l'arbre vasculaire lui-même. A l'opposé, une angiogénèse excessive peut conduire au développement de tumeurs ou de pathologies inflammatoires.

III.1.c Acteurs moléculaires modulant l'angiogénèse

Parmi les facteurs pro-angiogéniques on compte les familles des VEGF et des FGF, les angiopoïétines, l'EGF, l'IGF, l'IL-8 ou encore le PDGF.

La famille des VEGF comprend cinq membres (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le PlGF : Placental Growth Factor) et certains membres (VEGF-A et B) présentent plusieurs isoformes [355]. Cinq récepteurs aux VEGF ont été identifiés, trois récepteurs de haute affinité (VEGF-R1/Flt-1, VEGF-R2/KDR/Flk-1 et VEGF-R3) et deux récepteurs de basse affinité (NRP-1 et -2 : Neuropiline) [356]. Le médiateur le plus puissant, tant en terme quantitatif que qualitatif, est le VEGF-A₁₆₅ [357]. C'est un facteur de prolifération et de migration des cellules endothéliales qui favorise également leur survie en induisant l'expression de protéines anti-apoptotiques [356, 358]. Le VEGF-A est un facteur attractant des angioblastes [359] et son expression est corrélée à la progression de la vasculogénèse [360]. Concernant les autres isoformes, le VEGF-B est impliqué dans la prolifération cellulaire et la croissance des vaisseaux [361], le VEGF-C est impliqué dans la migration et la survie des cellules endothéliales [362] et le VEGF-D stimule la croissance des vaisseaux [363].

La famille des FGF comprend vingt-deux membres qui, au cours du développement embryonnaire, vont jouer différents rôles permettant le maintien de l'intégrité vasculaire [364]. Les FGF-1 (FGF acide) et FGF-2 (FGF basique) sont les deux membres les mieux caractérisés pour leurs effets pro-angiogéniques : ils stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. De

plus, le FGF-2 agit en synergie avec le VEGF dans l'induction de l'angiogenèse *in vivo* [365]. Les FGF ont cinq récepteurs de haute affinité, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 et FGFR5 (ou FGFR1) [366, 367].

Les angiopoïétines (Ang) 1 et 2 interviennent précocement dans le développement vasculaire et se lient au récepteur Tie-2 spécifiquement exprimé par les cellules endothéliales [368]. L'Ang-1, produite par les péricytes, stabilise les vaisseaux et induit leur maturation [369]. Au contraire, l'Ang-2, produite par les cellules endothéliales, agit en inhibiteur du récepteur Tie-2 et permet d'induire le remodelage vasculaire [370].

D'autres molécules aux effets anti-angiogéniques affirmés ont été identifiées : la thrombospondine, l'angiostatine, l'endostatine, le facteur plaquettaire 4 (PF-4), le TGF- β et certaines interleukines [371]. Tous ces facteurs inhibent la prolifération et/ou la migration des cellules endothéliales. L'endostatine induit en plus leur apoptose [372] et réprime l'expression du facteur de transcription pro-angiogénique HIF-1 α [373].

L'intégrité vasculaire est donc sous le contrôle d'une combinaison complexe de signaux solubles. De plus, la découverte en 1997 des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) par Asahara et son équipe [374] a montré que la formation de vaisseau au cours de la vie adulte n'était pas restreinte au processus d'angiogenèse (par prolifération de cellules endothéliales déjà intégrées au réseau) mais qu'elle pouvait également se réaliser par vasculogenèse, c'est-à-dire directement à partir de cellules souches [375].

III.2 Les Progéniteurs Endothéliaux Circulants (PEC)

III.2.a Mise en évidence et définition *in vivo* et *in vitro*

Les progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) font référence à une population de cellules initialement isolées à partir du sang périphérique adulte, exprimant *in vivo* les marqueurs CD34 et KDR (VEGF-R2), et capables de s'intégrer physiquement dans des vaisseaux en formation après ischémie [374]. L'origine médullaire de ces cellules a été démontrée par des expériences de greffes de moelle osseuse [375, 376]. L'équipe d'Asahara présente sa découverte comme l'existence d'un progéniteur commun aux cellules hématopoïétiques et aux cellules endothéliales : l'hémangioblaste (voir : III.1.b), caractérisé par la co-expression des marqueurs CD34 et KDR.

La définition de cette population sur la base d'une discrimination par les marqueurs CD34 et KDR est rapidement controversée étant donné que le marqueur CD34 est exprimé par une variété de types cellulaires incluant les cellules hématopoïétiques et certaines populations de cellules souches cancéreuses [377]. De plus, parmi les cellules CD34+, plusieurs types cellulaires vont également exprimer le marqueur KDR comme certaines cellules souches sanguines, les cellules endothéliales et les cellules cardiaques, empêchant toute discrimination d'une population de PEC. Ainsi, Peichev et ses collègues introduisent en 2000 le marqueur CD133 en plus comme marqueur d'immaturation, cette protéine étant connue pour être fortement exprimée dans les cellules souches hématopoïétiques et dont l'expression décroît au cours de la différenciation cellulaire. Ils montrent également que des cellules endothéliales matures de la veine de cordon ombilical, exprimant les marqueurs CD34 et KDR, n'expriment pas le marqueur CD133. Le phénotype CD34+/KDR+/CD133+ caractériserait donc des cellules progénitrices. Pour renforcer leurs résultats, ils montrèrent également que des cellules exprimant les marqueurs CD133 et KDR colonisent la surface luminale de dispositifs médicaux implantés dans le ventricule gauche de patient victimes d'insuffisance cardiaque [378]. Bien qu'aucune caractérisation supplémentaire n'ait été faite sur le lignage hématopoïétique ou endothélial des cellules colonisant le dispositif médical, cette caractérisation CD34+/KDR+/CD133+ a été une des plus largement utilisée à partir de là afin d'identifier les PEC *in vivo*.

Cependant, en 2007, une étude a démontré que la purification de cellules de phénotype CD34+/KDR+/CD133+ ne permettait pas d'obtenir des PEC *in vitro* (voir ci-après) et que cette caractérisation définissait les progéniteurs hématopoïétiques [379]. Le marqueur CD146 est exprimé à la surface des PEC et permet d'exclure la population de progéniteurs hématopoïétiques mais ce marqueur est également exprimé par les cellules endothéliales circulantes (CEC) [380]. Les CEC correspondent aux cellules endothéliales matures qui se détachent de la paroi vasculaire dans différentes situations pathologiques et rendent compte de l'intégrité vasculaire [381]. Ce sont des cellules endothéliales matures exprimant les antigènes endothéliaux CD31 et vWF mais elles n'expriment pas le marqueur CD133 [382], ce qui permet de les distinguer des PEC.

Par ailleurs, plusieurs équipes vont publier des travaux démontrant que l'on obtient, à partir d'un même donneur, deux populations de PEC distinctes en fonction des conditions de culture *in vitro* [383, 384] (Figure 19). Ces deux populations sont nommées en fonction du temps relatif au bout duquel elles apparaissent *in vitro* : les PEC précoces et les PEC tardifs, ou en fonction de la cellule initiale qui donne naissance à la colonie : les CFU-EC (endothelial cell colony-forming units) et les ECFC (endothelial colony-forming cell).

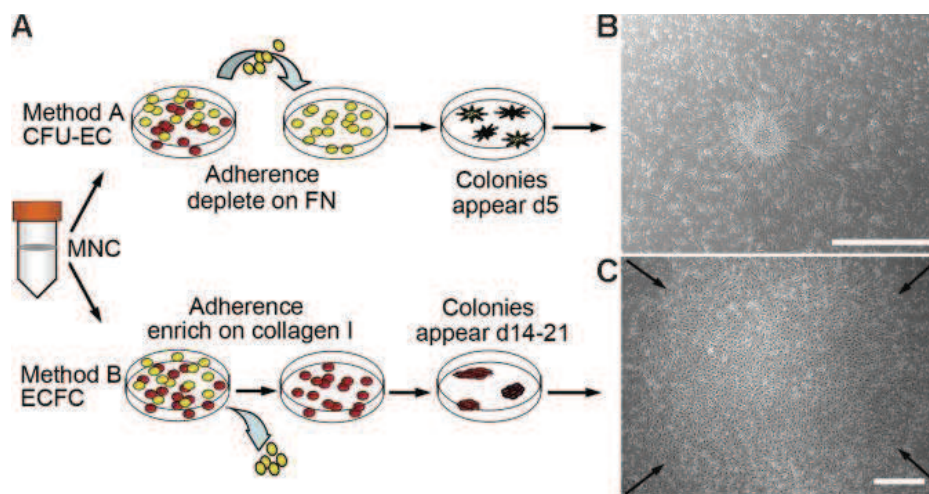


Figure 19 : Méthodes d'isolement des PEC

(d'après : [384])

La méthode A permet d'isoler les PEC précoces (CFU-EC) qui forment des colonies entre 4 et 9 jours. La méthode B permet l'isolement des PEC tardifs (ECFC) qui forment des colonies de cellules endothéliales entre 10 et 28 jours.

III.2.b Les PEC précoces

La culture des PEC précoces (ou CFU-EC) consiste en une première étape d'ensemencement durant laquelle des cellules vont adhérer sur une matrice de fibronectine. Au bout de quarante-huit heures, les cellules non adhérentes sont récupérées et ensemencées de nouveau sur une matrice de fibronectine. Des colonies apparaissent moins d'une semaine après l'ensemencement initial (Figure 19). Ces colonies de PEC précoces ont une morphologie en aiguille et un très faible potentiel de prolifération [384]. La culture de ces cellules dans un milieu de croissance adapté pour cellules endothéliales induit l'expression de marqueurs endothéliaux tels que KDR et vWF mais elles ne sont pas capables de former une monocouche de cellules endothéliales. Les PEC précoces sont d'origine hématopoïétique et plus précisément issus de la lignée monocytaire puisqu'ils expriment à la fois les marqueurs CD14 et CD45. De plus, ces cellules présentent *in vitro* une activité phagocytaire [384].

III.2.c Les PEC tardifs

La culture des PEC tardifs (ou ECFC) est à l'opposé de celle des PEC précoces, elle consiste en la récupération des cellules qui vont adhérer rapidement sur une matrice de collagène et en l'élimination progressive et quotidienne des cellules non adhérentes. Après une à trois semaines de culture des colonies de cellules endothéliales pavimenteuses bien délimitées vont apparaître (Figure 19). Les PEC tardifs n'expriment pas le CD14, ce qui exclut toute origine monocytaire [384]. Chaque colonie dérive d'un unique progéniteur circulant dans le sang, capable d'adhérer *in vitro*. Ce progéniteur, dont l'origine médullaire est depuis récemment controversée [385, 386], exprime à l'état circulant la combinaison de marqueurs CD34/KDR/CD133. Puis, une fois en culture l'expression des marqueurs CD133 puis CD34 est progressivement perdue pour ne plus exprimer que les marqueurs de cellules endothéliales tels que CD31, KDR, CD144, vWF et Tie-2 [384, 387, 388]. Contrairement aux PEC précoces, les PEC tardifs ont un pouvoir prolifératif extrêmement important puisqu'ils peuvent effectuer jusqu'à cent doublements de population [387]. Leur potentiel d'amplification est d'autant plus élevé qu'ils peuvent également donner naissance à une nouvelle descendance à partir d'une seule cellule (formation de colonies secondaires et tertiaires) [387]. De plus, les PEC tardifs répondent positivement à tous les tests fonctionnels de cellules endothéliales matures tels que la formation de tubes sur Matrigel®, la capacité à être activés en conditions pro-inflammatoires, l'incorporation du LDL (Low Density Lipoprotein) acétylé et la migration induite par un gradient de VEGF.

Ainsi, la caractérisation des PEC sur la base de l'expression des marqueurs CD34/KDR/CD133 est insuffisante pour discriminer une population cellulaire homogène et comprend en réalité deux populations bien distinctes en terme d'origine, de phénotype et de propriétés (Tableau 5). Une bonne discrimination des PEC tardifs *in vivo*, les véritables progéniteurs endothéliaux au sens strict, doit être basée au minimum sur le phénotype CD34+/KDR+/CD133+/CD146+/CD45-/CD14-.

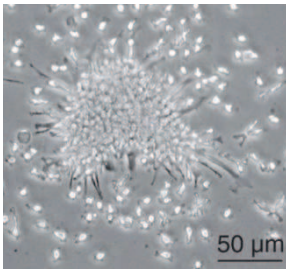
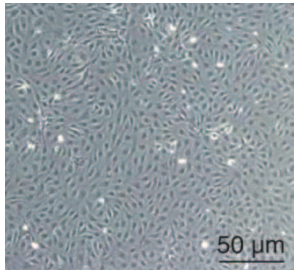
Caractéristiques	PEC précoces (CFU-EC)	PEC tardifs (ECFC)																																				
Morphologie																																						
Temps d'émergence en culture	< 1 semaine	entre 1 et 3 semaines																																				
Phénotype	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Antigen</th> <th>CFU-ECs</th> <th>ECFCs</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CD31</td> <td>92.31 ± 5.47</td> <td>92.29 ± 1.32</td> </tr> <tr> <td>CD105</td> <td>74.36 ± 6.32*</td> <td>96.73 ± 1.79</td> </tr> <tr> <td>CD144</td> <td>34.80 ± 8.74*</td> <td>99.15 ± 0.85</td> </tr> <tr> <td>CD146</td> <td>56.52 ± 10.00†</td> <td>94.21 ± 3.71</td> </tr> <tr> <td>KDR</td> <td>99.19 ± 0.81</td> <td>68.61 ± 11.26</td> </tr> <tr> <td>VWF</td> <td>67.21 ± 12.78</td> <td>97.09 ± 2.05</td> </tr> <tr> <td>UEA-I</td> <td>41.80 ± 11.67*</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>Ac-LDL</td> <td>73.68 ± 9.05*</td> <td>99.75 ± 0.25</td> </tr> <tr> <td>CD14</td> <td>98.53 ± 1.04‡</td> <td>1.20 ± 0.74</td> </tr> <tr> <td>CD45</td> <td>98.15 ± 1.85‡</td> <td>0.37 ± 0.37</td> </tr> <tr> <td>CD115</td> <td>94.42 ± 2.52‡</td> <td>0.28 ± 0.21</td> </tr> </tbody> </table>		Antigen	CFU-ECs	ECFCs	CD31	92.31 ± 5.47	92.29 ± 1.32	CD105	74.36 ± 6.32*	96.73 ± 1.79	CD144	34.80 ± 8.74*	99.15 ± 0.85	CD146	56.52 ± 10.00†	94.21 ± 3.71	KDR	99.19 ± 0.81	68.61 ± 11.26	VWF	67.21 ± 12.78	97.09 ± 2.05	UEA-I	41.80 ± 11.67*	100	Ac-LDL	73.68 ± 9.05*	99.75 ± 0.25	CD14	98.53 ± 1.04‡	1.20 ± 0.74	CD45	98.15 ± 1.85‡	0.37 ± 0.37	CD115	94.42 ± 2.52‡	0.28 ± 0.21
Antigen	CFU-ECs	ECFCs																																				
CD31	92.31 ± 5.47	92.29 ± 1.32																																				
CD105	74.36 ± 6.32*	96.73 ± 1.79																																				
CD144	34.80 ± 8.74*	99.15 ± 0.85																																				
CD146	56.52 ± 10.00†	94.21 ± 3.71																																				
KDR	99.19 ± 0.81	68.61 ± 11.26																																				
VWF	67.21 ± 12.78	97.09 ± 2.05																																				
UEA-I	41.80 ± 11.67*	100																																				
Ac-LDL	73.68 ± 9.05*	99.75 ± 0.25																																				
CD14	98.53 ± 1.04‡	1.20 ± 0.74																																				
CD45	98.15 ± 1.85‡	0.37 ± 0.37																																				
CD115	94.42 ± 2.52‡	0.28 ± 0.21																																				
Pouvoir prolifératif	-	+++																																				
Capacité d'auto-renouvellement	non	oui																																				
Fonctionnalités endothéliales	Incorporation du LDL acétylé	Incorporation du LDL acétylé Formation de tubes (Matrigel®) Migration par gradient VEGF																																				
Activité phagocytaire	oui	non																																				
Incorporation dans les vaisseaux	non	oui																																				
Sécrétion de cytokines	+++	+																																				
Potentiel pro-angiogénique <i>in vivo</i>	+	+++																																				

Tableau 5: Caractéristiques des PEC précoces et des PEC tardifs

(d'après : [384, 387, 389-391])

III.3 Rôle physiologique des PEC

III.3.a Mobilisation de la moelle vers le sang circulant

Les PEC résident probablement à l'état quiescent dans la moelle osseuse au sein d'une niche de cellules souches, un microenvironnement caractérisé par une très faible concentration en oxygène et une forte concentration en SDF-1 [392, 393]. Un certain nombre de PEC circulent à tout moment dans l'organisme mais les mécanismes de mobilisation de leur niche vers le sang circulant ne sont pas encore clairement définis. En conditions pathologiques, les PEC sont mobilisés vers le sang circulant en réponse à une hypoxie tissulaire périphérique ou suite à une lésion vasculaire induisant la production et la diffusion systémique de facteurs tels que l'EPO [394], l'HGF [395], le G-CSF [396], les œstrogènes [397], le VEGF [398] et le SDF-1 [399] (Tableau 6). L'activation d'HIF-1 lors d'une ischémie induit une expression de VEGF et SDF-1 à des concentrations supérieures à celles de la niche [89, 393]. La sortie des PEC de leur niche vers la circulation générale est également dépendante de la production de NO par les cellules stromales et de l'activation de MMP et en particulier de la MMP-9 [400]. Le VEGF et SDF-1 sont des inducteurs de la MMP-9 qui va cliver les interactions entre c-Kit et le SCF immobilisant les PEC au sein de la niche et ainsi permettre la migration des cellules hors de la niche [401]. Le G-CSF, depuis longtemps utilisé pour mobiliser les cellules souches hématopoïétiques, induit également la mobilisation des PEC, probablement par augmentation du nombre de neutrophiles circulants qui sécrètent du VEGF [402]. Ainsi, le VEGF et SDF-1 semblent être une combinaison de facteurs particulièrement efficace pour la mobilisation des PEC de leur niche médullaire vers la circulation générale.

D'autre part, il est intéressant de noter qu'il existe naturellement des variations circadiennes du nombre de PEC dans le sang. En début de journée le nombre de PEC circulants (CD34+/KDR+/CD133+) est au plus bas niveau et augmente significativement d'environ 25% vers 22h [403]. Ces variations vont de pair avec les changements décrits des niveaux de GM-CSF et G-CSF au cours de la journée [404, 405].

Par ailleurs, suite à une lésion vasculaire ou une ischémie, des médiateurs de l'inflammation sont également relargués dans le sang et vont eux aussi moduler positivement ou négativement la concentration de PEC circulants. La CRP (C-Reactive Protein) conduit à une mobilisation très rapide des PEC (CD34+/CD31+/CD144+/CD45-/CD14-) [406] tandis qu'une augmentation des niveaux de

TNF sanguins est inversement corrélée avec le nombre de colonies de PEC précoces obtenues en culture [407]. Une élévation des niveaux d'IL-6 conduit également à une diminution significative des populations circulantes CD34+/KDR+ et CD34+/CD133+ [408].

III.3.b Tropisme vers les sites de néoangiogenèse

Une fois mobilisés dans le sang circulant, les PEC suivent le gradient de cytokines libérées par le tissu activé et migrent ainsi jusqu'au site de la lésion. Le recrutement des PEC vers les sites de néoangiogenèse et leur intégration dans l'endothélium en formation nécessite plusieurs étapes : la chimio-attraction, l'adhérence, la migration et la différenciation en cellules endothéliales matures pleinement fonctionnelles (Figure 20).

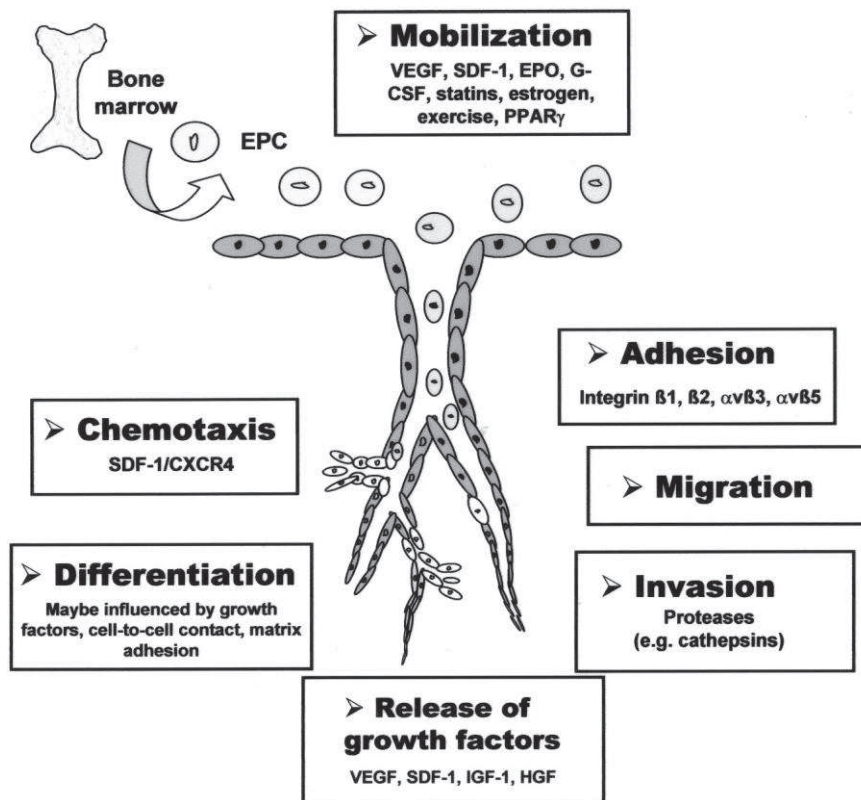


Figure 20 : Recrutement des PEC vers les sites de néoangiogenèse
(d'après : [409])

Compte tenu du faible nombre de PEC dans la circulation, la chimio-attraction est au centre du processus de recrutement des PEC au site de la lésion (« homing »). Les tissus ischémiques sécrètent très rapidement de nombreux facteurs (Tableau 6) stimulant le recrutement des cellules inflammatoires mais également d'autres cellules circulantes. Ainsi, certains facteurs décrits comme chemo-attractant des leucocytes, tels que MCP-1 ou RANTES, favoriseraient également le recrutement des PEC [410]. Les axes SDF-1/CXCR4 et VEGF/VEGF-R jouent également là encore un rôle déterminant [411-413]. D'autres chemokines comme GRO-1, NAP-2 (Neutrophil-activating protein, CXCL7) et IL-8 seraient également impliquées [414-416]. Par ailleurs, très rapidement après la lésion endothéliale, les plaquettes adhèrent sur la matrice sous-endothéliale mise à nue. Ainsi activées, les plaquettes produiraient du SDF-1 et le précurseur de NAP-2, ce qui induirait la sécrétion de multiples cytokines (MCP-1, IL-8) par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses adjacentes [417].

Les PEC mobilisés à proximité immédiate du site de la lésion doivent encore être « capturés », adhérer et s'intégrer afin de potentialiser la formation des néovaisseaux. C'est l'interaction de molécules membranaires exprimées par les PEC avec des ligands de la matrice sous-endothéliale ou exprimées par les cellules endothéliales activées sur le site de la lésion qui va permettre de capturer les cellules. Par exemple, l'expression de P-sélectine, E-sélectine, ICAM-1, PECAM-1 et des intégrines $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ et $\beta 5$, et en particulier VLA-4 (intégrine $\alpha 4/\beta 1$) facilite la liaison des PEC à l'endothélium [410, 418-420]. Les niveaux des intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ sont augmentés sur les PEC par HMGB1 (High mobility group box 1), un facteur de transcription relargué par les cellules endommagées [421]. De plus, les plaquettes activées constituent en elles-mêmes un support d'adhérence attractif qui va jouer un rôle important dans la capture des PEC [422, 423]. Les mécanismes conduisant à cette capture ont récemment été décrits comme un processus multi-étapes impliquant PSGL-1, CCR2, CXCR2 et CXCR4 à la surface des PEC. Par ailleurs, tous ces acteurs ne favoriseraient pas uniquement le recrutement des PEC mais également leur migration et leur différenciation [424].

Mobilisation de la moelle vers le sang	Recrutement au site de la lésion
SDF-1	SDF-1/CXCR4
VEGF	VEGF/VEGF-R
EPO	RANTES/CXCR5
HGF	GRO-1 et NAP-2 /CXCR2
G-CSF	IL-8/CXCR1 et CXCR2
Œstrogènes	VLA-4
NO	P-sélectine
HIF-1	E-sélectine
	ICAM-1
	PECAM-1

Tableau 6: Facteurs de mobilisation et de recrutement des PEC de la moelle au site lésé

III.3.c Dérégulation de l'homéostasie des PEC

Dans les pathologies cardiovasculaires ou les pathologies associées à un risque élevé de complications cardiovasculaires, des nombreuses études ont été menées et ont montré un impact sur le nombre de progéniteurs circulants et leur fonctionnalité.

Un nombre de progéniteurs circulants (CD34+/KDR+ ou CD133+) plus faible est observé dans les maladies coronariennes [425], associé à une capacité migratoire *in vitro* diminuée des PEC précoces [426] ainsi qu'à une altération de la cascade de signalisation activée par CXCR4 sur les cellules CD144+/KDR+/CD31+/vWF+ [427]. Dans les cardiomyopathies ischémiques, le nombre de progéniteurs (CD34+/KDR+/CD133+) augmente dans un premier temps, probablement suite au relargage des facteurs sécrétés immédiatement après ischémie, puis chute en cas d'ischémie chronique [428]. L'hypertension induit la sénescence et affecte les capacités migratoires *in vitro* des

PEC précoces, associé à une plus faible mobilisation à partir de la moelle osseuse et un nombre réduit de cellules circulantes [429-431].

Un nombre plus faible de progéniteurs CD34+/KDR+/CD133+ est retrouvé dans le sang des patients hypercholestérolémiques et une forte concentration en cholestérol amoindrit les fonctions cellulaires (prolifération, migration et angiogenèse *in vitro*) des PEC précoces [432]. Le LDL oxydé entraîne la sénescence des PEC précoces et inhibe la différenciation dépendante du VEGF en induisant une déphosphorylation d'Akt [433, 434]. Il est important de noter que l'effet du cholestérol est réversible : un régime alimentaire adapté associé à une pratique régulière d'exercices physiques ou un traitement par les statines permettent d'augmenter significativement le nombre de progéniteurs circulants [435, 436].

Le tabagisme a un effet négatif sur le nombre de progéniteurs circulants (CD34+/CD133+/CD45+ ou CD34+/KDR+/CD133+/CD45_{faible}) et les fonctions cellulaires (prolifération, migration, adhérence) des PEC précoces [437] qui, comme l'hypercholestérolémie, est réversible [429, 438].

Dans les deux formes de diabète (type 1 et type 2) une réduction du nombre de cellules circulantes CD34+/KDR+/CD144+/CD31+ et du nombre de colonies de PEC précoces est observée associée à une altération de la fonctionnalité cellulaire causée par le stress oxydatif (PEC précoces) [439] et les produits finaux de glycosylation avancée (PEC tardifs) [440].

De plus, en dehors du domaine cardiovasculaire, des études similaires principalement basées sur l'analyse des cellules de phénotype CD34+/KDR+ ou CD34+/CD133+ *in vivo* et les PEC précoces *in vitro* ont donné les mêmes résultats que ce soit pour l'arthrite rhumatoïde [408, 441], l'hypertension pulmonaire [442], l'insuffisance rénale [443] ou simplement le vieillissement physiologique [444, 445].

A l'opposé, plusieurs études ont montré que les œstrogènes augmentaient la production de PEC précoces en les protégeant de l'apoptose (voie dépendante de la caspase 8) [446] et augmentaient leur efficacité de réparation vasculaire en favorisant leur mobilisation depuis la moelle osseuse, via un mécanisme dépendant de l'eNOS (endothelial NO Synthase) impliquant une augmentation de l'expression de la MMP-9, ainsi que leur recrutement au site de néoangiogenèse

[447, 448]. Ces observations sont corrélées avec la présence d'un plus grand nombre de cellules circulantes CD34+/KDR+/CD133+/Lin-/7AAD- ou CD34+/KDR+ chez les femmes fertiles comparé à des femmes après la ménopause ou des hommes d'âge équivalent [449, 450].

Bien que toutes ces études aient été réalisées à partir de caractérisations phénotypiques des PEC différentes ne permettant pas d'identifier clairement la population cellulaire impliquée, elles suggèrent toutes cependant que les PEC pourraient être de bons biomarqueurs de multiples pathologies. Toutefois, de nombreuses études se sont orientées sur la fonctionnalité *in vitro* des PEC précoces et très peu sur les PEC tardifs, qui sont pourtant les véritables progéniteurs endothéliaux. Une étude récente de l'équipe de Yoder a démontré à partir de prélèvements sanguins de primates que le nombre de PEC tardifs (caractérisés à partir de colonies de cellules pavimenteuses par le phénotype CD31+/CD34+/CD105+/CD144+/CD146+/KDR+/CD45-/CD14- et capables d'incorporer le LDL-acétylé et de former des tubes *in vitro*), leur potentiel de clonogénicité et de prolifération ainsi que leur capacité à former des vaisseaux *in vivo* étaient diminués avec l'âge [451]. Ces résultats vont dans le sens de ce qui était décrit avec les populations CD34+/KDR+ ou CD34+/CD133+ mais doivent être confirmés chez l'homme et ne peuvent pour autant être généralisés. Afin de comprendre l'homéostasie des PEC tardifs, il est indispensable de réitérer les études avec une caractérisation précise et claire de la population cellulaire, à la fois *in vivo* et *in vitro*.

III.4 Intérêt des PEC en thérapie cellulaire de l'ischémie

III.4.a Les PEC dans le remodelage vasculaire

Tout l'intérêt porté aux PEC depuis leur mise en évidence par Asahara et son équipe en 1997 est lié à leur capacité à s'intégrer durablement dans les néovaisseaux en formation, et en particulier aux niveaux des sites ischémiques, démontrée dans le même temps [374]. La prise en compte de l'existence d'une double population de PEC a conduit à des travaux démontrant que chacune de ces populations de PEC, précoces et tardifs, favorisaient en fait la formation de vaisseau par des voies bien distinctes. En effet, les PEC précoces sont incapables de former des tubes *in vitro* (Matrigel®) ou de s'intégrer à un réseau existant [452]. Cependant, une expérience de co-culture des PEC précoces physiquement séparés des cellules endothéliales matures *in vitro* montrent que ces cellules favorisent significativement la formation du réseau tubulaire par les cellules endothéliales de façon dose dépendante, suggérant ainsi un effet paracrine [452]. Ce résultat est conforté par une étude montrant que les PEC précoces sécrètent de grande quantité de VEGF, HGF, G-CSF et GM-CSF [453]. Dans les mêmes conditions, les PEC tardifs n'ont pas d'effet paracrine sur la formation de tube mais sont cependant capables de former eux-mêmes des tubes et de s'intégrer à un réseau existant *in vitro* et *in vivo* [384, 452].

Toutefois, une étude pointe les limites des PEC tardifs de sang adulte comparé aux PEC tardifs de sang de cordon dans un modèle d'angiogenèse *in vivo*. En effet, les néovaisseaux formés par les PEC de sang adulte sont instables et régressent au bout de trois semaines alors que les vaisseaux formés par les PEC de sang de cordon présentent une fonction normale (flux sanguin, perméabilité, activation cytokinique, ...) au moins pendant quatre mois [454]. Par ailleurs, la capacité des PEC à favoriser l'angiogenèse et à restaurer le flux sanguin *in vivo* après ischémie est beaucoup plus forte que celle de cellules endothéliales matures (de type HMVEC : Human Microvascular Endothelial Cell) [455] (Figure 21).

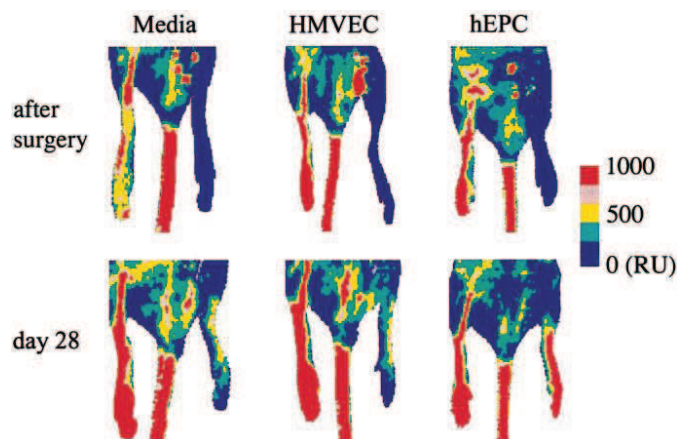


Figure 21 : Perfusion des membres inférieurs ischémiés de souris après injection de PEC

(d'après : [455])

Imagerie de perfusion par laser Doppler effectuée immédiatement après l'ischémie ou 28 jours après le traitement (bleu : pas de perfusion sanguine, jaune : perfusion moyenne, rouge : forte perfusion). Les souris ont été traitées avec du milieu de culture ou par injection intracardiaque de 500 000 cellules endothéliales humaines matures (HMVEC) ou de progéniteurs endothéliaux (hEPC). Au bout de 28 jours on distingue une faible amélioration de la perfusion du membre ischémié traité avec le milieu ou les cellules endothéliales matures. Au contraire, une très nette amélioration de la perfusion est observée dans le membre ischémié traité avec les progéniteurs endothéliaux.

En conclusion, les PEC issus du sang de cordon constituent un produit de thérapie cellulaire très attractif pour le traitement des pathologies ischémiques [456]. Actuellement, l'utilisation des cellules de sang de cordon ombilical est restreinte aux transplantations pour les pathologies hématologiques. L'avantage supplémentaire de l'utilisation des cellules du sang de cordon est la moindre incidence de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD : Graft versus host disease) comparé à d'autres sources de cellules compétentes comme la moelle osseuse [457]. Ceci s'explique par le fait que le système immunitaire de l'enfant dont provient le sang de cordon ombilical est «naïf». En effet, une étude comparant des transplantations de sang de cordon avec ou sans compatibilité totale HLA (Human Leukocyte Antigen) n'a montrée aucun cas de GVHD [458]. Ainsi le problème d'histocompatibilité reste minime puisque cette naïveté du système immunitaire permet une tolérance partielle de compatibilité du système HLA lors de la transplantation de cellules de sang de cordon. Au contraire, les cellules issues du sang périphérique doivent avoir une totale compatibilité des molécules HLA avec le receveur pour permettre la prise de greffe et éviter le rejet. Finalement, le développement des banques de sangs placentaires et leur mise en réseau au niveau national et international devrait permettre de constituer un réservoir de cellules histocompatibles rapidement accessibles. Cependant, si les processus de cryo-préservation des sangs placentaires ont été optimisés pour les cellules hématopoïétiques et n'ont pas d'incidence sur cette population au

moment de la décongélation, il a été démontré que le nombre de PEC tardifs isolés à partir de sang décongelé était plus faible comparé à du sang frais. Ces PEC conservent toutefois leurs propriétés phénotypiques et fonctionnelles [459].

III.4.b Les essais cliniques de première génération

Les résultats prometteurs des études pré-cliniques chez l'animal ont amenés les cliniciens à tester l'efficacité de l'injection de PEC dans des essais cliniques chez l'homme. La volonté de trouver rapidement une approche de thérapie cellulaire efficace pour le traitement des maladies cardiovasculaires et la nécessité de définir des protocoles simples et rapides pour la purification de cellules a amené ces praticiens à utiliser des populations non purifiées, supposées enrichies en PEC.

Par exemple, une injection intracoronarienne de cellules CD133+ peu après un infarctus aigu du myocarde semble améliorer la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) associée à une meilleure perfusion cardiaque au bout de quatre mois. Mais cette intervention est également associée à un remodelage artériel néfaste avec une diminution progressive du diamètre luminal [460]. A l'inverse, une injection locale ou proximale (dans la zone périphérique de l'ischémie) n'engendre pas d'effets secondaires délétères et semble améliorer la FEVG et la perfusion myocardique mais ces études sont limitées par le manque de groupes contrôles (sans injection de cellules) [461, 462].

L'essai REGENT a permis de comparer l'injection intracoronarienne de cellules totales ou de cellules CD34+/CXCR4+ de la moelle osseuse et a montré qu'au bout de six mois, la FEVG était améliorée d'environ 3% pour les deux groupes de patients traités, sans différence entre les deux populations cellulaires, alors qu'aucune modification notable n'est observée dans le groupe contrôle [463].

Une équipe a pris le temps de purifier des PEC précoces et a comparé leur efficacité avec des cellules totales de la moelle osseuse, en injection intra-coronarienne après infarctus aigu du myocarde. Le suivi à quatre mois après injection montre une augmentation de la FEVG de plus de 50% ainsi qu'une meilleure perfusion du cœur pour les deux groupes, sans différences entre eux [464]. Cette étude ne présente cependant aucun groupe contrôle.

D'autres groupes ont utilisé le G-CSF afin d'enrichir en PEC les cellules circulantes totales ou les fractions CD133+ ou CD34+ du sang périphérique. Toutes ces études ont été faites en injection intracoronarienne et ont montré une amélioration de la FEVG accompagnée parfois d'effets secondaires (maux de tête, fièvre, lumbago, douleurs osseuses, psoriasis, élévation des taux sanguins d'enzymes et d'acide urique) liés au G-CSF [465-467].

Si la majorité des essais a été conduit dans le domaine cardiaque, quelques travaux ont également été conduits pour traiter l'ischémie des membres inférieurs. Le groupe de Lara-Hernandez a sélectionné vingt-huit patients présentant une ischémie chronique et non éligibles aux traitements conventionnels (revascularisation chirurgicale ou endovasculaire : voir I.3.b). Après cinq jours de mobilisation par le G-CSF, les cellules CD34+ et CD133+ ont été injectées par voie intramusculaire directement dans le muscle ischémié. Le suivi à quatorze mois après injection montre une meilleure perfusion du muscle associée à une forte diminution de la douleur, mais sept patients (25% d'entre eux) ont dû être amputés [468].

En conclusion, de nombreuses études cliniques ont été menées et publiées en affichant le terme de PEC, montrant des résultats médiocres ou dont l'interprétation est limitée par le faible nombre de patients inclus ou le manque de groupe contrôle, ne permettant pas d'exclure des effets placebo ou d'estimer la part de régénération innée. De plus, aucune preuve n'est apportée de la participation des PEC à l'amélioration de la fonction tissulaire, qui peut être aussi bien liée à une toute autre population cellulaire ou à un effet paracrine global. Quelques informations sont toutefois exploitables de ces données : les cellules autologues issues de la moelle osseuse donnent de meilleurs résultats que les cellules autologues de sang périphérique et l'injection intramusculaire est une meilleure voie de délivrance que l'injection intra-artérielle [469]. Ces résultats pourraient être liés à la plus grande proportion de PEC dans la moelle osseuse comparée à la circulation périphérique et montrent l'avantage d'une infiltration cellulaire directe plutôt que basée sur le recrutement (« homing ») naturel aux sites de néo-angiogenèse, qui peut être limité par la faible sécrétion tissulaire de cytokines en cas d'ischémie chronique.

III.4.c Les limites actuelles à l'utilisation des PEC

Globalement, deux difficultés charnières font aujourd'hui obstacle à l'utilisation des PEC en thérapie : la méconnaissance de la biologie de ces cellules et leur rareté. En effet, le nombre de PEC tardifs est estimé entre 0,05 et 0,2 cellule par millilitre dans le sang périphérique adulte et entre 2 et 5 cellules dans le sang de cordon [376]. La mobilisation par le G-CSF pourrait permettre de mobiliser plus de cellules mais des travaux ont démontré un clivage et une inactivation de CXCR4, le récepteur de SDF-1, sur les PEC précoces isolés après mobilisation par le G-CSF [396]. En conséquence, ces cellules présentent des capacités de migration diminuées *in vitro* ainsi qu'une diminution de la formation de néovaisseaux dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez la souris [396]. La compréhension des mécanismes suivant l'injection doit également être une priorité dans la mesure où seulement 1,3 à 2,6% des cellules totales de la moelle osseuse demeurent une heure après injection et que cette proportion passe à 14-39% quand il s'agit de cellules CD34+ [470]. A plus long terme, des études chez le rat montrent que moins de 0,1% des cellules injectées est détectable après six à dix semaines [471] et d'autres qu'aucune cellule injectée n'est encore vivante après vingt-huit jours [472]. Enfin, le schéma chronologique d'injection doit également être éclairci puisque des essais cliniques menés par le même groupe montrent qu'une injection deux jours après l'accident ischémique cardiaque n'a pas d'effet [473] tandis qu'une injection plus tardive, entre trois et sept jours après l'accident, est plus favorable [474].

III.4.d Les stratégies alternatives

Finalement, plus de seize ans après leur mise en évidence par Asahara, l'utilisation des PEC en thérapie cellulaire pour la revascularisation des tissus semble plus complexe qu'initialement envisagé. Bien que ces cellules semblent naturellement douées de capacité d'angiogenèse (PEC précoces) ou de vasculogenèse (PEC tardifs), leur rareté et leur éventuelle altération dans les pathologies cardiovasculaires nécessitent de développer des stratégies alternatives à la simple injection de cellules non purifiées.

Les cibles d'action sont variées et certains travaux ont déjà montré un bénéfice du transfert de gène associé à la thérapie cellulaire. Dans un modèle murin, la transfection du gène du VEGF dans les PEC humains (CD34+/KDR+/CD133+) avant injection améliore considérablement la revascularisation [475]. Cet effet peut encore être potentialisé en co-injectant le facteur SDF-1 soluble et des PEC transfectés avec le gène du VEGF. En effet, dans un modèle d'ischémie des

membres inférieurs chez la souris, cette combinaison améliore le flux sanguin et la densité vasculaire comparé à l'injection de cellules transfectées seules ou l'injection de SDF-1. Cet effet s'explique *in vitro* par une amélioration des capacités migratoires des PEC ainsi qu'une plus forte résistance à l'apoptose induite par la privation de sérum. Il semble que la surexpression du VEGF par transfection induise une surexpression endogène de CXCR4, le récepteur de SDF-1 [476]. Très récemment, dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez le rat, l'injection de PEC co-transfectés avec deux gènes codant pour le VEGF et l'hème oxygénase a aussi montré un effet synergique bénéfique sur la densité vasculaire et le flux sanguin comparé à une transfection unique de l'un ou l'autre gène [477]. Chez l'homme, le transfert intramusculaire du gène du VEGF permet d'augmenter son expression par les tissus ischémiques et entraîne une forte mobilisation des PEC endogènes (précoces) dans le sang périphérique [478]. Actuellement, une étude randomisée en double aveugle (essai clinique ENACT-AMI) évalue l'apport du transfert du gène de l'eNOS dans les PEC précoces avant injection pour le traitement de l'infarctus aigu du myocarde [479].

D'autres approches consistent en l'association d'autres types cellulaires avec les PEC afin de promouvoir la formation de néovaisseaux. Ainsi, des études *in vitro* ont démontré que les cellules musculaires lisses soumises à un flux potentialisent la différenciation des PEC en cellules endothéliales matures via la voie Akt [480]. Une étude a montré que la co-injection de PEC tardifs et de cellules musculaires lisses dans les membres inférieurs ischémiés chez la souris permet d'améliorer la formation des vaisseaux. Des investigations *in vitro* suggèrent que cette potentialisation est due à la sécrétion par les cellules musculaires lisses d'Ang-1 qui va activer le récepteur Tie-2 exprimé par les PEC et ainsi favoriser leur survie [481]. D'autres types cellulaires associés à des PEC, comme les cellules stromales mésenchymateuses ou du tissu adipeux, augmentent la formation des vaisseaux dans différents modèles murins *in vivo* [482, 483]. Une étude a même démontré que l'association des deux types de PEC, précoces et tardifs, améliorerait l'angiogenèse chez la souris comparé à une injection de l'un ou l'autre type [484]. Des investigations *in vitro* montrent que les PEC précoces potentialisent la prolifération, la migration et la formation de tubes des PEC tardifs par la sécrétion de facteurs solubles et notamment du VEGF et de l'IL-8. Ces deux cytokines ont à la fois un effet paracrine sur les PEC tardifs en induisant une expression de la MMP-2 et également un effet autocrine sur les PEC précoces en induisant une expression de la MMP-9 [484].

Enfin, certains groupes se sont intéressés à l'association des cellules endothéliales avec des biomatériaux afin de recréer un environnement tridimensionnel mimant un microenvironnement physiologique et de limiter la mort cellulaire. Cependant, peu d'entre eux se sont intéressés aux PEC. Par exemple, Les PEC tardifs ensemencés sur des matrices poreuses synthétiques (polymère d'acide polyglycolique et d'acide polylactique) conservent leur phénotype endothélial mais n'induisent pas de formation de microvaisseau *in vitro*. Il est nécessaire de co-ensemencer les PEC avec des cellules musculaires lisses sur ce type de matrice pour voir la formation de microvaisseau *in vitro* [485]. D'autres types de matrices poreuses, composées de polysaccharides naturels (pullulane et dextrane), préservent la viabilité, la prolifération, le phénotype et les fonctionnalités endothéliales des PEC tardifs *in vitro* [486]. Une autre étude montre que la concentration de collagène dans les matrices n'a pas d'effet *in vitro* sur l'organisation d'un réseau par les PEC tardifs, mais elle influence significativement l'angiogenèse *in vivo* chez la souris. En effet, l'augmentation de la concentration en collagène va de pair avec une diminution de la densité vasculaire mais augmente significativement le diamètre des vaisseaux. Ces résultats démontrent clairement que les propriétés physiques des matrices peuvent moduler la formation des vaisseaux par les PEC *in vivo* [487].

OBJECTIFS DE LA THESE

Cette revue bibliographique nous a permis de montrer que l'ischémie chronique des membres inférieurs représente un problème majeur de santé publique, et dont les thérapeutiques conventionnelles sont mises en échec. Les PEC tardifs représentent de bons candidats pour la thérapie cellulaire de cette pathologie car ils sont naturellement impliqués dans la formation des néovaisseaux chez l'adulte. Cependant, les résultats des premiers essais cliniques à base de produits de thérapie cellulaire montrent que peu de cellules injectées survivent au site de la lésion et ne permettent pas de procurer un bénéfice fonctionnel au long terme. Par ailleurs, les GAG sont des macromolécules de la MEC modulant les processus inflammatoires, angiogéniques et myogéniques. Ainsi, la compréhension des mécanismes matriciels et plus particulièrement du remodelage des GAG au cours d'un processus d'ischémie, et l'association des PEC avec des GAG au moment de l'injection pourraient permettre d'optimiser la greffe des cellules thérapeutiques et de reconstruire un endothélium fonctionnel stable à long terme.

C'est dans cette optique que j'ai réalisé les différentes expérimentations au cours de ma thèse. Mon premier objectif a été d'**identifier un mimétique de GAG permettant d'optimiser les propriétés des PEC en culture**. Pour cela, j'ai comparé deux mimétiques de synthèse fournis par la société OTR3, les composés [OTR₄₂₁₀] et [OTR₄₁₃₁], de structures très similaires et ne différant uniquement par leur degré d'hydrophobicité, et les ai ajoutés au milieu de culture des PEC au cours de différentes expériences *in vitro*. Le but de cette série d'expérimentations a été de savoir si un de ces mimétiques présente un intérêt dans le cadre de l'angiogenèse thérapeutique. Le second objectif a été de **caractériser le remodelage structural des GAG et son effet sur leur fonctionnalité au cours de l'ischémie musculaire**. Cet aspect du projet de thèse s'inscrit dans une collaboration avec des partenaires académiques et industriels, avec le soutien financier de l'Agence Nationale de la Recherche. Ainsi, j'ai pu extraire et purifier les GAG des muscles de rats opérés et fournis par l'unité partenaire INSERM U698. A partir de ces GAG purifiés j'ai réalisé les différentes études structurales et fonctionnelles. Le but de cette série d'expérimentations a été d'apporter des données fondamentales pour une meilleure compréhension des mécanismes matriciels mis en jeu lors d'un processus ischémique.

RESULTATS & DISCUSSIONS

I Potentialisation des propriétés de PEC *in vitro* par les GAG

I.1 Introduction

Le concept d'angiogenèse thérapeutique a initialement été introduit par Michael Höckel, gynécologue, en 1989. Son idée était d'induire une croissance capillaire afin d'améliorer la perfusion tissulaire et donc la viabilité du tissu après une intervention chirurgicale [488]. La découverte en 1997 par l'équipe d'Asahara de progéniteurs endothéliaux, capables de s'intégrer physiquement dans les néovaisseaux en formation [374], a considérablement relancé ce concept, appliqué à la thérapie cellulaire.

Depuis, de nombreuses études ont été menées sur ces cellules et il est maintenant reconnu que les PEC tardifs sont les véritables progéniteurs endothéliaux. Ils peuvent être isolés à partir du sang périphérique (source autologue) ou du sang de cordon ombilical (source allogénique), aussi appelé sang placentaire. L'approche thérapeutique allogénique permet de répondre plus rapidement aux besoins cliniques en offrant une disponibilité immédiate des sangs placentaires stockés dans les biobanques. Une étude dans l'unité U972 a démontré que les PEC isolés à partir de sangs placentaires cryopréservés présentaient les mêmes caractéristiques et capacités fonctionnelles que des PEC obtenus à partir de sangs placentaires frais [459]. Toutefois, le processus de cryopréservation n'est aujourd'hui pas suffisamment optimisé pour la conservation des PEC car il réduit le nombre de colonies obtenues [459]. Par ailleurs, l'amplification cellulaire doit se faire dans des conditions de grade clinique, en absence de protéines animales, excluant la présence traditionnelle du sérum de veau fœtal dans le milieu de culture.

Parallèlement, certains mimétiques de GAG ont démontrés leur capacité à potentialiser l'activité des facteurs de croissance pro-angiogéniques FGF-2 et VEGF ainsi que l'activité de cellules endothéliales matures [337, 338].

C'est pourquoi, nous avons étudiés l'effet de deux mimétiques de GAG, les molécules [OTR₄₁₂₀] et [OTR₄₁₃₁], de structure très proche mais différant par leur degré d'hydrophobicité, sur les propriétés de PEC tardifs isolés à partir de sangs placentaires humains : formation de colonies, adhérence, prolifération, clonogénicité, migration et formation de tubes *in vitro*. Pour cela, nous avons établi une convention avec l'EFS de Créteil, permettant de nous fournir en sangs placentaires

dans un cadre légal. En tant que doctorant dans ce projet, j'ai géré l'approvisionnement en sangs placentaires, procédé au protocole d'isolement des progéniteurs endothéliaux immédiatement à réception de ces sangs, réalisé la mise au point des différentes techniques et effectué les expérimentations pour la prolifération, l'adhérence et la migration cellulaires. Les expériences de formation de colonies, de clonogénicité et de formation de tubes *in vitro* ont été réalisées en collaboration avec d'autres membres de l'unité U972.

Les résultats ont permis de rédiger une première publication présentée ci-après et portant sur l'effet du mimétique [OTR₄₁₃₁] sur les différentes propriétés cellulaires des PEC. Les résultats relatifs à l'effet du mimétique [OTR₄₁₂₀] sur les propriétés des PEC sont présentés en résultats complémentaires. De plus, j'ai également mené une étude préliminaire de localisation du mimétique [OTR₄₁₃₁] dans les cultures cellulaires, qui est également présentée dans cette section.

1.2 Article 1 : en révision pour *Stem Cell Research*

Glycosaminoglycan mimetic improves enrichment and cell functions of human endothelial progenitor cell colonies

CHEVALIER Fabien^{a,b}, LAVERGNE Mélanie^c, NEGRONI Elisa^b, FERRATGE Ségolène^b, CARPENTIER Gilles^a, GILBERT-SIRIEIX Marie^d, SIÑERIZ Fernando^d, UZAN Georges^b, ALBANESE Patricia^{a#}

^a EAC CNRS 7149, CRRET laboratory, Paris-Est Creteil University, Sciences and Technology Faculty, 61 Avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil Cedex, France

^b INSERM U972, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France

^c ABCell-Bio, 6 rue Pierre Haret, 75009 Paris, France

^d OTR3 company, 4 rue Française, 75001 Paris, France

Abstract

Human circulating endothelial progenitor cells isolated from peripheral blood generate in culture cells with features of endothelial cells named late-outgrowth endothelial colony-forming cells (ECFC). In adult blood, ECFC display a constant quantitative and qualitative decline during life span. Even after expansion, it is difficult to reach the cell dose required for cell therapy of vascular diseases, thus limiting the clinical use of these cells. Glycosaminoglycans (GAG) are components from the extracellular matrix (ECM) that are able to interact and potentiate Heparin Binding Growth Factor activities. According to these relevant biological properties of GAG, we designed a GAG mimetic having the capacity to increase the yield of ECFC production from blood and to improve functionality of their endothelial outgrowth. We demonstrate that the addition of [OTR₄₁₃₁] mimetic during the isolation process of ECFC from Cord Blood induces a 4 fold increase the number of colonies. Moreover, addition of [OTR₄₁₃₁] to cell culture media improves adhesion, proliferation, migration and self-renewal of ECFC. We provide evidences showing that GAG mimetics may have great interest for cell therapy applied to vascular regeneration therapy and represent an alternative to exogenous growth factor treatments to optimize potential therapeutic properties of ECFC.

Keywords: endothelial progenitor cell, glycosaminoglycan, heparin binding growth factor

Abbreviations: GAG, glycosaminoglycan; HBGF, heparin binding growth factor; HS, heparan sulfate; CS, chondroitin sulfate

[#] Corresponding author at: Université Paris Est Créteil, Faculté des Sciences et Technologie, CRRET Laboratory, 61 avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil cedex, France. Phone: +33 1 45 17 14 05, e-mail address: albanese@u-pec.fr (P. Albanese).

1. Introduction

Vascular diseases are the leading causes of death in the world [1, 2]. Current therapies including life style management, pharmacological control of risk factors and surgical revascularization do not completely reverse the pathology. Since the initial discovery in 1997 of endothelial progenitor cells (EPC) by Asahara and coworkers, these cells are considered as a promising therapeutic tools for vascular repair [3]. Culture of blood mononuclear cells reveals two distinct populations of EPC that have been classified according to the time at which they appear in culture: early endothelial cell colony-forming units (CFU-EC) and late-outgrowth endothelial colony-forming cells (ECFC), both expressing specific endothelial markers and with capabilities to stimulate angiogenesis [4]. On one hand, CFU-EC differentiate into phagocytic macrophages and fail to form vessels *in vivo*. On the other hand, ECFC display high proliferative potential when compared to mature endothelial cells [5], form vessels *in vivo* and are incorporated into pre-existing vascular networks [4, 6, 7]. Moreover, ECFC are more sensitive to angiogenic factors, such as VEGF and FGF-2, which confer to these cells greater protection against cell death. Their functional features indicate that although these cells have undergone some differentiation steps, they still have the properties of immature cells, suggesting greater tissue repair capabilities [5]. However, the use of autologous ECFC in cell therapy is limited by their rarity in adult peripheral blood (PB) as they constitute less than 0.01% of circulating mononuclear cells [8, 9]. Cord blood (CB) contains more ECFC than PB, and following a crucial step of adhesion *in vitro*, they form primary colonies of well-circumscribed monolayers of cobblestone appearing cells. After expansion, ECFC can give rise to secondary colonies from a single cell [4].

For clinical application, it is important to reach the therapeutic cell dose with a limited number of cell division and limited culture time. This will limit occurrence of genetic abnormalities that may occur during long term cultures as observed for the use of mesenchymal stem cells (MSC) [10]. To improve production of ECFC, two parameters are very important: 1) the initial number of colony obtained and 2) the proliferation rate of endothelial outgrowth obtained from these colonies. In this study we propose a new strategy for improving these two parameters, based on the use of glycosaminoglycans (GAG) type compounds in culture media to potentiate endothelial cell properties.

Sulfated GAG, such as Heparan Sulfate (HS) or Chondroitin Sulfate (CS), are polysaccharidic molecules associated to core protein to form proteoglycans, which interact with proteins to strengthen the structure and stability of the extracellular matrix (ECM). GAG also have functional roles since they regulate numerous biological processes through their abilities to interact with heparin-binding growth factors (HBGF) [11]. The structure of GAG is highly complex due to heterogeneity in glycosidic linkage, sulfation pattern and hydrophobic regions regulating their interactions with surrounding molecules. It is now accepted that particular structural characteristics of GAG are

involved in their ability to modulate the activities of HBGF which include growth factors, chemokines, cytokines and enzymes [12]. GAG thus provide matrix-bound or cell surface-bound reservoirs for HBGF, protecting them from proteolytic degradation and increasing their half-life, providing storage and protection sites [13, 14]. Moreover these structural features evolve during physiological and pathological processes and are involved in tissue homeostasis [15, 16]. According to such interest, a family of structural and functional analogues of natural GAG has been developed allowing availability of well-characterized GAG mimetics [17]. These compounds, also named RGTA (for ReGeneraTing Agents), greatly increase the rate and quality of wound healing in various preclinical models (for review [18]). It was demonstrated that a RGTA improves in vitro endothelialisation of vascular prosthesis [19] and partly prevents in vivo skeletal muscle damage caused by ischemia [20]. This regenerative effect could be explained by RGTA resistance to glycanases degradation which improve HBGF protection and function [21]. It was indeed demonstrated that RGTA binds VEGF, potentiates its binding to specific receptors, improves its biological activity on HUVEC and modulates in vivo angiogenesis [22]. Finally, recent data support the interest of these GAG mimetics according to their effects on the mobilization and the potentiation of progenitors and stem cells from hematopoietic and mesenchymal lineages [23-25].

According to the relevance of GAG functions we investigate here whether a selected GAG mimetic [OTR₄₁₃₁] would be able to potentiate in vitro different properties of human ECFC from CB, such as adhesion, growth, migration, primary and secondary colony formation. This should enable optimization of the expansion capacity of these cells for further therapeutic applications.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

The GAG mimetic [OTR₄₁₃₁] was obtained from OTR3 Inc. (Paris, France). This sulfated dextran derivative, composed of about 250 glucosidic units, presents degrees of substitution of carboxylates, and sulfates residues close to heparin, but differing from this one by a lower acetyl groupment ratio with an homogeneous repartition [17]. Heparin used as natural GAG control was cell culture grade (Sigma-Aldrich, France, H9399 lot 125K1400). Recombinant human FGF-2 and human VEGF were purchased from Promokine (PromoCell, GmbH, Heidelberg, Germany).

2.2 Human endothelial progenitor cell isolation and culture

Human umbilical CB samples were collected in a citrate phosphate dextrose solution from healthy full-term newborns after maternal informed consent according to approved institutional guidelines (Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France). ECFC were isolated from Cord Blood MonoNuclear Cells (CBMNC) as previously described [26]. To assess an effect of [OTR₄₁₃₁] on appearance of ECFC colonies, CBMNC resuspended in EGM2-MV complete media (Lonza, Ermerainville, France) were divided into 2 equal volumes, in which either phosphate buffered saline (PBS) or 100 ng/mL of [OTR₄₁₃₁] (final concentration) was added. Cell suspensions were both gently mixed and left for 30 min at room temperature (RT) before seeding. First media change, following a washing with PBS, was performed after 24 hours (h) to eliminate nonadherent cells and daily for 7 days. Thereafter, media was then changed every 2 days. ECFC appeared between days 7 and 25 and were visually identified as well-circumscribed monolayers of cobblestone appearing cells.

2.3 Adhesion assay

ECFC at sub-confluence were trypsinized and incubated in EGM2-MV complete media supplemented with or without 100 ng/mL of heparin or [OTR₄₁₃₁] for 15 min at RT. Cells were seeded onto non coated plates for 2h at 37°C and the amount of attached viable cells was evaluated by a MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], inner salt)-based colorimetric method [27]. Briefly, after a washing step to remove unattached cells, adherent cells were incubated for 2h30 at 37°C with 20% (v:v) MTS reagent (Promega, Charbonnières, France) in a fresh EBM2 basal medium (without FBS and growth factors). The amount of soluble formazan product converted from MTS by dehydrogenase enzymes is directly proportional to the number of metabolically active cells. The absorbance of the obtained formazan dye is measured at 492 nm using a spectrophotometric TECAN Infinite M1000 plate reader (Tecan, Durham, NC).

2.4 Growth factors dependent mitogenic activity assay

ECFC were seeded into 48 wells plates at density of 10.000 cells/cm² and left for 5h in complete EGM2-MV medium to allow cell adhesion. To investigate the effect of GAG on growth factor-induced proliferation, medium was changed by an EBM2 basal medium supplemented with 0.5% FBS and SingleQuots of growth factors devoided of FGF-2 and VEGF (EGM2 modified medium – 0.5% FBS). After overnight incubation, medium was replaced by the same medium supplemented with FGF-2 or VEGF. GAG, [OTR₄₁₃₁] or heparin, were added to wells from 0.1 to 100 µg/mL (final concentration). Cells were incubated for 5 days, with a renewal of medium, GAG and growth factors at day 3. The amount of viable cells was evaluated by a MTS-based colorimetric method as previously described.

2.5 Chemotactic migration assay

ECFC migration in response to VEGF gradient was assessed in a 24-well modified Boyden chamber, on polycarbonate membrane filter with 8 µm pore diameter (BD Biosciences) coated with 50 µg/mL rat tail collagen type I (BD Biosciences). After an overnight starvation in EBM2 basal medium supplemented with 0.2% FBS, ECFC were loaded in starving medium into the upper part of the microchamber at 200.000 cells/well, with the same medium containing or not 2 ng/mL of VEGF with or without 1 µg/mL of [OTR₄₁₃₁] or heparin on the lower chambers. After 12h of incubation cells on the upper surface of membrane filter were removed by wipping with a cotton swab. Then, all membranes were MGG-stained, mounted and photographed through an Aristoplan Leitz microscope coupled to a CoolSnap color CCD camera (Photometrics). The number of cells per field was automatically counted using a previously described procedure [28] programmed with the macro language of the ImageJ software [29]. Briefly, the red component of RGB images was extracted and segmented using the so called "Otsu" method, and then subsegmented with a 8-bit watershed method. Objects count was then automatically performed to get the cells number. Results are reported as the mean of 18 areas from three pictures by filter, in duplicate during 3 independent experiments.

2.6 Clonogenicity frequency

Serial dilutions of ECFC were performed to obtain 32, 16, 8, 4, 2, 1 and 0.5 cells per well - with 12 to 36 replicate wells per cell dilution. Cells were maintained in EGM2-MV complete medium supplemented or not 1 µg/mL of [OTR₄₁₃₁] or heparin (final concentration). Each medium was renewed every 3 days. Individual wells were scored for the presence of colony after 15 days of culture. The percentage of negative wells as a function of the number of cells/well overlaid was used to estimate the frequency of the clonogenicity, as the 37% log intercept according to Poisson statistics.

2.7 Endothelial Tube Formation in Matrigel™

Ability of ECFC to organize into capillary-like structures in the presence of basement membrane matrix was analyzed using Matrigel™ (BD, France) as previously described [30]. To assess the pro-angiogenic effect of GAG, ECFC were cultured on Matrigel™ with complete EGM2-MV medium supplemented or not with 1 µg/mL of [OTR₄₁₃₁] or heparin (final concentration). Four pictures per well were taken using a camera associated to an inverted microscope with a 4X objective in phase contrast mode. Images were analyzed using an original home-made plugin [31], developed for the ImageJ software [32]. Briefly, phase contrast images were segmented and skeletonized. The trees were then analyzed by detection of junctions and extremities, defining the segments and branches of the cellular meshed network organization. Among these elements, junctions and segments were used for statistical analysis.

2.8 Flow cytometry

Fluorescence activated flow cytometry was performed with BD Accuri C6 flow cytometer (BD) and a minimum of 10.000 events were analyzed for each sample. The cells were harvested, washed in BSA 0.5% in PBS and incubated for 45 min at 4°C, with primary antibodies to analyze the expression of endothelial cell surface marker proteins: FITC-conjugated mouse anti-human CD31 (PECAM-1) IgG1 (BD), PE-conjugated mouse anti-human CD144 IgG1 (Beckman Coulter, France) and Alexa Fluor 647-conjugated mouse anti-human CD309 (VEGFR2) IgG1 (BD). All the antibodies were used in the concentrations suggested by the suppliers. Living cells were discriminated by adding the 7AAD dye (BD). Background fluorescence was obtained from the negative control cells stained with FITC-conjugated mouse IgG1, PE-conjugated mouse IgG1 and APC-conjugated mouse IgG1 antibodies (Beckman Coulter) and subtracted from the mean channel fluorescence of the specific staining patterns. The expression of each antigen was expressed as the mean channel fluorescence.

2.9 Endothelial Function Assays

The ability to express adherence molecules ICAM-1 and VCAM-1 in inflammatory conditions and the ability to uptake acetylated LDL are two main endothelial functional assays. In order to explore these functional capacities, ECFC were cultured with either 10 ng/mL of TNF α (R&D Systems, France) for 18h or with 15 µg/mL of Ac-LDL AlexaFluor 488 (Life technologies, Cergy Pontoise, France) for 4h at 37°C. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 (Biolegend, , France) were analyzed by flow cytometry and internalization of Ac-LDL was visualized using a fluorescent microscope, as previously described [30]. The number of Ac-LDL positive cell was measured by manual counting under a fluorescent microscope.

2.10 Immunocytochemistry

ECFC were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min and washed in PBS-BSA 0.5%. Saturation and permeabilization were performed by incubating fixed cells in PBS-FCS 2% - Triton 0.1% solution for 1h at RT. After washing steps, staining of specific endothelial cell markers were performed using mouse anti-human CD31 (BD) and rabbit anti-human von Willebrand Factor (vWF; Dako, Trappes, France) primary antibodies followed by Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse and Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rabbit secondary antibodies (Life Technologies) staining. Negative control samples included cells treated with secondary antibodies only. All the antibodies were used in the concentrations suggested by the suppliers. Nuclei were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich). Images were visualized using an Olympus BX60 microscope (Olympus Optical, Hamburg, Germany), digitalized using a CCD camera (Photometrics CoolSNAP fx; Roper Scientific, Tucson, AZ) and analyzed using MetaView image analysis system (Universal Imaging, Downingtown, PA)

2.11 Statistical Analysis

Each experiment was performed at least three times and each sample was tested in triplicate. Data are expressed as mean \pm SD. Difference statistically significant was determined with one way ANOVA analysis followed by the Dunnett post-test when there were more than two groups. For analysis between two groups student-t test was used.

3. Results

3.1 [OTR₄₁₃₁] improves colony forming efficiency of human ECFC

The colony forming efficiency (CFE) of ECFC is a very critical step in production of therapeutic endothelial cells, as it will determine the first pool of endothelial outgrowth from which further expansion steps will proceed. The capacity of the [OTR₄₁₃₁] mimetic to improve this step was evaluated on ECFC from human CBMNC (Fig. 1). A single 24 hours exposure of cells to a dose of 100 ng/mL of [OTR₄₁₃₁] added in EGM2-MV medium at day 0 is associated to a significant 1.8-fold increase of the CFE as compared to PBS-treated cells (Fig. 1A). A continuous exposure to 100 ng/mL of [OTR₄₁₃₁] during the first 7 days of culture, corresponding to the daily renewing medium needed to obtain ECFC, significantly increase by 2.7-fold the CFE compared to the PBS-treated group (Fig. 1B), with larger colonies size corresponding to an increased number of cells per colony (data not shown). Same results were obtained with 1 µg/mL dose of [OTR₄₁₃₁] (data not shown). These data clearly indicate that [OTR₄₁₃₁] is able to increase the number of ECFC obtained from a fixed cord blood (CB) volume. Moreover this could be due to [OTR₄₁₃₁] effects not only on early steps such as adhesion of ECFC but also on later steps such as self-renewing and/or proliferation of ECFC.

3.2 Phenotype and functionality of ECFC isolated with [OTR₄₁₃₁]

Characterization of ECFC populations obtained in [OTR₄₁₃₁]-supplemented culture conditions were performed in single shot or 7 days continuous additions, by flow cytometry (Fig. 2A) and immunofluorescence (Fig. 2B) analysis. ECFC initially isolated with 7 days continuous additions of [OTR₄₁₃₁] and further amplified in medium without GAG express cell surface endothelial markers, including PECAM-1 (CD31), VE-Cadherin (CD144), VEGF-R2 (CD309) and vWF to the same extend than cells isolated and cultured without [OTR₄₁₃₁]. Moreover, Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha) activation (Fig. 2C) and acetylated low density lipoprotein (LDL-Ac) uptake (Fig. 2D) assays indicated that ECFC isolated in presence of [OTR₄₁₃₁] are fully functional, since they are able to uptake in comparable extent LDL-Ac through specific receptor (PBS-treated positive cells : 94.9%±1.2, [OTR₄₁₃₁]-treated positive cells : 97.8%±1.2), and can be activated through TNF-alpha-pathways as efficiently as observed for classically isolated cells without [OTR₄₁₃₁]. Same results were obtained from ECFC treated by single shot of [OTR₄₁₃₁] (data not shown). Finally the two kinds of isolation procedures lead to the production of ECFC able to form a vascular-like network on MatrigelTM (Fig. 2E).

3.3 Effect of [OTR₄₁₃₁] on adhesion of ECFC

Because cell adhesion is a crucial property involved in CFE of ECFC, we explored the effect of [OTR₄₁₃₁] on this process. Since data collected from ECFC are limited by the small number of cells in colonies at passage 0, we analyse the effect of pre-incubating [OTR₄₁₃₁] with ECFC on their capacities to attach to culture dish with cells at P3. In contrast to heparin, a natural GAG used as control, which inhibited adhesion by 15%, the [OTR₄₁₃₁] compound significantly improved ECFC adhesion by 25% (Fig. 3).

3.4 [OTR₄₁₃₁] potentiates heparin binding growth factor effects on ECFC proliferation

To further explore the effect of GAG mimetic and because data collected from ECFC are limited by the low number of cells at passage 0, we tested the effect of GAG on ECFC at P2 induced to proliferate for 5 days. First experiments were performed with addition of both GAG, natural or mimetic, in EGM2-MV complete medium and no effect was observed (data not shown), probably due to a saturation of mitogenic signals in this complete medium. In order to measure a possible effect of GAG on ECFC growth, we used modified EGM2-MV medium with only 0.5% of FBS (0.5% EGM2-MV) in which we controlled the concentration of VEGF and FGF-2, the two most potent cytokines for ECFC proliferation. Figures 4A and 4B show results of VEGF and FGF-2 dose-effect, respectively on proliferation rate of ECFC in 0.5% EGM2-MV for 5 days as compared to medium without neither FGF2-2 nor VEGF. We confirm that an ECFC proliferation rate increases according to increasing dose of the growth factor added in the medium and reaches a saturation level for 2 ng/mL and 10 ng/mL of FGF-2 and VEGF respectively. We clearly observed that suboptimal concentration of both growth factors is around 1 ng/mL and decided to use this dose to test potential synergic effect of heparin and [OTR₄₁₃₁] (Fig. 4C, 4D).

ECFC proliferation rate in 0.5% EGM2-MV critically decreased when compared to EGM2-MV complete medium (7 folds). Addition of increasing doses of GAG in 0.5% EGM2-MV did not affect the ECFC growth (data not shown), suggesting GAG do not promote proliferation properties of other growth factors present in the medium (neither IGF-1 nor EGF) or secreted by ECFC. Whereas addition of the suboptimal dose of 1 ng/mL VEGF alone didn't have significant effect, addition of 1 ng/mL FGF-2 alone increased 1.7 fold the proliferation rate of ECFC (Fig. 4C, 4D). In the case of proliferation associated to VEGF, whereas heparin significantly decreased the proliferation rate of ECFC at high doses, the mimetic [OTR₄₁₃₁] induced a significant 1.35 fold increase of ECFC proliferation, only at 0.1 µg/mL. In the case of ECFC proliferation induced by 1 ng/ml of FGF-2, a growth effect was observed with addition of 0.1 µg/mL of heparin (1.4-fold increase) but which decreased with higher doses. A lower increase of ECFC proliferation rate was obtained with 0.1 µg/mL of [OTR₄₁₃₁], but the FGF-2-induced proliferation was significantly potentiated in a dose-

dependent manner since at higher doses of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, increases of 1.4-fold and 1.8-fold respectively were observed. These data clearly indicate that [OTR₄₁₃₁] is able to potentiate HBGF activity on ECFC proliferation in low serum condition.

3.5 [OTR₄₁₃₁] doubles the capacity of a single ECFC to give rise to a clonal progeny

ECFC derived from EPC retain some immature properties after adhesion and proliferation in vitro such as the ability to form secondary colonies from a single cell. In order to evaluate this secondary colony forming capacity of ECFC, we adapted a serial dilutions protocol, as described for hematopoietic stem cells for the quantification of cobblestone area-forming cells [33]. This method permits evaluation of the influence of GAG on ECFC self-renewal capacity. In absence of GAG, ECFC secondary colony frequency ranged between 1/2 and 1/40. According to this inter-individual variability, and to be able to compare the frequency obtained in presence of GAG, we defined a clonogenicity index which corresponds to the ratio of the frequency with/without GAG. Thereby, while heparin had no significant effect with a colony forming index at 1.3, [OTR₄₁₃₁] increased the colony forming index by 2-fold (Fig. 5).

3.6 [OTR₄₁₃₁] improves migration of ECFC

GAG mimetic effect was tested in vitro on ECFC migration in Boyden chambers using VEGF as chemoattractant and compared to heparin (Fig. 6). A basal migration level was defined in EBM2 basal medium with 0.2% serum in the absence of both VEGF and GAG (dotted line) and was enumerated around 100 cells per field. Interestingly, addition of heparin or mimetic [OTR₄₁₃₁] alone to basal medium (0.2% serum) induced a 2-fold increase of ECFC migration. This increase was similar to that induced by addition of VEGF (2 ng/mL). This suggests that heparin and [OTR₄₁₃₁] are able to potentiate chemoattraction of ECFC mediated by growth factors present in the 0.2% serum medium. Finally, in presence of VEGF, addition of heparin or [OTR₄₁₃₁] statistically improves the migration rate by 1.5 fold and 2 fold, respectively, reaching similar level obtained with 10 ng/mL of VEGF in the absence of GAG. This clearly indicates that [OTR₄₁₃₁] and heparin are able to potentiate chemoattractant effect of VEGF.

3.7 [OTR₄₁₃₁] does not modify vascular-like structure formation on Matrigel™

Matrigel™ assay allows investigating functional ability of ECFC to form vascular-like tubes on a pro-angiogenic substrate. As shown in figure 7, ECFC cultured in presence of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of [OTR₄₁₃₁] displayed a similar capacity to form tubes on Matrigel™ as control ECFC. Interestingly, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of heparin induce a better network of vascular-like structures including 40% more segments, nodes and mesh with a total length of the network 20% higher.

4. Discussion

EPC are considered as a promising cell therapy tool for ischemic disease, but these cells represent a scarce population in blood and furthermore, many studies on circulating cell populations expressing combination of CD133, KDR and CD34 markers demonstrate that an inverse correlation exists between risk factors for cardiovascular diseases and potential EPC number and functionality (for review: [34]), suggesting that ECFC could be affected too. This is reinforced by recent published data of Shelley and colleagues demonstrating that the number and functionality of ECFC is affected in aged individuals, which represent the population with highest cardiovascular risk [35]. To further improve the efficacy of EPC transplantation, several approaches are currently being developed to enhance EPC expansion and bioactivities. These are mainly based on the combination of several growth factors such as SCF, FGF-2, VEGF, TPO, GCSF, and IL-3 and 6 in culture media [36-41]. Most of them are heparin-binding cytokines. Nevertheless, despite progress in growth factor combination needed for endothelial system, the optimal expansion conditions compatible with clinical use in serum-free medium still need to be defined. Since GAG are polysaccharide components of the ECM, known to potentiate the bioactivity of numerous HBGF on cells, we hypothesize that they will potentiate the activity of exogenous growth factors added to culture medium and/or secreted by the cells. However, GAG mixtures from natural origin are not well structurally characterized and carry high risk of contamination avoiding their clinical use for therapeutic application. Here, we studied the effect of a synthetic GAG-like product, the [OTR₄₁₃₁] compound, synthesized in reproducible and standardized methods [17] compatible with clinical use, on the properties of ECFC.

4.1 [OTR₄₁₃₁] optimizes the essential steps of in vitro ECFC colony formation frequency

Most patients with vascular diseases, eligible for autologous ECFC cell therapy are aged and display decreased frequency of these progenitor cells. Use of allogenic ECFC from CB may represent an efficient alternative strategy. To access existing CB banks, because the freezing conditions are not adapted to EPC and yield lesser number of ECFC [26], the ECFC production from frozen CB units must be optimized. Thus, whatever the source of blood selected for obtaining ECFC, improvement of the number of colonies is important issue for further reaching the cellular therapeutic dose. We demonstrate here that addition of a GAG mimetic during the first 24 hours of CBMNC plating results in a 2 fold increase of the number of ECFC colonies (Fig 1A). One of possible mechanism of action of the GAG mimetic at this very early step of colony formation is the improvement of adhesion properties of EPC. This hypothesis is supported by the ability of the same GAG mimetic to improve cell adhesion of ECFC (Fig. 3). This result is very promising since it proves that we are able to optimize the essential step of in vitro ECFC colony formation. This is reinforced by previous similar

data demonstrating that treatment of rat bone marrow mononuclear cells with GAG mimetics during the first step of culture increases the colony forming efficiency of MSC [24].

Furthermore, addition of the [OTR₄₁₃₁] mimetic not only for the first 24 hours after plating but all along the first 7 days of culture improves almost 3 fold the number of colonies (Fig. 1B). These data clearly suggest that the GAG mimetic acts not only on early steps of colony formation but also on later steps such as self-renewal and/or cell proliferation of ECFC. This hypothesis is supported by our results demonstrating an improving effect of this GAG mimetic on ECFC proliferation and secondary colony frequency (Fig. 4 and 5). In the past few years, evidences about the regulation of stem cell behavior by ubiquitous GAG such HS and CS have been accumulated. In mouse embryonic stem cell, siRNA knockdown of the EXT1 gene, encoding the enzyme involved in the elongation of the HS chains, leads to a decrease by half of the number of colonies remaining undifferentiated, even in the presence of LIF and serum, and to a critical decrease of the proliferation rate [42]. CS are also involved in stem cell fate as demonstrated by their involvement in the regulation of signaling pathways essential for the proliferation, self-renewal, and cell lineage commitment of neural stem/progenitor cells [43]. All these studies clearly highlight the importance of HS and CS in the modulation of stem cells self-renewal and lineage fate [44, 45]. Our data clearly demonstrate for the first time that [OTR₄₁₃₁] GAG mimetic, by acting on ECFC clonogenicity, is able to impact stem cell properties as it was demonstrated for natural GAG.

4.2 [OTR₄₁₃₁] is able to potentiate the in vitro amplification of ECFC.

GAG are essential for HBGF signaling implicated in endothelial cell proliferation since it has been shown that heparin potentiates mitogenic effect of both FGF-1 and VEGF165 on endothelial cell [46-48] and HS are required for binding FGF-2 and VEGF165 to their high affinity receptors [49, 50]. We show here that [OTR₄₁₃₁] mimetic is able to potentiate ECFC proliferation induced by VEGF and FGF-2, in a cell culture medium with a low (0.5%) concentration of serum (Fig. 4). Interestingly, our data also indicate that the [OTR₄₁₃₁] GAG mimetic action is much higher on FGF-2 effect than on VEGF. This is probably due to different affinities of this GAG toward each growth factor. This hypothesis is supported by several studies analyzing GAG structures relationships with specific binding affinity and different biological effects of HBGF [48, 51-54]. Moreover, our data are in accordance with previous published results demonstrating that another GAG mimetic [OTR₄₁₂₀] binds to VEGF165 and potentiates the affinity for its receptors, leading to better in vitro VEGF-induced proliferation and migration of endothelial cells such as HUVEC [22]. Otherwise, we had already observed that only [OTR₄₁₃₁] significantly potentiates the growth of rat MSC through a FGF-2/FGFR1 pathway, when compared to [OTR₄₁₂₀] or heparin [24].

4.3 [OTR₄₁₃₁] promotes the migration of ECFC

In this study, we show that [OTR₄₁₃₁] is able to promote the VEGF-dependant migration of ECFC (Fig. 6). Moreover, in absence of VEGF it also potentiates migration, probably through interaction with different chemo-attractant molecules secreted by cells or present in the medium. Likewise, we previously demonstrated that [OTR₄₁₃₁] is able to potentiate the migration of rat MSC [24]. In addition, [OTR₄₁₃₁] is able to mobilize immature population of hematopoietic stem cells according to a process that involves SDF-1 interactions [23]. These observations are supported by the demonstration that some HS carrying acetyl groups, like [OTR₄₁₃₁] GAG mimetic, display a better binding of chemokines such CCR2 (MCP-1) [55] which is involved in EPC homing to neovascularisation site [56]. Finally, such migratory effect of [OTR₄₁₃₁] suggests that this GAG mimetic could be of great interest if injected during regenerative process, to attract therapeutic stem cells and mobilize endogenous circulating or resident ones into the injury site.

4.4 Role of [OTR₄₁₃₁] in angiogenesis

Here, we demonstrate that the [OTR₄₁₃₁] mimetic doesn't improve tube formation on Matrigel™ in vitro (Fig. 7). However, it has been documented that another GAG mimetic, the [OTR₄₁₂₀] which presents a structure close to that of [OTR₄₁₃₁], is able to potentiate angiogenesis in vivo in chicken embryo chorioallantoic membrane development [22]. Our hypothesis is that this kind of GAG mimetics act by reinforcing the extracellular matrix during tissue remodeling that occurs during development or regeneration following injury. During in vitro Matrigel™ assay, such matrix remodeling do not occurs. Moreover, we demonstrate here that [OTR₄₁₃₁] is able to reinforce cell adhesion in vitro whereas heparin inhibits it. However, it is well known that partly disruption of endothelial cell-matrix contact is a pre-requisite for angiogenesis [57], suggesting that such adhesive effect of the [OTR₄₁₃₁] mimetic could explain absence of stimulated angiogenesis in vitro.

5. Conclusion

Our results demonstrate that the GAG mimetic [OTR₄₁₃₁] is able to enhance the critical human ECFC colony formation frequency, required to improve the amplification of ECFC, and to promote cell properties such as cell adhesion, migration and self-renewal. Moreover, [OTR₄₁₃₁] is able to potentiate the mitogenic effect of angiogenic growth factors such as FGF-2 and VEGF in low serum condition. Considering cell therapy for ischemic diseases by ECFC isolated from CB or PB, [OTR₄₁₃₁] appears to be a promising tool to increase the cell recovery from these blood sources without modifying their properties and to optimize the development of clinical grade serum-free medium. Moreover, these data suggest that matrix therapeutic strategy based on GAG mimetics will be in accordance with innovative tissue engineering approaches to synergize exogenous growth factors treatments and/or to potentiate in vivo effects of cell-based therapeutic products. The addition of [OTR₄₁₃₁] to injured tissue should constitute scaffolds for a proper micro-environment before cell transplantation that will be able, according to its migratory effect, to induce the in situ recruitment of stem/progenitor cells to the defective sites and increase again tissue repair.

6. Acknowledgments

This work was supported by Region Ile-de-France doctoral fellowship for F. Chevalier. We also acknowledge the financial support from the French National Research Agency (ANR-010-TecSan-2010). We thank Pr. D. Papy-Garcia for helpful readings of the manuscript.

7. References

7. References

1. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 317-25.
2. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study*. Lancet, 1997. **349**(9061): p. 1269-76.
3. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
4. Yoder, M.C., et al., *Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals*. Blood, 2007. **109**(5): p. 1801-9.
5. Bompais, H., et al., *Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells*. Blood, 2004. **103**(7): p. 2577-84.
6. Au, P., et al., *Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1302-5.
7. Sieveking, D.P., et al., *Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(6): p. 660-8.
8. Khan, S.S., M.A. Solomon, and J.P. McCoy, Jr., *Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry*. Cytometry B Clin Cytom, 2005. **64**(1): p. 1-8.
9. Ingram, D.A., et al., *Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2752-60.
10. Tarte, K., et al., *Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation*. Blood, 2010. **115**(8): p. 1549-53.
11. Gandhi, N.S. and R.L. Mancera, *The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins*. Chem Biol Drug Des, 2008. **72**(6): p. 455-82.
12. Gallagher, J.T., *Multiprotein signalling complexes: regional assembly on heparan sulphate*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 3): p. 438-41.
13. Handel, T.M., et al., *Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 385-410.
14. Friedl, A., et al., *Differential binding of fibroblast growth factor-2 and -7 to basement membrane heparan sulfate: comparison of normal and abnormal human tissues*. Am J Pathol, 1997. **150**(4): p. 1443-55.

15. Huynh, M.B., et al., *Age-related changes in rat myocardium involve altered capacities of glycosaminoglycans to potentiate growth factor functions and heparan sulfate-altered sulfation*. J Biol Chem, 2012. **287**(14): p. 11363-73.
16. Huynh, M.B., et al., *Glycosaminoglycans from aged human hippocampus have altered capacities to regulate trophic factors activities but not Abeta42 peptide toxicity*. Neurobiol Aging, 2012. **33**(5): p. 1005 e11-22.
17. Papy-Garcia, D., et al., *Nondegradative sulfation of polysaccharides. Synthesis and structure characterization of biologically active heparan sulfate mimetics*. Macromolecules, 2005. **38**: p. 4647-4654.
18. Barritault, D. and J.P. Caruelle, [*Regenerating agents (RGTA): a new therapeutic approach*]. Ann Pharm Fr, 2006. **64**(2): p. 135-44.
19. Desgranges, P., et al., *Beneficial use of fibroblast growth factor 2 and RGTA, a new family of heparan mimics, for endothelialization of PET prostheses*. J Biomed Mater Res, 2001. **58**(1): p. 1-9.
20. Desgranges, P., et al., *A substituted dextran enhances muscle fiber survival and regeneration in ischemic and denervated rat EDL muscle*. Faseb J, 1999. **13**(6): p. 761-6.
21. Meddahi, A., et al., *Pharmacological studies of RGTA(11), a heparan sulfate mimetic polymer, efficient on muscle regeneration*. J Biomed Mater Res, 2002. **62**(4): p. 525-31.
22. Rouet, V., et al., *A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis*. J Biol Chem, 2005. **280**(38): p. 32792-800.
23. Albanese, P., et al., *Glycosaminoglycan mimetics-induced mobilization of hematopoietic progenitors and stem cells into mouse peripheral blood: structure/function insights*. Exp Hematol, 2009. **37**(9): p. 1072-83.
24. Frescaline, G., et al., *Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells*. Stem Cell Res, 2011. **8**(2): p. 180-92.
25. Frescaline, G., et al., *Glycosaminoglycan mimetic associated to human mesenchymal stem cell based scaffolds inhibit ectopic bone formation but induce angiogenesis in vivo*. Tissue Eng Part A, 2013.
26. Vanneaux, V., et al., *In vitro and in vivo analysis of endothelial progenitor cells from cryopreserved umbilical cord blood: are we ready for clinical application?* Cell Transplant, 2010. **19**(9): p. 1143-55.
27. Cory, A.H., et al., *Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture*. Cancer Commun, 1991. **3**(7): p. 207-12.

28. Destouches, D., et al., *Multivalent pseudopeptides targeting cell surface nucleoproteins inhibit cancer cell invasion through tissue inhibitor of metalloproteinases 3 (TIMP-3) release*. J Biol Chem, 2012. **287**(52): p. 43685-93.
29. Rasband, W.S., *ImageJ*, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. 1997 - 2013, U. S. National Institutes of Health: Bethesda, Maryland, USA.
30. Lavergne, M., et al., *Porous polysaccharide-based scaffolds for human endothelial progenitor cells*. Macromol Biosci, 2012. **12**(7): p. 901-10.
31. Carpentier, G., et al., *Angiogenesis Analyzer*, in *4th ImageJ User and Developer Conference proceedings ISBN: 2-919941-18-6 : 198-201*. 2012.
32. Carpentier, G., *Angiogenesis Analyzer for ImageJ* <http://rsb.info.nih.gov/ij/macros/toolsets/Angiogenesis%20Analyzer.txt>. 2012.
33. Pettengell, R., et al., *Direct comparison by limiting dilution analysis of long-term culture-initiating cells in human bone marrow, umbilical cord blood, and blood stem cells*. Blood, 1994. **84**(11): p. 3653-9.
34. Alaiti, M.A., M. Ishikawa, and M.A. Costa, *Bone marrow and circulating stem/progenitor cells for regenerative cardiovascular therapy*. Transl Res, 2010. **156**(3): p. 112-29.
35. Shelley, W.C., et al., *Changes in the frequency and in vivo vessel-forming ability of rhesus monkey circulating endothelial colony-forming cells across the lifespan (birth to aged)*. Pediatr Res, 2012. **71**(2): p. 156-61.
36. Schlechta, B., et al., *Ex-vivo expanded umbilical cord blood stem cells retain capacity for myocardial regeneration*. Circ J, 2010. **74**(1): p. 188-94.
37. Janic, B., et al., *Human cord blood-derived AC133+ progenitor cells preserve endothelial progenitor characteristics after long term in vitro expansion*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9173.
38. Kalka, C., et al., *Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3422-7.
39. Lippross, S., et al., *Platelet released growth factors boost expansion of bone marrow derived CD34(+) and CD133(+) endothelial progenitor cells for autologous grafting*. Platelets, 2011. **22**(6): p. 422-32.
40. O, E., et al., *Efficient nonadhesive ex vivo expansion of early endothelial progenitor cells derived from CD34+ human cord blood fraction for effective therapeutic vascularization*. Faseb J, 2011. **25**(1): p. 159-69.
41. Senegaglia, A.C., et al., *Are purified or expanded cord blood-derived CD133+ cells better at improving cardiac function?* Exp Biol Med (Maywood), 2010. **235**(1): p. 119-29.
42. Sasaki, N., et al., *Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(6): p. 3594-606.

43. Purushothaman, A., K. Sugahara, and A. Faissner, *Chondroitin sulfate "wobble motifs" modulate maintenance and differentiation of neural stem cells and their progeny*. J Biol Chem, 2012. **287**(5): p. 2935-42.
44. Kraushaar, D.C., S. Dalton, and L. Wang, *Heparan sulfate: a key regulator of embryonic stem cell fate*. Biol Chem, 2013.
45. Smith, R.A., et al., *Glycosaminoglycans as regulators of stem cell differentiation*. Biochem Soc Trans, 2011. **39**(1): p. 383-7.
46. Thornton, S.C., S.N. Mueller, and E.M. Levine, *Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation*. Science, 1983. **222**(4624): p. 623-5.
47. Ono, K., et al., *Structural features in heparin that interact with VEGF165 and modulate its biological activity*. Glycobiology, 1999. **9**(7): p. 705-11.
48. Ashikari-Hada, S., et al., *Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins*. J Biol Chem, 2005. **280**(36): p. 31508-15.
49. Yayon, A., et al., *Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor*. Cell, 1991. **64**(4): p. 841-8.
50. Gitay-Goren, H., et al., *The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules*. J Biol Chem, 1992. **267**(9): p. 6093-8.
51. Cole, C.L., et al., *Synthetic heparan sulfate oligosaccharides inhibit endothelial cell functions essential for angiogenesis*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11644.
52. Goger, B., et al., *Different affinities of glycosaminoglycan oligosaccharides for monomeric and dimeric interleukin-8: a model for chemokine regulation at inflammatory sites*. Biochemistry, 2002. **41**(5): p. 1640-6.
53. Ouidja, M.O., et al., *Structure-activity studies of heparan mimetic polyanions for anti-prion therapies*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **363**(1): p. 95-100.
54. Zhao, W., et al., *Binding affinities of vascular endothelial growth factor (VEGF) for heparin-derived oligosaccharides*. Biosci Rep, 2012. **32**(1): p. 71-81.
55. Schenauer, M.R., et al., *CCR2 chemokines bind selectively to acetylated heparan sulfate octasaccharides*. J Biol Chem, 2007. **282**(35): p. 25182-8.
56. Hristov, M., et al., *Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury*. Circ Res, 2007. **100**(4): p. 590-7.
57. Ingber, D.E., *Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology*. Circ Res, 2002. **91**(10): p. 877-87.

Figures

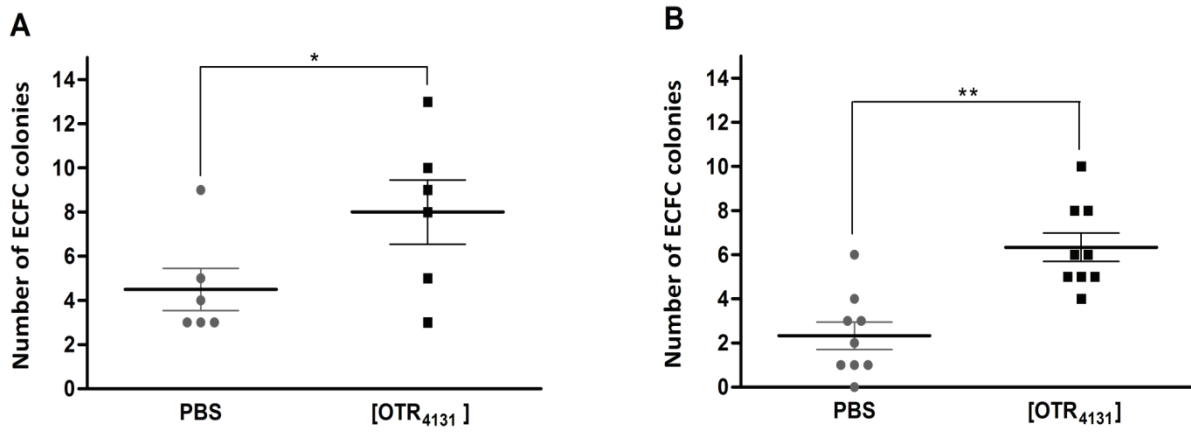


Figure 1 Effect of [OTR₄₁₃₁] on human ECFC colony formation efficiency

Number of ECFC colonies, identified as well-circumscribed monolayers of cobblestone appearing cells by visual inspection, were counted after 25 days of culture of purified CBMNC fraction, divided into 2 equal volumes and incubated either in PBS or [OTR₄₁₃₁] solutions, for 24h (panel A) or 7 days (panel B). Values are the mean and SEM calculated from either 6 (24h) or 9 (7 days) individual blood samples processed in independent experiments, (n=6 or n=9, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

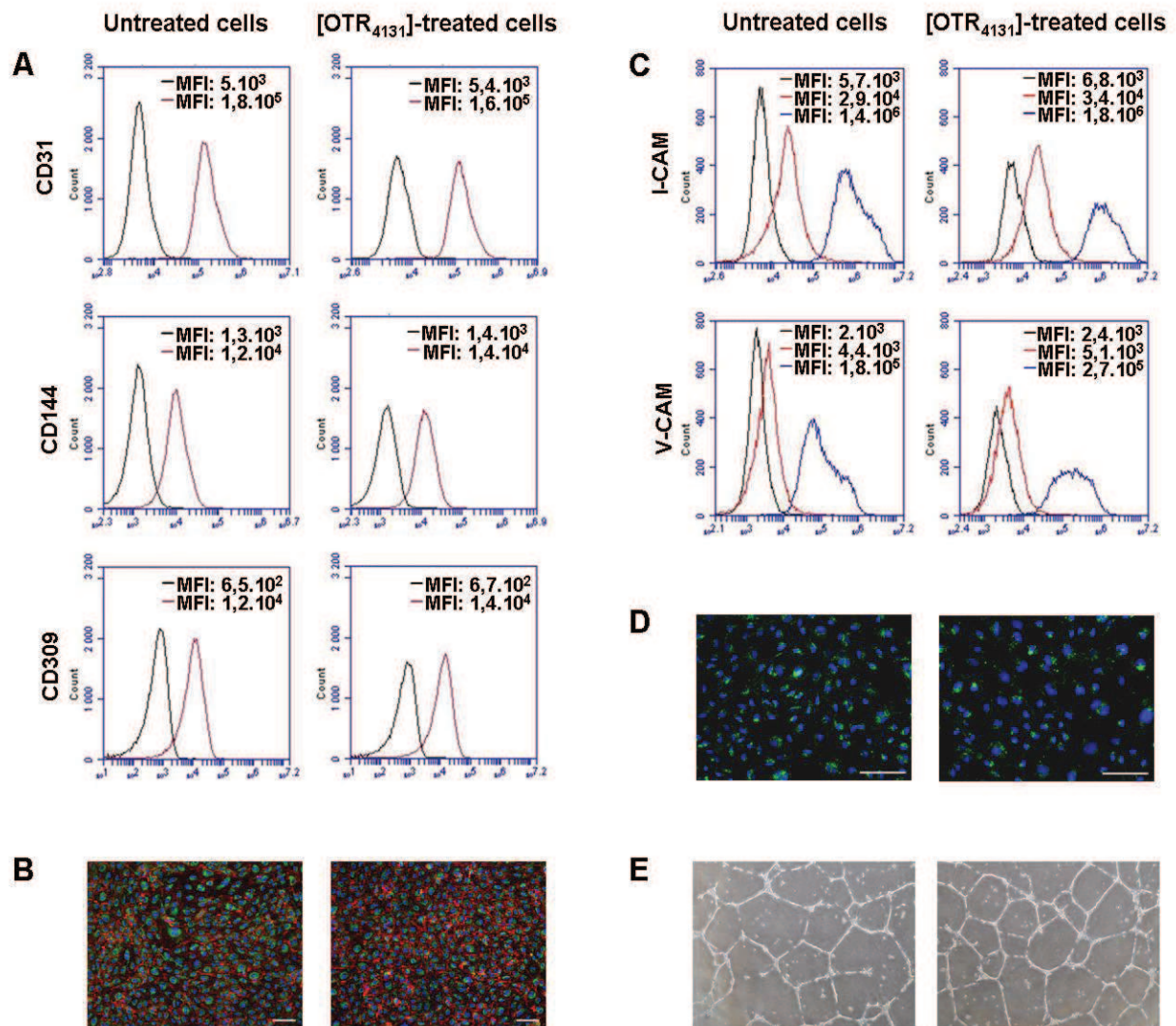


Figure 2 Phenotype and functionality of human ECFC isolated with [OTR₄₁₃₁]

Phenotypical considerations: (A) Flow cytometry analysis of the expression of specific endothelial markers CD31, CD144 and CD309 (IgG: black line; expression: red line; MFI: Mean Fluorescence Intensity in arbitrary unit). (B) ICC analysis of specific endothelial markers CD31 (red color) and vWF (green color) associated to nuclei staining (blue color); scale bar = 100 μ m. Functional considerations: (C) Flow cytometry analysis of ICAM-1 and VCAM-1 surexpression according to TNF alpha activation (IgG: black line; basal expression: red line; surexpression: blue line). (D) LDL-Ac (green color) uptake associated to nuclei staining (blue color); scale bar = 100 μ m. (E) Tubular network formation on MatrigelTM.

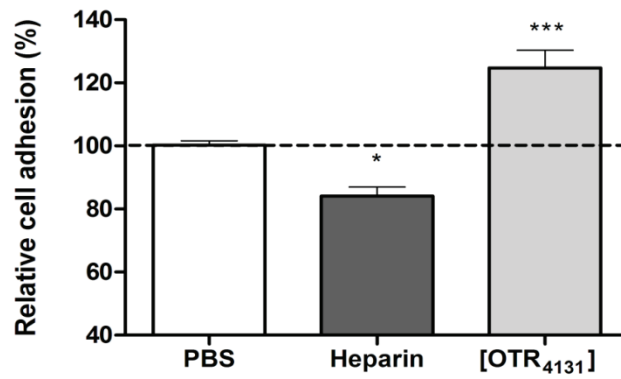


Figure 3 Effect of Heparin and [OTR₄₁₃₁] on human ECFC adhesion

Relative adhesion capacity of ECFC pre incubated with or without 100 ng/mL Heparin or [OTR₄₁₃₁]. The relative adhesion performance of each condition was expressed as fold changes as compared to the control condition without GAG (PBS). Values are the mean and SEM calculated from triplicates in 4 independent experiments, (n=4, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

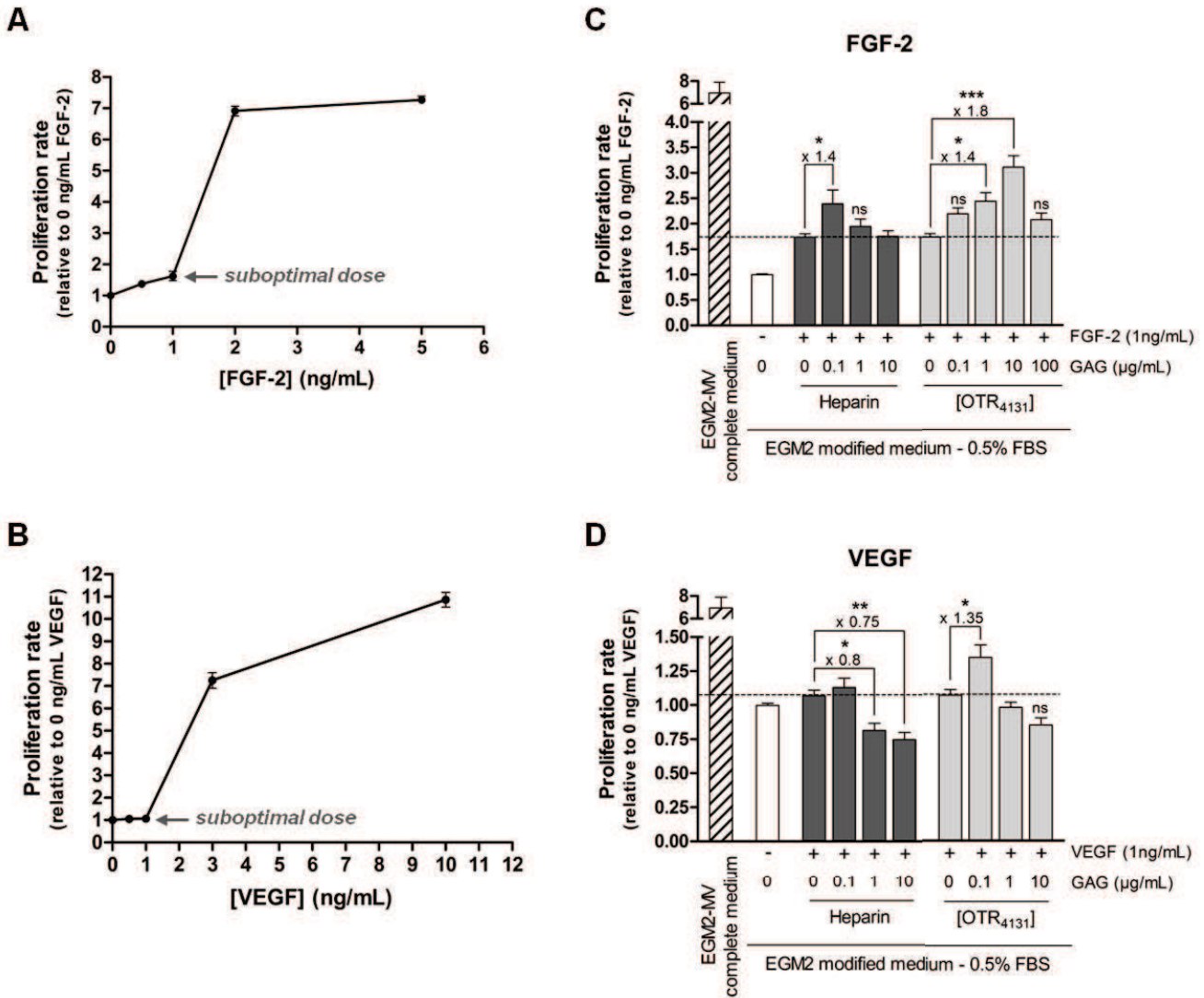


Figure 4 Effect of Heparin and [OTR₄₁₃₁] on human ECFC proliferation

Proliferation rate of ECFC with increasing concentrations of either FGF-2 (panel A) or VEGF (panel B) and amplified with 1 ng/mL of FGF-2 (panel C) or VEGF (panel D) with the indicated concentration of [OTR₄₁₃₁] or Heparin in EGM2 modified medium – 0.5% FBS for 5 days. The proliferation rate of each condition was expressed as fold changes as compared to condition without cytokines and without GAG (=1). In order to see the effect of GAG alone, the dotted line represents the proliferation rate with cytokine alone. Values are the mean and SEM calculated from triplicates in 4 independent experiments, (n=4, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

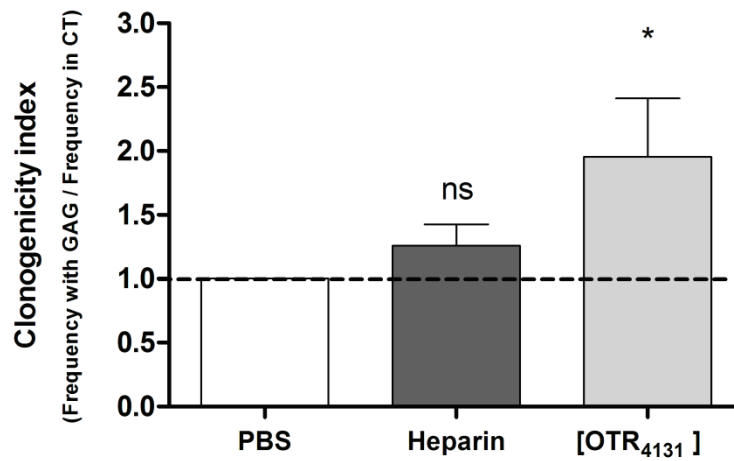


Figure 5 Effect of Heparin and [OTR₄₁₃₁] on human ECFC secondary clonogenicity

Clonogenicity index (Frequency with GAG/Frequency CT) of ECFC after 15 days of culture with or without 1 µg/mL final concentration of Heparin or [OTR₄₁₃₁]. Values are the mean and SEM calculated from 6 individual blood samples in 6 independent experiments, (n=6, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

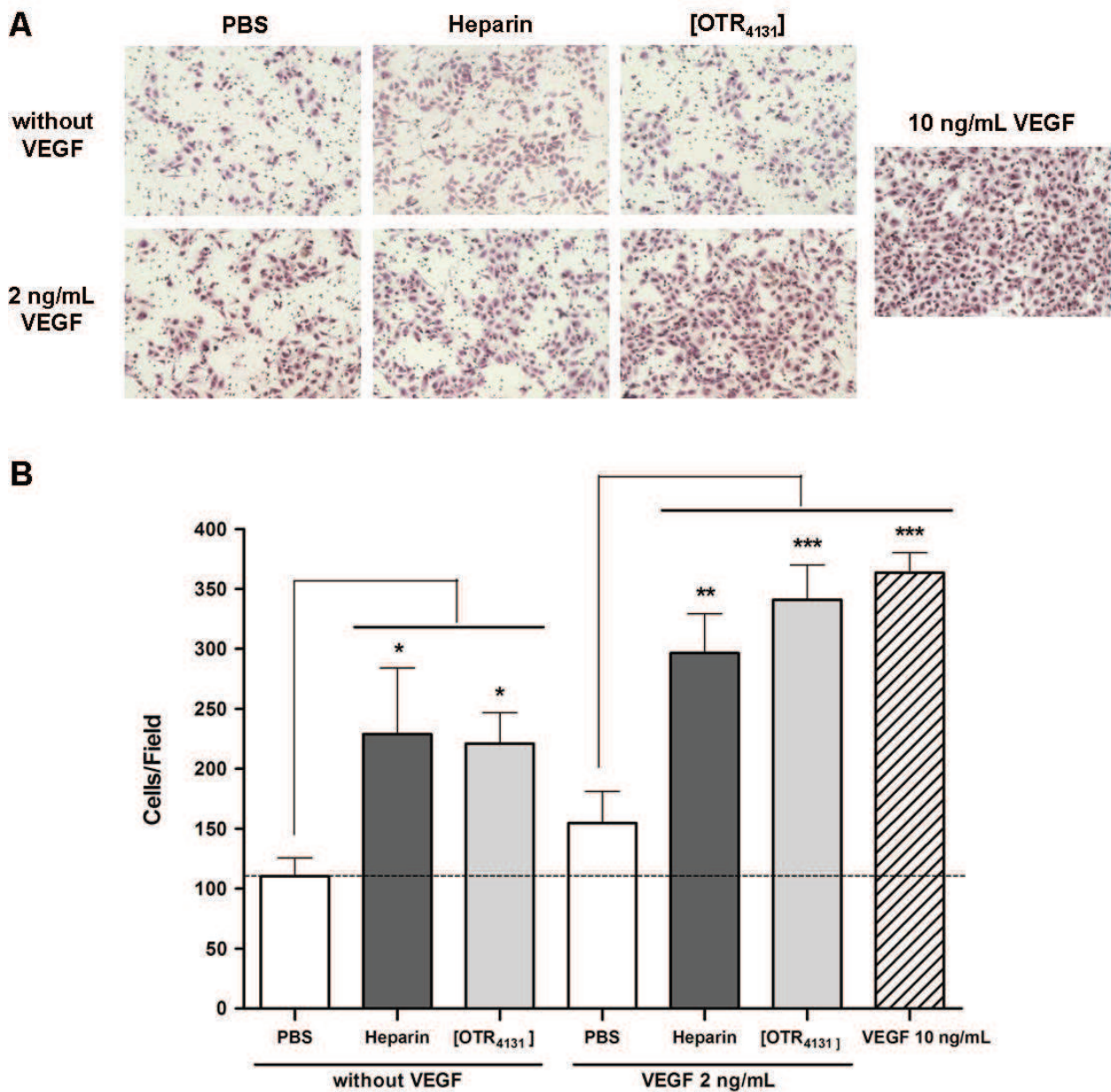


Figure 6 Effect of Heparin and [OTR₄₁₃₁] on human ECFC migration capacity

(A) Representative pictures of MGG-stained transwell membranes (B) Migration levels of ECFC exposed to 1 $\mu\text{g/mL}$ of Heparin or [OTR₄₁₃₁] with or without VEGF. Data represent the mean and SEM from 3 independent experiments with each condition in duplicate (each value was determined by the mean of three different representative photographs) (n=3, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

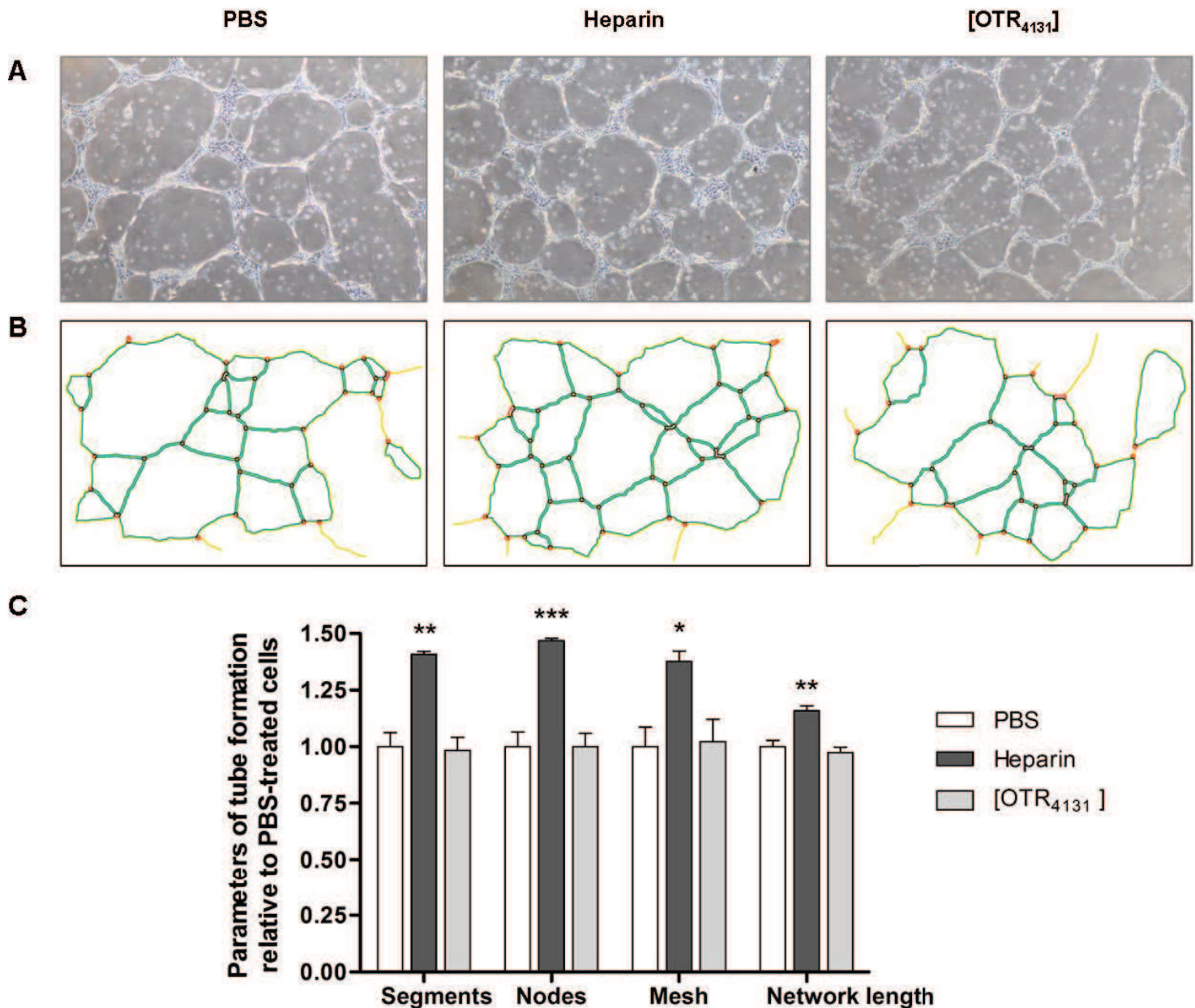


Figure 7 Effect of Heparin and [OTR₄₁₃₁] on human ECFC tubes formation

(A) Representative phase contrast pictures of tubular network on Matrigel™ formed by ECFC in presence or not of 1 μg/mL of Heparin or [OTR₄₁₃₁]. (B) Extracted skeletons of tubular networks identifying segments (yellow color), mesh (blue color) and nodes (red color). (C) ImageJ plugin analyzed parameters of tube formation. Values are the mean and SEM calculated from triplicates in 3 independent experiments, (n=3, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

I.3 Résultats complémentaires

Les résultats complémentaires suivants ont été obtenus lors des expériences décrites dans l'article 1. Il s'agit de l'effet d'un second mimétique de GAG, l'[OTR₄₁₂₀] (discuté dans l'article) dont la structure est très proche de celle de l'[OTR₄₁₃₁] mais renferme moins de groupements hydrophobes.

I.3.a Effet de l'[OTR₄₁₂₀] sur l'adhérence des PEC

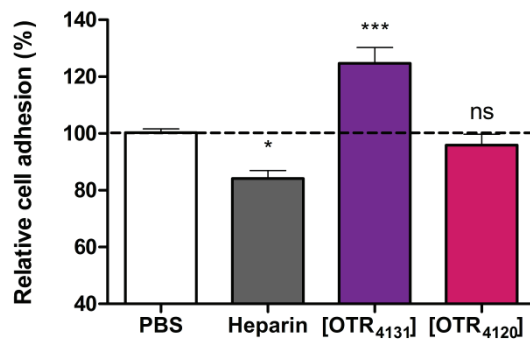


Figure 22 : Effet des GAG sur l'adhérence des PEC tardifs

Capacité d'adhérence relative des PEC tardifs pré-incubés avec ou sans 100 ng/mL de GAG. La performance relative d'adhérence est exprimée pour chaque condition par référence à l'adhérence en absence de GAG (PBS). Les valeurs représentent la moyenne associée à l'écart-type à la moyenne calculés à partir de triplicats répétés dans 4 expériences indépendantes, (n=4, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

I.3.b Effet de l' [OTR₄₁₂₀], des HS et des CS B sur la prolifération des PEC

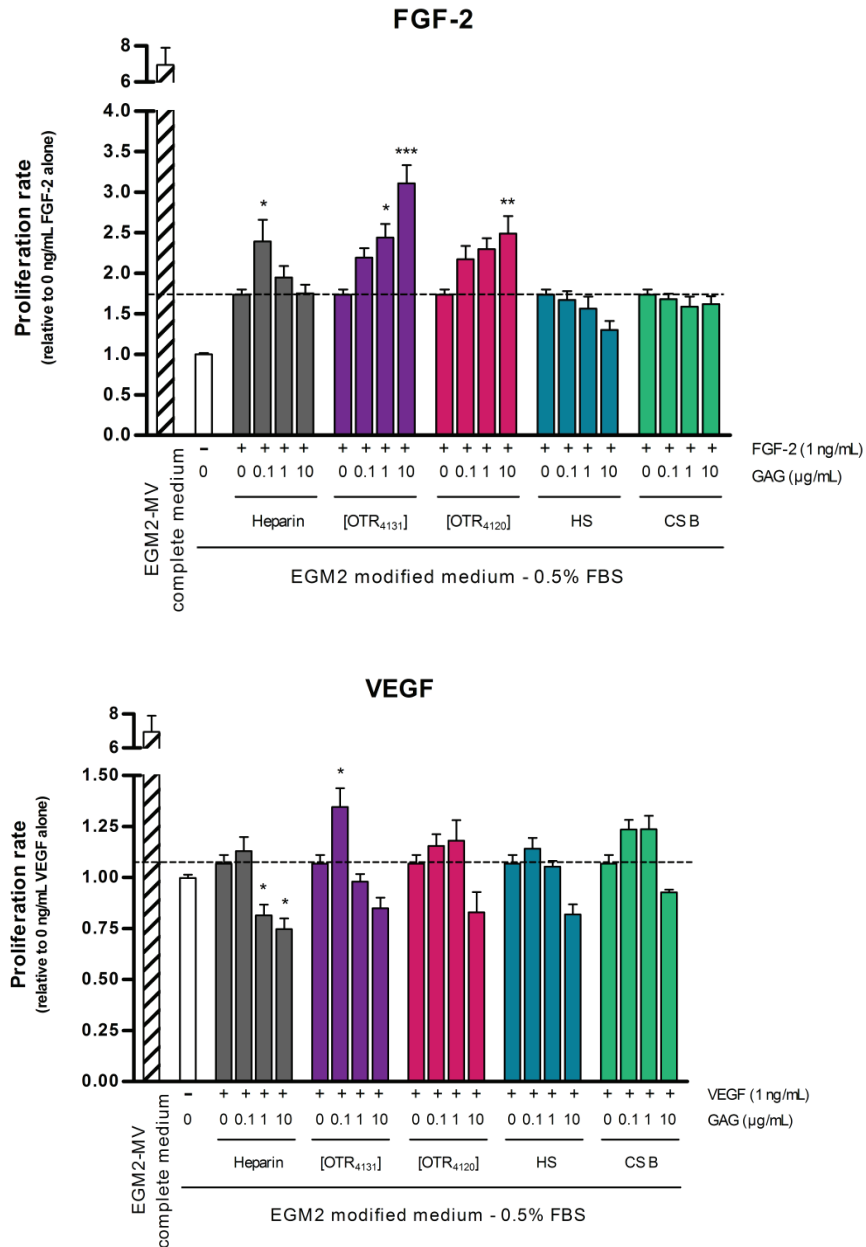


Figure 23 : Effet des GAG sur la prolifération des PEC tardifs

Prolifération relative des PEC tardifs en présence d'une concentration croissante de différents GAG dans un milieu EGM2 modifié à 0,5% de serum pendant 5 jours. Le taux de prolifération pour chaque condition est relatif à la condition sans cytokine et sans GAG, définie comme le taux de prolifération à 1. Afin de visualiser l'effet des GAG, la ligne pointillée rappelle le taux de prolifération en présence de cytokine seule. Les valeurs indiquées représentent la moyenne associée à l'écart-type à la moyenne calculés à partir de triplicats répétés dans 4 expériences indépendantes, (n=4, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

I.3.c Effet de l' [OTR₄₁₂₀] sur la clonogénicité secondaire des PEC

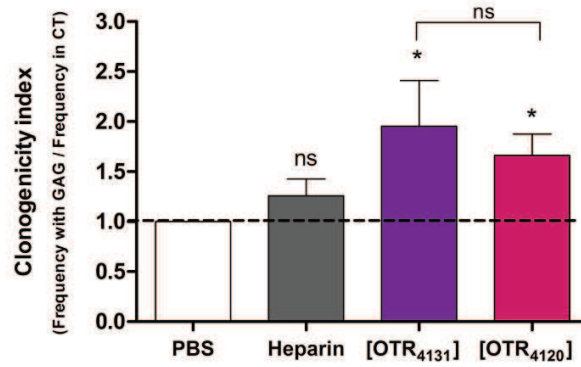


Figure 24 : Effet des GAG sur la clonogénicité secondaire des PEC tardifs

Index de clonogénicité secondaire (calculé par le rapport entre la fréquence d'apparition des colonies secondaires en présence de GAG sur la fréquence basale) des PEC tardifs après 15 jours de culture en présence ou en absence de GAG, à une concentration finale de 1 µg/mL. Les valeurs indiquées représentent la moyenne associée à l'écart-type à la moyenne calculés à partir 6 prélèvements sanguins individuels et traités dans 6 expériences indépendantes, (n=6, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

I.3.d Effet de l' [OTR₄₁₂₀] sur la migration des PEC

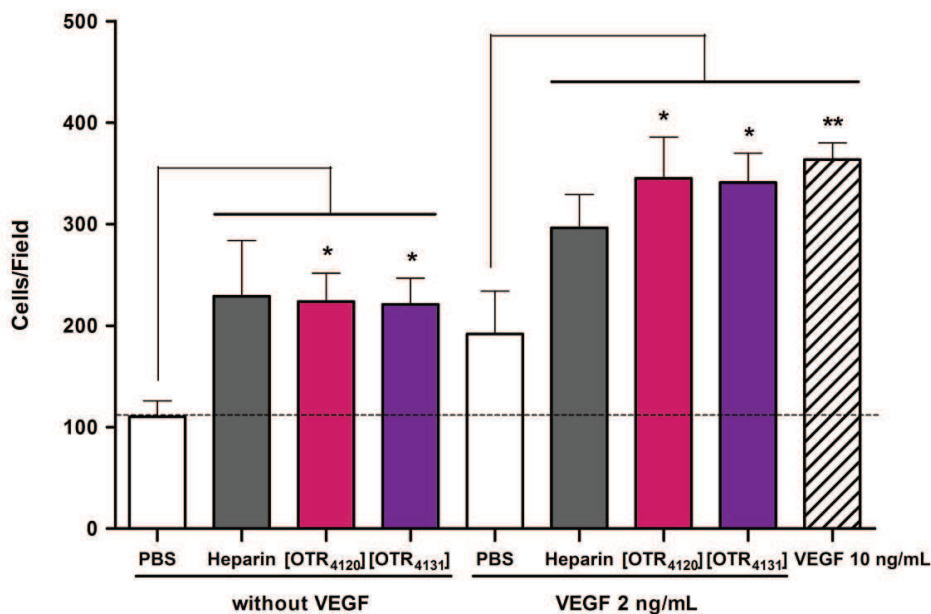


Figure 25 : Effet des GAG sur la migration des PEC tardifs

Niveaux de migration des PEC tardifs exposés à 1 µg/mL de GAG en présence ou en absence de VEGF. Les valeurs indiquées représentent la moyenne associée à l'écart-type à la moyenne calculés à partir de duplicats répétés dans 3 expériences indépendantes, (n=3, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

I.3.e Effet de l' [OTR₄₁₂₀] sur la formation de tubes par les PEC *in vitro*

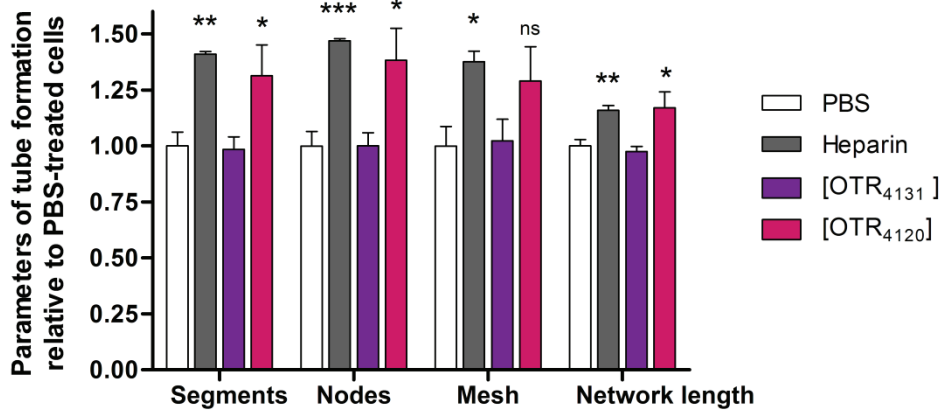


Figure 26 : Effet des GAG sur la formation de tubes par les PEC tardifs

Paramètres structuraux de la formation de tubes (segments, nœuds, mailles et longueur du réseau) par les PEC tardifs *in vitro*. Chaque paramètre est exprimé par rapport à la structure basale formée par les PEC en absence de GAG. Les valeurs indiquées représentent la moyenne associée à l'écart-type à la moyenne calculés à partir de triplicats répétés dans 3 expériences indépendantes, (n=3, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

I.3.f Suivi cinétique du devenir cellulaire de l'[OTR₄₁₃₁]

Parrallèlement aux expériences décrites dans l'article 1, nous avons investigués lors d'expériences préliminaires le devenir cellulaire du mimétique [OTR₄₁₃₁] dans des cultures cellulaires de fibroblastes (sécrétant beaucoup de matrice extracellulaire) et de nos cellules d'intérêt : les PEC.

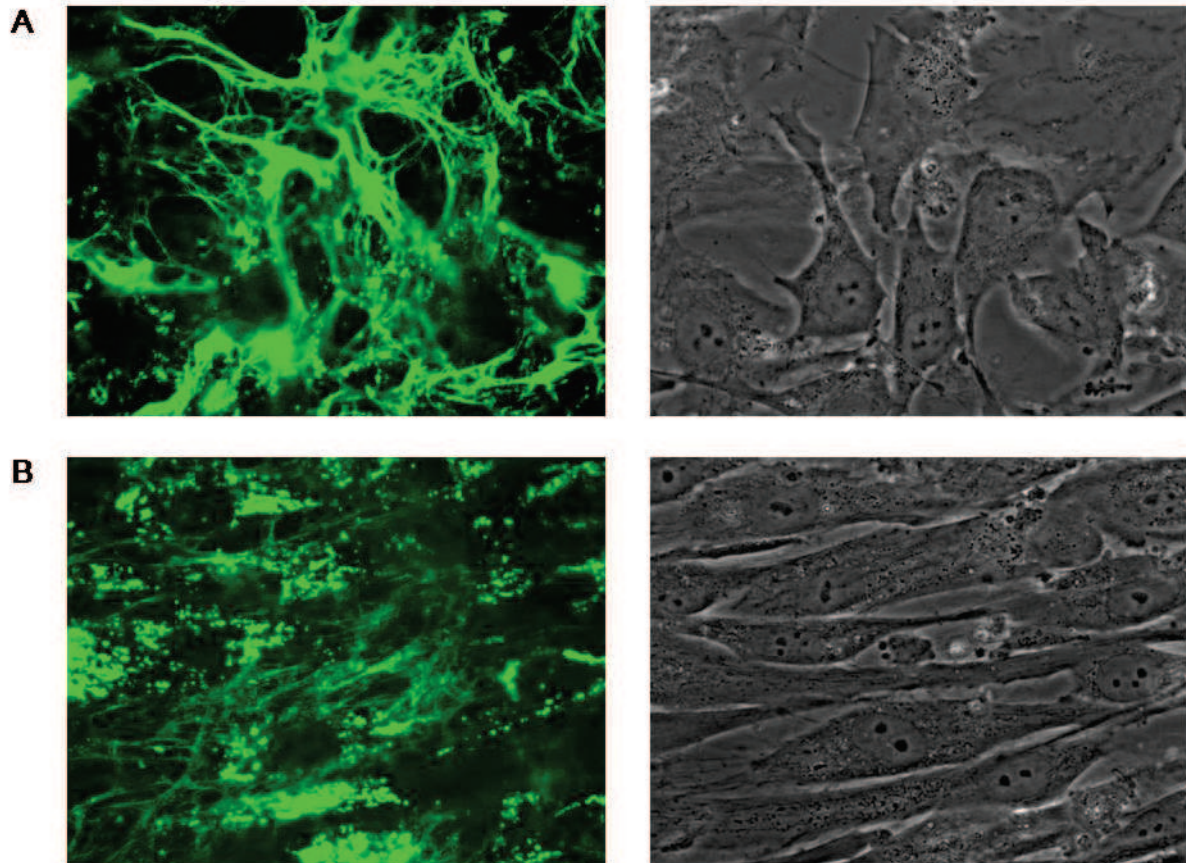


Figure 27 : Localisation de l'[OTR₄₁₃₁] ajouté dans le milieu de culture de fibroblastes

Le mimétique [OTR₄₁₃₁] covalentement couplé au fluorochrome Alexa Fluor® 647 a été ajouté une unique fois à 10 µg/mL (concentration finale) dans le milieu de culture (EGM2-MV) de fibroblastes de sang de cordon ombilical humain. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours. Les images de gauche représentent la fluorescence spécifique émise par le fluorochrome Alexa Fluor® 647 et les images de droite correspondent aux photographies correspondantes en contraste de phase.

Au bout de deux heures, on le retrouve essentiellement associé à la matrice extracellulaire et dans quelques vésicules intracellulaires (A). Le marquage est persistant au bout de trois jours mais est plus faible au niveau matriciel et plus intense au niveau intracellulaire (B), suggérant une endocytose du mimétique.

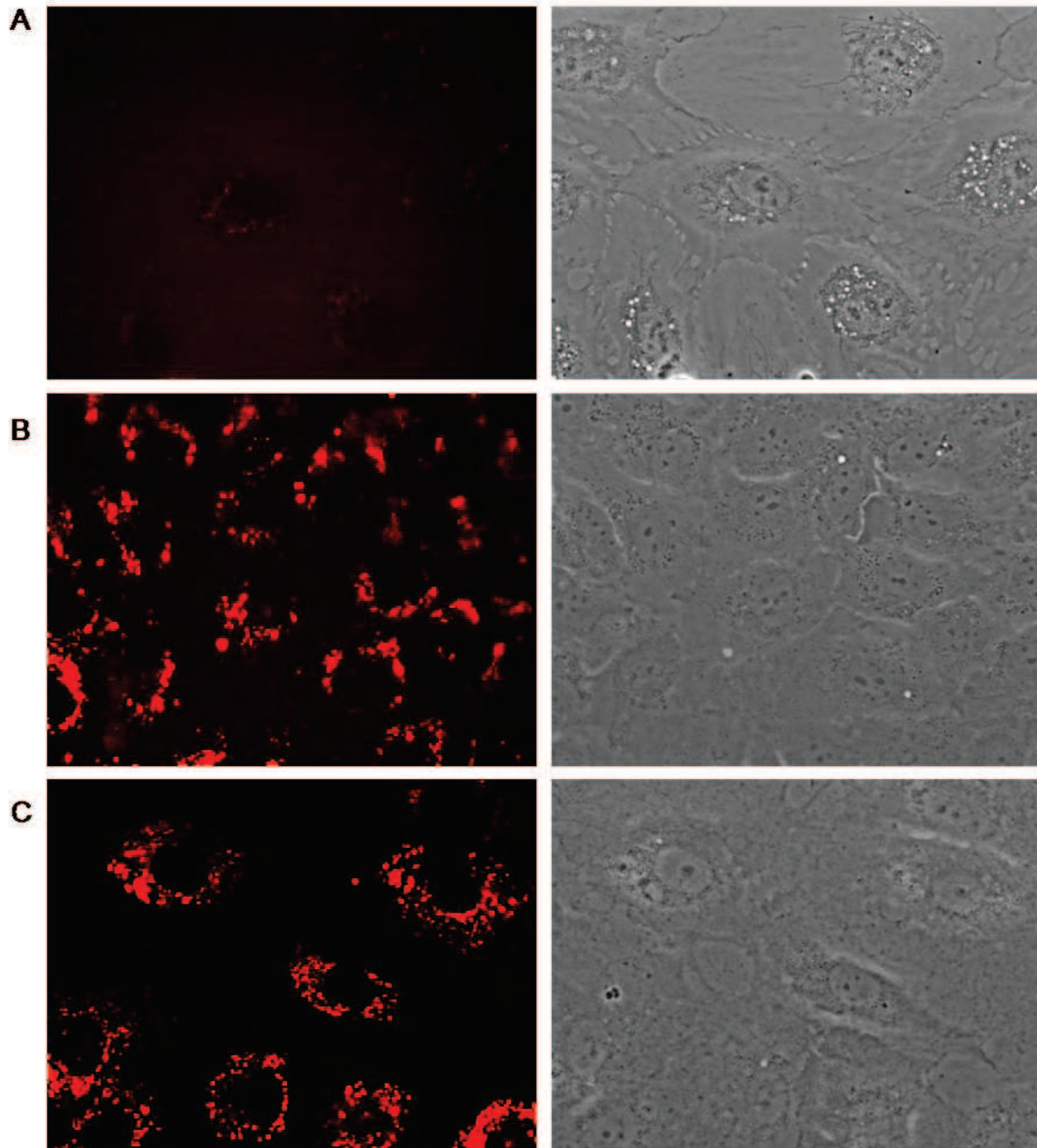


Figure 28 : Localisation de l'[OTR₄₁₃₁] ajouté dans le milieu de culture de PEC

Le mimétique [OTR₄₁₃₁] covalentement couplé au fluorochrome Alexa Fluor® 647 a été ajouté une unique fois à 10 µg/mL (concentration finale) dans le milieu de culture (EGM2-MV) de PEC de sang de cordon ombilical humain. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours. Les images de gauche représentent la fluorescence spécifique émise par le fluorochrome Alexa Fluor® 647 et les images de droite correspondent aux photographies correspondantes en contraste de phase.

Au bout de deux heures, on retrouve un marquage faible en général, un peu plus accentué dans quelques vésicules intracellulaires (A). Le marquage des vésicules est intense au bout de trois jours (B), et persiste au bout de quinze jours (C).

I.4 Discussion

Nos résultats ont permis de démontrer que le mimétique de GAG [OTR₄₁₃₁] permettait d'augmenter le nombre de colonies isolées à partir du sang de cordon. Nous avons également observés de façon récurrente que les colonies isolées en présence de l'[OTR₄₁₃₁] étaient de taille plus importante que celles isolées en conditions standard. Ainsi, l'ajout de ce mimétique dans le milieu de culture des PEC permet d'améliorer considérablement le nombre de cellules récupérées à partir du sang placentaire, un paramètre critique déterminant dans le processus d'amplification des PEC. De plus, ce mimétique potentialise les propriétés d'auto-renouvellement des PEC ainsi que leur prolifération dans un milieu appauvri en sérum. L'[OTR₄₁₃₁] pourrait donc être un composé efficace dans la formulation de milieux de grade clinique permettant d'obtenir la dose de cellules nécessaire pour le protocole thérapeutique en un nombre de divisions cellulaires limitées. Par ailleurs, l'[OTR₄₁₃₁] améliore également les capacités d'adhérence et de migration des PEC, deux paramètres mis en jeu lors du recrutement des cellules aux sites de lésion. Ainsi, en plus d'un intérêt *in vitro* dans le développement de protocoles d'isolement des PEC pour la thérapie allogénique, ce mimétique de GAG présente également un intérêt *in vivo* en tant que produit de thérapie matriciel, permettant d'optimiser le recrutement des PEC endogènes aux sites de néovascularisation.

L'étude de deux mimétiques de GAG, de structures similaires et ne différant que par le degré d'hydrophobicité, nous a permis de mettre en évidence la conséquence d'une telle modification sur différentes propriétés cellulaires. En effet, alors que le mimétique [OTR₄₁₃₁] potentialise significativement l'adhérence et la prolifération des PEC, le mimétique [OTR₄₁₂₀] n'a aucun effet sur l'adhérence et potentialise bien plus faiblement la prolifération dépendante du FGF-2 et pas du tout la prolifération dépendante du VEGF (Figure 22 et Figure 23). Ce dernier résultat est intéressant puisqu'il a déjà été démontré que l'[OTR₄₁₂₀] potentialisait la prolifération dépendante du VEGF des HUVEC, des cellules endothéliales matures de la veine de cordon ombilical [337]. De plus, l'effet de l'[OTR₄₁₃₁] est totalement différent entre son action synergique avec le FGF-2 et celle avec le VEGF. Il potentialise au maximum par 180% l'activité du FGF-2 à une dose de 10 µg/mL alors qu'il potentialise au maximum par 35% l'activité du VEGF à une dose de 0,1 µg/mL (Figure 23). Toutes ces données suggèrent que l'action des mimétiques est à la fois dépendante de la cytokine mais aussi de façon très précise du type cellulaire. De plus, nous avons également démontrés que les deux mimétiques [OTR₄₁₂₀] et [OTR₄₁₃₁] potentialisaient indifféremment la migration des PEC induite par le VEGF (Figure 25). Ce résultat apporte un niveau de complexité supplémentaire en montrant que l'effet de ces deux mimétiques en présence de VEGF est différent sur la prolifération cellulaire, mais

pas sur la migration cellulaire. Nous avons également montré qu'alors que le mimétique [OTR₄₁₂₀] potentialise la formation de tubes *in vitro* par les PEC au même niveau que l'héparine, le mimétique [OTR₄₁₃₁] n'a aucun effet sur ce paramètre (Figure 26). Ceci peut être lié à la capacité de l'[OTR₄₁₃₁] à favoriser l'adhérence des PEC et donc stabiliser l'accroche des ces cellules à leur support. En effet, physiologiquement, la déstabilisation de l'endothélium (médiée par le système Tie-2/Ang-2) est un pré-requis à l'angiogenèse [370].

Ainsi, les mécanismes d'action des mimétiques mériteraient d'être étudiés afin de mieux comprendre leurs effets. Grâce au couplage du mimétique [OTR₄₁₃₁] avec un fluorochrome, on a déjà pu constater que le mimétique se fixait aux autres molécules matricielles sécrétées par les cellules puis qu'il était progressivement endocyté pour se retrouver dans des vésicules intracellulaires (Figure 27). L'identité de ces vésicules doit également être clarifiée, il pourrait s'agir uniquement des lysosomes mais la persistance du signal au bout de quinze jours dans les cellules endothéliales (Figure 28) suggère que le mimétique pourrait également être stocké dans des vésicules d'autres natures, comme les corps de Weibel-Palade, renfermant des facteurs liant l'héparine tels que l'IL-8, l'IL-6, encore ou MCP-1 [489].

Enfin, dans nos études nous avons systématiquement comparé l'effet des mimétiques avec des GAG naturels, et très majoritairement l'héparine, le GAG endogène le plus sulfaté. En considérant les expérimentations ayant un temps d'incubation des GAG avec les cellules relativement courts, de quelques heures, on remarque que l'héparine a tantôt un effet similaire (migration : Figure 25 ; formation de tubes : Figure 26), tantôt un effet totalement différent (adhérence : Figure 22). Toutefois, en considérant les expérimentations se déroulant sur plusieurs jours, on remarque que les GAG naturels ont un effet systématiquement plus faible que les mimétiques (formation de colonies secondaires : Figure 24 ; prolifération : Figure 23), mettant ainsi en avant l'intérêt de la résistance des GAG mimétiques aux glycanases [342], qui potentialisent alors les effets des facteurs de croissance dans le temps, alors que les GAG naturels sont rapidement dégradés.

En conclusion, cette étude nous a permis de montrer que le mimétique [OTR₄₁₃₁] était un composé idéal pour optimiser les paramètres de culture pour l'isolement et l'amplification des PEC de sangs placentaires.

II Remodelage glycanique dans le muscle ischémié

II.1 Introduction

Longtemps considérée comme un support physique inerte, la MEC est depuis plusieurs années de plus en plus étudiée. Cette évolution est illustrée par une recherche par mot-clés (extracellular matrix) sur PubMed, qui renvoie 23 000 articles scientifiques publiés entre 1990 et 1999, deux fois plus sur la décennie suivante et déjà près de 15 000 articles depuis 2010.

La MEC a montré un rôle prépondérant dans le développement et les mécanismes de régénération, bien plus qu'un support physique la MEC constitue un panel de signaux instructifs, déterminant le comportement cellulaire et *in fine* l'organisation tissulaire. Grâce à l'abondance des techniques disponibles pour l'étude des protéines, les recherches sont essentiellement axées sur ces macromolécules de la MEC. Petit à petit, les études portant sur les protéines ont abouties à des études plus ciblées sur les PG et enfin à la mise en évidence que les chaînes de GAG portées par ces PG sont responsables de la majeure partie de l'effet sur les cellules.

Concernant le développement ou la régénération musculaire, il existe plusieurs études portant sur les protéines et PG (revues : [213, 490, 491]). Chacune de ces études porte en général sur l'étude précise d'un ou deux PG. Mais finalement, il n'existe aucune étude portant sur la description des modifications de la composante glycanique en général, alors qu'il est admis que ce sont les chaînes de GAG qui sont essentiellement responsables de l'effet des PG.

C'est pourquoi, nous avons développés et adaptés des techniques biochimiques permettant d'étudier le remodelage des GAG au cours d'un processus d'ischémie-régénération, dans un modèle *in vivo* chez le rat. La chirurgie sur l'animal, le prélèvement des muscles et l'histologie ont été réalisés par un ingénieur au sein de l'unité INSERM U698, avec qui nous avons collaborés dans le cadre d'un projet ANR. En tant que doctorant dans ce projet, je suis intervenu à la fois dans le développement des techniques d'études et dans la réalisation des expérimentations. Concernant le développement technique, j'ai optimisé et validé le protocole d'extraction des GAG à partir de muscles EDL de rat, mis au point les tests ELISA et la mesure de l'activité mitogénique des cellules Baf32 par cytométrie en flux et développé l'électrophorèse sur gel d'agarose pour visualiser la taille des chaînes de GAG. La mise au point des techniques relatives à l'étude de l'expression des gènes a été réalisée en

collaboration avec des membres de l'unité U972. Le développement des méthodes HPLC à été réalisé par des membres du laboratoire CRRET et de la société OTR3. Concernant les expérimentations, j'ai procédé aux migrations sur gel d'agarose, aux différents tests ELISA, à l'étude de la prolifération cellulaire par cytométrie en flux et à l'étude de l'expression des gènes. Les expériences d'extraction des GAG, de dosage et de purification des HS et CS ont été réalisées en collaboration avec un ingénieur de l'équipe de recherche au laboratoire CRRET. Les expériences d'HPLC ont été réalisées par un ingénieur de l'équipe du laboratoire CRRET et un membre de la société OTR3.

Les résultats ont permis de rédiger une seconde publication présentée ci-après et portant sur la caractérisation structurale et fonctionnelle des HS et des CS au cours d'un processus d'ischémie-régénération dans le muscle EDL chez le rat. J'ai également réalisé des études sur la relation entre la structure des GAG et leur fonction, présentées en résultats complémentaires. De plus, une étude préliminaire de caractérisation structurale des GAG au cours d'un processus d'ischémie-régénération dans le muscle EDL chez la souris immunodéficiente est également présentée dans cette section.

II.2 Article 2 : en préparation pour *Circulation Research*

1. Title page

Ischemic muscle regeneration is associated to glycosaminoglycan structural modifications: new insight on glycosaminoglycan mimetic to accelerate tissue healing.

CHEVALIER Fabien, PhD ^{a,c}, ARNAUD Denis ^{b,§}, HENAULT Emilie ^{a,§}, GUILLEVIC Oriane ^c, SIÑERIZ Fernando, PhD ^d, UZAN Georges, PhD ^c, PAPY-GARCIA Dulce, PhD ^a, BARRITAUULT Denis, PhD ^d, LETOURNEUR Didier, PhD ^b, MEDDAHI-PELLÉ Anne, PhD ^b, HLAWATY Hanna, PhD ^b, ALBANESE Patricia, PhD ^{a,#}

^a EAC CNRS 7149, CRRET laboratory, Université Paris Est Créteil, Créteil, France

^b Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, INSERM U698, Bichat Hôpital, Paris, France

^c INSERM U972, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France

^d OTR3 company, 4 rue Française, 75001 Paris, France

[§] These authors contribute equally to this work

[#] Corresponding author at: Université Paris Est Créteil, Faculté des Sciences et Technologie, CRRET Laboratory, 61 avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil cedex, France. Phone: (+33)1.45.17.14.05, Fax: (+33)1.45.17.18.16, e-mail address: albanese@u-pec.fr (P. Albanese).

Short title: Glycosaminoglycan's changes in ischemic muscle

Subject codes:

Ischemic biology - basic studies

Growth factors/cytokines

Animal models of human disease

Remodeling

Angiogenesis

2. Abstract

Rationale: Critical limb ischemia often leads to amputation of the limb and potential mortality. Moreover there are still significant problems with current therapeutic treatments, according to poor revascularisation of degenerated tissue probably due to modifications within the microenvironment. **Objective:** This study is focused on the changes of structure and bioactivity of glycosaminoglycans (GAG), especially heparan sulfate (HS) and chondroitin sulfate (CS) in rat EDL muscle after ischemia. Moreover, we assess the efficacy of a synthetic GAG mimetic, [OTR₄₁₃₁], for the improvement of muscle regeneration. **Methods and Results:** Male Wistar rats were subjected to ischemic-injury by ligation of muscle-tendon. After 4, 8, 15, 21, 60 and 90 days, the rats were sacrificed and the muscles were collected and submitted to histological and biochemical and gene expression assays. Ischemia induces modifications of expression of GAG biosynthetic enzymes associated to significant changes in HS and CS structural features such as size and sulfation pattern. These changes are correlated with functional modifications of GAG to bind growth factors and to modulate cell activity. [OTR₄₁₃₁] treatment accelerated ischemic muscle repair through modulation of inflammatory cytokines levels and angiogenesis, without modification of endogenous GAG contents. **Conclusions:** Major GAG structural and functional remodeling is associated to muscle ischemia and regeneration process. Relevance of the role of these GAG hallmark is validated by the regenerative effect of [OTR₄₁₃₁] GAG mimetic. Such synthetic compound as matrix therapeutic product could be of interest as an alternative for conventional treatment in critical ischemia.

Keywords: glycosaminoglycan, ischemia, muscle, angiogenesis, matrix therapy

Non-standard Abbreviations and Acronyms:

CS: chondroitin sulfate; CLI: critical limb ischemia; ECM: extracellular matrix; GAG: glycosaminoglycans; HS: heparan sulfate; HBGF: heparin-binding growth factors; HA: hyaluronic acid; PAD: peripheral artery disease; PG: proteoglycans

3. Introduction

Peripheral artery disease (PAD) refers to dysfunction of the blood vessels located outside the heart and brain, resulting in blood flow decrease to the legs. Critical limb ischemia (CLI) is the most advanced form of PAD, often leading to amputation of the limb and potential mortality despite surgical therapies^{1, 2}. Recently, clinical trials using cell therapy have demonstrated promising results³. But there are still a significant problem with poor cell retention and survival⁴⁻⁶. This is probably due to high expression of inflammatory mediators and degradation of pro-survival or proliferating factors⁷⁻⁹. This underlines the relevance to better knowing the microenvironment on which therapeutic strategies are performed. Skeletal muscle has the capacity to repair in response to injury according to a complex homeostatic process that occurs in four interrelated and time-dependent phases: degeneration, inflammation, regeneration and tissue remodeling¹⁰. A better understanding of all of these regulated steps should allow optimizing therapeutic strategies. It is well known that multiple cell populations and numerous cytokines and growth factors, released from injured tissue, are involved in the progression of the regeneration process. However, few are known about extracellular matrix (ECM) components that play complex roles on cell behaviour to maintain tissue homeostasis. Among them, glycosaminoglycans (GAG) are long anionic polysaccharides composed by specific disaccharides building blocks. The structure of GAG is highly complex due to heterogeneity in glycosidic linkage, sulfation pattern and hydrophobic regions regulating their interactions with surrounding molecules. Four GAG subfamilies are distinguished through their repeating disaccharide units: heparan sulfate (HS), chondroitin sulfate (CS), keratan sulfate and hyaluronic acid (HA). Sulfated GAG are covalently linked to core protein to form proteoglycans (PG) whereas HA, which is the only one unsulfated GAG species, is free in the ECM. PG and HA interact with proteins to strengthening the structure and equilibrium of the ECM. However, it is now accepted that GAG have also functional roles, related to their particular structural characteristics, since they protect and trigger the activity of heparin-binding growth factors (HBGF) which include chemokines, cytokines and enzymes¹¹. Sulfated GAG thus provide matrix-bound or cell surface-bound reservoirs for HBGF, protecting them from proteolytic degradation, increasing their half-life and providing storage sites^{12, 13}. Moreover, by immobilizing HBGF on the ECM and cell surfaces, GAG restrain their diffusion and facilitate both the formation of local gradients and the synchronous coordination of motility and cell adhesion¹⁴⁻¹⁶. Whereas many studies focus on PG syndecan 3 and 4 roles during muscle regeneration¹⁷⁻¹⁹, few data are available on the effect of GAG remodeling. In that way, we have developed techniques that permit to extensively study structural and functional glycan features. We recently demonstrated that the fine structure of GAG and their capacities to regulate trophic factors activities are modified during physiological processes such as aging^{20, 21}. Hence, according to the role of GAG in tissue homeostasis, we investigate here how endogenous GAG, especially HS and CS species, would be structurally and functionally modified over the time after ischemia. Finally, the relevance of GAG involvement in muscle repair will be clearly demonstrated as we will be able to show that the use of a GAG mimetic efficiently permits to accelerate tissue healing.

4. Methods

4.1 Experimental model of critical hindlimb ischemia

Surgical procedure and therapeutic design

The surgical procedure was approved by the Bichat University Institutional Animal Care and use Committee (N°2011-14/698-0038). Male Wistar rats (Janvier, CERJ, Laval, France), weighing 280 to 300g and aged 8 weeks, were used for this study were anesthetized with 50 mg/kg sodium pentobarbital (CEVA Santé Animal, Libourne, France). Both sides of Extensor Digitorum Longus (EDL)-tendon were ligated (surgical suture 4-0, Ethicon, France) to perform the hindlimb ischemic-injury. Critical ischemia was achieved after scraping the microvasculature muscle with the neighboring tissue with a forceps and then the skin was sutured. To establish the complete-course of EDL-ischemic muscle (EDL_{isch}) regeneration, rats were euthanized by an overdose of sodium pentobarbital according to a time-spanning from day 0 to days 4, 8, 15, 21, 60 and 90 after ischemia. Muscle samples were treated for histological studies and GAG characterization as described below and compared to a normal (healthy or contralateral) EDL rat muscle (EDL_{normal}). Finally, to evaluate the therapeutic effect of [OTR₄₁₃₁] treatment (OTR3 company, Paris, France), either 100µL of 10 µg/mL [OTR₄₁₃₁] solution (EDL_{isch}+OTR) or saline solution (EDL_{isch}) were injected in ischemic muscle immediately after surgery and rats were euthanized after 4 or 8 days.

Histology and histochemistry

EDL muscles were embedded in Tissue-Tek OCT Compound (Tissue-Tek, Hatfield, PA), frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C. The muscles were sectioned transversally at 10 µm thick sections using a cryostat and stained with hematoxylin/eosin for topographical examination. Digital-slide were acquired and analyzed with a NanoZoomer® (Hamamatsu, Japan). Additional sections were stained with 1% lugol substrate (Merck, Germany) to study phosphorylase activity, indicating metabolic status of skeletal muscle fibers (brown stain: glycogenolysis ; yellow stain: no metabolic activity)²². To evaluate the effect of the [OTR₄₁₃₁] treatment on angiogenesis, the total number of capillary and the total surface of muscle cross-section were counted using the NDP software (Hamamatsu, Japan).

4.2 GAG extraction and quantification

Frozen EDL muscles were freeze-dried and suspended in extraction buffer for further GAG extraction as previously described²⁰, according to slight modifications. Briefly, samples were digested by proteinase K (Merck, France) and DNase (Qiagen, France) and then transferred to 4 mol/L NaCl final sample concentration and vigorously agitated for 30 min. Proteins were precipitated and supernatants were cleared by chloroform washing followed by dialysis (Spectrum, France) of the aqueous phase against extraction buffer and then pure water. After freeze drying, species of the extracted GAG were analyzed by specific digestion with chondroitinase ABC (Sigma-Aldrich, France) or by nitrous acid treatment and quantified according to the 1–9 dimethyl-methylene blue (DMMB) assay as previously described²³.

4.3 Structural characterization of GAG

Agarose gel electrophoresis

Five μg of GAG were loaded in a 2% agarose gel and run in TAE 1X buffer for 150 min at 50 mV. After migration, the plate was stained with 0.005% Stains-All solution (Sigma-Aldrich) overnight in the dark and destained with water.

Size Exclusion Chromatographic (SEC) Method

This HPLC-SEC technique allows GAG mass distribution determinations through absorbance detection of the complexes formed between copper ions and carboxylate GAG groupments²⁴. Briefly, extracted GAG samples (HS or CS, 5 μg in 90 μL H_2O) were eluted at 0.8 mL/min flow rate with a solution containing 1 mmol/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and 10 mmol/L NaCl at pH 5.0 through a Shodex OHPak SB-804-HQ column placed at 40°C. Chromatograms of copper-GAG complexes were recorded after UV detection and peaks of retention time were used to calculate shifts between GAG (HS or CS) extracted from EDL_{normal} or EDL_{isch}. GAG chain length modifications were estimated from these values, according to a standard curve.

HPLC: Disaccharides Analysis

Disaccharides of purified HS or CS were obtained by treatment with either heparinase I, II, and III (AMSBio, U.K.) cocktail (0.25 mU each, 24 h, 37 °C) or chondroitinase ABC (Sigma-Aldrich) (20 mU, 90 min, 37°C). Samples were analyzed by HPLC as previously described²⁵ with some modifications. Briefly, 50 μL of sample was loaded onto a Propac PA-1 (Dionex) strong-anion exchange column eluted by a NaCl-solvent gradient. Post-column in-line modification was realized by mixing 2-cyanoacetamide solution (2% v/v) and 250 mmol/L NaOH supplied both at 0.25 mL/min. The mixture passed through a reaction coil set in an oven at 120°C, followed by a cooling coil and then fluorimetric monitoring was registered ($\lambda=346$ nm excitation, $\lambda=410$ nm emission). Areas under curve were measured and the percentage of each disaccharide in sample was calculated relative to external standards.

4.4 GAG biosynthetic enzymes expression in ischemic muscle

Total RNA was extracted from frozen rat EDL_{normal} or EDL_{isch} muscle using the commercial RNeasy® Fibrous Tissue Midi Kit (Qiagen) according to the provided manufacturer's manuals. Extracted RNA was used to synthesize complementary DNA (cDNA) by a reverse transcriptase reaction with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, France). The quantitative PCR assays were performed in 96-well plate with TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies, France) disposable on request, in presence of 40 ng of cDNA per well, with Stratagene Mx3500P system (Agilent Technologies, France). The quantification levels for the gene expression were calculated using the $2^{-\Delta\text{CT}}$ method by normalizing to endogenous rat TATA-box binding protein (TBP), used as housekeeping gene.

4.5 GAG binding competition towards heparin-binding growth factors

Capacities of GAG extracted from EDL_{normal} and EDL_{isch} to bind to human FGF-2 and IL-8 were evaluated by an ELISA based competition assay as described by Najjam *et al.*²⁶. Briefly, ELISA plates (VWR, France) were coated with 0.5 µg/well of heparin-BSA complex. After washing (1X PBS – 0.05% Tween 20), wells were saturated with 3% BSA in 1X PBS. Then, HBGF (FGF-2: 0.5 ng/well; IL-8: 20 ng/well) and increasing concentration of extracted GAG (0; 0.1; 1; 10; 100; 1000 and 10000 ng/mL in 1X PBS) were simultaneously added into duplicate wells. After 1h of binding competition, the protein remaining bond to heparin was targeted by a corresponding specific antibody (anti-FGF-2 : R&D Systems, France ; anti-IL-8: Promokine, Germany) followed by a HRP-conjugated secondary antibody (Interchim, France). Resulting peroxidase activity was measured by the oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Thermo Scientific, France) substrate as described by manufacturer's protocol. The maximum binding value was determined in absence of extracted GAG and was used as a reference to determine the dose sufficient to displace 50% of binding of HBGF to immobilized heparin (IC₅₀). Finally, IC₅₀ values were normalized for each HBGF to the IC₅₀ of GAG extracted from EDL_{normal} (IC₅₀ reference=1).

4.6 Effect of GAG on BaF32 cells mitogenic activity

BaF32 cells were maintained in RPMI medium supplemented with 10% horse serum and 1 ng/mL IL-3, as previously described²⁷. For the assay, cells were seeded into 96 well plates at a density of 500,000 cells/well in RPMI-10% horse serum with 50 ng/mL FGF-2 and 1 µg/mL of the extracted GAG (final concentration). After 72h incubation at 37°C, propidium iodide-negative living cells were counted by flow cytometry (MACS Quant, Miltenyi Biotech, France). Results were normalized to the number of living cells in the PBS condition.

4.7 Cytokines and growth factors levels in ischemic tissue after [OTR₄₁₃₁] treatment

At day 4 post-surgery EDL_{normal}, EDL_{isch} or EDL_{isch+OTR} muscles were harvested, flashed with 1X PBS and incubated for 24h in 0.5 mL of RPMI serum free media. Supernatants were analyzed for vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin-10 (IL-10), IL-6, IL-1β, IL-1α, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES/CCL5), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1/CCL2), IL-12 (p70), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and tumor necrosis factor-α (TNF-α) using cytokine/chemokine analysis kits based on the Luminex MPA technology (MILLIPLEX MAP Kit, Rat Cytokine/Chemokines Magnetic Bead Panel, N°RECYTMAG-65K, Milipore, Germany) on the Bio-Plex 200 (Bio Rad, Germany). The samples were analyzed followed the manufacturer's recommendations.

5. Results

5.1 Clinical evolution of muscle architecture and function

The time course of lesion and repair processes in rat ischemic EDL was analysed on the cross-sections of the muscles up to 90 days of post-surgery (Fig 1A left and middle panels). There was evidence of severe diffuse cellular ischemia and muscular atrophy characterized by a loss of muscle architecture. The disappearance of the nuclei from the periphery of the myofibers at day 4 evidenced the injury process. The inflammatory cells infiltration appeared in the enlarged endomysium up to day 15 post-surgery. The spontaneous regeneration process was observed at day 8 when the nuclei began to migrate from the center to the periphery of myofibers (Fig 1, arrowheads). The muscle fibers maturation started at day 15 as numerous nuclei were observed at the peripheral location (Fig 1, arrows). Finally, at day 90 muscle fibers were well organized, with the myofilaments assembly that was tightened. From 3 weeks after surgery, all animals presented a significant decrease of muscle size from $10.9 \pm 1.2 \text{ mm}^2$ to $4.2 \pm 0.3 \text{ mm}^2$ at day 21 and to $1.9 \pm 0.5 \text{ mm}^2$ at day 90 (Fig 1B). Phosphorylase activity was revealed all along the time course to attest muscle functionality (Fig 1A, right panel). Only few mature cells were still functional and stained brown at day 4 post-surgery in periphery of muscles, indicating an important decrease of ATP-dependent activity in the central part of muscles. Thereafter, from day 8 to day 90 the ECM and myofibers remodeling started to appear from periphery to central part of muscle leading to increased phosphorylase activity. Finally, the regeneration of ischemic tissue was almost finished at day 60 as mature functional muscle cells presented nucleus localization in the periphery, high phosphorylase activity and seems to healthy muscle before surgery at day 0 (data not shown) as observed at day 90 (Fig 1).

5.2 HS and CS sulfation levels are specifically increased during ischemia

The basal amount of total sulfated GAG was $0.75 \mu\text{g}$ per mg of dried healthy muscle (Fig 2A). As compared to this basal level, no significant difference was detected in non-ischemic contralateral EDL over the time. After surgical ligation, the GAG sulfation content increased by 3 fold at day 4 and reached a plateau from day 8 to day 21 with a 4.5 fold increase ($3.4 \mu\text{g}/\text{mg}$). Thereafter the GAG sulfation level decreased and stabilized at $1.8 \mu\text{g}/\text{mg}$ at days 60 and 90, corresponding to a remaining 2.5 fold increase as compared to the initial level. The specific GAG depolymerisation by either CSase digestion or nitrous acid treatment allowed distinguishing sulfation levels among HS and CS species respectively (Fig 2B). Basal levels of CS or HS sulfation were 0.45 and $0.3 \mu\text{g}$ per mg of dried healthy EDL muscle respectively and any significant difference was detected in contralateral EDL as for total sulfated GAG. Both HS and CS increased from day 4. HS sulfation progressively extended to 4.3 fold increase ($1.3 \mu\text{g}/\text{mg}$) peak at day 15 and thereafter progressively returned to basal level at day 90. CS increased quicker and higher and reached a peak at day 8 with a 5.5 fold increase ($2.5 \mu\text{g}/\text{mg}$). From day 8, a CS sulfation level slowly decreased to $1.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ occurred at day 60 and remained stable until day 90, demonstrating that GAG hallmark of injury observed with total GAG quantification was only composed of CS species.

5.3 Sulfation pattern of HS and CS disaccharides units evolved over the time after ischemia

HPLC analysis allowed determining the relative composition in each disaccharide units of HS or CS species, namely the non sulfated (NoS), the monosulfated (MonoS), the disulfated (DiS) and the trisulfated (TriS). HS chains from EDL_{normal} were composed by 89% of NoS, 6.5% of MonoS, 3% of DiS and 1.5% of TriS disaccharide units (Fig 3A). In EDL_{isch} NoS units progressively decreased to 80% from day 0 to day 21 and finally returned to the basal level at day 60. Inversely MonoS units increased up to 15% at day 8, remained higher until day 21, and returned to basal level at day 60. DiS units increased up to 4.7% between day 14 and 21 whereas TriS units increased between day 8 and day 15. At day 60, all HS disaccharide units backed to the initial proportion of EDL_{normal}. In EDL_{normal}, CS chains were composed by 57% of NoS, 40% of MonoS and 3% of DiS units (Fig 3B). In EDL_{isch}, a peak of NoS disaccharides was observed at day 4, probably due to the amount of HA observed in figure 4A and which was depolymerised by CSase treatment²⁸. At day 8, NoS units greatly decreased to remain stable and 1.5 fold lower than control. Finally, from day 8 MonoS units are doubled, and DiS units level are not significantly modified. At day 60, a significant modification of CS sulfation pattern persisted, characterized by an inversion of NoS and MonoS units proportion.

5.4 HS and CS chains length quickly increase after ischemia

Migration of purified GAG was performed on agarose gel electrophoresis to evaluate qualitatively chain length modification (Fig 4A). EDL_{normal} from healthy (day 0) and contralateral muscles (days 4, 8, 15, 21) presented similar chains length, thus defining a basal length. Interestingly, chain length in EDL_{isch} from day 4 to day 21 increased as compared to this basal line. Moreover, a peak of high molecular weight HA, identified by the specific light blue staining with Stains-All dye, appeared at day 4 and disappeared immediately after. These data are confirmed by size exclusion chromatographic method, performed on both HS and CS purified species from extracted GAG after ischemia and compared to contralateral EDL, used as reference with 1 as relative value. As expected, HS and CS chains length from healthy EDL (day 0) were same as contralateral EDL, respectively 1.04 and 1.01 fold change (Fig 4B). At day 4 after ischemia, both HS and CS chain length were increased by 1.8. Then, HS chain length decreased and returned to basal level after 21 days. Contrariwise, CS chain length remained always 1.5 fold higher than control after 21 days, confirming that GAG hallmark of injury after ischemia concerned CS species.

5.5 GAG metabolic enzymes expression is modified following ischemia

HS are composed by repeating disaccharides units of glucuronic acid (GlcA) or iduronic acid (IdoA) and *N*-acetyl-glucosamine (GlcNAc). Quantitative RT-PCR analysis of the expression of enzymes involved in HS biosynthesis (Fig 5A) showed very significant increases of a majority of them as soon as day 4 with a rapid return to initial level. Both EXT-1 and EXT-2 enzymes involved in polymerization of HS were significantly up-regulated by 3.7 and 4.8 fold respectively. HS2ST enzyme catalyzing the 2-*O*-sulfation of GlcA/IdoA was up-regulated by 4 fold at day 4 and 2.6 fold at day 8. The expression of GLCE, an enzyme involved in epimerisation of GlcA to IdoA, was up-regulated by 3 fold at day 4. The expression of enzymes catalyzing the *N*-sulfation (NDST family) and 6-*O*-sulfation (HS6ST family) of GlcNAc were also clearly modified. NDST-1 and NDST-2

transcripts were highly up-regulated at day 4 (5 fold and 2 fold respectively) and NDST-3 was *de novo* expressed as it was not detected in healthy EDL, whereas NDST-4 transcripts were never detected. HS6ST-1 and -2 isoforms were highly up-regulated (20 fold and 8 fold respectively) whereas HS6ST-3 isoform was strongly down-regulated all along the kinetic. The expression of heparanase (HSPE), responsible of the depolymerization of HS, was up-regulated by 10 fold from day 4 to day 8.

CS are composed by repeating disaccharides units of GlcA or IdoA and *N*-acetyl-galactosamine (GalNAc). Analysis of enzymes involved in CS/DS biosynthesis (Fig 5B) showed that expression of both CS synthase CSS-1/ChSy and CSS-2/ChPF catalyzing the polymerization of CS were significantly up-regulated immediately after ischemia. Whereas CSS-1 expression increased by 6 fold at day 4 and returned to a basal level from day 8, higher CSS-2 expression was maintain until day 21. The expression of the UST enzyme, catalyzing the 2-*O*-sulfation of GlcA or IdoA, didn't change over the time. However the expression of dermatan sulfate epimerase (DSE), which converts GlcA to IdoA in CS/DS biosynthesis, was strikingly increased by 10 fold after ischemia up to day 8 and overexpression was maintain until day 15. Interestingly, there was a differential up-regulation of the three isoforms of C4ST enzymes catalyzing the 4-*O*-sulfation: C4ST-1 and C4ST-2 transcripts were highly up-regulated (by 10 fold and 20 fold respectively) at day 4 whereas C4ST-3 transcripts were up-regulated from day 15 to day 21. The expression of D4ST-1 enzyme, allowing the 4-*O*-sulfation of GalNAc adjacent to IdoA, was up-regulated from day 4 to day 15. Slightest modifications were observed for enzymes catalyzing the 6-*O*-sulfation of GalNAc as C6ST-1 and C6ST-2 expression were transiently up-regulated at day 4. The expression of the GalNAc4S-6ST enzyme, transferring a sulfate group on GalNAc-4S, didn't change. Finally, the expression of the CS hydrolase CSHY/Hyal-4 enzyme, involved in the degradation of CS, was not detected in all samples.

Concerning enzymes involved in the biosynthesis of HA (Fig 5C), two isoforms of HA synthase, HAS-1 and HAS-2 involved in high molecular weight HA synthesis²⁹, were strongly up-regulated by 50 fold and 30 fold respectively at day 4, whereas no modification of the HAS-3 isoform, implicated in the synthesis of low molecular weight HA²⁹, was observed. The HA-degrading enzyme Hyal-2 was also up-regulated in the same time and suggests a rapid degradation of HA to oligosaccharides.

All of these data clearly indicates that muscle ischemia rapidly induces a major modification of GAG structure through the regulation of enzymes involved in their biosynthesis and degradation. Finally, gene expression involved in muscle injury and regeneration was also analyzed (Fig 5D). Over-expression by 200 fold of IL-6, related to pro-inflammatory process, occurred few days after ischemia and persisted up to day 8. The IL-10 transcripts related to anti-inflammatory process, was not detected in EDL_{normal}, and *de novo* expressed in EDL_{isch} all along the kinetic. Muscle damage was confirmed by cell death related to the elevated expression of fas associated via death domain (FADD) transcripts and the lost expression of myosin heavy chain 2 (Myh-2) marker of mature muscle at day 4, whereas induced muscle regeneration all along the kinetic was associated to the up-regulation of myogenin transcripts.

5.6 GAG from injured EDL display differential binding affinities toward growth factors

The capacity of GAG to regulate protein functions is largely related to their abilities to bind to HBGF. An ELISA-based competitive binding assay was used to investigate if structural modifications of GAG after ischemia are associated to distinct abilities to bind HBGF. GAG from EDL_{normal} were able to bind to FGF-2 and IL-8 and to inhibit their binding to heparin with EC₅₀ values of 2.7 and 15 µg/mL respectively (data not shown). These were taken as relative values (1) to compare binding capacities of extracted GAG. As shown in figure 6A, GAG from EDL_{isch} have significant higher capacities, around 2.5 fold, to bind to FGF-2 all along the kinetic. In contrast, IL-8 binding capacity significantly increased by 4 fold only after 15 days following ischemia. Thus, the capacities of GAG to bind HBGF were significantly modified in EDL_{isch} depending on each individual growth factor.

5.7 GAG from injured EDL potentiate FGF-2 mitogenic activity

To investigate if GAG extracted after ischemia could have modified abilities to potentiate HBGF activities we used a mitogenic activity assay on BaF32 cells, a cell line devoid of cell surface HS and transfected with the FGF receptor type 1. These cells respond to FGF-2 only in the presence of exogenous GAG or heparin²⁷. Effectively, heparin potentiated FGF-2-induced proliferation on BaF32 cells by 1.8 fold as compared to PBS (Fig 6B). The same dose of extracted GAG from EDL_{normal} potentiated it only by 1.3 fold. Interestingly, potentiating effect of extracted GAG from EDL_{isch} all along the time course of ischemia was increased. GAG extracted from EDL_{isch} at day 8 to day 21 significantly potentiated the proliferation by 1.5 fold.

5.8 [OTR₄₁₃₁] GAG mimetic treatment improves muscle regeneration

Therapeutic effect of [OTR₄₁₃₁] GAG mimetic treatment was investigated by its intra-muscular injection just after surgical procedure. As observed by histology staining at day 8 post-surgery, ischemic injury was less developed and a regeneration process of myofibers in the periphery part of muscles was observed in EDL_{isch+OTR} group as compared to untreated animals (Fig 7A). In addition, the nucleus localization in the periphery of the myofibers and the increased phosphorylase activity in the EDL_{isch+OTR} group evidenced the presence of mature and functional muscle fibers not observed in EDL_{isch} group. A significant decrease of muscle area was observed in EDL_{isch+OTR} group (4.9±2.2mm²) as compared to EDL_{isch} group (8.1±1.3mm²) suggesting that [OTR₄₁₃₁] treatment could prevent inflammatory cells infiltration (Fig 7B). Interestingly, the architecture and composition of myofibers in the EDL_{isch+OTR} muscle were similar to those of EDL_{isch} muscle at day 15 (Fig 1A), indicating that [OTR₄₁₃₁]-treatment accelerates ischemic tissue regeneration up to 1 week. As muscle regeneration after ischemia is related to neoangiogenesis, we evaluate the effect of the [OTR₄₁₃₁] compound on vessels number in treated-muscles (Fig 7B). The total number of vessels (N) for each muscle, and the total number of vessels on the area of the entire muscle cross-section (vessels density: N/mm²) were counted (Fig 7B). There were significantly more vessels in the EDL_{isch+OTR} group (N=10±1.8) compared to EDL_{isch} group (N=6±1.8). In addition, the vessels density was significantly increased in EDL_{isch+OTR} group (2.1±0.9/mm²) as compared to EDL_{isch} (0.74±0.3/mm²), suggesting that [OTR₄₁₃₁] GAG mimetic potentiates angiogenesis in damaged tissues. Otherwise, injection of [OTR₄₁₃₁] did not modify neither the total sulfated GAG quantity nor HS and CS distribution (Fig 7C). Further investigations showed any modification in endogenous GAG fine structure (size and disaccharides composition) or endogenous GAG affinity toward HBGF (data not shown).

5.9 [OTR₄₁₃₁] treatment modulates inflammatory cytokines level

The concentrations of VEGF, IL-10, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2, IL-12(p70), GM-CSF and TNF- α were measured and compared in the supernatant of rat EDL_{normal}, EDL_{isch} and EDL_{isch+OTR} at day 4 of experiment (Fig 8). The highest concentrations were measured for VEGF, IL-6 and MCP-1/CCL2 and the lowest for IL-1 α and RANTES/CCL5 whereas IL-10 and IL-1 β had intermediated concentrations. IL-12, GM-CSF and TNF- α were not detected. Ischemia was associated to a significant increase of VEGF, IL-10, IL-1 α and IL-1 β levels whereas IL-6, RANTES/CCL5 and MCP-1/CCL2 levels were not induced. The [OTR₄₁₃₁]-treatment increased IL-10 and VEGF levels by 100% and 32% respectively and decreased IL-1 α and IL-1 β levels by over 60% in EDL_{isch+OTR} as compared to EDL_{isch}. IL-6 and RANTES/CCL5 levels were reduced to the basal level before ischemia whereas no modification of the MCP-1/CCL2 level was observed after treatment.

6. Discussion

The presence of ECM compounds is essential for normal myogenesis *in vitro*^{30, 31}, offering to cell not only an optimal mechanical environment to survive but also the necessary signals to grow, differentiate, move, and respond to stress. A recent proteomic study reveals a biosignature of early- and late-stage ECM remodeling after myocardial ischemia-reperfusion injury³². Thus, the quality of the ECM can influence the function of chemical signals and effectors in tissue repair³³. Herein we present a glycomic study and described for the first time GAG remodeling after ischemia in the rat EDL.

6.1 HS and CS species structurally evolve in distinct ways after ischemia

We demonstrate that sulfation level of GAG strongly increases immediately after ischemia and progressively decreases up to 60 days, as previously described after induced-ischemia in the heart³⁴. These changes in sulfation level of both HS and CS are explained in part by the enriched proportion of sulfated disaccharides all along the GAG chains and an increase of chain length. However, these data do not exclude the possibility of an increased number of GAG chains. Moreover, all of these results are consistent with an up-regulation of the expression of the enzymes involved in HS and CS modifications, correlated with the different waves of HS and CS amount. Interestingly, while the enzymes involved in HS chains modification are up-regulated soon at day 4 after ischemia, then return quickly to basal level, expression levels of heparanase are modulated in the same way. This suggests that HS changes during ischemia-repair process involved *de novo* synthesis and sulfation as well as degradation step. Contrariwise, the enzymes involved in CS modification are mainly up-regulated at day 4 too but remain elevated for some isoforms up to day 21, whereas absence of active CS degradation was suggested according to undetected chondroitin sulfate hydrolase expression. Such pattern could explain the presence of a “CS scare” observed from 60 days following ischemia as a glycomic hallmark of injury, which role remains to be explored.

6.2 Fine structure of GAG is a crucial determinant to modulate muscle repair

Our results indicate an increased sulfation of HS species that could be associated to the modulation of growth factor activities driving inflammatory response as well as angiogenesis during muscle repair after ischemia. This modified pattern is characterized by a strong up-regulation of sulfotransferases, relevant with the role of HS sulfation in myogenesis and muscle regeneration. HS 6-*O*-sulfation through HS6ST enzymes is essential for muscle development³⁵ and is required for the binding toward growth factors such as FGF-2, HGF and VEGF which are implicated in muscle regeneration³⁶. Moreover, HS 6-*O*-sulfation is essential for FGF-2 signaling inducing satellite cell proliferation and inhibiting myoblast fusion during the early phase of muscle regeneration^{37, 38}. HS play also role during inflammatory step of muscle repair since HS sulfation through NDST enzymes increases the chemotactic gradient of RANTES/CCL5 and IL-8, both involved in the recruitment of leukocytes^{39, 40}. Concerning angiogenesis, overexpression of NDST enzymes induced by hypoxia results in high sensibility of endothelial cells to FGF-2 associated to increased proliferation⁴¹. More surprisingly, we demonstrate for the first time that sulfated GAG modification during muscle regeneration is mainly related to neosynthesis of CS chains composed by more monosulfated disaccharides and higher chain length and is stabilized as a glycomic hallmark

of ischemia-induced injury. If the role of HS has been extensively studied in many biological processes including muscle repair, few is known about the role of CS. Even if PG carrying CS chains have been demonstrated as regulator of TGF- β signaling⁴², their roles remain elusive. Some *in vitro* studies have pointed out the role of CS/DS chains in the control of muscle regeneration: DS chains potentiate the FGF-2- or HGF-induced proliferation and migration of myoblasts⁴³, whereas CS chains of myoblasts are dramatically diminished at the stage of extensive syncytial myotube formation⁴⁴. Our results are consistent with the recent demonstration that *in vivo* injection of a CS-degrading enzyme boosts myofiber regeneration and ameliorates dystrophic pathology in *mdx* muscles⁴⁴. Besides modification of sulfated GAG, we demonstrated that HA biosynthesis is modulated *in vivo* during ischemic process development in rat EDL. As it was already demonstrated that oligosaccharides of HA promote both the production of pro-inflammatory cytokines and angiogenesis⁴⁵, we suggest that such transient increase of HA could be involved in the initiation of inflammatory and angiogenic processes, essential for muscle repair. Finally, all of these data suggest that the control of GAG composition in ECM could be a promising new therapeutic approach for the treatment of skeletal muscle injury.

6.3 GAG affinities toward HBGF change to modulate cell function following ischemia

In this study, we demonstrate that ischemia and repair process are associated to an enrichment of GAG chains with sulfate groups and iduronic acids, which are structural features implicated in more flexible chains with increased binding potentials for ligands^{11, 46}. The relevance of such structural modifications after ischemia was validated since we demonstrated that the sulfated GAG affinities evolve differently over the time toward FGF-2 and IL-8, both HBGF released from the damaged myofibers^{47, 48}. FGF-2 has been implicated in satellite cell migration and proliferation⁴⁹ and inhibition of myofiber differentiation⁵⁰. IL-8 mediates neutrophil recruitment, accumulation, and their function at sites of inflammation⁵¹. Furthermore, both FGF-2 and IL-8 are regulators of angiogenesis^{52, 53}. Moreover, GAG displaying elevated binding affinities toward FGF-2 potentiate FGF-2-induced proliferation *in vitro*. All of these data suggest that a defined control of GAG structure takes place after ischemia in order to modulate specific regeneration steps through modulation of HBGF activity.

6.4 [OTR₄₁₃₁] accelerates neovascularization and ischemic tissue regeneration through modulation of cytokines levels

Rat EDL ischemia was associated to a rapid inflammatory cells infiltration and myofibers degradation 4 days after ischemia with a spontaneous regeneration after 15 days. Since we demonstrated here that ischemia is associated to a strong GAG remodeling with modifications of HBGF activities, we validated that [OTR₄₁₃₁] GAG mimetic treatment could restore ECM stability, leads to less inflammatory cells infiltration and accelerates myofibers reconstruction and vessels formation earlier from day 8 of post-surgery. Accordingly, we previously reported that the treatment with another GAG mimetic improves pig myocardium function recovery after ischemia⁵⁴ and both protects muscle fibers from degeneration and preserves the differentiated state of the surviving fibers in ischemic and denervated rat EDL⁵⁵. Moreover, we previously demonstrated that the vegetal origin fucoidan induces revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia⁵⁶. A hypothesis about the mode of action of the [OTR₄₁₃₁] compound is to interact with IL-10, which is quickly up-regulated after ischemia

in rat EDL, and thereby potentiating its activity which leads to an early conversion of pro-inflammatory macrophages to anti-inflammatory macrophages⁵⁷. This could explain that [OTR₄₁₃₁] treatment decreases the levels of IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and RANTES/CCL5 pro-inflammatory cytokines and increases the levels of VEGF and IL-10 itself. Moreover, as already described for others synthetic GAG, the [OTR₄₁₃₁]-binding to VEGF may protect it from inhibition and proteolytic cleavage thus increasing its bioavailability and potentiating its affinity for specific receptor, leading to better angiogenesis⁵⁸⁻⁶⁰. Finally, we recently demonstrated that [OTR₄₁₃₁] injection mobilizes immature population of hematopoietic stem cells according to a process that involves SDF-1/CXCL12 interactions⁶¹. Since endothelial progenitor cells (EPC) are mobilized from the bone marrow niche to neo-angiogenesis site by the dual VEGF-SDF-1/CXCL12 gradient^{62, 63}, the [OTR₄₁₃₁] treatment could have increased angiogenesis through potentiating the homing of EPC at site of injury. Thus, [OTR₄₁₃₁] should permit to optimize cell transplantation protocols by promoting cells engraftment *in situ*. All of these data highlight the therapeutic potential of sulfated polysaccharides for use in angiogenesis and tissue repair.

6.5 Conclusion

We demonstrate that an intense GAG remodeling, especially HS and CS, occurs following muscle ischemia and suggests specific roles of each GAG species on muscle regeneration. Fine modifications of the structure of GAG along the time of regeneration after ischemia, such as hyper-sulfation, chains size and enriched proportions in iduronic acid were characterized and involved in modulation of growth factors activities. In this context, we validated the great interest to use GAG mimetic such as [OTR₄₁₃₁] to restore a proper microenvironment that potentiates neovascularization and accelerates ischemic muscle regeneration, and open a new way of investigation on the role of [OTR₄₁₃₁] in modulation of inflammatory response.

7. Acknowledgments

None

8. Sources of Funding

This work was supported by Region Ile-de-France doctoral fellowship for F. Chevalier. We also acknowledge the financial support from the French National Research Agency (ANR-010-TecSan-2010).

9. Disclosures

None

10. References

1. Sobieszczyk P, Eisenhauer A. Management of patients after endovascular interventions for peripheral artery disease. *Circulation*. 2013;128(7):749-757.
2. Berger JS, Hiatt WR. Medical therapy in peripheral artery disease. *Circulation*. 2012;126(4):491-500.
3. Raval Z, Losordo DW. Cell therapy of peripheral arterial disease: from experimental findings to clinical trials. *Circulation research*. 2013;112(9):1288-1302.
4. Terrovitis J, Lautamaki R, Bonios M, Fox J, Engles JM, Yu J, Leppo MK, Pomper MG, Wahl RL, Seidel J, Tsui BM, Bengel FM, Abraham MR, Marban E. Noninvasive quantification and optimization of acute cell retention by in vivo positron emission tomography after intramyocardial cardiac-derived stem cell delivery. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(17):1619-1626.
5. Zeng L, Hu Q, Wang X, Mansoor A, Lee J, Feygin J, Zhang G, Suntharalingam P, Boozer S, Mhashilkar A, Panetta CJ, Swingen C, Deans R, From AH, Bache RJ, Verfaillie CM, Zhang J. Bioenergetic and functional consequences of bone marrow-derived multipotent progenitor cell transplantation in hearts with postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation*. 2007;115(14):1866-1875.
6. Goussetis E, Manginas A, Koutelou M, Peristeri I, Theodosaki M, Kollaros N, Leontiadis E, Theodorakos A, Paterakis G, Karatasakis G, Cokkinos DV, Graphakos S. Intracoronary infusion of CD133+ and CD133-CD34+ selected autologous bone marrow progenitor cells in patients with chronic ischemic cardiomyopathy: cell isolation, adherence to the infarcted area, and body distribution. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2006;24(10):2279-2283.
7. Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, Brand NJ, Barton PJ, Varela-Carver A, Fukushima S, Coppen SR, Partridge TA, Yacoub MH. Role of interleukin-1beta in acute inflammation and graft death after cell transplantation to the heart. *Circulation*. 2004;110(11 Suppl 1):II219-224.
8. Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmítko PE, Zucco L, Wang CH, Badiwala MV, Mickle DA, Weisel RD, Fedak PW, Stewart DJ, Kutryk MJ. 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(17):2058-2067.
9. Desouza CV, Hamel FG, Bidasee K, O'Connell K. Role of inflammation and insulin resistance in endothelial progenitor cell dysfunction. *Diabetes*. 2011;60(4):1286-1294.
10. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. *The American journal of sports medicine*. 1994;22(5):702-710.
11. Gandhi NS, Mancera RL. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chemical biology & drug design*. 2008;72(6):455-482.
12. Handel TM, Johnson Z, Crown SE, Lau EK, Proudfoot AE. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annual review of biochemistry*. 2005;74:385-410.
13. Friedl A, Chang Z, Tierney A, Rapraeger AC. Differential binding of fibroblast growth factor-2 and -7 to basement membrane heparan sulfate: comparison of normal and abnormal human tissues. *The American journal of pathology*. 1997;150(4):1443-1455.
14. Schumann K, Lammermann T, Bruckner M, Legler DF, Polleux J, Spatz JP, Schuler G, Forster R, Lutz MB, Sorokin L, Sixt M. Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. *Immunity*. 2010;32(5):703-713.
15. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science (New York, N.Y.)*. 1998;279(5349):381-384.
16. Lortat-Jacob H. The molecular basis and functional implications of chemokine interactions with heparan sulphate. *Current opinion in structural biology*. 2009;19(5):543-548.

17. Casar JC, Cabello-Verrugio C, Olguin H, Aldunate R, Inestrosa NC, Brandan E. Heparan sulfate proteoglycans are increased during skeletal muscle regeneration: requirement of syndecan-3 for successful fiber formation. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 1):73-84.
18. Cornelison DD, Filla MS, Stanley HM, Rapraeger AC, Olwin BB. Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Developmental biology*. 2001;239(1):79-94.
19. Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, Morimoto J, Sato M, Tanaka S, Kojima T, Tsutsui H, Uede T. Syndecan-4 prevents cardiac rupture and dysfunction after myocardial infarction. *Circulation research*. 2011;108(11):1328-1339.
20. Huynh MB, Morin C, Carpentier G, Garcia-Filipe S, Talhas-Perret S, Barbier-Chassefiere V, van Kuppevelt TH, Martelly I, Albanese P, Papy-Garcia D. Age-related changes in rat myocardium involve altered capacities of glycosaminoglycans to potentiate growth factor functions and heparan sulfate-altered sulfation. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(14):11363-11373.
21. Huynh MB, Villares J, Diaz JE, Christiaans S, Carpentier G, Ouidja MO, Sissoeff L, Raisman-Vozari R, Papy-Garcia D. Glycosaminoglycans from aged human hippocampus have altered capacities to regulate trophic factors activities but not Abeta42 peptide toxicity. *Neurobiology of aging*. 2012;33(5):1005 e1011-1022.
22. Carlson BM, Gutmann E. Regeneration in free grafts of normal and denervated muscles in the rat: morphology and histochemistry. *Anat Rec*. 1975;183(1):47-62.
23. Barbosa I, Garcia S, Barbier-Chassefiere V, Caruelle JP, Martelly I, Papy-Garcia D. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology*. 2003;13(9):647-653.
24. Toida T, Shima M, Azumaya S, Maruyama T, Toyoda H, Imanari T, Linhardt RJ. Detection of glycosaminoglycans as a copper(II) complex in high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1997;787(1-2):266-270.
25. Toyoda H, Yamamoto H, Ogino N, Toida T, Imanari T. Rapid and sensitive analysis of disaccharide composition in heparin and heparan sulfate by reversed-phase ion-pair chromatography on a 2 μ m porous silica gel column *Journal of Chromatography A*. 1999;830(1):197-201.
26. Najjam S, Gibbs RV, Gordon MY, Rider CC. The binding of interleukin 2 to heparin revealed by a novel ELISA method. *Biochemical Society transactions*. 1997;25(1):3S.
27. Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, Leder P. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Molecular and cellular biology*. 1992;12(1):240-247.
28. Yamagata T, Saito H, Habuchi O, Suzuki S. Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *The Journal of biological chemistry*. 1968;243(7):1523-1535.
29. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(35):25085-25092.
30. Melo F, Carey DJ, Brandan E. Extracellular matrix is required for skeletal muscle differentiation but not myogenin expression. *J Cell Biochem*. 1996;62(2):227-239.
31. Osses N, Brandan E. ECM is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression. *American journal of physiology*. 2002;282(2):C383-394.
32. Barallobre-Barreiro J, Didangelos A, Schoendube FA, Drozdov I, Yin X, Fernandez-Caggiano M, Willeit P, Puntmann VO, Aldama-Lopez G, Shah AM, Domenech N, Mayr M. Proteomics analysis of cardiac extracellular matrix remodeling in a porcine model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2012;125(6):789-802.
33. Marastoni S, Ligresti G, Lorenzon E, Colombatti A, Mongiat M. Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connect Tissue Res*. 2008;49(3):203-206.

34. Drobnik J, Szczepanowska A, Dabrowski R. Temporary augmentation of glycosaminoglycans content in the heart after left coronary artery ligation. *Pathophysiology*. 2004;11(1):35-39.
35. Bink RJ, Habuchi H, Lele Z, Dolk E, Joore J, Rauch GJ, Geisler R, Wilson SW, den Hertog J, Kimata K, Zivkovic D. Heparan sulfate 6-o-sulfotransferase is essential for muscle development in zebrafish. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(33):31118-31127.
36. Narita K, Staub J, Chien J, Meyer K, Bauer M, Friedl A, Ramakrishnan S, Shridhar V. HSulf-1 inhibits angiogenesis and tumorigenesis in vivo. *Cancer Res*. 2006;66(12):6025-6032.
37. Langsdorf A, Do AT, Kusche-Gullberg M, Emerson CP, Jr., Ai X. Sulfs are regulators of growth factor signaling for satellite cell differentiation and muscle regeneration. *Developmental biology*. 2007;311(2):464-477.
38. Tran TH, Shi X, Zaia J, Ai X. Heparan sulfate 6-O-endosulfatases (Sulfs) coordinate the Wnt signaling pathways to regulate myoblast fusion during skeletal muscle regeneration. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(39):32651-32664.
39. Carter NM, Ali S, Kirby JA. Endothelial inflammation: the role of differential expression of N-deacetylase/N-sulphotransferase enzymes in alteration of the immunological properties of heparan sulphate. *Journal of cell science*. 2003;116(Pt 17):3591-3600.
40. Wang L, Fuster M, Sriramarao P, Esko JD. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat Immunol*. 2005;6(9):902-910.
41. Li J, Shworak NW, Simons M. Increased responsiveness of hypoxic endothelial cells to FGF2 is mediated by HIF-1alpha-dependent regulation of enzymes involved in synthesis of heparan sulfate FGF2-binding sites. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 9):1951-1959.
42. Droguett R, Cabello-Verrugio C, Riquelme C, Brandan E. Extracellular proteoglycans modify TGF-beta bio-availability attenuating its signaling during skeletal muscle differentiation. *Matrix Biol*. 2006;25(6):332-341.
43. Villena J, Brandan E. Dermatan sulfate exerts an enhanced growth factor response on skeletal muscle satellite cell proliferation and migration. *J Cell Physiol*. 2004;198(2):169-178.
44. Mikami T, Koyama S, Yabuta Y, Kitagawa H. Chondroitin sulfate is a crucial determinant for skeletal muscle development/regeneration and improvement of muscular dystrophies. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(46):38531-38542.
45. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol*. 2006;85(8):699-715.
46. Thelin MA, Bartolini B, Axelsson J, Gustafsson R, Tykesson E, Pera E, Oldberg A, Maccarana M, Malmstrom A. Biological functions of iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate. *FEBS J*. 2013;280(10):2431-2446.
47. Clarke MS, Khakee R, McNeil PL. Loss of cytoplasmic basic fibroblast growth factor from physiologically wounded myofibers of normal and dystrophic muscle. *Journal of cell science*. 1993;106 (Pt 1):121-133.
48. Akerstrom T, Steensberg A, Keller P, Keller C, Penkowa M, Pedersen BK. Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal muscle. *The Journal of physiology*. 2005;563(Pt 2):507-516.
49. Yablonka-Reuveni Z, Seger R, Rivera AJ. Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cells in young and old rats. *J Histochem Cytochem*. 1999;47(1):23-42.
50. Allen RE, Boxhorn LK. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol*. 1989;138(2):311-315.
51. Knall C, Worthen GS, Johnson GL. Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(7):3052-3057.
52. Chen CH, Poucher SM, Lu J, Henry PD. Fibroblast growth factor 2: from laboratory evidence to clinical application. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004;2(1):33-43.

53. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)*. 1992;258(5089):1798-1801.
54. Yamauchi H, Desgranges P, Lecerf L, Papy-Garcia D, Tournaire MC, Moczar M, Loisan D, Barritault D. New agents for the treatment of infarcted myocardium. *Faseb J.* 2000;14(14):2133-2134.
55. Desgranges P, Barbaud C, Caruelle JP, Barritault D, Gautron J. A substituted dextran enhances muscle fiber survival and regeneration in ischemic and denervated rat EDL muscle. *Faseb J.* 1999;13(6):761-766.
56. Luyt CE, Meddahi-Pelle A, Ho-Tin-Noe B, Collic-Jouault S, Guezennec J, Louedec L, Prats H, Jacob MP, Osborne-Pellegrin M, Letourneur D, Michel JB. Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2003;305(1):24-30.
57. Frangiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol.* 2000;165(5):2798-2808.
58. Rouet V, Hamma-Kourbali Y, Petit E, Panagopoulou P, Katsoris P, Barritault D, Caruelle JP, Courty J. A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(38):32792-32800.
59. Rouet V, Meddahi-Pelle A, Miao HQ, Vlodaysky I, Caruelle JP, Barritault D. Heparin-like synthetic polymers, named RGTAs, mimic biological effects of heparin in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2006;78(4):792-797.
60. Meddahi A, Lemdjabar H, Caruelle JP, Barritault D, Hornebeck W. Inhibition by dextran derivatives of FGF-2 plasmin-mediated degradation. *Biochimie.* 1995;77(9):703-706.
61. Albanese P, Caruelle D, Frescaline G, Delbe J, Petit-Cocault L, Huet E, Charnaux N, Uzan G, Papy-Garcia D, Courty J. Glycosaminoglycan mimetics-induced mobilization of hematopoietic progenitors and stem cells into mouse peripheral blood: structure/function insights. *Experimental hematology.* 2009;37(9):1072-1083.
62. Rabbany SY, Heissig B, Hattori K, Rafii S. Molecular pathways regulating mobilization of marrow-derived stem cells for tissue revascularization. *Trends Mol Med.* 2003;9(3):109-117.
63. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation.* 2003;107(9):1322-1328.

11. Figures with Figure Legends

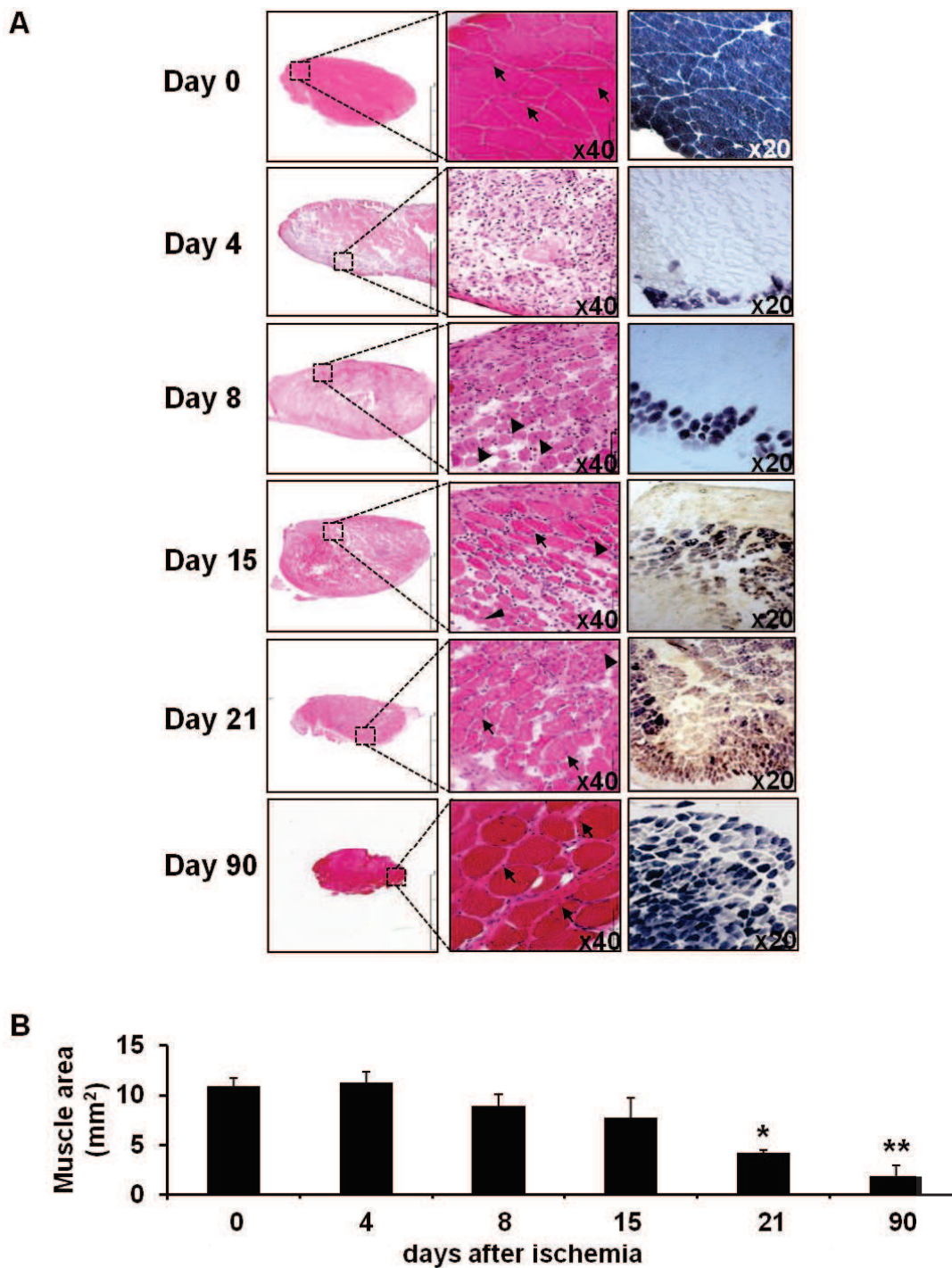


Figure 1: Morphological studies of ischemic muscle up to 90 days of post-surgery

(A) The time course of lesion and regeneration processes in EDL ischemia was analysed in the muscles cross-sections assessed for phosphorylase activity (right panel, magnification : x20) and stained with hematoxylin-eosin (middle panel, scale bar=3mm and left panel, magnification : x40). Arrows indicate the nuclear localization in the periphery of the mature cells. Arrowheads indicate the nuclear localization in the central part of the immature cells. (B) The total surface of muscle cross-section was quantified using the NDP software (n=18, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

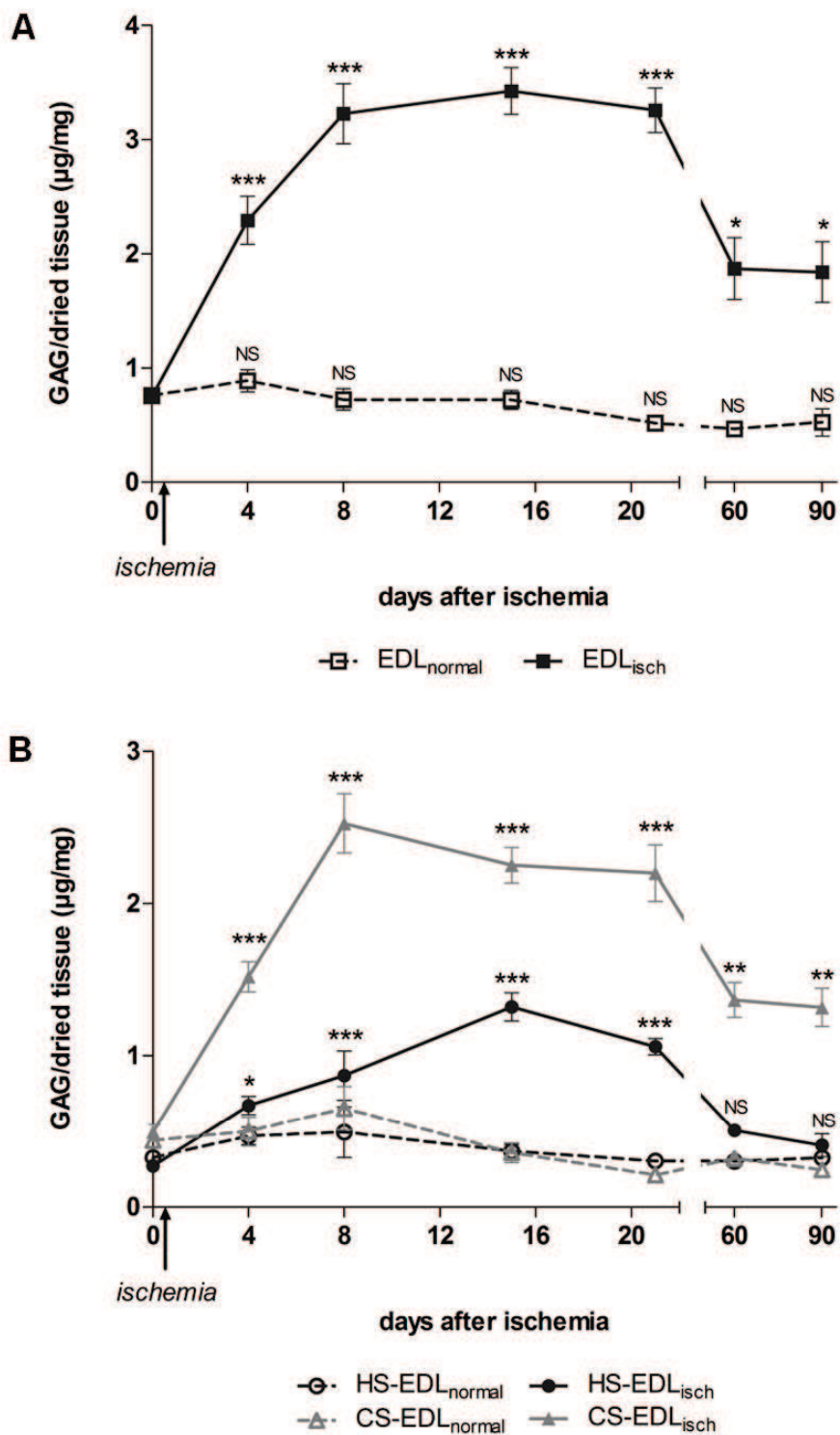


Figure 2: Evolving GAG sulfation levels during rat muscle ischemia and subsequent regeneration

Sulfation levels of total GAG (panel A) and purified CS and HS species (panel B) extracted from EDL_{normal} (day 0) or EDL_{isch} (4; 8; 15; 21; 60 and 90 days) were determined by DMMB assay. Values were normalized on weight of each dried muscle. Sulfation level control corresponds to GAG extracted from EDL_{normal} (dotted lines). Values are the mean and SEM calculated from 12 individual EDL samples in 4 independent experiments for each time point (n=12, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

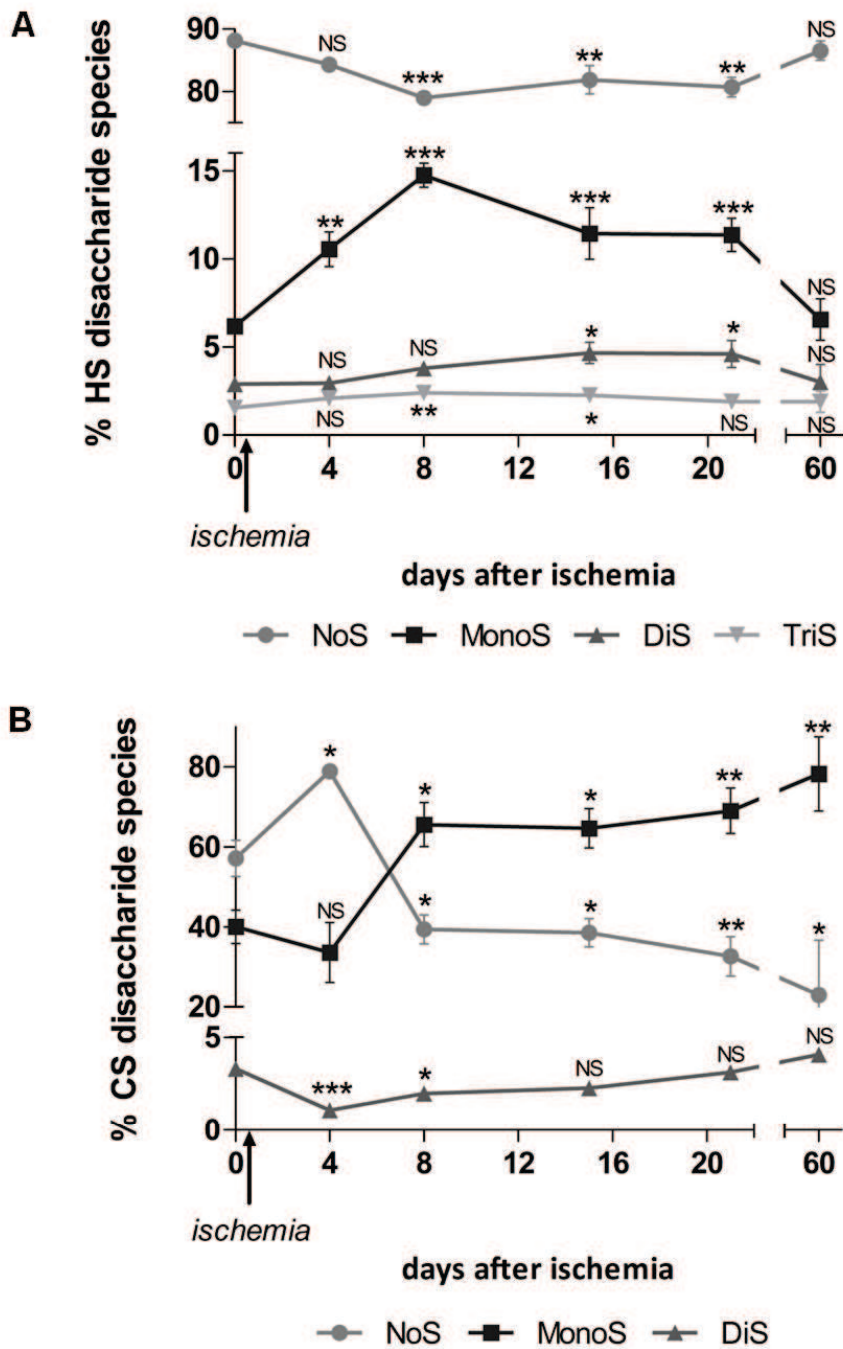


Figure 3: Disaccharides composition of HS and CS over the time following ischemia

Disaccharides species constituting HS (panel A) and CS (panel B) extracted from EDL_{normal} (day 0) or EDL_{isch} (4; 8; 15; 21; and 60 days) were determined by HPLC analysis. Values are the mean and SEM calculated from 6 individual EDL samples in 2 independent experiments for each time point (n=12, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

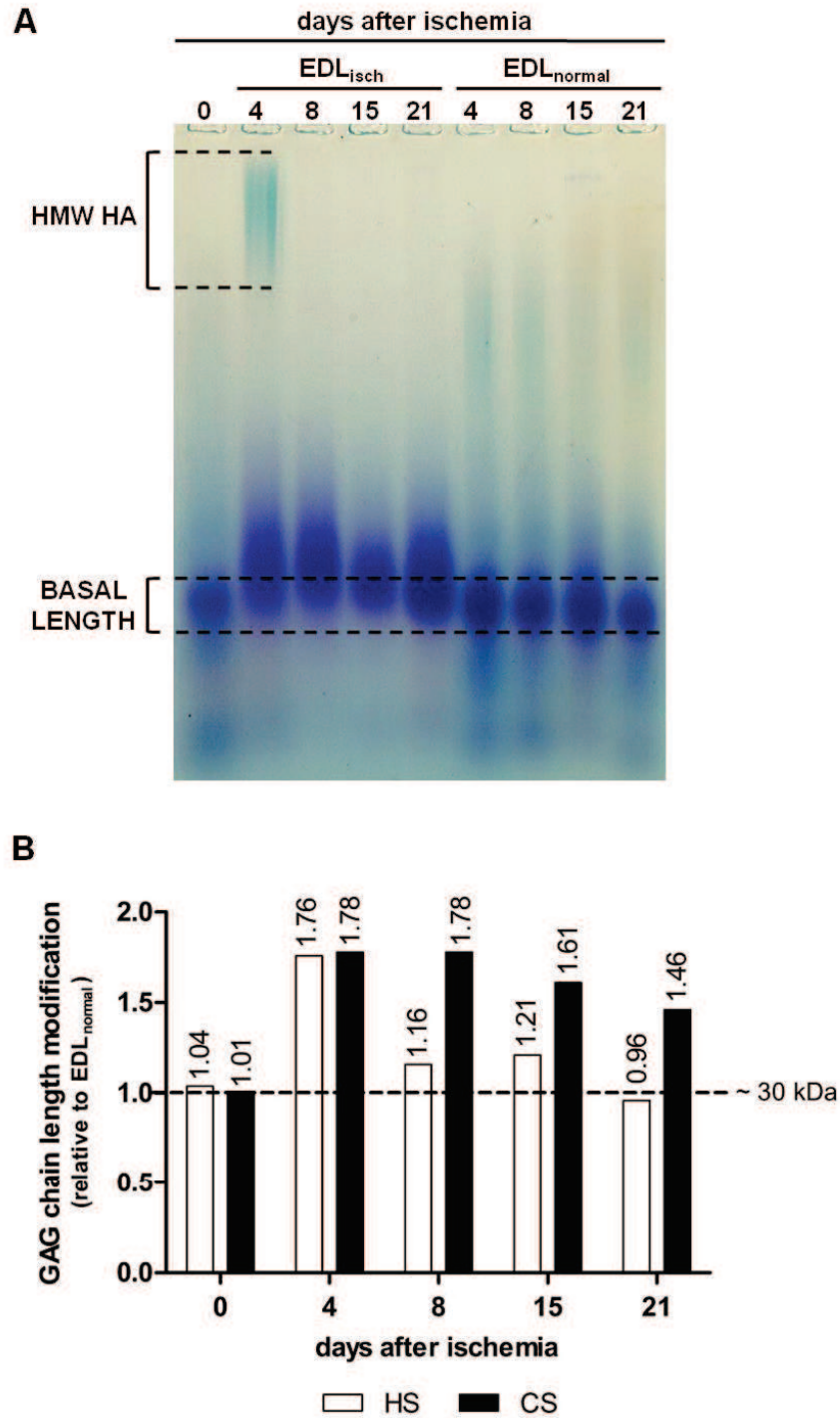
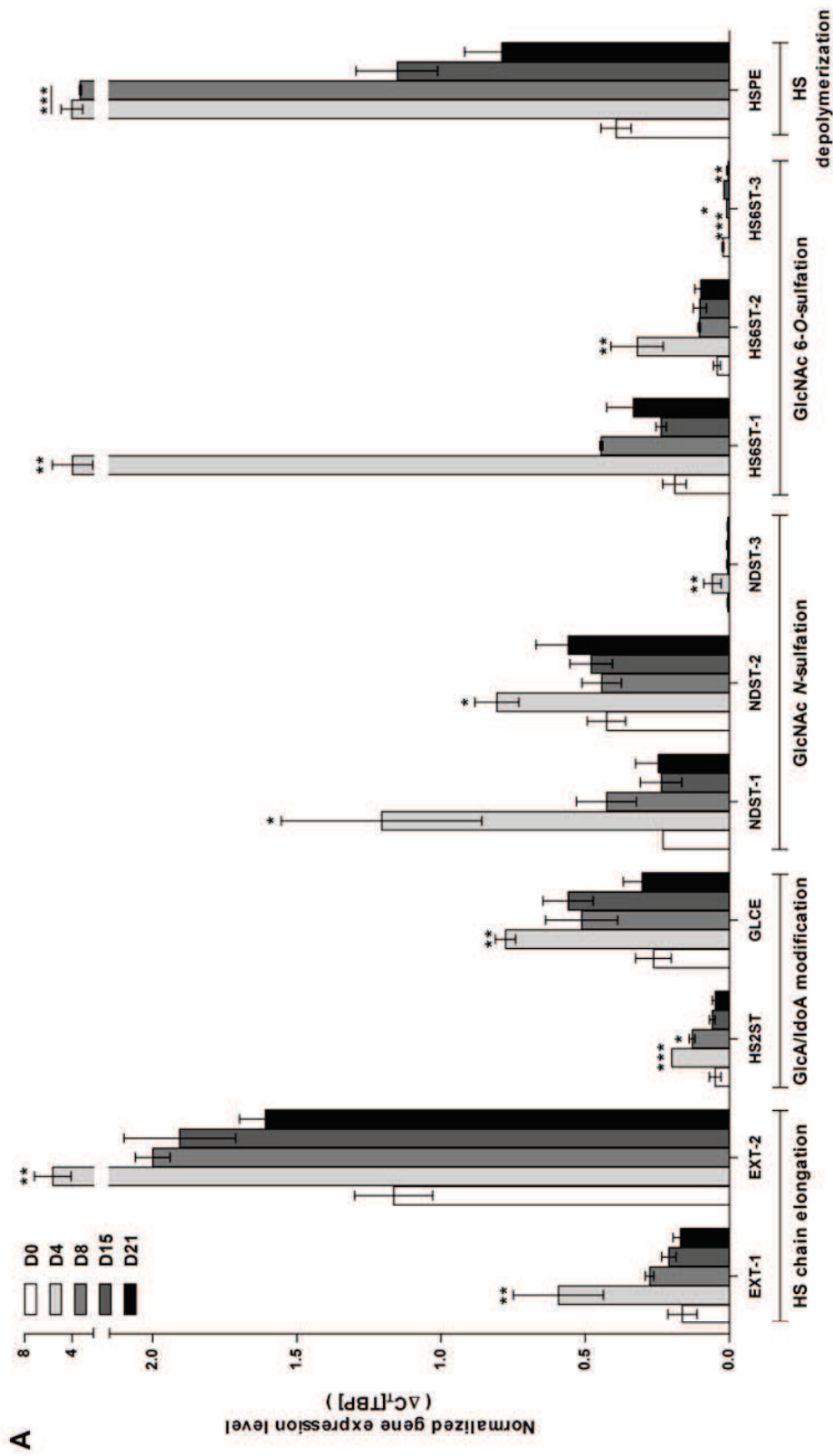
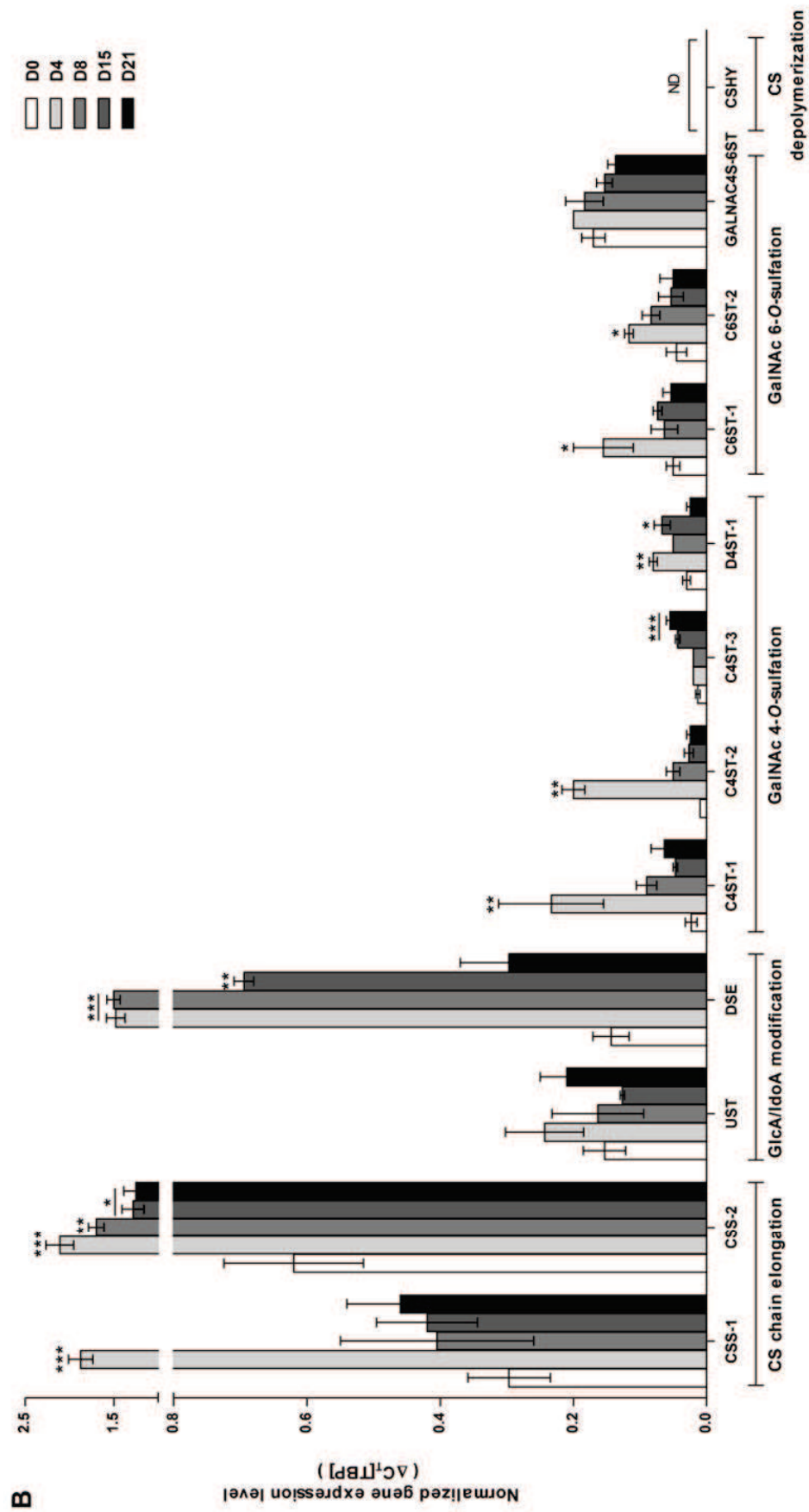


Figure 4: GAG chain length modification over the time following ischemia

(A) Modification of the length of GAG chains was visualized by agarose gel electrophoresis and Stains-All staining. The basal length (dotted line) was determined by delimiting the upper and the lower signal of each spot of the EDL_{normal}. Among purified GAG, sulfated GAG were identified by the specific dark blue-staining whereas high molecular weight HA (HMW HA) was identified by the specific light blue-staining with Stains-All dye. The photography is representative of 3 independent experiments. (B) Modification of the length of GAG chains was estimated by HPLC-SEC. Purified HS or CS from 3 individual EDL_{normal} or EDL_{isch} were pooled and analyzed as a single sample for each time point (n=1). GAG chain length obtained with contralateral EDL_{normal} served as reference.





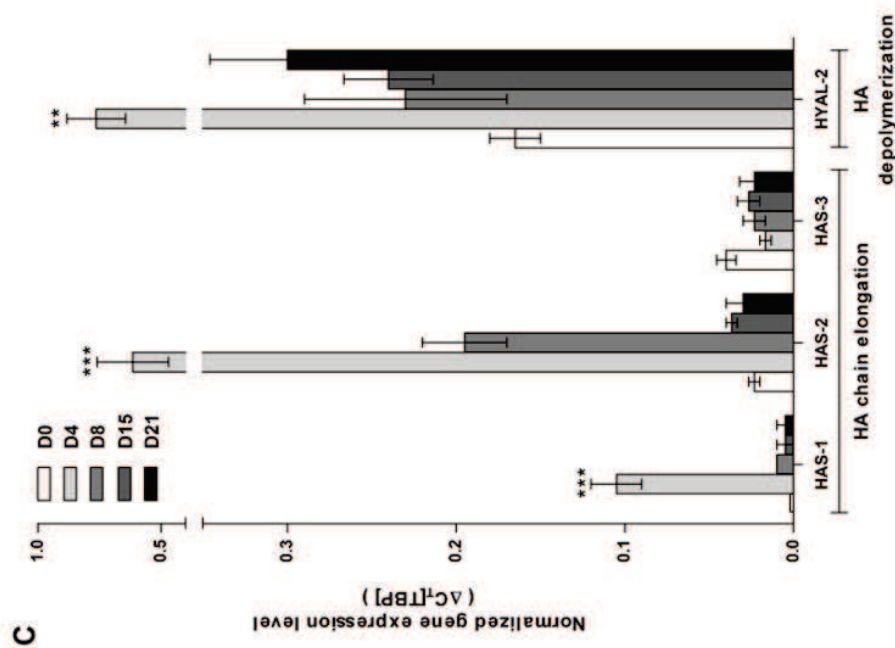
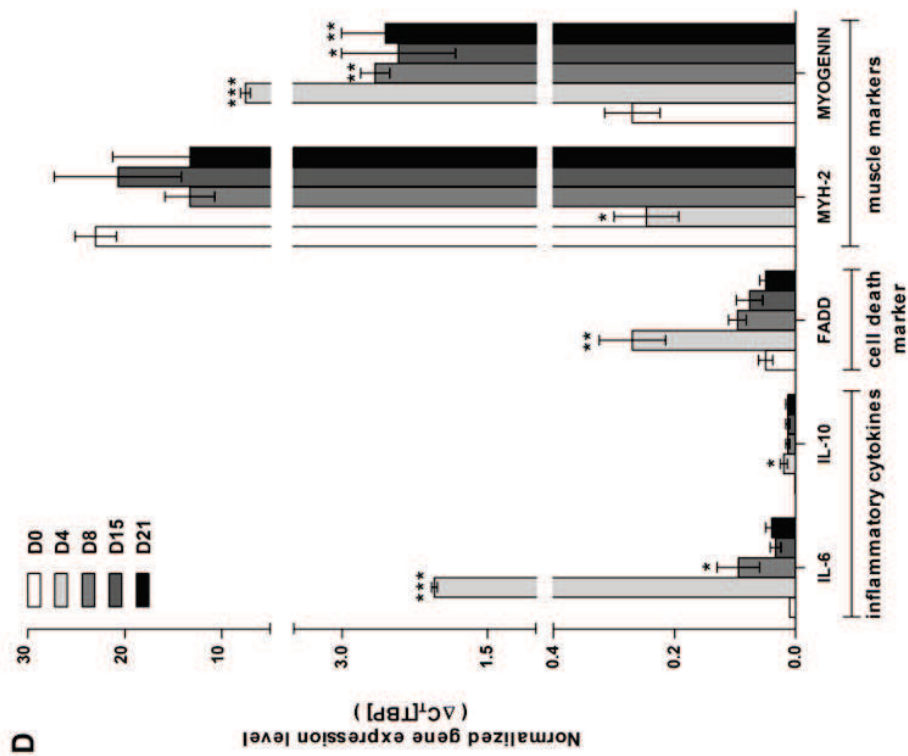


Figure 5: GAG metabolic enzymes expression is modified following ischemia

Gene expression of HS biosynthesis (panel A), CS biosynthesis (panel B), HA biosynthesis (panel C) and inflammation and muscle regeneration processes (panel D) were determined by RTqPCR analysis. Results are presented as gene expression level following $2^{-\Delta C_t}$ normalization using TBP as housekeeping gene. Values are the mean and SEM calculated from 3 individual EDL samples (n=3, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

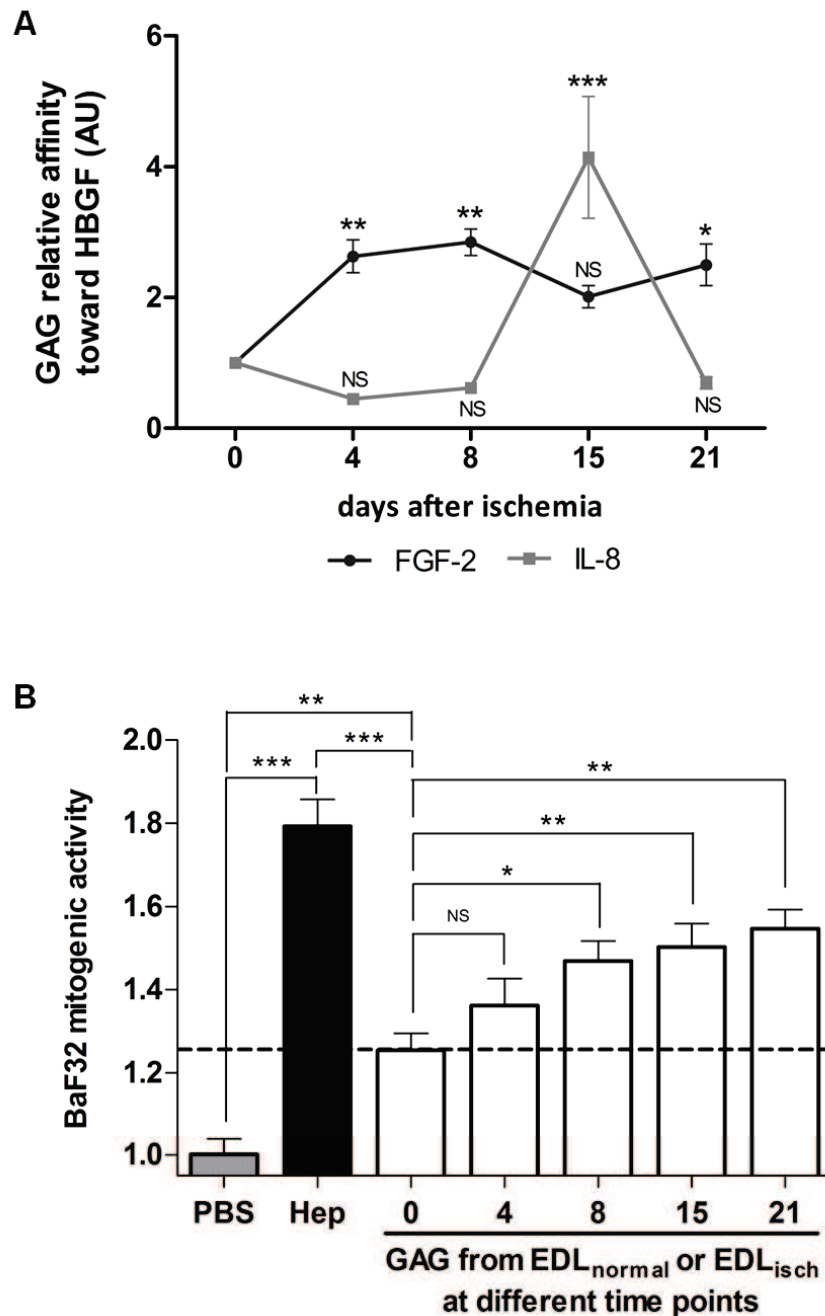


Figure 6: GAG affinities and activities toward cytokines change during ischemia-regeneration process

(A) GAG from EDL_{normal} or EDL_{isch} binding capacities toward FGF-2 and IL-8 were measured using an ELISA competition assay. Results are expressed as relative affinity after normalizing to EC₅₀ value of GAG extracted from EDL_{normal} (day 0). Values are the mean and SEM calculated from 3 individual EDL samples (n=3, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001). (B) GAG activities in presence of FGF-2 were analyzed in an *in vitro* model of cell proliferation using BaF32 cells. Heparin (1 µg/mL) was used as positive control. Values are the mean and SEM calculated from GAG extracted from 3 individual EDL samples in 2 independent experiments (n=6, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

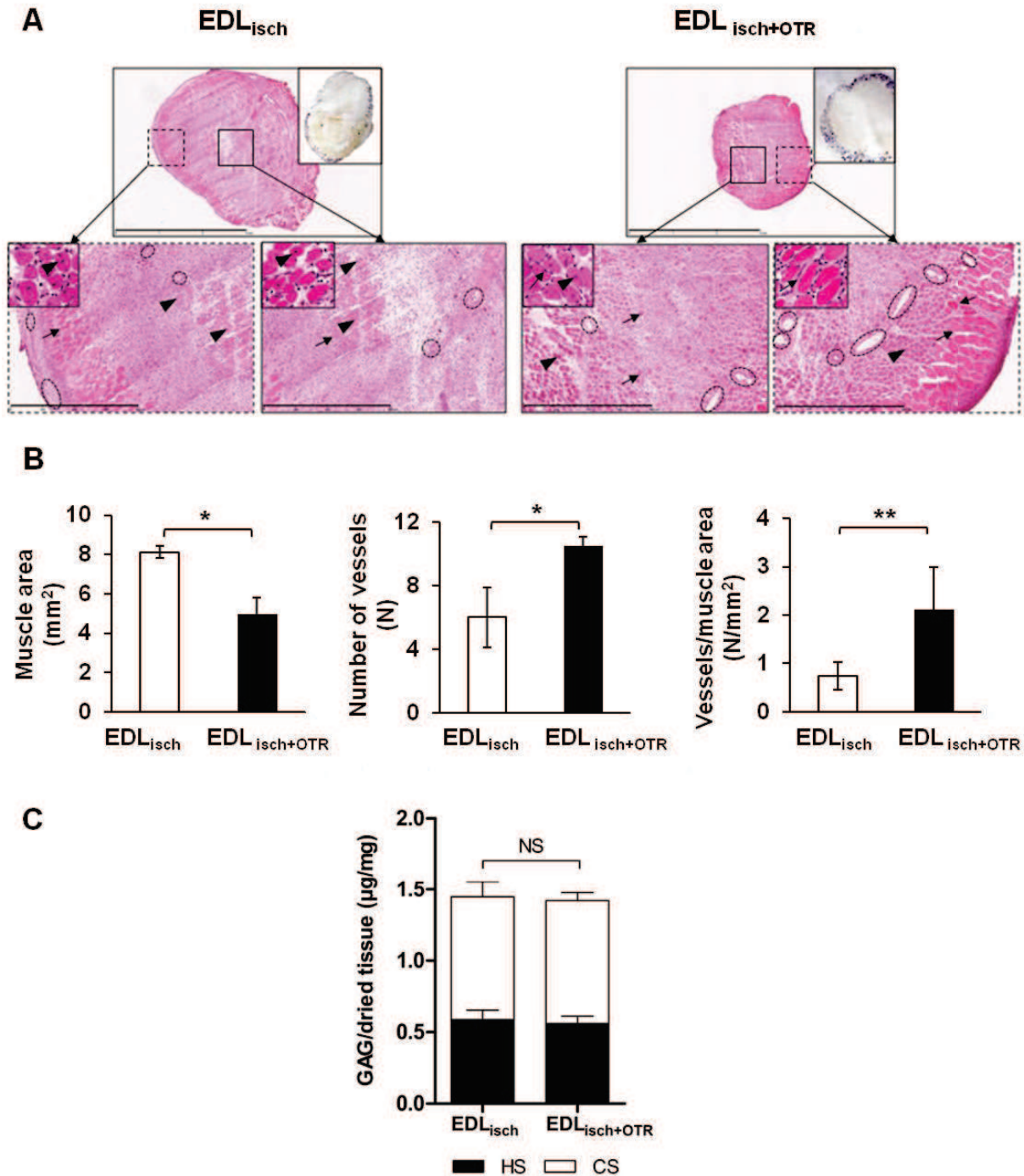


Figure 7: Morphological studies of muscle sections 8 days after [OTR₄₁₃₁] treatment

(A) Transverse sections of EDL_{isch} and EDL_{isch+OTR} muscles were stained with hematoxylin-eosin and assessed for phosphorylase activity (upper panel, scale bar=3mm and lower panel with high view inserts, scale bar=800µm). Arrows indicate the nuclear localization in the periphery of the mature cells and arrowheads indicate the nuclear localization in the central part of the immature cells. The dotted circles show the presence of vessels. (B) The total area of muscle cross-section (mm²), the number of vessels (N) and vessels density (N/mm²) were counted using the NDP software (n=6, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001). (C) Sulfation levels of CS and HS species extracted from EDL_{isch} or EDL_{isch+OTR} (day 8) were determined by DMMB assay. Values were normalized on weight of each dried muscle. Values are the mean and SEM calculated from 6 individual EDL samples in 2 independent experiments.

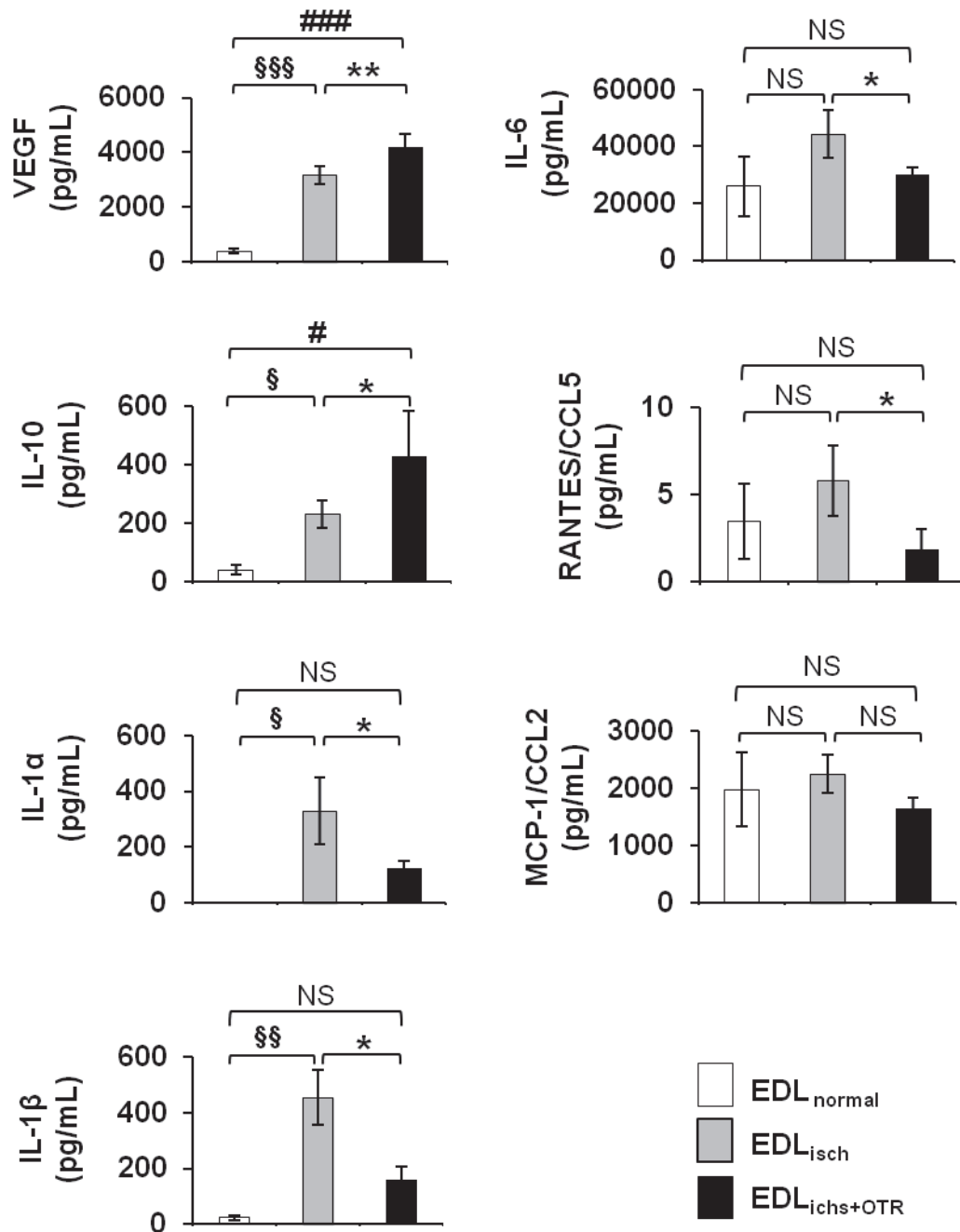


Figure 8: Cytokines and growth factors levels in ischemic tissue 4 days after [OTR₄₁₃₁] treatment

The concentration of VEGF, IL-10, IL-1α, IL-1β, IL-6, RANTES/CCL5 and MCP-1 were measured in the supernatant of EDL_{normal}, EDL_{isch} and EDL_{isch+OTR} by multiplex assays at day 4 of experiment (n=3, *, §, #p<0.05; **, §§, ###p<0.001; ***, §§§, ####p<0.0001).

II.3 Résultats complémentaires

Les résultats complémentaires suivants portent sur une étude préliminaire d'évolution des GAG au cours de l'ischémie chez la souris immunodéficiente. Le protocole d'extraction et de dosage des GAG est identique à celui décrit dans l'article 2.

II.3.a Dosage des GAG endogènes dans l'EDL ischémié de souris immunodéficientes

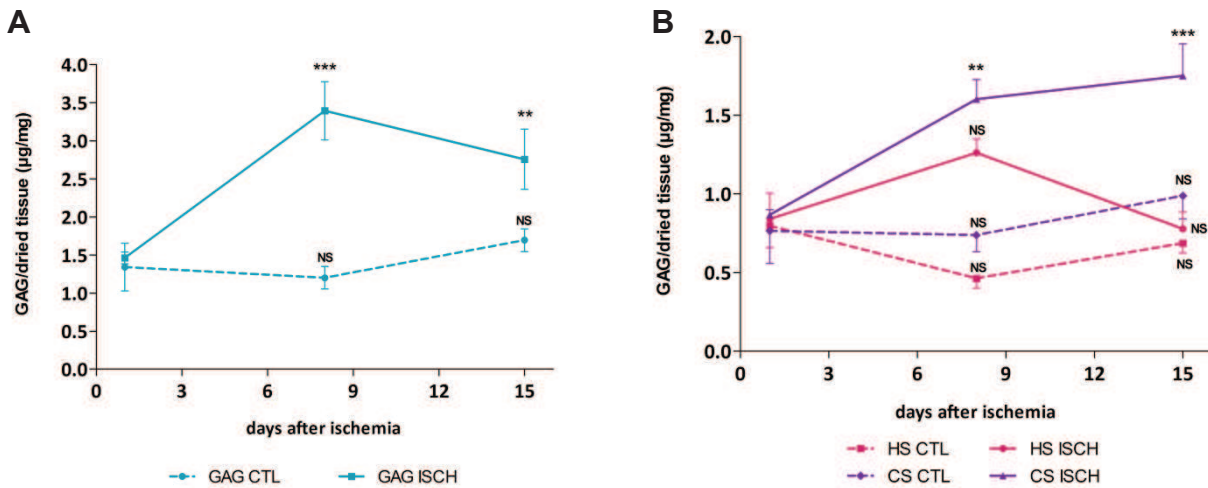


Figure 29 : Dosage des GAG dans le muscle ischémié de souris immunodéficiente

Niveau de sulfatation des GAG totaux (panel A) et des HS et CS (panel B) extraits de muscles EDL ischémiés (1, 8 et 15 jours après chirurgie) ou normaux (contralatéraux) de souris immunodéficientes NOD/SCID. Les valeurs représentent la moyenne associée à l'écart-type à la moyenne calculés à partir de 6 animaux ($n=6$, $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$).

On observe une augmentation des GAG sulfatés totaux d'environ 2,3 fois huit jours après ischémie, puis une diminution à quinze jours, tandis qu'aucune modification significative n'est observée dans la patte controlatérale. Cette évolution des GAG sulfatés totaux est le reflet à la fois d'une augmentation de la sulfatation des CS (de 1,8 fois) et des HS (1,6 fois) à huit jours. Alors que la sulfatation des CS continue d'augmenter à quinze jours, celle des HS diminue pour retourner au niveau initial.

Les études suivantes ont consisté à déterminer la relation entre la structure et la fonction des GAG. Pour cela, des expériences de liaison de GAG naturels commerciaux ou mimétiques de synthèse envers certains facteurs de croissance en compétition vis-à-vis de l'héparine ont été réalisées par une méthode ELISA, comme décrit dans l'article 2.

II.3.b Importance du degré de sulfatation sur la liaison aux facteurs de croissance

Au sein de la chimiothèque de mimétiques de GAG disponible au laboratoire CRRET, plusieurs variants de la molécule [OTR₄₁₂₀] étaient disponibles. Ces molécules, de structures identiques, ne diffèrent entre elles uniquement par leur degré de sulfatation (ds). Ainsi, la molécule [OTR₄₁₂₀] « classique » a été définie comme portant 100% des groupements sulfates (ds=1), puis trois autres molécules « [OTR₄₁₂₀]-like » portant 80% (ds=0.8), 30% (ds=0.3) et 10% (ds=0.1) de groupements sulfates ont été testées pour leur capacité à lier le FGF-2.

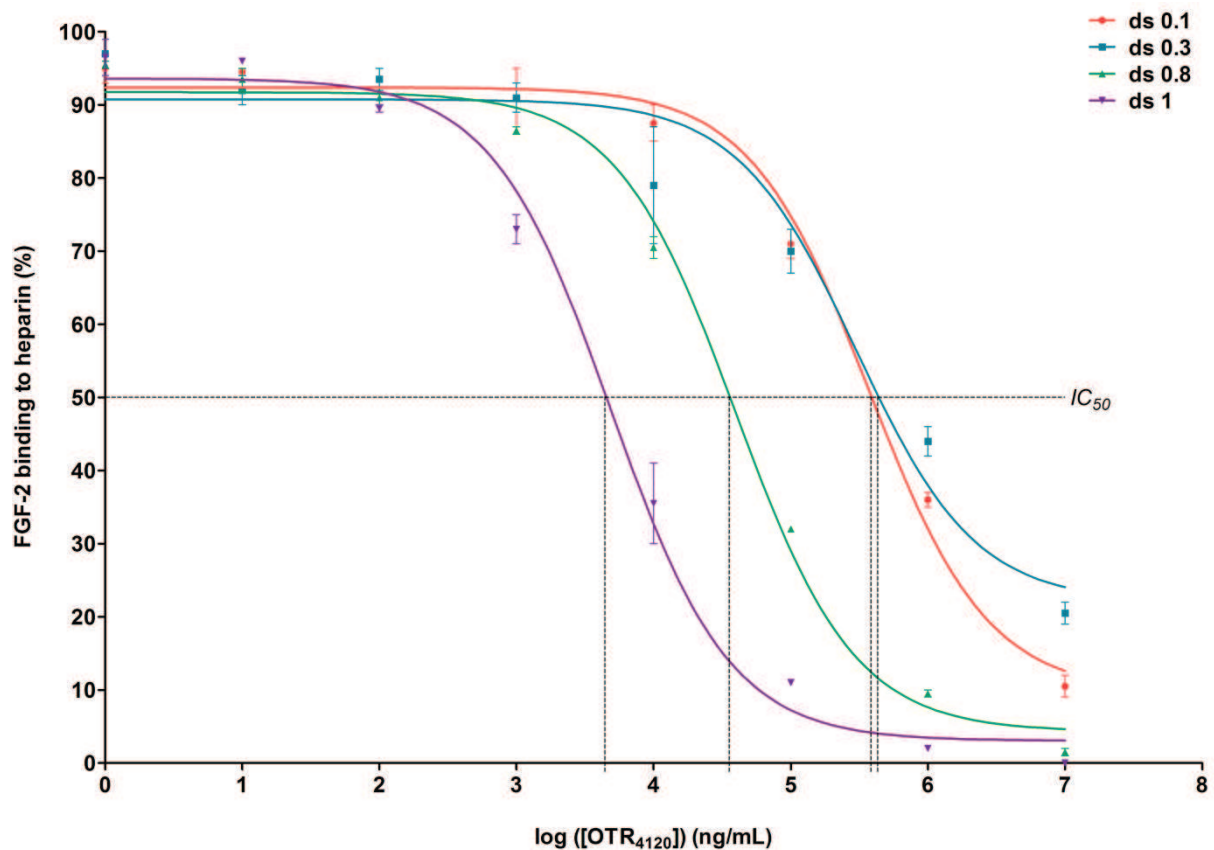


Figure 30 : Effet du degré de sulfatation de l'[OTR₄₁₂₀] sur sa liaison au FGF-2

Les molécules [OTR₄₁₂₀] et « [OTR₄₁₂₀]-like » ont été ajoutées à des concentrations croissantes (de 1 ng/mL à 10 mg/mL) en même temps que le FGF-2 (5 ng/mL) en présence d'héparine fixée. En parallèle, le FGF-2 est incubé avec l'héparine en absence de GAG compétiteurs, ce qui permet de définir un niveau de liaison maximal. Cette référence permet de déterminer l'affinité des GAG testés en calculant l'IC₅₀, c'est-à-dire la dose suffisante de mimétiques de GAG pour déplacer 50% de la liaison du FGF-2 à l'héparine.

ds [OTR ₄₁₂₀]	Log(IC ₅₀) (ng/mL)	IC ₅₀ (ng/mL)	Affinité relative (%)
1	3,69	4 870	100
0,8	4,60	39 510	12,3
0,3	5,48	301 490	1,6
0,1	5,57	371 130	1,3

Tableau 7 : Affinité des différentes molécules "[OTR₄₂₁₀]-like" pour le FGF-2

Une diminution de 20% du degré de sulfatation de la molécule entraîne une chute considérable de près de 90% de sa capacité à lier le FGF-2. Les molécules avec un degré de sulfatation à 10% et 30% n'ont quasiment plus aucune interaction avec le FGF-2, respectivement 1,3 et 1,6%.

II.3.c Influence de l'hydrophobicité des GAG sur leur liaison aux facteurs de croissance

Dans le même esprit que précédemment, des études ont été réalisées afin de déterminer le rôle du degré d'hydrophobicité sur la liaison aux facteurs de croissance (Figure 31) en comparant les molécules [OTR₄₁₂₀] et [OTR₄₁₃₁]. En effet, l'[OTR₄₁₂₀] ne présente aucun groupement hydrophobe tandis que l'[OTR₄₁₃₁] est composé par 10% de groupements hydrophobes (acétates).

Facteur de croissance	Log(IC ₅₀) (ng/mL)		IC ₅₀ (ng/mL)		Affinité relative (% ; réf=[OTR ₄₁₂₀])	
	[OTR ₄₁₂₀]	[OTR ₄₁₃₁]	[OTR ₄₁₂₀]	[OTR ₄₁₃₁]	[OTR ₄₁₂₀]	[OTR ₄₁₃₁]
FGF-2	3,58	3,41	3 796	2 559	100	148
VEGF	1,98	1,93	96	86	100	112
SDF-1	2,10	1,76	126	58	100	217

Tableau 8 : Comparatif des affinités de l'[OTR₄₁₂₀] et de l'[OTR₄₁₃₁] pour différents facteurs

Aucune différence n'est observée entre les deux mimétiques [OTR₄₁₂₀] et [OTR₄₁₃₁] pour la liaison au VEGF alors que l'hydrophobicité de l'[OTR₄₁₃₁] favorise de 50% sa liaison au FGF-2 et double celle au SDF-1 par rapport à l'[OTR₄₁₂₀].

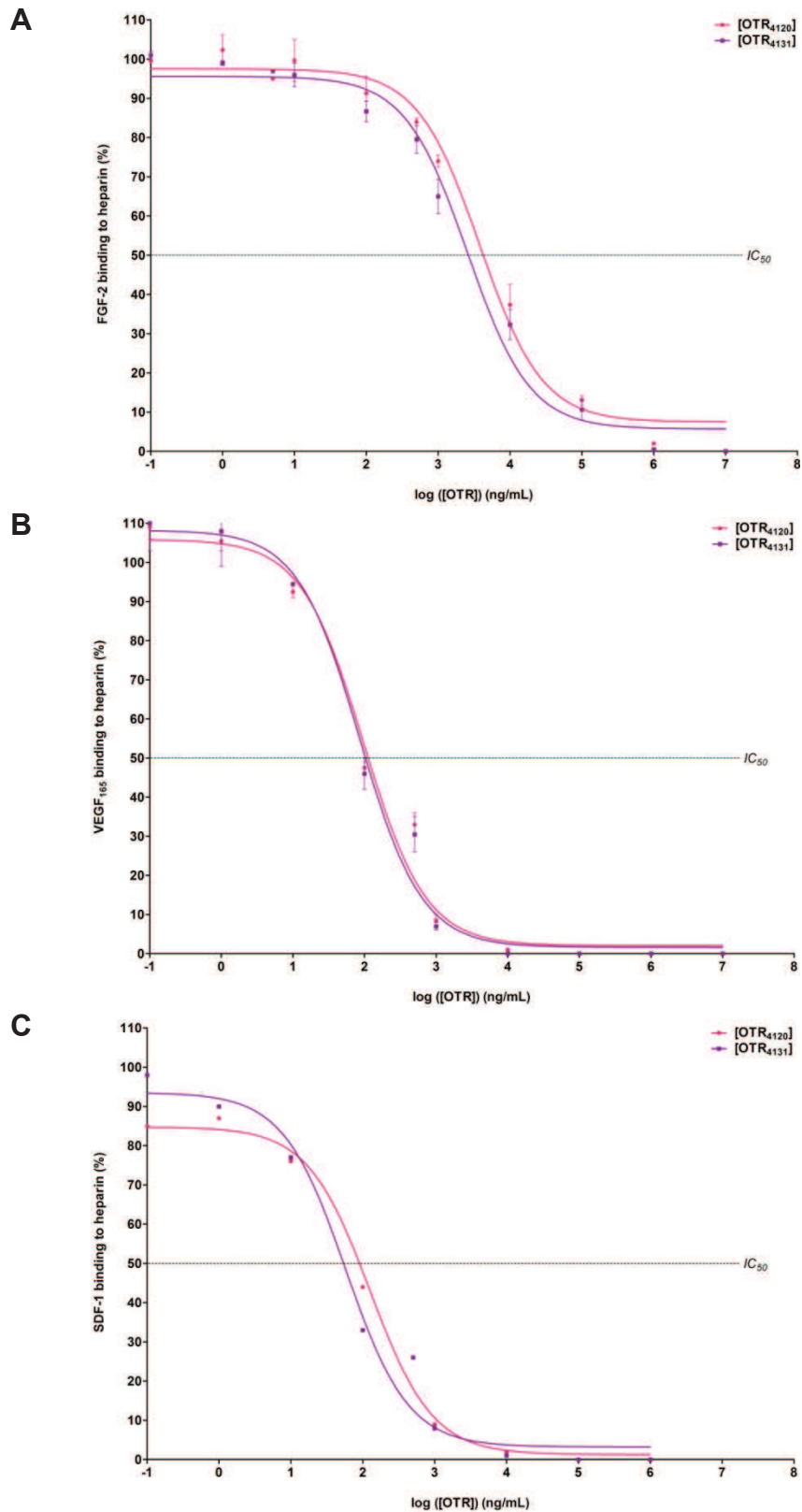


Figure 31 : Effet du degré d'hydrophobicité sur la liaison aux facteurs de croissance

Les molécules [OTR₄₁₂₀] et [OTR₄₁₃₁] ont été ajoutées à des concentrations croissantes (entre 0,1 ng/mL et 10 mg/mL) en même temps que le FGF-2 (5 ng/mL ; panel A ; n=3), le VEGF (50 ng/mL ; panel B ; n=2) ou le SDF-1 (200 ng/mL ; panel C ; n=1) en présence d'héparine fixée. Les différentes IC₅₀ sont obtenues comme décrit précédemment.

II.3.d Affinité de différents GAG naturels commerciaux pour le FGF-2

Dans cette série d'études de la liaison des GAG avec les facteurs de croissance nous avons également voulu comparer l'effet des mimétiques par rapport aux GAG naturels commerciaux. Pour cela, nous avons étudié une purification d'héparine (identique à celle utilisée pour réaliser la compétition), de HS, de CS A, de CS B, de CS C et d'AH de haut poids moléculaire, en parallèle des deux mimétiques de GAG [OTR₄₁₂₀] et [OTR₄₁₃₁].

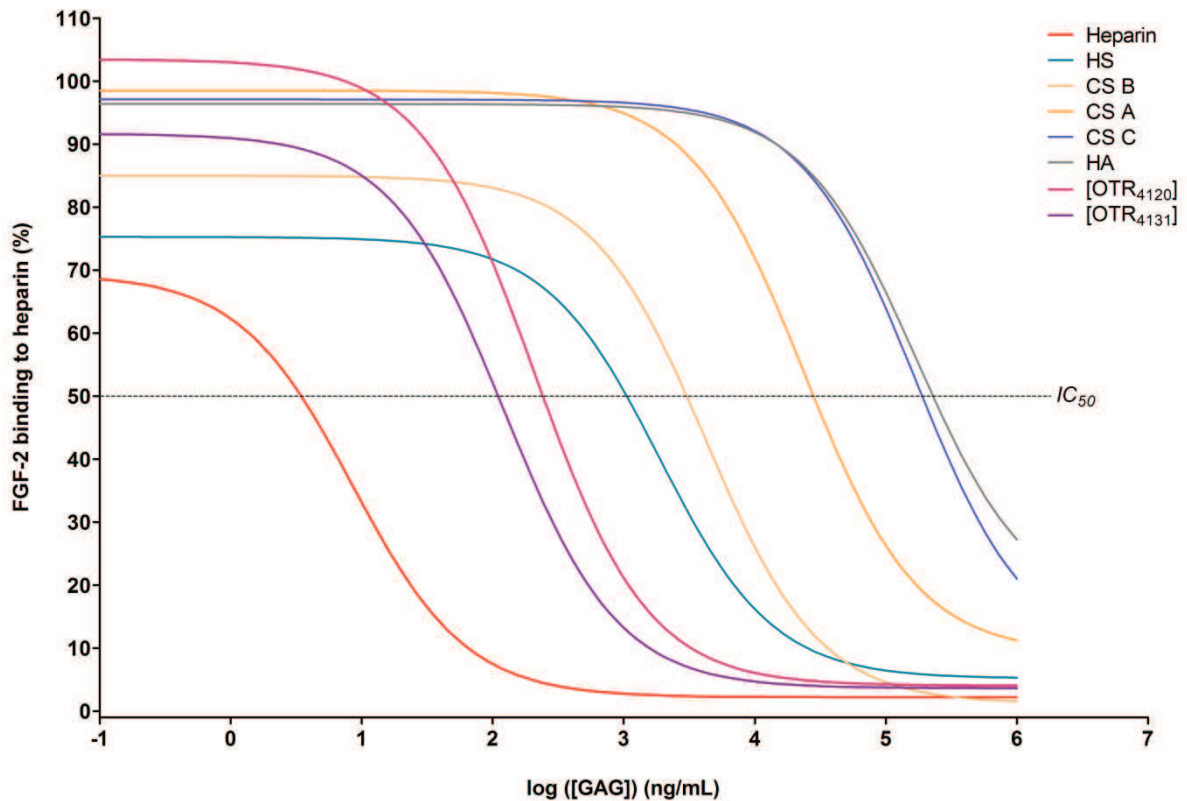


Figure 32: Affinités de GAG naturels et mimétiques pour le FGF-2

Les différentes molécules Héparine, HS, CS A, CS B, CS C, AH, [OTR₄₁₂₀] et [OTR₄₁₃₁] ont été ajoutées à des concentrations croissantes (entre 0,1 ng/mL et 1 mg/mL) en même temps que le FGF-2 (5 ng/mL) en présence d'héparine fixée. Les différentes IC₅₀ sont obtenues comme décrit précédemment.

GAG	Log(IC ₅₀) (ng/mL)	IC ₅₀ (ng/mL)	Affinité relative (% ; réf=[OTR ₄₁₂₀])
Héparine	0,93	8,5	2440
HS	3,27	1 866	11
CS A	4,37	23 660	1
CS B	3,62	4 215	5
CS C	5,22	167 770	0,1
AH	5,23	170 629	0,1
[OTR ₄₁₂₀]	2,32	207,6	100
[OTR ₄₁₃₁]	2,09	122,4	170

Tableau 9 : Comparatif des affinités des GAG naturels et mimétiques pour le FGF-2

L'héparine est le GAG le plus affiné, avec une affinité quasiment vingt-cinq fois plus forte que l'[OTR₄₁₂₀]. L'[OTR₄₁₃₁] a une affinité plus élevée pour comparé à l'[OTR₄₁₂₀] et l'AH, un GAG non sulfaté, n'établit aucune liaison. La CS C ne présente également aucune affinité alors que la CS A présente une petite affinité pour le FGF-2. La CS B présente une affinité plus forte que la CS A, mais moins forte que les HS. Enfin, l'[OTR₄₁₂₀] est un mimétique des HS qui présente une affinité dix fois supérieure à son modèle naturel.

II.4 Discussion

Au travers des résultats présentés dans l'article 2, nous avons démontrés qu'il existait un remodelage matriciel glycanique intense au cours du processus d'ischémie-régénération chez le rat. Il semble que la quantité et la structure des GAG soient modifiées tout au long de ce processus, et que ces modifications structurales influencent la capacité de liaison aux facteurs de croissance et cytokines, associé à un effet fonctionnel différent sur les cellules. Dans la perspective d'utiliser des souris immunodéficientes (NOD/SCID) afin de réaliser un protocole de thérapie cellulaire par injection de progéniteurs endothéliaux humains dans le muscle EDL ischémié, nous avons voulu valider dans ce modèle murin l'évolution de la composante glycanique observée chez le rat (article 2). Ainsi, nous avons tout d'abord confirmé qu'il existait un remodelage glycanique suite à l'ischémie musculaire, y compris chez la souris immunodéficiente. Toutefois, ce remodelage pour les GAG sulfatés totaux se fait selon une intensité différente du modèle chez le rat immunocompétent. Alors que chez le rat, le niveau de GAG sulfatés est multiplié par 4,3 au bout de huit jours et 4,6 au bout de quinze jours (Figure 2, article 2), chez la souris il n'est augmenté que de 2,3 après huit jours et commence à diminuer dès quinze jours (Figure 29, page 154). Si l'on s'intéresse en détails à l'évolution des CS et des HS, on remarque également une accélération du processus de retour à la normale chez la souris. Là où il faut attendre soixante jours chez le rat, le niveau de sulfatation des HS revient à sa valeur initiale au bout de quinze jours. Toutefois, on retrouve toujours chez la souris un niveau élevé de la sulfatation des CS qui diminue beaucoup moins rapidement que celui des HS. Les données collectées actuellement ne permettent pas de faire la part entre ce qui est lié à l'espèce animale et ce qui dépend de l'intégrité immunitaire. Il faudrait pour cela comparer en plus l'évolution des GAG après ischémie dans des souris immunocompétentes ou des rats immunodéficients. Malgré les différences, nos résultats valident l'idée qu'une thérapie matricielle associée à la thérapie cellulaire puisse optimiser la régénération musculaire. De plus, le mimétique [OTR₄₁₃₁] représente potentiellement un outil thérapeutique capable d'améliorer l'angiogenèse en favorisant le recrutement des PEC endogènes et l'activité des cellules endothéliales impliquées dans la régénération vasculaire (article 1). Ainsi, les expériences de co-injection de progéniteurs endothéliaux humains avec le mimétique [OTR₄₁₃₁] sont actuellement en cours de réalisation avec nos partenaires de l'U972 et de l'U698.

Nos études préliminaires sur la relation entre la structure et la fonction des GAG montrent qu'un haut niveau de sulfatation est absolument indispensable pour permettre l'interaction avec les facteurs de croissance. Toutefois, les groupements sulfates ont un effet non linéaire, autrement dit,

la liaison aux facteurs de croissance ne dépend pas uniquement du nombre de groupements. En effet, si l'on compare les molécules avec un degré de sulfatation à 10% et 30%, bien que l'une de ces molécules présente 20% de groupements sulfate en plus, on ne constate aucune différence dans leur capacité de liaison (Tableau 7, page 156). De plus, les CS C et CS A, qui présentent tous deux un groupement sulfate par unité disaccharidique (Tableau 4, page 44) n'ont pas les mêmes affinités pour le FGF-2. La CS C n'a aucune affinité, au même titre que l'AH non sulfaté, alors que la CS A présente une petite affinité pour le FGF-2. Ainsi, au-delà du degré de sulfatation, c'est à dire le rapport entre le nombre de groupements sulfate et le nombre d'unités saccharidiques sur la chaîne de GAG, c'est également la position des groupements qui va définir le potentiel de liaison des GAG aux facteurs de croissance. On peut imaginer que ces paramètres vont conférer à la molécule une structure tridimensionnelle et une flexibilité idéales. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait étudier des molécules de différentes tailles présentant le même degré de substitution en groupements sulfate. Toutefois, il est probable que la liaison des GAG aux facteurs de croissance requiert aussi une certaine taille, encadrée par un nombre d'unités saccharidiques minimal, en dessous duquel la liaison n'est physiquement pas possible, et un nombre d'unités saccharidiques maximal, au-delà duquel aucun bénéfice n'est conféré voire affecte négativement la liaison. Par ailleurs, l'effet de l'hydrophobicité des GAG sur leur liaison aux facteurs de croissance semble totalement dépendant du facteur étudié. En effet, alors que pour la liaison au VEGF aucune différence flagrante n'est observée entre les deux mimétiques [OTR₄₁₂₀] et [OTR₄₁₃₁], les liaisons au FGF-2 et au SDF-1 semblent affectées par ce paramètre. Bien que la différence obtenue avec SDF-1 soit plus importante, ce résultat est à considérer avec précaution car l'expérience n'a été réalisée qu'une unique fois et doit être répétée afin de valider ce qui semble être une affinité deux fois plus forte de l'[OTR₄₁₃₁] vis-à-vis du SDF-1, par rapport à l'[OTR₄₁₂₀]. Malgré tout, l'expérience avec le FGF-2 ayant été répétée trois fois, on peut avancer que l'hydrophobicité plus importante de la molécule [OTR₄₁₃₁] favorise sa liaison au FGF-2 de 50%, comparé à l'[OTR₄₁₂₀]. Si les groupements hydrophobes ne semblent pas jouer un rôle aussi déterminant que la sulfatation dans la liaison des GAG aux facteurs de croissance, ils semblent systématiquement conférer un bénéfice qui, pour certains facteurs de croissance, peut s'avérer non négligeable. Ceci suggère qu'en modulant le degré d'hydrophobicité, au-delà des 10% de l'[OTR₄₁₃₁], on puisse améliorer encore la liaison avec ces facteurs. Il faudrait également s'intéresser à l'interaction du complexe GAG-facteurs de croissance avec le récepteur cellulaire, par exemple par résonance plasmonique de surface, et ainsi établir une structure optimale qui permette de lier et de protéger le facteur mais également de favoriser son interaction avec son récepteur cellulaire, optimisant ainsi la réponse cellulaire.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

La thérapie cellulaire a pour objectif la reconstruction des tissus lésés. Historiquement, les premières greffes de cellules datent des premières transfusions sanguines, au XVII^e siècle, où un médecin français, Jean Baptiste Denis, publia une lettre via la Royal Society, dans laquelle il décrit le succès thérapeutique d'une transfusion de sang de mouton à un jeune patient atteint d'une fièvre jusque là inextinguible, (<http://www.ints.fr>)¹. Plusieurs siècles après, la découverte et la compréhension du système immunitaire ont permis d'améliorer considérablement la réponse à ce type de traitement. La transfusion sanguine est aujourd'hui pratique courante et permet de sauver chaque année un nombre inestimable de patients avec 85 millions de dons de sang annuels, (<http://www.who.int>)². Néanmoins, la transfusion sanguine est une greffe de cellules différenciées qui peut s'avérer insuffisante chez certains patients dont la moelle osseuse, siège de la production des éléments figurés du sang, n'est pas suffisamment fonctionnelle. Ainsi s'est développée la greffe de moelle osseuse, qui renferme une proportion importante de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les succès de ces greffes de CSH sont à l'origine du développement des nouvelles stratégies de thérapie cellulaire, qui s'étendent à présent à d'autres types de cellules souches, avec plus ou moins de succès. L'essor de ces thérapies a cependant considérablement évolué ces dernières années par la compréhension des mécanismes gouvernant l'homéostasie tissulaire. En particulier les phénomènes de mobilisation et de « homing » des cellules souches sont à présents mieux compris, grâce à la caractérisation des interactions des ces cellules souches avec les différents éléments de leur microenvironnement normal (la « niche ») ou pathologique (le site d'une lésion). Parmi ces éléments matriciels, les GAG sont des acteurs de plus en plus mis en avant dans le contrôle du développement et de la régénération tissulaires. Aujourd'hui, plusieurs axes de médecine régénératrice ont été explorés, la thérapie cellulaire, la thérapie génique et la thérapie à base de facteurs de croissance. Les nombreux résultats obtenus tendent à démontrer qu'une approche unilatérale est insuffisante et qu'il est nécessaire de combiner plusieurs approches afin d'obtenir une régénération fonctionnelle à long terme. Le travail réalisé au cours de cette thèse apporte de nouvelles données renforçant l'intérêt de la thérapie matricielle par un traitement à base de mimétique de GAG. En effet, les mimétiques de GAG permettent à la fois d'optimiser les produits de thérapie cellulaire tels que les progéniteurs endothéliaux, mais aussi de favoriser intrinsèquement la régénération tissulaire.

Au cours de cette thèse nous avons mis en évidence l'intérêt d'utiliser des mimétiques de GAG afin de potentialiser les propriétés de cellules endothéliales dérivées de progéniteurs circulants

¹ <http://www.ints.fr> : site officiel de l'institut national de la transfusion sanguine

² <http://www.who.int> : site officiel de l'OMS « world health organization »

du sang de cordon, ainsi que la fréquence d'apparition des colonies primaires. Toutefois, la législation actuelle n'autorise pas de traitement thérapeutique à base de cellules issues du sang de cordon pour d'autres applications qu'en hématologie, telle que pour le traitement de l'ischémie musculaire. Ainsi, il serait très intéressant de valider les effets précédemment décrits du mimétique [OTR₄₁₃₁] sur des cellules endothéliales issues du sang périphérique adulte de patients présentant des risques cardiovasculaires, ce qui permettrait une utilisation en thérapie autologue.

D'autres effets du mimétique [OTR₄₁₃₁] doivent également être investigués. Par exemple, si nous avons déjà démontrés que ce mimétique favorise la prolifération des cellules dérivées de PEC tardifs, il serait intéressant d'explorer son effet sur la sénescence réplivative. En effet, une étude au sein du laboratoire CRRET a montré que les GAG, et en particulier les HS, étaient structurellement et fonctionnellement altérés au cours du vieillissement dans le myocarde. Ces GAG présentent en effet des affinités plus faibles envers les facteurs de croissance FGF-1 et FGF-2 et une plus forte affinité pour le VEGF [492]. Ainsi, une dérégulation des voies de signalisation dépendantes de ces facteurs pourrait en partie expliquer le vieillissement tissulaire au travers de la modification des GAG. Les résultats obtenus au sein de notre laboratoire sont confortés par une étude publiée récemment montrant que la structure des HS exprimés à la surface des cellules endothéliales dérivées de PEC tardifs est altérée au cours du vieillissement et que cette modification entraîne une moindre capacité migratoire des cellules [493]. On peut donc imaginer que la présence de mimétiques de GAG dans le milieu des cellules puisse restaurer des fonctionnalités cellulaires perdues suite à l'altération de la structure des GAG endogènes et ainsi préserver les cellules de la sénescence. Des études sont actuellement en cours de réalisation dans l'unité de recherche U972 à ce sujet.

Par ailleurs, une étude précédemment réalisée au laboratoire a permis de démontrer que l'injection intrapéritonéale chez la souris des mimétiques [OTR₄₁₂₀] et [OTR₄₁₃₁] permettait de mobiliser des progéniteurs hématopoïétiques dans la circulation par déplacement du gradient de la chimiokine SDF-1 et activation de la MMP-9, mais que seul le mimétique [OTR₄₁₃₁] permettait de mobiliser des populations cellulaires plus immatures (c-Kit+) [494]. Ainsi, il serait intéressant d'investiguer si l'injection de l'[OTR₄₁₃₁] permet plus spécifiquement la mobilisation des progéniteurs endothéliaux et par quels mécanismes distincts de l'[OTR₄₁₂₀] il agit.

En collaboration avec l'unité de recherche U698 nous avons également montrés que l'injection intramusculaire de l'[OTR₄₁₃₁] permettait d'accélérer la régénération tissulaire en favorisant la réponse anti-inflammatoire et en augmentant l'angiogenèse. Ce résultat rejoint des études précédentes réalisées au laboratoire CRRET qui ont montré que le traitement de brûlures

cutanées chez le rat par application topique de l'[OTR₄₁₂₀] accélérât également la cicatrisation [495, 496]. Les résultats de ces études montrent que le traitement par le mimétique [OTR₄₁₂₀] module la production des collagènes et permet de rétablir un bon ratio collagène III/collagène I. De plus, dans ce modèle le traitement par le mimétique est associé à une production et une activation des MMP-2 et -9. Or, plusieurs études ont démontré le rôle pro-angiogénique de ces deux MMP en modulant la migration et la survie des cellules endothéliales [497, 498] et en favorisant la mobilisation de cellules souches hématopoïétiques et de progéniteurs endothéliaux de la moelle vers la circulation périphérique [401, 499, 500]. Ainsi, il serait très intéressant de vérifier si le mécanisme d'action de l'[OTR₄₁₃₁] dans notre modèle d'ischémie passe également par l'activation des MMP-2 et -9, comme cela est suggéré, au moins pour la MMP-9, dans les expériences de mobilisation décrites précédemment.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont également permis de démontrer qu'il existait un fort remodelage glycanique au cours d'un processus d'ischémie-régénération musculaire. De façon tout à fait intéressante, les différentes familles de GAG, HS ou CS, ne sont pas affectées de la même manière et alors que la plupart des études portant sur les GAG sont axées sur les HS, nous avons montrés que les HS retournaient à un état basal alors que les CS restaient modifiés longtemps après l'accident ischémique. Il serait intéressant d'investiguer la fonctionnalité de ces CS isolés et notamment vis-à-vis du TGF- β , connu pour inhiber la différenciation des myoblastes et modulé par des PG à chaînes de CS/DS (II.3.d, page 57). De plus, si nous avons montrés que la capacité des GAG à lier les facteurs de croissance était modulée au cours du temps, il serait intéressant de pouvoir réitérer les mêmes expériences non pas à partir d'un mélange de HS et CS mais à partir de fractions purifiées de l'une ou l'autre famille afin de clairement établir le rôle de chacune d'elles au cours de l'ischémie-régénération musculaire. Toutefois, en plus de ces expériences permettant de déterminer une affinité envers des facteurs de croissance, il est indispensable d'y associer des tests fonctionnels sur des cultures cellulaires *in vitro*. En effet, si l'on met en relation les données de la première partie des résultats, portant sur la potentialisation des propriétés de PEC *in vitro* par les GAG mimétiques, et les résultats complémentaires de la seconde partie, portant sur les comparatifs d'affinité de l'[OTR₄₁₃₁] et de l'[OTR₄₁₂₀], on remarque par exemple que les deux mimétiques présentent la même affinité pour le VEGF (Tableau 8, page 156) mais ont un effet différent sur la prolifération induite par ce facteur (Figure 23, page 117). Cette différence peut s'expliquer par le fait que la signalisation de ces facteurs, dépendante des GAG, passe par la formation d'un complexe ternaire GAG/cytokine/récepteur, et que l'interaction du complexe GAG/cytokine avec le récepteur puisse

être modulée par la nature du GAG impliqué. L'affinité d'un GAG pour un facteur de croissance ne préjuge donc pas de son activité sur les cellules.

Par ailleurs, il serait intéressant d'approfondir les résultats que l'on a obtenus en analysant la distribution spatiale des GAG, HS et CS, dans le muscle au cours du processus d'ischémie-régénération, associé à une analyse de la distribution des cellules endothéliales, myogéniques et inflammatoires. Ces informations permettraient de mieux comprendre l'évolution des GAG endogènes et la façon dont ils régulent le processus de régénération, ainsi que d'identifier le mécanisme d'action du traitement par le mimétique [OTR₄₁₃₁]. En effet, il est connu que le nombre de cellules satellites est corrélé positivement avec la densité capillaire des fibres musculaires, que les cellules endothéliales stimulent la prolifération des myoblastes et enfin que, inversement, les cellules myogéniques différenciées favorisent l'angiogenèse [501]. De par leur proximité immédiate avec les capillaires sanguins, les cellules satellites répondent donc probablement à des signaux du microenvironnement après ischémie, en plus des facteurs solubles. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet des GAG endogènes après ischémie sur les propriétés des cellules satellites. De plus, le traitement par l'[OTR₄₁₃₁] a montré qu'il favorisait la réponse anti-inflammatoire en augmentant notamment la quantité d'IL-10 dans le muscle et en diminuant les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1. On peut supposer que le mimétique protège et favorise l'action de l'IL-10, accélérant ainsi la transition entre l'état pro- et anti-inflammatoire. Pour confirmer cette hypothèse il faudrait quantifier et localiser les deux populations de macrophages M1 et M2 au cours de l'ischémie, avec et sans traitement par le mimétique de GAG. De plus, il serait très intéressant de comparer l'affinité de l'[OTR₄₁₃₁] pour l'IL-6 et l'IL-10 afin de comprendre si l'inversion de la balance pro/anti-inflammatoire est liée à un différentiel de liaison du GAG mimétique pour ces acteurs protéiques. Toutefois, le mécanisme conduisant à l'augmentation des niveaux d'IL-10 et VEGF peut aussi être le résultat d'une immunomodulation indirecte, par exemple par recrutement des PEC. En effet, comme exposé plus haut, l'[OTR₄₁₃₁] est capable de mobiliser des populations immatures de cellules souches et progéniteurs résidents de la moelle. Or, une étude récente a montré que la transplantation de PEC augmentait les niveaux plasmatiques d'IL-10 et de VEGF, et réduisait ceux d'IL-1 β [502], comme observé dans notre étude après injection intramusculaire du mimétique.

Enfin, notre étude préliminaire dans le modèle de souris immunodéficiente suggère que la réponse glycanique à une ischémie peut varier entre les différentes espèces animales et est dépendante du processus inflammatoire. Cette dernière hypothèse rejoint des travaux publiés très récemment montrant que l'IL-1 β induit l'expression et la sécrétion de lumican, un PG à chaîne de KS, par des fibroblastes *in vitro* [503]. Les voies de signalisation impliquées restent cependant à élucider.

Annexe I : Article 3, en préparation

Au cours de ma thèse j'ai également participé à des travaux avec une équipe de recherche de l'unité U698 affiliée à l'Université Paris 13 et située à Bobigny. Mon implication a consisté en la mise au point d'un protocole d'extraction des GAG à partir de culots cellulaires et de surnageants de culture, à l'extraction et au dosage des HS et CS. Les résultats obtenus ont été intégrés à une étude plus complète qui a permis de rédiger une publication actuellement en préparation et dans laquelle je signe en quatrième auteur. Un résumé de cette publication est présenté ici.

Role of low molecular weight fucoidan in syndecan-1 and -4 cell expression and heparan sulfate biosynthesis.

O Haddad¹, E Guyot^{1,2}, N Marinval¹, F Chevalier³, L Gadi¹, L Maillard¹, O Oudar¹, A Sutton^{1,2}, N Charnaux^{1,2*}, H Hlawaty^{1*}

* Equal contribution

¹ Inserm, U698, Bio-ingénierie Cardiovasculaire, UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France

² Laboratoire de Biochimie, Hôpital Jean Verdier AP-HP, Bondy, France

³ EAC CNRS 7149, CRRET laboratory, Paris-Est Creteil University, Sciences and Technology Faculty, 61, Avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil Cedex, France

Corresponding author:

Dr Hanna Hlawaty

Inserm U698, UFR SMBH - Université Paris 13
Cardiovascular Bioengineering,
74 rue Marcel Cachin, 93017
Bobigny Cedex, France

E-mail: hanna.hlawaty@univ-paris13.fr

Telephone number: (33) 1.48.38.85.14

Summary

Therapeutic induction of angiogenesis is a potential treatment for chronic ischemia. Low molecular weight fucoidan (LMWF), a sulfated polysaccharide from brown seaweeds that mimics some biological activity of heparin, has been shown to promote revascularization in a rat critical hindlimb ischemia. Furthermore, fucoidan can induce endothelial colony-forming cells (ECFC) to adopt an angiogenic phenotype *in vitro* and greatly increases angiogenesis *in vivo*. We have previously demonstrated that LMWF prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix-metalloproteinase-2 expression. It increased HUV-EC-C migration but decreased vascular smooth muscle cell migration (Hlawaty *et al Biochem Pharmacol*, 2011). In this study, we hypothesized that LMWF could also modify the amount and the distribution of heparan sulfate (HS) chains exposed at the endothelial cell surface and of two major heparan sulfate membrane proteoglycans, namely the syndecan-1 and -4 (SDC-1 and SDC-4). These molecules consist of a protein core and unique sulfated carbohydrate chains of glycosaminoglycans (GAGs) covalently bound with it. SDCs are expressed in a developmental-, cell-type-, and tissue-specific manner. They are involved in cell spreading and they are associated to cell cytoskeletal rearrangement leading to cell migration. Biosynthesis of a HS is a complex process involving enzymes responsible for chain polymerization (EXT1 and EXT2) and also enzymes responsible for chain degradation (heparanase HPSE). The over-expression of HPSE by tumors may activate tumor angiogenesis through various mechanisms in addition to promoting the release of growth factor-decorated HS fragments. Recently, Wang *et al* have demonstrated that the complex EXT1/EXT2 regulates the motility of mouse osteosarcoma cell lines via heparanase. The aim of this study was to investigate the effects of LMWF on SDC-1 and -4 cell expression and on HS biosynthesis enzymes including heparanase.

Our results showed that LMWF increases endothelial cell migration, spreading and capillary tube formation. We have also reported that LMWF decreased the amount of HS chains exposed at the membrane of endothelial cells probably by decreasing the mRNA and protein level of EXT2, whereas the level of mRNA encoding for EXT1 was unaffected. The spreading, migration and capillary tube formation of LMWF-treated cells transfected with *Ext2* siRNA or *Ext2* siRNA was reduced as compared to untreated cells. Moreover, reduced levels of HS synthases in LMWF-treated cells were considered to be responsible for the low expression of HS. Alternatively, the low levels of HS in LMWF-treated cells may also be attributable to the expression of the HS-degrading enzyme, HPSE. Quantitative PCR and western blotting assays showed that, *HPSE* mRNA and protein expression were increased in LMWF-treated cells. Interestingly, HPSE activity was also increased in the lysate of LMWF-treated cells. To clarify the contribution of HPSE to biological effects in HUV-EC-C cells, *HPSE* siRNA-transfected cells were assessed for migration, spreading and capillary tube formation assays. The results showed that, *HPSE* siRNA-transfection decrease cell migration and spreading, however, they were unaffected in *HPSE* siRNA-transfected and LMWF-treated cells. In contrast, HUV-EC-C capillary tube length was enhanced in *HPSE* siRNA-transfected and LMWF-treated cells. In addition, we evidenced that LMWF changed the distribution of SDCs expression on HUV-EC-Cs. Strikingly, LMWF increased the level of SDC-1 mRNA and protein expression, assayed by quantitative PCR and western blot, whereas both are decreased for SDC-4. Moreover, HUV-EC-C spreading, migration and capillary tube formation induced by LMWF were decreased in siRNA SDC-1 and SDC-4-transfected, as assayed in wound healing and Boyden chamber assays.

Altogether, these data suggest that SDC-1 and SDC-4 may participate at least partly to LMWF-induced biological effects in HU-VE-C cells.

REFERENCES

1. Shamma, N.W., *Epidemiology, classification, and modifiable risk factors of peripheral arterial disease*. Vasc Health Risk Manag, 2007. **3**(2): p. 229-34.
2. *Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia*. Circulation, 1991. **84**(4 Suppl): p. IV1-26.
3. Norgren, L., et al., *Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II)*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2007. **33** Suppl 1: p. S1-75.
4. Novo, S., G. Coppola, and G. Milio, *Critical limb ischemia: definition and natural history*. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2004. **4**(3): p. 219-25.
5. Eneroth, M., et al., *Operations, total hospital stay and costs of critical leg ischemia. A population-based longitudinal outcome study of 321 patients*. Acta Orthop Scand, 1996. **67**(5): p. 459-65.
6. Tortora, G.J., S.R. Grabowski, and J.-C. Parent, *Principes d'anatomie et de physiologie*. Anat.Physio. 1994, Montréal: DeBoeck Université.
7. Bottinelli, R. and C. Reggiani, *Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity*. Prog Biophys Mol Biol, 2000. **73**(2-4): p. 195-262.
8. Gillies, A.R. and R.L. Lieber, *Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix*. Muscle Nerve, 2011. **44**(3): p. 318-31.
9. Light, N. and A.E. Champion, *Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens*. Biochem J, 1984. **219**(3): p. 1017-26.
10. Hedbom, E. and D. Heinegard, *Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens*. J Biol Chem, 1993. **268**(36): p. 27307-12.
11. Brandan, E. and N.C. Inestrosa, *Isolation of the heparan sulfate proteoglycans from the extracellular matrix of rat skeletal muscle*. J Neurobiol, 1987. **18**(3): p. 271-82.
12. Buckingham, M., *Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates*. Curr Opin Genet Dev, 2006. **16**(5): p. 525-32.
13. Edmondson, D.G. and E.N. Olson, *Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription*. J Biol Chem, 1993. **268**(2): p. 755-8.
14. Rudnicki, M.A., et al., *MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1351-9.
15. Wright, W.E., D.A. Sassoon, and V.K. Lin, *Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD*. Cell, 1989. **56**(4): p. 607-17.
16. Gossett, L.A., et al., *A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(11): p. 5022-33.
17. Buckingham, M., et al., *The formation of skeletal muscle: from somite to limb*. J Anat, 2003. **202**(1): p. 59-68.
18. Relaix, F., et al., *Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells*. J Cell Biol, 2006. **172**(1): p. 91-102.
19. Bladt, F., et al., *Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud*. Nature, 1995. **376**(6543): p. 768-71.
20. Yang, X.M., et al., *Expression of the met receptor tyrosine kinase in muscle progenitor cells in somites and limbs is absent in Splotch mice*. Development, 1996. **122**(7): p. 2163-71.
21. Relaix, F., et al., *A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells*. Nature, 2005. **435**(7044): p. 948-53.
22. Charge, S.B. and M.A. Rudnicki, *Cellular and molecular regulation of muscle regeneration*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 209-38.
23. Mauro, A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. J Biophys Biochem Cytol, 1961. **9**: p. 493-5.
24. Schultz, E., M.C. Gibson, and T. Champion, *Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study*. J Exp Zool, 1978. **206**(3): p. 451-6.

25. Hawke, T.J. and D.J. Garry, *Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology*. J Appl Physiol, 2001. **91**(2): p. 534-51.
26. Schmalbruch, H. and U. Hellhammer, *The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells*. Anat Rec, 1977. **189**(2): p. 169-75.
27. Christov, C., et al., *Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(4): p. 1397-409.
28. Luque, E., et al., *Capillary supply during development of individual regenerating muscle fibers*. Anat Histol Embryol, 1995. **24**(2): p. 87-9.
29. Scholz, D., et al., *Angiogenesis and myogenesis as two facets of inflammatory post-ischemic tissue regeneration*. Mol Cell Biochem, 2003. **246**(1-2): p. 57-67.
30. Rhoads, R.P., et al., *Satellite cell-mediated angiogenesis in vitro coincides with a functional hypoxia-inducible factor pathway*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **296**(6): p. C1321-8.
31. Abou-Khalil, R., R. Mounier, and B. Chazaud, *Regulation of myogenic stem cell behavior by vessel cells: the "menage a trois" of satellite cells, periendothelial cells and endothelial cells*. Cell Cycle, 2010. **9**(5): p. 892-6.
32. Steinau, H.U., *Major limb replantation and postischemia syndrome: investigation of acute ischemia-induced myopathy and reperfusion injury*. 1988, New York: Springer Verlag.
33. Petrasek, P.F., S. Homer-Vanniasinkam, and P.M. Walker, *Determinants of ischemic injury to skeletal muscle*. J Vasc Surg, 1994. **19**(4): p. 623-31.
34. Beckman, J.S., et al., *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(4): p. 1620-4.
35. Carmeli, E., et al., *Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review*. Muscle Nerve, 2004. **29**(2): p. 191-7.
36. Dirnagl, U., C. Iadecola, and M.A. Moskowitz, *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view*. Trends Neurosci, 1999. **22**(9): p. 391-7.
37. Iadecola, C., *Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury*. Trends Neurosci, 1997. **20**(3): p. 132-9.
38. Hammersen, F., et al., *The ultrastructure of microvessels and their contents following ischemia and reperfusion*. Prog Appl Microcirc., 1989. **13**: p. 1-26.
39. Sexton, W.L., R.J. Korthuis, and M.H. Laughlin, *Ischemia-reperfusion injury in isolated rat hindquarters*. J Appl Physiol, 1990. **68**(1): p. 387-92.
40. Kurose, I., et al., *Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage*. Circ Res, 1994. **74**(2): p. 336-43.
41. Lu, Y.T., P.G. Hellewell, and T.W. Evans, *Ischemia-reperfusion lung injury: contribution of ischemia, neutrophils, and hydrostatic pressure*. Am J Physiol, 1997. **273**(1 Pt 1): p. L46-54.
42. Bodine-Fowler, S., *Skeletal muscle regeneration after injury: an overview*. J Voice, 1994. **8**(1): p. 53-62.
43. Ruscher, K., et al., *Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons*. Neurosci Lett, 1998. **254**(2): p. 117-20.
44. Lindsberg, P.J., et al., *Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke*. Circulation, 1996. **94**(5): p. 939-45.
45. Zhang, R., et al., *The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion*. Brain Res, 1998. **785**(2): p. 207-14.
46. Zhang, Z., et al., *Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia*. Brain Res, 1998. **784**(1-2): p. 210-7.
47. Kyriakides, C., et al., *Skeletal muscle reperfusion injury is mediated by neutrophils and the complement membrane attack complex*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. C1263-8.

48. Lieber, R.L., et al., *Contractile and cellular remodeling in rabbit skeletal muscle after cyclic eccentric contractions*. J Appl Physiol, 1994. **77**(4): p. 1926-34.
49. Linder, E., V.P. Lehto, and S. Stenman, *Activation of complement by cytoskeletal intermediate filaments*. Nature, 1979. **278**(5700): p. 176-8.
50. Pizza, F.X., et al., *Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions*. J Appl Physiol, 2002. **92**(5): p. 1873-8.
51. Teixeira, C.F., et al., *Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with Bothrops asper snake venom*. Muscle Nerve, 2003. **28**(4): p. 449-59.
52. Jolly, S.R., et al., *Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion*. Am Heart J, 1986. **112**(4): p. 682-90.
53. Korthuis, R.J., M.B. Grisham, and D.N. Granger, *Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle*. Am J Physiol, 1988. **254**(5 Pt 2): p. H823-7.
54. Pizza, F.X., et al., *Neutrophils injure cultured skeletal myotubes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(1): p. C335-41.
55. Tiidus, P.M., *Radical species in inflammation and overtraining*. Can J Physiol Pharmacol, 1998. **76**(5): p. 533-8.
56. Chazaud, B., et al., *Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth*. J Cell Biol, 2003. **163**(5): p. 1133-43.
57. McLennan, I.S., *Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions*. J Anat, 1996. **188 (Pt 1)**: p. 17-28.
58. Chazaud, B., et al., *Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration*. Exerc Sport Sci Rev, 2009. **37**(1): p. 18-22.
59. Tidball, J.G. and S.A. Villalta, *Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **298**(5): p. R1173-87.
60. McLennan, I.S., *Resident macrophages (ED2- and ED3-positive) do not phagocytose degenerating rat skeletal muscle fibres*. Cell Tissue Res, 1993. **272**(1): p. 193-6.
61. St Pierre, B.A. and J.G. Tidball, *Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension*. J Appl Physiol, 1994. **77**(1): p. 290-7.
62. Siwik, D.A., D.L. Chang, and W.S. Colucci, *Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro*. Circ Res, 2000. **86**(12): p. 1259-65.
63. Biffl, W.L., et al., *Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor*. J Trauma, 1996. **40**(4): p. 575-8; discussion 578-9.
64. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
65. Sonnet, C., et al., *Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 12): p. 2497-507.
66. Cantini, M. and U. Carraro, *Macrophage-released factor stimulates selectively myogenic cells in primary muscle culture*. J Neuropathol Exp Neurol, 1995. **54**(1): p. 121-8.
67. Cantini, M., et al., *Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo*. Neurol Sci, 2002. **23**(4): p. 189-94.
68. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, *The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(2): p. 184-95.
69. Frangogiannis, N.G., et al., *IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury*. J Immunol, 2000. **165**(5): p. 2798-808.

70. Lacraz, S., et al., *IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes*. J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2304-10.
71. Tatsumi, R., et al., *Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(6): p. C1487-94.
72. Hurme, T., et al., *Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study*. Med Sci Sports Exerc, 1991. **23**(7): p. 801-10.
73. Plaghki, L., [*Regeneration and myogenesis of striated muscle*]. J Physiol (Paris), 1985. **80**(2): p. 51-110.
74. Sartore, S., L. Gorza, and S. Schiaffino, *Fetal myosin heavy chains in regenerating muscle*. Nature, 1982. **298**(5871): p. 294-6.
75. Seale, P. and M.A. Rudnicki, *A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells*. Dev Biol, 2000. **218**(2): p. 115-24.
76. Grounds, M.D., *Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **854**: p. 78-91.
77. Rosenblatt, J.D., D. Yong, and D.J. Parry, *Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle*. Muscle Nerve, 1994. **17**(6): p. 608-13.
78. Whalen, R.G., et al., *Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles*. Dev Biol, 1990. **141**(1): p. 24-40.
79. d'Albis, A., et al., *Myosin isoform transitions in regeneration of fast and slow muscles during postnatal development of the rat*. Dev Biol, 1989. **135**(2): p. 320-5.
80. Zammit, P.S., et al., *Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?* J Cell Biol, 2004. **166**(3): p. 347-57.
81. Talmadge, R.J., *Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms*. Muscle Nerve, 2000. **23**(5): p. 661-79.
82. Midrio, M., *The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review*. Eur J Appl Physiol, 2006. **98**(1): p. 1-21.
83. Sanes, J.R., L.M. Marshall, and U.J. McMahan, *Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. Differentiation of regenerating axons at original synaptic sites*. J Cell Biol, 1978. **78**(1): p. 176-98.
84. Langenfeld-Oster, B., et al., *Polyclonal antibodies against NCAM and tenascin delay endplate reinnervation*. J Neurocytol, 1994. **23**(10): p. 591-604.
85. Grubb, B.D., J.B. Harris, and I.S. Schofield, *Neuromuscular transmission at newly formed neuromuscular junctions in the regenerating soleus muscle of the rat*. J Physiol, 1991. **441**: p. 405-21.
86. Jirmanova, I. and S. Thesleff, *Ultrastructural study of experimental muscle degeneration and regeneration in the adult rat*. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1972. **131**(1): p. 77-97.
87. Luo, F., et al., *Vascular growth factor expression in a rat model of severe limb ischemia*. J Surg Res, 2002. **108**(2): p. 258-67.
88. Rissanen, T.T., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration*. Am J Pathol, 2002. **160**(4): p. 1393-403.
89. Tuomisto, T.T., et al., *HIF-VEGF-VEGFR-2, TNF-alpha and IGF pathways are upregulated in critical human skeletal muscle ischemia as studied with DNA array*. Atherosclerosis, 2004. **174**(1): p. 111-20.
90. Carlson, B.M. and J.A. Faulkner, *The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review*. Med Sci Sports Exerc, 1983. **15**(3): p. 187-98.
91. Zador, E., et al., *Expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-transport ATPase protein isoforms during regeneration from notexin-induced necrosis of rat soleus muscle*. Acta Histochem, 1998. **100**(4): p. 355-69.

92. Zador, E. and F. Wuytack, *Expression of SERCA2a is independent of innervation in regenerating soleus muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(4): p. C853-61.
93. Germinario, E., et al., *Expression of sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase slow (SERCA2) isoform in regenerating rat soleus skeletal muscle depends on nerve impulses*. Exp Physiol, 2002. **87**(5): p. 575-83.
94. Carosio, S., et al., *Impact of ageing on muscle cell regeneration*. Ageing Res Rev, 2011. **10**(1): p. 35-42.
95. Gill, S.E. and W.C. Parks, *Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1334-47.
96. Goetsch, S.C., et al., *Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration*. Physiol Genomics, 2003. **14**(3): p. 261-71.
97. Kherif, S., et al., *Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles*. Dev Biol, 1999. **205**(1): p. 158-70.
98. Zimowska, M., et al., *Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo*. Int J Dev Biol, 2008. **52**(2-3): p. 307-14.
99. Bellayr, I., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition negatively affects muscle stem cell behavior*. Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(2): p. 124-41.
100. Lei, H., et al., *Matrix-metalloproteinase 13 (MMP-13) is a new contributor to skeletal muscle regeneration and critical for myoblast migration*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013.
101. Gasparyan, A.Y., T. Watson, and G.Y. Lip, *The role of aspirin in cardiovascular prevention: implications of aspirin resistance*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(19): p. 1829-43.
102. McAuliffe, S.J., J.A. Moors, and H.B. Jones, *Comparative effects of anti-platelet agents as adjuncts to tissue plasminogen activator in a dog model of occlusive coronary thrombosis*. Br J Pharmacol, 1994. **112**(1): p. 272-6.
103. Savi, P., et al., *Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel*. Thromb Haemost, 2000. **84**(5): p. 891-6.
104. Gresele, P., et al., *Mechanism of the antiplatelet action of dipyridamole in whole blood: modulation of adenosine concentration and activity*. Thromb Haemost, 1986. **55**(1): p. 12-8.
105. Harker, L.A. and R.A. Kadatz, *Mechanism of action of dipyridamole*. Thromb Res Suppl, 1983. **4**: p. 39-46.
106. Rosenson, R.S., *Treatment with aspirin and dipyridamole is more effective than aspirin in reducing low shear blood viscosity*. Microcirculation, 2008. **15**(7): p. 615-20.
107. Chakrabarti, S., et al., *The effect of dipyridamole on vascular cell-derived reactive oxygen species*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(2): p. 494-500.
108. Adam, D.J., et al., *Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial*. Lancet, 2005. **366**(9501): p. 1925-34.
109. Nakagawa, M., et al., *A decline in platelet activation and inflammatory cell infiltration is associated with the phenotypic redifferentiation of neointimal smooth muscle cells after bare-metal stent implantation in acute coronary syndrome*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(7): p. 675-87.
110. Slovit, D.P. and T.M. Sullivan, *Critical limb ischemia: medical and surgical management*. Vasc Med, 2008. **13**(3): p. 281-91.
111. Minar, E., *Critical limb ischaemia*. Hamostaseologie, 2009. **29**(1): p. 102-9.
112. Sobel, M. and R. Verhaeghe, *Antithrombotic therapy for peripheral artery occlusive disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)*. Chest, 2008. **133**(6 Suppl): p. 815S-843S.
113. Raval, Z. and D.W. Losordo, *Cell therapy of peripheral arterial disease: from experimental findings to clinical trials*. Circ Res, 2011. **112**(9): p. 1288-302.

114. Madonna, R. and G. Rokosh, *Insights into gene therapy for critical limb ischemia: the devil is in the details*. *Vascul Pharmacol*, 2012. **57**(1): p. 10-4.
115. Germani, A., et al., *Regenerative therapy in peripheral artery disease*. *Cardiovasc Ther*, 2009. **27**(4): p. 289-304.
116. Wolff, J.A., et al., *Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle*. *J Cell Sci*, 1992. **103 (Pt 4)**: p. 1249-59.
117. Rizzuto, G., et al., *Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(11): p. 6417-22.
118. Tsurumi, Y., et al., *Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion*. *Circulation*, 1996. **94**(12): p. 3281-90.
119. Kuliszewski, M.A., et al., *Vascular gene transfer of SDF-1 promotes endothelial progenitor cell engraftment and enhances angiogenesis in ischemic muscle*. *Mol Ther*, 2011. **19**(5): p. 895-902.
120. Nabel, E.G. and G.J. Nabel, *Complex models for the study of gene function in cardiovascular biology*. *Annu Rev Physiol*, 1994. **56**: p. 741-61.
121. Olea, F.D., et al., *Repeated, but not single, VEGF gene transfer affords protection against ischemic muscle lesions in rabbits with hindlimb ischemia*. *Gene Ther*, 2009. **16**(6): p. 716-23.
122. Baumgartner, I., et al., *Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia*. *Circulation*, 1998. **97**(12): p. 1114-23.
123. Gu, Y., et al., *A phase I clinical study of naked DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor to treat patients with critical limb ischemia*. *J Gene Med*, 2011. **13**(11): p. 602-10.
124. Crystal, R.G., *Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success*. *Science*, 1995. **270**(5235): p. 404-10.
125. Negishi, Y., et al., *Delivery of an angiogenic gene into ischemic muscle by novel bubble liposomes followed by ultrasound exposure*. *Pharm Res*, 2011. **28**(4): p. 712-9.
126. Ouboter, D.D., et al., *Multicompartment micelle-structured peptide nanoparticles: A new biocompatible gene- and drug-delivery tool*. *J Biomed Mater Res A*, 2013.
127. Chen, S., et al., *Bioreducible Polypeptide Containing Cell-Penetrating Sequence for Efficient Gene Delivery*. *Pharm Res*, 2013.
128. Shimpo, M., et al., *AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model*. *Cardiovasc Res*, 2002. **53**(4): p. 993-1001.
129. Makarevich, P., et al., *Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e38776.
130. Wilson, J.M., *Adenoviruses as gene-delivery vehicles*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(18): p. 1185-7.
131. Chu, H. and Y. Wang, *Therapeutic angiogenesis: controlled delivery of angiogenic factors*. *Ther Deliv*, 2012. **3**(6): p. 693-714.
132. Formiga, F.R., et al., *Angiogenic therapy for cardiac repair based on protein delivery systems*. *Heart Fail Rev*, 2012. **17**(3): p. 449-73.
133. Lederman, R.J., et al., *Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial*. *Lancet*, 2002. **359**(9323): p. 2053-8.
134. Ruvinov, E., J. Leor, and S. Cohen, *The effects of controlled HGF delivery from an affinity-binding alginate biomaterial on angiogenesis and blood perfusion in a hindlimb ischemia model*. *Biomaterials*, 2010. **31**(16): p. 4573-82.

135. Miyagi, Y., et al., *Biodegradable collagen patch with covalently immobilized VEGF for myocardial repair*. *Biomaterials*, 2011. **32**(5): p. 1280-90.
136. Nillesen, S.T., et al., *Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF*. *Biomaterials*, 2007. **28**(6): p. 1123-31.
137. Ehrbar, M., et al., *Endothelial cell proliferation and progenitor maturation by fibrin-bound VEGF variants with differential susceptibilities to local cellular activity*. *J Control Release*, 2005. **101**(1-3): p. 93-109.
138. Tang, D.W., et al., *Heparinized chitosan/poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles for multi-functional delivery of fibroblast growth factor and heparin*. *Biomaterials*, 2010. **31**(35): p. 9320-32.
139. Phelps, E.A., et al., *Bioartificial matrices for therapeutic vascularization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(8): p. 3323-8.
140. Zisch, A.H., M.P. Lutolf, and J.A. Hubbell, *Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors*. *Cardiovasc Pathol*, 2003. **12**(6): p. 295-310.
141. Nussbaum, J., et al., *Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response*. *FASEB J*, 2007. **21**(7): p. 1345-57.
142. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-76.
143. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(10): p. 2566-73.
144. Al-Khaldi, A., et al., *Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model*. *Ann Thorac Surg*, 2003. **75**(1): p. 204-9.
145. Liew, A. and T. O'Brien, *Therapeutic potential for mesenchymal stem cell transplantation in critical limb ischemia*. *Stem Cell Res Ther*, 2012. **3**(4): p. 28.
146. Uemura, R., et al., *Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling*. *Circ Res*, 2006. **98**(11): p. 1414-21.
147. Dow, J., et al., *Washout of transplanted cells from the heart: a potential new hurdle for cell transplantation therapy*. *Cardiovasc Res*, 2005. **67**(2): p. 301-7.
148. Maurel, A., et al., *Can cold or heat shock improve skeletal myoblast engraftment in infarcted myocardium?* *Transplantation*, 2005. **80**(5): p. 660-5.
149. Myllyharju, J. and K.I. Kivirikko, *Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms*. *Trends Genet*, 2004. **20**(1): p. 33-43.
150. Chothia, C. and E.Y. Jones, *The molecular structure of cell adhesion molecules*. *Annu Rev Biochem*, 1997. **66**: p. 823-62.
151. Mithieux, S.M. and A.S. Weiss, *Elastin*. *Adv Protein Chem*, 2005. **70**: p. 437-61.
152. Moore, J. and S. Thibeault, *Insights into the role of elastin in vocal fold health and disease*. *J Voice*, 2012. **26**(3): p. 269-75.
153. Rosenbloom, J., W.R. Abrams, and R. Mecham, *Extracellular matrix 4: the elastic fiber*. *FASEB J*, 1993. **7**(13): p. 1208-18.
154. Iozzo, R.V., *Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 609-52.
155. Verzijl, N., et al., *Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(50): p. 39027-31.
156. Powell, J.T., N. Vine, and M. Crossman, *On the accumulation of D-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta*. *Atherosclerosis*, 1992. **97**(2-3): p. 201-8.
157. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001. **17**: p. 463-516.
158. Marastoni, S., et al., *Extracellular matrix: a matter of life and death*. *Connect Tissue Res*, 2008. **49**(3): p. 203-6.

159. Papy-Garcia, D., et al., *Glycosaminoglycans, protein aggregation and neurodegeneration*. *Curr Protein Pept Sci*, 2011. **12**(3): p. 258-68.
160. Fischer, G. and C. Boedeker, *Künstliche Bildung von Zucker aus Knorpel (Chondrogen), und über die Umsetzung des genossenen Knorpels im menschlichen Körper*. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1861. **117**(1): p. 111–118.
161. Howell, W.H., *The isolation of heparin from the liver*. *Science*, 1927. **3**.
162. Meyer, K. and J.W. Palmer, *The polysaccharide of the vitreous humor*. *J Biol Chem*, 1934. **107**: p. 629-634.
163. Meyer, K. and E. Chaffee, *The mucopolysaccharides of skin*. *J Biol Chem*, 1941. **138**: p. 491-499.
164. Meyer, K., et al., *The mucopolysaccharides of bovine cornea*. *J Biol Chem*, 1953. **205**(2): p. 611-616.
165. Lindahl, U., et al., *Structure of the antithrombin-binding site in heparin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(7): p. 3198-202.
166. Lindahl, U., et al., *Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(11): p. 6551-5.
167. Rosenberg, R.D. and L. Lam, *Correlation between structure and function of heparin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(3): p. 1218-22.
168. Feizi, T. and B. Mulloy, *Carbohydrates and glycoconjugates. Glycomics: the new era of carbohydrate biology*. *Curr Opin Struct Biol*, 2003. **13**(5): p. 602-4.
169. Esko, J.D., K. Kimata, and U. Lindahl, *Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans, in Essentials of Glycobiology*, C.R. Varki A, Esko JD, et al., Editor. 2009, Cold Spring Harbor: New York.
170. Zhang, L., G. David, and J.D. Esko, *Repetitive Ser-Gly sequences enhance heparan sulfate assembly in proteoglycans*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(45): p. 27127-35.
171. Lind, T., et al., *The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(41): p. 26265-8.
172. McCormick, C., et al., *The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(2): p. 668-73.
173. Pikas, D.S., I. Eriksson, and L. Kjellen, *Overexpression of different isoforms of glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase results in distinct heparan sulfate N-sulfation patterns*. *Biochemistry*, 2000. **39**(15): p. 4552-8.
174. Holmborn, K., et al., *Heparan sulfate synthesized by mouse embryonic stem cells deficient in NDST1 and NDST2 is 6-O-sulfated but contains no N-sulfate groups*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(41): p. 42355-8.
175. Grobe, K., et al., *Heparan sulfate and development: differential roles of the N-acetylglucosamine N-deacetylase/N-sulfotransferase isozymes*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1573**(3): p. 209-15.
176. Westling, C. and U. Lindahl, *Location of N-unsubstituted glucosamine residues in heparan sulfate*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(51): p. 49247-55.
177. Kusche-Gullberg, M. and L. Kjellen, *Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis*. *Curr Opin Struct Biol*, 2003. **13**(5): p. 605-11.
178. Crawford, B.E., et al., *Cloning, Golgi localization, and enzyme activity of the full-length heparin/heparan sulfate-glucuronic acid C5-epimerase*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(24): p. 21538-43.
179. Jemth, P., et al., *Oligosaccharide library-based assessment of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase substrate specificity*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(27): p. 24371-6.

180. Razi, N. and U. Lindahl, *Biosynthesis of heparin/heparan sulfate. The D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase reaction: target and inhibitor saccharides*. J Biol Chem, 1995. **270**(19): p. 11267-75.
181. Rong, J., et al., *Substrate specificity of the heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfotransferase*. Biochemistry, 2001. **40**(18): p. 5548-55.
182. Pinhal, M.A., et al., *Enzyme interactions in heparan sulfate biosynthesis: uronosyl 5-epimerase and 2-O-sulfotransferase interact in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 12984-9.
183. Turnbull, J.E. and J.T. Gallagher, *Sequence analysis of heparan sulphate indicates defined location of N-sulphated glucosamine and iduronate 2-sulphate residues proximal to the protein-linkage region*. Biochem J, 1991. **277 (Pt 2)**: p. 297-303.
184. Lindahl, U., M. Kusche-Gullberg, and L. Kjellen, *Regulated diversity of heparan sulfate*. J Biol Chem, 1998. **273**(39): p. 24979-82.
185. Ferro, D.R., et al., *Conformer populations of L-iduronic acid residues in glycosaminoglycan sequences*. Carbohydr Res, 1990. **195**(2): p. 157-67.
186. Ueno, M., et al., *Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 29134-40.
187. Kitagawa, H., T. Uyama, and K. Sugahara, *Molecular cloning and expression of a human chondroitin synthase*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38721-6.
188. Yada, T., et al., *Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 39711-25.
189. Yada, T., et al., *Chondroitin sulfate synthase-2. Molecular cloning and characterization of a novel human glycosyltransferase homologous to chondroitin sulfate glucuronyltransferase, which has dual enzymatic activities*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 30235-47.
190. Kitagawa, H., et al., *Molecular cloning of a chondroitin polymerizing factor that cooperates with chondroitin synthase for chondroitin polymerization*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23666-71.
191. Izumikawa, T., et al., *Involvement of chondroitin sulfate synthase-3 (chondroitin synthase-2) in chondroitin polymerization through its interaction with chondroitin synthase-1 or chondroitin-polymerizing factor*. Biochem J, 2007. **403**(3): p. 545-52.
192. Maccarana, M., et al., *Biosynthesis of dermatan sulfate: chondroitin-glucuronate C5-epimerase is identical to SART2*. J Biol Chem, 2006. **281**(17): p. 11560-8.
193. Ito, Y. and O. Habuchi, *Purification and characterization of N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase from the squid cartilage*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34728-36.
194. Evers, M.R., et al., *Molecular cloning and characterization of a dermatan-specific N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferase*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36344-53.
195. Miller, M.J., et al., *A tandem mass spectrometric approach to determination of chondroitin/dermatan sulfate oligosaccharide glycoforms*. Glycobiology, 2006. **16**(6): p. 502-13.
196. Sugahara, K., et al., *Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate*. Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(5): p. 612-20.
197. Sarrazin, S., *Caractérisation des interactions glycosaminoglycannes/protéines dans le but de développer des molécules d'intérêt thérapeutique: exemples de l'Endocan et de l'interféron gamma*. 2007, Joseph Fourier: Grenoble. p. 412.
198. Funderburgh, J.L., *Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function*. Glycobiology, 2000. **10**(10): p. 951-8.
199. Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi, *Hyaluronan synthases*. J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.

200. Itano, N. and K. Kimata, *Mammalian hyaluronan synthases*. IUBMB Life, 2002. **54**(4): p. 195-9.
201. Itano, N., et al., *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 25085-92.
202. Prabhakar, V. and R. Sasisekharan, *The biosynthesis and catabolism of galactosaminoglycans*. Adv Pharmacol, 2006. **53**: p. 69-115.
203. Kaneiwa, T., et al., *Identification of human hyaluronidase-4 as a novel chondroitin sulfate hydrolase that preferentially cleaves the galactosaminidic linkage in the trisulfated tetrasaccharide sequence*. Glycobiology, 2009. **20**(3): p. 300-9.
204. Lepperdinger, G., J. Mullegger, and G. Kreil, *Hyal2--less active, but more versatile?* Matrix Biol, 2001. **20**(8): p. 509-14.
205. Knudson, W., G. Chow, and C.B. Knudson, *CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan*. Matrix Biol, 2002. **21**(1): p. 15-23.
206. Stern, R., *Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway*. Eur J Cell Biol, 2004. **83**(7): p. 317-25.
207. Fuller, M., et al., *A defect in exodegradative pathways provides insight into endodegradation of heparan and dermatan sulfates*. Glycobiology, 2006. **16**(4): p. 318-25.
208. Elkin, M., et al., *Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action*. FASEB J, 2001. **15**(9): p. 1661-3.
209. Ramani, V.C., et al., *Heparanase plays a dual role in driving hepatocyte growth factor (HGF) signaling by enhancing HGF expression and activity*. J Biol Chem, 2011. **286**(8): p. 6490-9.
210. Gilat, D., et al., *Regulation of adhesion of CD4+ T lymphocytes to intact or heparinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta*. J Immunol, 1994. **153**(11): p. 4899-906.
211. Vaday, G.G. and O. Lider, *Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(2): p. 149-59.
212. Roy, M. and D. Marchetti, *Cell surface heparan sulfate released by heparanase promotes melanoma cell migration and angiogenesis*. J Cell Biochem, 2009. **106**(2): p. 200-9.
213. Jenniskens, G.J., J.H. Veerkamp, and T.H. van Kuppevelt, *Heparan sulfates in skeletal muscle development and physiology*. J Cell Physiol, 2006. **206**(2): p. 283-94.
214. Toole, B.P., *Hyaluronan in morphogenesis*. Semin Cell Dev Biol, 2001. **12**(2): p. 79-87.
215. Lin, X. and N. Perrimon, *Role of heparan sulfate proteoglycans in cell-cell signaling in Drosophila*. Matrix Biol, 2000. **19**(4): p. 303-7.
216. Capila, I. and R.J. Linhardt, *Heparin-protein interactions*. Angew Chem Int Ed Engl, 2002. **41**(3): p. 391-412.
217. Nadanaka, S. and H. Kitagawa, *Heparan sulphate biosynthesis and disease*. J Biochem, 2008. **144**(1): p. 7-14.
218. Stringer, S.E., M.S. Nelson, and P. Gupta, *Identification of an MIP-1alpha -binding heparan sulfate oligosaccharide that supports long-term in vitro maintenance of human LTC-ICs*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2243-5.
219. Vives, R.R., et al., *A kinetics and modeling study of RANTES(9-68) binding to heparin reveals a mechanism of cooperative oligomerization*. Biochemistry, 2002. **41**(50): p. 14779-89.
220. Najjam, S., et al., *Further characterization of the binding of human recombinant interleukin 2 to heparin and identification of putative binding sites*. Glycobiology, 1998. **8**(5): p. 509-16.
221. Spillmann, D., D. Witt, and U. Lindahl, *Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate*. J Biol Chem, 1998. **273**(25): p. 15487-93.
222. Salek-Ardakani, S., et al., *Heparin and heparan sulfate bind interleukin-10 and modulate its activity*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1879-88.
223. Butcher, E.C., *Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1033-6.

224. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
225. Marshall, L.J., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 supports IL-8-mediated neutrophil transendothelial migration by inhibition of the constitutive shedding of endothelial IL-8/heparan sulfate/syndecan-1 complexes*. J Immunol, 2003. **171**(4): p. 2057-65.
226. Halden, Y., et al., *Interleukin-8 binds to syndecan-2 on human endothelial cells*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 2): p. 533-8.
227. Wang, L., et al., *Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 902-10.
228. Axelsson, J., et al., *Inactivation of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase accentuates neutrophil infiltration during acute inflammation in mice*. Blood, 2012. **120**(8): p. 1742-51.
229. Proudfoot, A.E., et al., *Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1885-90.
230. Suffee, N., et al., *RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans*. Angiogenesis, 2012. **15**(4): p. 727-44.
231. Johnson, Z., A.E. Proudfoot, and T.M. Handel, *Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(6): p. 625-36.
232. Boukpepsi, T., et al., *The effect of stromelysin-1 (MMP-3) on non-collagenous extracellular matrix proteins of demineralized dentin and the adhesive properties of restorative resins*. Biomaterials, 2008. **29**(33): p. 4367-73.
233. Moreth, K., et al., *The proteoglycan biglycan regulates expression of the B cell chemoattractant CXCL13 and aggravates murine lupus nephritis*. J Clin Invest, 2010. **120**(12): p. 4251-72.
234. Schaefer, L., et al., *The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2223-33.
235. Babelova, A., et al., *Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors*. J Biol Chem, 2009. **284**(36): p. 24035-48.
236. Moreth, K., R.V. Iozzo, and L. Schaefer, *Small leucine-rich proteoglycans orchestrate receptor crosstalk during inflammation*. Cell Cycle, 2012. **11**(11): p. 2084-91.
237. Merline, R., et al., *Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21*. Sci Signal, 2011. **4**(199): p. ra75.
238. Tufvesson, E. and G. Westergren-Thorsson, *Tumour necrosis factor-alpha interacts with biglycan and decorin*. FEBS Lett, 2002. **530**(1-3): p. 124-8.
239. Hildebrand, A., et al., *Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta*. Biochem J, 1994. **302** (Pt 2): p. 527-34.
240. Kim, S., et al., *Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis*. Nature, 2009. **457**(7225): p. 102-6.
241. Vij, N., et al., *Lumican regulates corneal inflammatory responses by modulating Fas-Fas ligand signaling*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(1): p. 88-95.
242. Carlson, E.C., et al., *Keratocan and lumican regulate neutrophil infiltration and corneal clarity in lipopolysaccharide-induced keratitis by direct interaction with CXCL1*. J Biol Chem, 2007. **282**(49): p. 35502-9.
243. Fraser, J.R., T.C. Laurent, and U.B. Laurent, *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*. J Intern Med, 1997. **242**(1): p. 27-33.
244. McKee, C.M., et al., *Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44*. J Clin Invest, 1996. **98**(10): p. 2403-13.

245. Termeer, C.C., et al., *Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells*. J Immunol, 2000. **165**(4): p. 1863-70.
246. Noble, P.W., et al., *Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages*. J Exp Med, 1996. **183**(5): p. 2373-8.
247. Fieber, C., et al., *Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 2): p. 359-67.
248. Rockey, D.C., et al., *Stimulation of inducible nitric oxide synthase in rat liver by hyaluronan fragments*. Hepatology, 1998. **27**(1): p. 86-92.
249. Scheibner, K.A., et al., *Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2*. J Immunol, 2006. **177**(2): p. 1272-81.
250. Day, A.J. and C.A. de la Motte, *Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation?* Trends Immunol, 2005. **26**(12): p. 637-43.
251. Bollyky, P.L., et al., *Intact extracellular matrix and the maintenance of immune tolerance: high molecular weight hyaluronan promotes persistence of induced CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(3): p. 567-72.
252. Ruhrberg, C., et al., *Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis*. Genes Dev, 2002. **16**(20): p. 2684-98.
253. Turnbull, J.E., et al., *Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate*. J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10337-41.
254. Habuchi, H., et al., *Structure of a heparan sulphate oligosaccharide that binds to basic fibroblast growth factor*. Biochem J, 1992. **285 (Pt 3)**: p. 805-13.
255. Guimond, S., et al., *Activating and inhibitory heparin sequences for FGF-2 (basic FGF). Distinct requirements for FGF-1, FGF-2, and FGF-4*. J Biol Chem, 1993. **268**(32): p. 23906-14.
256. Gitay-Goren, H., et al., *The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules*. J Biol Chem, 1992. **267**(9): p. 6093-8.
257. Chiang, M.K. and J.G. Flanagan, *Interactions between the Flk-1 receptor, vascular endothelial growth factor, and cell surface proteoglycan identified with a soluble receptor reagent*. Growth Factors, 1995. **12**(1): p. 1-10.
258. Narita, K., et al., *HSulf-1 inhibits angiogenesis and tumorigenesis in vivo*. Cancer Res, 2006. **66**(12): p. 6025-32.
259. Uchimura, K., et al., *HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1*. BMC Biochem, 2006. **7**: p. 2.
260. Chen, E., et al., *A unique role for 6-O sulfation modification in zebrafish vascular development*. Dev Biol, 2005. **284**(2): p. 364-76.
261. Lundin, L., et al., *Selectively desulfated heparin inhibits fibroblast growth factor-induced mitogenicity and angiogenesis*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24653-60.
262. Li, J., N.W. Shworak, and M. Simons, *Increased responsiveness of hypoxic endothelial cells to FGF2 is mediated by HIF-1alpha-dependent regulation of enzymes involved in synthesis of heparan sulfate FGF2-binding sites*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 9): p. 1951-9.
263. Harfouche, R., et al., *Glycome and transcriptome regulation of vasculogenesis*. Circulation, 2009. **120**(19): p. 1883-92.
264. Jiang, X. and J.R. Couchman, *Perlecan and tumor angiogenesis*. J Histochem Cytochem, 2003. **51**(11): p. 1393-410.
265. Aviezer, D., et al., *Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis*. Cell, 1994. **79**(6): p. 1005-13.

266. Savore, C., et al., *Perlecan knockdown in metastatic prostate cancer cells reduces heparin-binding growth factor responses in vitro and tumor growth in vivo*. Clin Exp Metastasis, 2005. **22**(5): p. 377-90.
267. Marchisone, C., et al., *Phenotypic alterations in Kaposi's sarcoma cells by antisense reduction of perlecan*. Pathol Oncol Res, 2000. **6**(1): p. 10-7.
268. Zhou, Z., et al., *Impaired angiogenesis, delayed wound healing and retarded tumor growth in perlecan heparan sulfate-deficient mice*. Cancer Res, 2004. **64**(14): p. 4699-702.
269. Garl, P.J., et al., *Perlecan-induced suppression of smooth muscle cell proliferation is mediated through increased activity of the tumor suppressor PTEN*. Circ Res, 2004. **94**(2): p. 175-83.
270. Handler, M., P.D. Yurchenco, and R.V. Iozzo, *Developmental expression of perlecan during murine embryogenesis*. Dev Dyn, 1997. **210**(2): p. 130-45.
271. Costell, M., et al., *Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes*. J Cell Biol, 1999. **147**(5): p. 1109-22.
272. Noguer, O., et al., *Syndecan-2 downregulation impairs angiogenesis in human microvascular endothelial cells*. Exp Cell Res, 2009. **315**(5): p. 795-808.
273. Jang, E., et al., *Syndecan-4 proteoliposomes enhance fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-induced proliferation, migration, and neovascularization of ischemic muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(5): p. 1679-84.
274. Charnaux, N., et al., *Syndecan-4 is a signaling molecule for stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12*. FEBS J, 2005. **272**(8): p. 1937-51.
275. Rueda, P., et al., *Homeostatic and tissue reparation defaults in mice carrying selective genetic invalidation of CXCL12/proteoglycan interactions*. Circulation, 2012. **126**(15): p. 1882-95.
276. Gengrinovitch, S., et al., *Glypican-1 is a VEGF165 binding proteoglycan that acts as an extracellular chaperone for VEGF165*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 10816-22.
277. Santra, M., et al., *Ectopic decorin expression up-regulates VEGF expression in mouse cerebral endothelial cells via activation of the transcription factors Sp1, HIF1alpha, and Stat3*. J Neurochem, 2008. **105**(2): p. 324-37.
278. Bechard, D., et al., *Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 48341-9.
279. Chen, L.Y., et al., *Over-expression of the Endocan gene in endothelial cells from hepatocellular carcinoma is associated with angiogenesis and tumour invasion*. J Int Med Res, 2010. **38**(2): p. 498-510.
280. Roudnicky, F., et al., *Endocan is upregulated on tumor vessels in invasive bladder cancer where it mediates VEGF-A-induced angiogenesis*. Cancer Res, 2012. **73**(3): p. 1097-106.
281. Wang, Y.Z., et al., *CD44 mediates oligosaccharides of hyaluronan-induced proliferation, tube formation and signal transduction in endothelial cells*. Exp Biol Med (Maywood), 2011. **236**(1): p. 84-90.
282. West, D.C. and S. Kumar, *The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity*. Exp Cell Res, 1989. **183**(1): p. 179-96.
283. Takahashi, Y., et al., *Hyaluronan fragments induce endothelial cell differentiation in a CD44- and CXCL1/GRO1-dependent manner*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 24195-204.
284. Slevin, M., S. Kumar, and J. Gaffney, *Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 41046-59.
285. Turley, E.A., P.W. Noble, and L.Y. Bourguignon, *Signaling properties of hyaluronan receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4589-92.
286. Hall, C.L., et al., *Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity*. J Cell Biol, 1994. **126**(2): p. 575-88.

287. Assmann, V., et al., *The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 22)**: p. 3943-54.
288. Zhang, S., et al., *The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase*. J Biol Chem, 1998. **273(18)**: p. 11342-8.
289. Matou-Nasri, S., et al., *Oligosaccharides of hyaluronan induce angiogenesis through distinct CD44 and RHAMM-mediated signalling pathways involving Cdc2 and gamma-adducin*. Int J Oncol, 2009. **35(4)**: p. 761-73.
290. Yayon, A., et al., *Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor*. Cell, 1991. **64(4)**: p. 841-8.
291. Rapraeger, A.C., A. Krufka, and B.B. Olwin, *Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation*. Science, 1991. **252(5013)**: p. 1705-8.
292. Lyon, M., et al., *Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate. Elucidation of the major heparan sulfate structural determinants*. J Biol Chem, 1994. **269(15)**: p. 11216-23.
293. Arai, T., et al., *Heparin, heparan sulfate, and dermatan sulfate regulate formation of the insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein complexes*. J Biol Chem, 1994. **269(32)**: p. 20388-93.
294. Feyzi, E., et al., *Characterization of heparin and heparan sulfate domains binding to the long splice variant of platelet-derived growth factor A chain*. J Biol Chem, 1997. **272(9)**: p. 5518-24.
295. Gautam, M., et al., *Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice*. Cell, 1996. **85(4)**: p. 525-35.
296. Mis, K., et al., *Acetylcholinesterase and agrin: different functions, similar expression patterns, multiple roles*. Chem Biol Interact, 2013. **203(1)**: p. 297-301.
297. Gorio, A., et al., *Muscle reinnervation following neonatal nerve crush. Interactive effects of glycosaminoglycans and insulin-like growth factor-I*. Neuroscience, 1998. **82(4)**: p. 1029-37.
298. Gorio, A., et al., *Glycosaminoglycan supplementation promotes nerve regeneration and muscle reinnervation*. Eur J Neurosci, 1997. **9(8)**: p. 1748-53.
299. Brandan, E., et al., *Anchorage of collagen-tailed acetylcholinesterase to the extracellular matrix is mediated by heparan sulfate proteoglycans*. J Cell Biol, 1985. **101(3)**: p. 985-92.
300. Xu, Z., et al., *Perlecan deficiency causes muscle hypertrophy, a decrease in myostatin expression, and changes in muscle fiber composition*. Matrix Biol, 2010. **29(6)**: p. 461-70.
301. Larrain, J., D.J. Carey, and E. Brandan, *Syndecan-1 expression inhibits myoblast differentiation through a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism*. J Biol Chem, 1998. **273(48)**: p. 32288-96.
302. Larrain, J., et al., *Expression of perlecan, a proteoglycan that binds myogenic inhibitory basic fibroblast growth factor, is down regulated during skeletal muscle differentiation*. Exp Cell Res, 1997. **234(2)**: p. 405-12.
303. Larrain, J., et al., *Syndecan-1 expression is down-regulated during myoblast terminal differentiation. Modulation by growth factors and retinoic acid*. J Biol Chem, 1997. **272(29)**: p. 18418-24.
304. Cornelison, D.D., et al., *Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration*. Dev Biol, 2001. **239(1)**: p. 79-94.
305. Casar, J.C., et al., *Heparan sulfate proteoglycans are increased during skeletal muscle regeneration: requirement of syndecan-3 for successful fiber formation*. J Cell Sci, 2004. **117(Pt 1)**: p. 73-84.
306. Langsdorf, A., et al., *Sulfs are regulators of growth factor signaling for satellite cell differentiation and muscle regeneration*. Dev Biol, 2007. **311(2)**: p. 464-77.

307. Tran, T.H., et al., *Heparan sulfate 6-O-endosulfatases (Sulfs) coordinate the Wnt signaling pathways to regulate myoblast fusion during skeletal muscle regeneration*. J Biol Chem, 2012. **287**(39): p. 32651-64.
308. Cabello-Verrugio, C. and E. Brandan, *A novel modulatory mechanism of transforming growth factor-beta signaling through decorin and LRP-1*. J Biol Chem, 2007. **282**(26): p. 18842-50.
309. Riquelme, C., et al., *Antisense inhibition of decorin expression in myoblasts decreases cell responsiveness to transforming growth factor beta and accelerates skeletal muscle differentiation*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3589-96.
310. Casar, J.C., et al., *Transient up-regulation of biglycan during skeletal muscle regeneration: delayed fiber growth along with decorin increase in biglycan-deficient mice*. Dev Biol, 2004. **268**(2): p. 358-71.
311. Droguett, R., et al., *Extracellular proteoglycans modify TGF-beta bio-availability attenuating its signaling during skeletal muscle differentiation*. Matrix Biol, 2006. **25**(6): p. 332-41.
312. Olguin, H. and E. Brandan, *Expression and localization of proteoglycans during limb myogenic activation*. Dev Dyn, 2001. **221**(1): p. 106-15.
313. Villena, J. and E. Brandan, *Dermatan sulfate exerts an enhanced growth factor response on skeletal muscle satellite cell proliferation and migration*. J Cell Physiol, 2004. **198**(2): p. 169-78.
314. Khor, E. and L.Y. Lim, *Implantable applications of chitin and chitosan*. Biomaterials, 2003. **24**(13): p. 2339-49.
315. Dornish, M., D. Kaplan, and O. Skaugrud, *Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products: ASTM alginate and chitosan standard guides*. American Society for Testing and Materials. Ann N Y Acad Sci, 2001. **944**: p. 388-97.
316. Rabea, E.I., et al., *Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action*. Biomacromolecules, 2003. **4**(6): p. 1457-65.
317. Liu, Z., et al., *The influence of chitosan hydrogel on stem cell engraftment, survival and homing in the ischemic myocardial microenvironment*. Biomaterials, 2012. **33**(11): p. 3093-106.
318. Liu, H.T., et al., *Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells*. Pharmacol Res, 2009. **59**(3): p. 167-75.
319. Wang, H., et al., *Improved myocardial performance in infarcted rat heart by co-injection of basic fibroblast growth factor with temperature-responsive chitosan hydrogel*. J Heart Lung Transplant, 2010. **29**(8): p. 881-7.
320. Fujita, M., et al., *Therapeutic angiogenesis induced by controlled release of fibroblast growth factor-2 from injectable chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel in a rat hindlimb ischemia model*. Wound Repair Regen, 2007. **15**(1): p. 58-65.
321. Seo, S.B., et al., *Inhibitory effect of high molecular weight water-soluble chitosan on hypoxia-induced inflammatory cytokine production*. Biol Pharm Bull, 2003. **26**(5): p. 717-21.
322. Patankar, M.S., et al., *A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21770-6.
323. Collic-Jouault, S., et al., *Effect of low-molecular-weight fucoidan on experimental arterial thrombosis in the rabbit and rat*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(5): p. 1114-5.
324. Giraux, J.L., et al., *Modulation of human endothelial cell proliferation and migration by fucoidan and heparin*. Eur J Cell Biol, 1998. **77**(4): p. 352-9.
325. Matou, S., et al., *Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro*. Thromb Res, 2002. **106**(4-5): p. 213-21.
326. Chabut, D., et al., *Low molecular weight fucoidan and heparin enhance the basic fibroblast growth factor-induced tube formation of endothelial cells through heparan sulfate-dependent alpha6 overexpression*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(3): p. 696-702.

327. Zemani, F., et al., *Low-molecular-weight fucoïdan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells*. *Biochem Pharmacol*, 2005. **70**(8): p. 1167-75.
328. Lake, A.C., et al., *Low molecular weight fucoïdan increases VEGF165-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF165 binding to VEGFR-2 and NRP1*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(49): p. 37844-52.
329. Luyt, C.E., et al., *Low-molecular-weight fucoïdan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. **305**(1): p. 24-30.
330. Manzo-Silberman, S., et al., *Therapeutic potential of fucoïdan in myocardial ischemia*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011. **58**(6): p. 626-32.
331. Sweeney, E.A., et al., *Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells*. *Blood*, 2002. **99**(1): p. 44-51.
332. Li, C., et al., *Fucoïdan, a sulfated polysaccharide from brown algae, against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via regulating the inflammation response*. *Food Chem Toxicol*, 2011. **49**(9): p. 2090-5.
333. Chen, J., et al., *Low molecular weight fucoïdan against renal ischemia-reperfusion injury via inhibition of the MAPK signaling pathway*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56224.
334. Bojakowski, K., et al., *Fucoïdan improves the renal blood flow in the early stage of renal ischemia/reperfusion injury in the rat*. *J Physiol Pharmacol*, 2001. **52**(1): p. 137-43.
335. Kim, K.J., O.H. Lee, and B.Y. Lee, *Low-molecular-weight fucoïdan regulates myogenic differentiation through the mitogen-activated protein kinase pathway in C2C12 cells*. *Br J Nutr*, 2011. **106**(12): p. 1836-44.
336. Papy-Garcia, D., et al., *Nondegradative sulfation of polysaccharides. Synthesis and structure characterization of biologically active heparan sulfate mimetics*. *Macromolecules*, 2005. **38**: p. 4647-4654.
337. Rouet, V., et al., *A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(38): p. 32792-800.
338. Desgranges, P., et al., *Beneficial use of fibroblast growth factor 2 and RGTA, a new family of heparan mimics, for endothelialization of PET prostheses*. *J Biomed Mater Res*, 2001. **58**(1): p. 1-9.
339. Papy-Garcia, D., et al., *Glycosaminoglycan mimetics (RGTA) modulate adult skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro*. *J Biomed Mater Res*, 2002. **62**(1): p. 46-55.
340. Zimowska, M., et al., *Novel glycosaminoglycan mimetic (RGTA, RGD120) contributes to enhance skeletal muscle satellite cell fusion by increasing intracellular Ca²⁺ and calpain activity*. *J Cell Physiol*, 2005. **205**(2): p. 237-45.
341. Aamiri, A., et al., *Influence of a dextran derivative on myosin heavy chain expression during rat skeletal muscle regeneration*. *Neurosci Lett*, 1995. **201**(3): p. 243-6.
342. Meddahi, A., et al., *Pharmacological studies of RGTA(11), a heparan sulfate mimetic polymer, efficient on muscle regeneration*. *J Biomed Mater Res*, 2002. **62**(4): p. 525-31.
343. Yamauchi, H., et al., *New agents for the treatment of infarcted myocardium*. *Faseb J*, 2000. **14**(14): p. 2133-4.
344. Pries, A.R. and W.M. Kuebler, *Normal endothelium*. *Handb Exp Pharmacol*, 2006(176 Pt 1): p. 1-40.
345. Levi, M., H. ten Cate, and T. van der Poll, *Endothelium: interface between coagulation and inflammation*. *Crit Care Med*, 2002. **30**(5 Suppl): p. S220-4.
346. Collard, C.D. and S. Gelman, *Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury*. *Anesthesiology*, 2001. **94**(6): p. 1133-8.
347. Marcelo, K.L., L.C. Goldie, and K.K. Hirschi, *Regulation of endothelial cell differentiation and specification*. *Circ Res*, 2013. **112**(9): p. 1272-87.

348. Adams, R.H. and K. Alitalo, *Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(6): p. 464-78.
349. Coultas, L., K. Chawengsaksophak, and J. Rossant, *Endothelial cells and VEGF in vascular development*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 937-45.
350. Rocha, S.F. and R.H. Adams, *Molecular differentiation and specialization of vascular beds*. Angiogenesis, 2009. **12**(2): p. 139-47.
351. Jain, R.K., *Molecular regulation of vessel maturation*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 685-93.
352. Pepper, M.S., *Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(7): p. 1104-17.
353. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
354. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
355. Takahashi, S., *Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy*. Biol Pharm Bull, 2011. **34**(12): p. 1785-8.
356. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
357. Tischer, E., et al., *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing*. J Biol Chem, 1991. **266**(18): p. 11947-54.
358. Gerber, H.P., et al., *Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30336-43.
359. Cleaver, O. and P.A. Krieg, *VEGF mediates angioblast migration during development of the dorsal aorta in Xenopus*. Development, 1998. **125**(19): p. 3905-14.
360. Jakeman, L.B., et al., *Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis*. Endocrinology, 1993. **133**(2): p. 848-59.
361. Olofsson, B., et al., *Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19310-7.
362. Saharinen, P. and T.V. Petrova, *Molecular regulation of lymphangiogenesis*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1014**: p. 76-87.
363. He, Y., T. Karpanen, and K. Alitalo, *Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1654**(1): p. 3-12.
364. Murakami, M., et al., *The FGF system has a key role in regulating vascular integrity*. J Clin Invest, 2008. **118**(10): p. 3355-66.
365. Savona, C., et al., *[Angiogenesis and neoangiogenesis]*. Rev Prat, 1997. **47**(20): p. 2239-43.
366. Mohammadi, M., S.K. Olsen, and O.A. Ibrahimi, *Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 107-37.
367. Wiedemann, M. and B. Trueb, *Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors*. Genomics, 2000. **69**(2): p. 275-9.
368. Partanen, J., et al., *A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(4): p. 1698-707.
369. Suri, C., et al., *Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1171-80.
370. Maisonpierre, P.C., et al., *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis*. Science, 1997. **277**(5322): p. 55-60.
371. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy*. Oncologist, 2004. **9 Suppl 1**: p. 2-10.

372. Dhanabal, M., et al., *Endostatin induces endothelial cell apoptosis*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11721-6.
373. Abdollahi, A., et al., *Endostatin's antiangiogenic signaling network*. Mol Cell, 2004. **13**(5): p. 649-63.
374. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
375. Asahara, T., et al., *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization*. Circ Res, 1999. **85**(3): p. 221-8.
376. Lin, Y., et al., *Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood*. J Clin Invest, 2000. **105**(1): p. 71-7.
377. Hirschi, K.K., D.A. Ingram, and M.C. Yoder, *Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(9): p. 1584-95.
378. Peichev, M., et al., *Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors*. Blood, 2000. **95**(3): p. 952-8.
379. Case, J., et al., *Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors*. Exp Hematol, 2007. **35**(7): p. 1109-18.
380. Delorme, B., et al., *Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells*. Thromb Haemost, 2005. **94**(6): p. 1270-9.
381. Sabatier, F., et al., *Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(3): p. 454-71.
382. George, F., et al., *Cytofluorometric detection of human endothelial cells in whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody*. J Immunol Methods, 1991. **139**(1): p. 65-75.
383. Hur, J., et al., *Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(2): p. 288-93.
384. Yoder, M.C., et al., *Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals*. Blood, 2007. **109**(5): p. 1801-9.
385. Amini, A.R., C.T. Laurencin, and S.P. Nukavarapu, *Differential analysis of peripheral blood- and bone marrow-derived endothelial progenitor cells for enhanced vascularization in bone tissue engineering*. J Orthop Res, 2012. **30**(9): p. 1507-15.
386. Tura, O., et al., *Late outgrowth endothelial cells resemble mature endothelial cells and are not derived from bone marrow*. Stem Cells, 2013. **31**(2): p. 338-48.
387. Ingram, D.A., et al., *Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2752-60.
388. Bompais, H., et al., *Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells*. Blood, 2004. **103**(7): p. 2577-84.
389. Bhatwadekar, A.D., L.C. Shaw, and M.B. Grant, *Promise of endothelial progenitor cell for treatment of diabetic retinopathy*. Expert Rev Endocrinol Metab, 2010. **5**(1): p. 29-37.
390. Kirton, J.P. and Q. Xu, *Endothelial precursors in vascular repair*. Microvasc Res, 2010. **79**(3): p. 193-9.
391. Leone, A.M., et al., *From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells*. Eur Heart J, 2009. **30**(8): p. 890-9.
392. Harrison, J.S., et al., *Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers*. Blood, 2002. **99**(1): p. 394.
393. Ceradini, D.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 858-64.
394. Heeschen, C., et al., *Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1340-6.

395. Ishizawa, K., et al., *Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **324**(1): p. 276-80.
396. Honold, J., et al., *Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(10): p. 2238-43.
397. Iwakura, A., 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**(25): p. 3115-21.
398. Asahara, T., et al., *VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. *EMBO J*, 1999. **18**(14): p. 3964-72.
399. De Falco, E., et al., *SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells*. *Blood*, 2004. **104**(12): p. 3472-82.
400. Aicher, A., et al., *Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells*. *Nat Med*, 2003. **9**(11): p. 1370-6.
401. Heissig, B., et al., *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand*. *Cell*, 2002. **109**(5): p. 625-37.
402. Ohki, Y., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils*. *FASEB J*, 2005. **19**(14): p. 2005-7.
403. Thomas, H.E., et al., *Circulating endothelial progenitor cells exhibit diurnal variation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(3): p. e21-2.
404. Dincol, D., et al., *Diurnal variations of serum GM-CSF levels*. *Cytokine*, 2000. **12**(7): p. 1151-5.
405. Takeuchi, M., et al., *Circadian rhythm of plasma levels of endogenous granulocyte colony stimulating factor in healthy volunteers*. *Int J Hematol*, 1996. **64**(3-4): p. 293-5.
406. Guven, H., et al., *The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **48**(8): p. 1579-87.
407. Ablin, J.N., et al., *Effect of anti-TNFalpha treatment on circulating endothelial progenitor cells (EPCs) in rheumatoid arthritis*. *Life Sci*, 2006. **79**(25): p. 2364-9.
408. Herbrig, K., et al., *Endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is associated with a reduced number and impaired function of endothelial progenitor cells*. *Ann Rheum Dis*, 2006. **65**(2): p. 157-63.
409. Urbich, C. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology*. *Circ Res*, 2004. **95**(4): p. 343-53.
410. Hristov, M., et al., *Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury*. *Thromb Haemost*, 2007. **98**(2): p. 274-7.
411. Yamaguchi, J., et al., *Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization*. *Circulation*, 2003. **107**(9): p. 1322-8.
412. Hill, W.D., et al., *SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004. **63**(1): p. 84-96.
413. Rabbany, S.Y., et al., *Molecular pathways regulating mobilization of marrow-derived stem cells for tissue revascularization*. *Trends Mol Med*, 2003. **9**(3): p. 109-17.
414. Ishida, Y., et al., *Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(2): p. 711-21.

415. Hristov, M., et al., *Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury*. *Circ Res*, 2007. **100**(4): p. 590-7.
416. Kocher, A.A., et al., *Myocardial homing and neovascularization by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro CXC chemokines*. *J Mol Cell Cardiol*, 2006. **40**(4): p. 455-64.
417. Weber, C., *Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime*. *Circ Res*, 2005. **96**(6): p. 612-6.
418. Chavakis, E., et al., *Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells*. *J Exp Med*, 2005. **201**(1): p. 63-72.
419. Duan, H., et al., *LFA-1 and VLA-4 involved in human high proliferative potential-endothelial progenitor cells homing to ischemic tissue*. *Thromb Haemost*, 2006. **96**(6): p. 807-15.
420. Silverman, M.D., et al., *The role of vascular cell adhesion molecule 1/ very late activation antigen 4 in endothelial progenitor cell recruitment to rheumatoid arthritis synovium*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(6): p. 1817-26.
421. Chavakis, E., et al., *High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells*. *Circ Res*, 2007. **100**(2): p. 204-12.
422. Massberg, S., 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**(5): p. 1221-33.
423. Langer, H., et al., *Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro*. *Circ Res*, 2006. **98**(2): p. e2-10.
424. de Boer, H.C., 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**(7): p. 1653-9.
425. Werner, N., et al., *Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease*. *Basic Res Cardiol*, 2007. **102**(6): p. 565-71.
426. Keymel, S., et al., *Impaired endothelial progenitor cell function predicts age-dependent carotid intimal thickening*. *Basic Res Cardiol*, 2008. **103**(6): p. 582-6.
427. Walter, D.H., et al., *Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease*. *Circ Res*, 2005. **97**(11): p. 1142-51.
428. Valgimigli, M., et al., *CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure*. *Circulation*, 2004. **110**(10): p. 1209-12.
429. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. *Circ Res*, 2001. **89**(1): p. E1-7.
430. Zhou, Z., et al., *Accelerated senescence of endothelial progenitor cells in hypertension is related to the reduction of calcitonin gene-related peptide*. *J Hypertens*, 2010. **28**(5): p. 931-9.
431. Magen, E., et al., *Potential link between C3a, C3b and endothelial progenitor cells in resistant hypertension*. *Am J Med Sci*, 2010. **339**(5): p. 415-9.
432. Chen, J.Z., et al., *Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia*. *Clin Sci (Lond)*, 2010. **119**(12): p. 545.
433. Imanishi, T., et al., *Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003. **30**(9): p. 665-70.
434. Imanishi, T., et al., *Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004. **31**(7): p. 407-13.

435. Croce, G., et al., *Nonpharmacological treatment of hypercholesterolemia increases circulating endothelial progenitor cell population in adults*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(5): p. e38-9.
436. Dimmeler, S., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(3): p. 391-7.
437. Michaud, S.E., et al., *Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities*. *Atherosclerosis*, 2006. **187**(2): p. 423-32.
438. Kondo, T., et al., *Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(8): p. 1442-7.
439. Hamed, S., et al., *Nitric oxide and superoxide dismutase modulate endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes mellitus*. *Cardiovasc Diabetol*, 2009. **8**: p. 56.
440. Chen, Q., et al., *Advanced glycation end products impair function of late endothelial progenitor cells through effects on protein kinase Akt and cyclooxygenase-2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **381**(2): p. 192-7.
441. Grisar, J., et al., *Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis*. *Circulation*, 2005. **111**(2): p. 204-11.
442. Marsboom, G., et al., *Sustained endothelial progenitor cell dysfunction after chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension*. *Stem Cells*, 2008. **26**(4): p. 1017-26.
443. Choi, J.H., et al., *Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(7): p. 1246-52.
444. Heiss, C., et al., *Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **45**(9): p. 1441-8.
445. Tao, J., et al., *Circulating endothelial progenitor cell deficiency contributes to impaired arterial elasticity in persons of advancing age*. *J Hum Hypertens*, 2006. **20**(7): p. 490-5.
446. Strehlow, K., et al., *Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation*. *Circulation*, 2003. **107**(24): p. 3059-65.
447. Hamada, H., 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**(21): p. 2261-70.
448. Iwakura, A., 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. **113**(12): p. 1605-14.
449. Rousseau, A., et al., *Impact of age and gender interaction on circulating endothelial progenitor cells in healthy subjects*. *Fertil Steril*, 2010. **93**(3): p. 843-6.
450. Fadini, G.P., et al., *Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(5): p. 997-1004.
451. Shelley, W.C., et al., *Changes in the frequency and in vivo vessel-forming ability of rhesus monkey circulating endothelial colony-forming cells across the lifespan (birth to aged)*. *Pediatr Res*, 2012. **71**(2): p. 156-61.
452. Sieveking, D.P., et al., *Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **51**(6): p. 660-8.
453. Rehman, J., et al., *Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors*. *Circulation*, 2003. **107**(8): p. 1164-9.

454. Au, P., et al., *Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels*. *Blood*, 2008. **111**(3): p. 1302-5.
455. Kalka, C., et al., *Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(7): p. 3422-7.
456. Lavergne, M., et al., *Cord blood-circulating endothelial progenitors for treatment of vascular diseases*. *Cell Prolif*, 2011. **44 Suppl 1**: p. 44-7.
457. Thomson, B.G., et al., *Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation*. *Blood*, 2000. **96**(8): p. 2703-11.
458. Wagner, J.E., *Umbilical cord blood transplantation: overview of the clinical experience*. *Blood Cells*, 1994. **20**(2-3): p. 227-33; discussion 233-4.
459. Vanneaux, V., et al., *In vitro and in vivo analysis of endothelial progenitor cells from cryopreserved umbilical cord blood: are we ready for clinical application?* *Cell Transplant*, 2010. **19**(9): p. 1143-55.
460. Bartunek, J., et al., *Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety*. *Circulation*, 2005. **112**(9 Suppl): p. 1178-83.
461. Ahmadi, H., et al., *Safety analysis and improved cardiac function following local autologous transplantation of CD133(+) enriched bone marrow cells after myocardial infarction*. *Curr Neurovasc Res*, 2007. **4**(3): p. 153-60.
462. Stamm, C., et al., *Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration*. *Lancet*, 2003. **361**(9351): p. 45-6.
463. Tendera, M., et al., *Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial*. *Eur Heart J*, 2009. **30**(11): p. 1313-21.
464. Dobert, N., et al., *Transplantation of progenitor cells after reperfused acute myocardial infarction: evaluation of perfusion and myocardial viability with FDG-PET and thallium SPECT*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2004. **31**(8): p. 1146-51.
465. Pasquet, S., et al., *Long-term benefit of intracardiac delivery of autologous granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized blood CD34+ cells containing cardiac progenitors on regional heart structure and function after myocardial infarct*. *Cytotherapy*, 2009. **11**(8): p. 1002-15.
466. Kawamoto, A., et al., *Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial*. *Stem Cells*, 2009. **27**(11): p. 2857-64.
467. Flores-Ramirez, R., et al., *Intracoronary infusion of CD133+ endothelial progenitor cells improves heart function and quality of life in patients with chronic post-infarct heart insufficiency*. *Cardiovasc Revasc Med*, 2010. **11**(2): p. 72-8.
468. Lara-Hernandez, R., et al., *Safety and efficacy of therapeutic angiogenesis as a novel treatment in patients with critical limb ischemia*. *Ann Vasc Surg*, 2010. **24**(2): p. 287-94.
469. Fadini, G.P., C. Agostini, and A. Avogaro, *Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature*. *Atherosclerosis*, 2010. **209**(1): p. 10-7.
470. Hofmann, M., et al., *Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium*. *Circulation*, 2005. **111**(17): p. 2198-202.

471. Carr, C.A., et al., *Bone marrow-derived stromal cells home to and remain in the infarcted rat heart but fail to improve function: an in vivo cine-MRI study*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(2): p. H533-42.
472. Amsalem, Y., et al., *Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium*. Circulation, 2007. **116**(11 Suppl): p. I38-45.
473. Schachinger, V., et al., *Bone-marrow-derived progenitor cell therapy in need of proof of concept: design of the REPAIR-AMI trial*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006. **3 Suppl 1**: p. S23-8.
474. Schachinger, V., et al., *Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 2006. **355**(12): p. 1210-21.
475. Yi, C., et al., *Transplantation of endothelial progenitor cells transferred by vascular endothelial growth factor gene for vascular regeneration of ischemic flaps*. J Surg Res, 2006. **135**(1): p. 100-6.
476. Yu, J.X., et al., *Combination of stromal-derived factor-1alpha and vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization*. J Vasc Surg, 2009. **50**(3): p. 608-16.
477. Long, J., et al., *The therapeutic effect of vascular endothelial growth factor gene- or heme oxygenase-1 gene-modified endothelial progenitor cells on neovascularization of rat hindlimb ischemia model*. J Vasc Surg, 2013.
478. Kalka, C., et al., *Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects*. Circ Res, 2000. **86**(12): p. 1198-202.
479. Taljaard, M., et al., *Rationale and design of Enhanced Angiogenic Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction (ENACT-AMI): the first randomized placebo-controlled trial of enhanced progenitor cell therapy for acute myocardial infarction*. Am Heart J, 2010. **159**(3): p. 354-60.
480. Ye, C., et al., *Shear stress and vascular smooth muscle cells promote endothelial differentiation of endothelial progenitor cells via activation of Akt*. Clin Biomech (Bristol, Avon), 2008. **23 Suppl 1**: p. S118-24.
481. Foubert, P., et al., *Coadministration of endothelial and smooth muscle progenitor cells enhances the efficiency of proangiogenic cell-based therapy*. Circ Res, 2008. **103**(7): p. 751-60.
482. Melero-Martin, J.M., et al., *Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells*. Circ Res, 2008. **103**(2): p. 194-202.
483. Traktuev, D.O., et al., *Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells*. Circ Res, 2009. **104**(12): p. 1410-20.
484. Yoon, C.H., et al., *Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases*. Circulation, 2005. **112**(11): p. 1618-27.
485. Wu, X., et al., *Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(2): p. H480-7.
486. Lavergne, M., et al., *Porous polysaccharide-based scaffolds for human endothelial progenitor cells*. Macromol Biosci, 2012. **12**(7): p. 901-10.
487. Critser, P.J., et al., *Collagen matrix physical properties modulate endothelial colony forming cell-derived vessels in vivo*. Microvasc Res, 2010. **80**(1): p. 23-30.
488. Hockel, M. and J.F. Burke, *Angiotropin treatment prevents flap necrosis and enhances dermal regeneration in rabbits*. Arch Surg, 1989. **124**(6): p. 693-8.
489. Knipe, L., et al., *A revised model for the secretion of tPA and cytokines from cultured endothelial cells*. Blood, 2010. **116**(12): p. 2183-91.
490. Velleman, S.G., *The role of the extracellular matrix in skeletal muscle development*. Poult Sci, 1999. **78**(5): p. 778-84.

491. Brandan, E., C. Cabello-Verrugio, and C. Vial, *Novel regulatory mechanisms for the proteoglycans decorin and biglycan during muscle formation and muscular dystrophy*. *Matrix Biol*, 2008. **27**(8): p. 700-8.
492. Huynh, M.B., et al., *Age-related changes in rat myocardium involve altered capacities of glycosaminoglycans to potentiate growth factor functions and heparan sulfate-altered sulfation*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(14): p. 11363-73.
493. Williamson, K.A., et al., *Age-related impairment of endothelial progenitor cell migration correlates with structural alterations of heparan sulfate proteoglycans*. *Aging Cell*, 2013. **12**(1): p. 139-47.
494. Albanese, P., et al., *Glycosaminoglycan mimetics-induced mobilization of hematopoietic progenitors and stem cells into mouse peripheral blood: structure/function insights*. *Exp Hematol*, 2009. **37**(9): p. 1072-83.
495. Barbier-Chassefiere, V., et al., *Matrix therapy in regenerative medicine, a new approach to chronic wound healing*. *J Biomed Mater Res A*, 2009. **90**(3): p. 641-7.
496. Garcia-Filipe, S., et al., *RGTA OTR4120, a heparan sulfate mimetic, is a possible long-term active agent to heal burned skin*. *J Biomed Mater Res A*, 2007. **80**(1): p. 75-84.
497. Ben-Yosef, Y., et al., *Hypoxia of endothelial cells leads to MMP-2-dependent survival and death*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005. **289**(5): p. C1321-31.
498. Jadhav, U., et al., *Inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces in vitro invasion and angiogenesis in human microvascular endothelial cells*. *Int J Oncol*, 2004. **25**(5): p. 1407-14.
499. Cheng, X.W., et al., *Mechanisms underlying the impairment of ischemia-induced neovascularization in matrix metalloproteinase 2-deficient mice*. *Circ Res*, 2007. **100**(6): p. 904-13.
500. Huang, P.H., et al., *Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(8): p. 1179-84.
501. Mounier, R., F. Chretien, and B. Chazaud, *Blood vessels and the satellite cell niche*. *Curr Top Dev Biol*, 2011. **96**: p. 121-38.
502. Cao, J.P., et al., *Autologous transplantation of peripheral blood-derived circulating endothelial progenitor cells attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits by direct endothelial repair and indirect immunomodulation*. *Anesthesiology*, 2012. **116**(6): p. 1278-87.
503. Engebretsen, K.V., et al., *Lumican is increased in experimental and clinical heart failure, and its production by cardiac fibroblasts is induced by mechanical and proinflammatory stimuli*. *FEBS J*, 2013. **280**(10): p. 2382-98.

