



Conception de polysaccharides sulfatés inhibiteurs de l'héparanase pour le traitement de l'angiogénèse tumorale

Nicolas Poupard

► To cite this version:

Nicolas Poupard. Conception de polysaccharides sulfatés inhibiteurs de l'héparanase pour le traitement de l'angiogénèse tumorale. Biologie cellulaire. Université de La Rochelle, 2017. Français. ⟨NNT: 2017LAROS011⟩. ⟨tel-01753818⟩

HAL Id: tel-01753818

<https://theses.hal.science/tel-01753818v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



HAL Authorization



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE

Sciences pour l'Environnement Gay-Lussac

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266 CNRS-ULR
Equipe Approches Moléculaires, Environnement-Santé (AMES)

THESE

présentée par:

Nicolas POUPARD

Thèse soutenue le 30 juin 2017

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de la Rochelle
Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Conception de polysaccharides sulfatés inhibiteurs de
l'héparanase pour le traitement de l'angiogénèse tumorale**

JURY:

Mr Philippe MICHAUD

Professeur, Polytech Clermont-Ferrand, Rapporteur

Mme Nathalie CHARNAUX

Professeur, Université Paris 13, Rapportrice

Mme Catherine GRILLON

Chargé de recherche, HDR, Centre de Biophysique
moléculaire, Orléans, Examinatrice

Mr Jean-Marie PIOT

Professeur, Université de la Rochelle, Examineur

Mr Thierry MAUGARD

Professeur, Université de la Rochelle, Directeur de thèse

Mme Ingrid FRUITIER-ARNAUDIN

Maître de conférences HDR, Université de la Rochelle,
Co-directrice de thèse

Contributions scientifiques

En lien direct avec ce travail :

Publications :

Poupard, N.; Groult, H.; Bodin, J.; Bridiau, N.; Bordenave-Juchereau, S.; Sannier, F.; Piot, J.-M.; Fruitier-Arnaudin, I.; Maugard, T. (2017). Production of heparin and λ -carrageenan anti-heparanase derivatives using a combination of physicochemical depolymerization and glycol splitting. *Carbohydr. Polym.* **166**, 156-465.

Poupard, N.; Badarou, P. ; Fasani, F. ; Groult, H. J.; Bridiau, N.; Sannier, F.; Bordenave-Juchereau, S.; Kieda,C.; Piot, J.-M.; Grillon,C. ; Fruitier-Arnaudin, I.; Maugard, T. Assessment of heparanase-mediated angiogenesis using microvascular endothelial cells: identification of λ -Carrageenan derivative as a potent anti angiogenic agent. **Accepté pour publication dans le journal *Marine Drugs* le 27 avril 2017.**

Communications orales :

Poupard, N.; Fruitier-Arnaudin, I.; Maugard, T.; Bridiau, N.; Piot, J.-M. Development of a nano-system targeting the tumor micro-environment for the detection and treatment of tumors by inhibition of a specific glycosidase. *Immune and stromal responses in cancerology: New challenges for therapeutic targeting*. Workshop international, cancérôpôle grand ouest, La Turballe (Octobre 2014).

Poupard, N.; Groult, H.; Bridiau, N.; Kieda,C.; Grillon,C.; Piot, J.-M.Fruitier-Arnaudin, I.; Maugard, T. Targeting heparanase for the regulation of breast tumoral angiogenesis using structural analogs of heparan sulfate. *New chemical and biological tools for targeting in cancer imaging and therapy*. Workshop international, cancérôpôle grand ouest, Le Bono (Octobre 2016).

○ ***Prix de la meilleure communication orale*** ○

Communications Poster :

Poupard, N.; Achour, A.; Bridiau, N.; Grillon,C. ; Kieda,C.; Piot, J.-M.; Maugard, T.; Fruitier-Arnaudin, I. Design of a nano-system targeting the tumor micro-environment for the treatment of tumor by inhibition of a specific β -endoglycosidase responsible for angiogenesis. *11th jenner Glycobiology and medicine symposium* (Paris, avril 2015)

Poupard, N.; Achour, A.; Bridiau, N.; ; Piot, J.-M.; Maugard, T.; Fruitier-Arnaudin, I. Production of sulfated oligosaccharides using different depolymerization methods: Evaluation of bioactivity on Hemostase and a specific β -endoglycosidase responsible for angiogenesis in cancer. *Carbohydrate Bioengineering CBM11* (Helsinki, mai 2015).

Poupard, N.; Achour, A.; Bridiau, N.; ; Piot, J.-M.; Maugard, T.; Fruitier-Arnaudin, I. Production d'oligosaccharides sulfatés via différentes méthodes de dépolymérisation: Evaluation de leur activité sur l'Hémostase ainsi que sur une β -endoglycosidase promotrice de l'angiogénèse tumorale. 9^{ème} journée cancéropôle grand ouest (Les sables d'Olonne, juin 2015)

Poupard, N.; Badarou, P. ; Groult, H. J.; Bridiau, N.; Kieda, C.; Grillon, C.; Piot, J.-M.; Fruitier-Arnaudin, I.; Maugard, T. Elaboration d'un modèle basé sur des cellules endothéliales microvasculaires pour étudier l'impact de l'héparanase dans l'angiogénèse tumorale. 10^{ème} journée cancéropôle grand ouest (Les sables d'Olonne, juin 2016).

Autres :

Publications :

Achour, O., Ashraf, Y., Bridiau, N., Kacem, M., **Poupard, N.**, Bordenave-Juchereau, S., Sannier F., Lamerant-Fayel, N., Kieda, C., Liaudet-Coopman, E., Piot J.-M., Maugard, T., Fruitier-Arnaudin, I. (2016). Alteration of cathepsin D trafficking induced by hypoxia and extracellular acidification in MCF-7 breast cancer cells. *Biochimie*, **121**, 123–130.

Achour, O., **Poupard, N.**, Bridiau, N., Bordenave Juchereau, S., Sannier, F., Piot, J.-M., Fruitier-Arnaudin, I., Maugard, T. (2016). Anti-heparanase activity of ultra-low-molecular-weight heparin produced by physicochemical depolymerization. *Carbohydrate Polymers*, **135**, 316–323.

Groult, H ; **Poupard, N.**; Herranz, F., Conforto, E., Bridiau, N., Bordenave-Juchereau, S., Piot, J.-M., Ruiz-Cabello, J., Fruitier-Arnaudin, I., Maugard, T. Family of bioactive heparins-coated iron oxide nanoparticles with T1-positive magnetic resonance contrast for various biomedical applications. Soumis le 7 avril 2017 au journal *Biomaterials*

Modérément sage
Devrait être chacun,
Jamais trop sage ;
Les vies les meilleures
Sont vécues par ces hommes
Dont la sagesse a largement grandi

Modérément sage
Devrait être chacun,
Jamais trop sage ;
Car le cœur du sage
Rarement est heureux
Si trop grande sagesse il a gagné

Le Hávamál, strophes 54 ; 55

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent au comité 17 de la Ligue Contre le Cancer présidé par le Pr Jean-Marie PIOT. Sans le soutien de la Ligue, aucun des travaux présentés dans ce manuscrit n'aurait pu être réalisé. J'exprime une profonde reconnaissance envers les généreux donateurs de l'association qui nous ont accordé leur confiance ainsi qu'envers les bénévoles dont l'engagement et la bienveillance m'ont touché à chacune de nos rencontres.

Mes remerciements vont également aux membres du jury qui ont accepté d'apporter leur expertise en évaluant ce travail.

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'équipe Approches Moléculaires, Environnement Santé (AMES) du laboratoire LIENSs UMR 7266 CNRS-ULR dirigé par M. Olivier de Viron que je souhaite remercier pour m'avoir accueilli au sein de sa structure.

Je tiens à remercier particulièrement mes directeurs de thèse, le Pr Thierry Maugard et le Dr Ingrid Fruitier Arnaudin pour avoir encadré ce projet. Ils ont toujours veillé à ce que les ressources nécessaires soient disponibles pour ces travaux et ils ont su me donner des responsabilités qui m'ont permis de m'épanouir professionnellement.

Je souhaiterais exprimer ma sincère gratitude à M. Jean Marc Augier, président de l'université de la Rochelle ainsi qu'au Pr Jean-Marie PIOT qui en tant que directeur du département de Biotechnologie, m'a accordé sa confiance pendant 3 ans en me permettant ainsi d'effectuer des enseignements. J'ai pris beaucoup de plaisir dans cette expérience et j'espère pouvoir la renouveler à l'avenir.

Un grand merci au Dr Nicolas Bridiau qui a toujours trouvé le temps pour me donner ses conseils tant pour mon projet scientifique que pour mes activités d'enseignement.

Je remercie également le Dr Catherine Grillon co-directrice de l'équipe "microenvironnement cellulaire et cibles pharmacologique" du Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) pour m'avoir accueilli au sein de sa structure dans le cadre de notre collaboration. J'ai beaucoup appris sur l'angiogénèse pendant ce séjour donc je vous remercie encore Mme Grillon.

Je remercie également tous mes collègues de bureau (ou de paillasse) actuels ou ancien : Nicolas, Camille, Mariem, Florence, Emilie, Rachida, et Yesmine ; vous avez toujours participé à la bonne ambiance générale de travail dans le laboratoire.

Oussama, c'est toi qui m'a passé le flambeau sur ce projet de thèse. Tu as fait preuve de patience et de beaucoup de pédagogie face à mes nombreuses questions et j'ai beaucoup appris à tes côtés donc merci à toi. Merci Amandine pour ta bonne humeur, j'ai été ravi de travailler avec toi et je sais au fond de moi que l'on partage les mêmes goûts musicaux. Benjamin, tu as changé de voix maintenant, mais ce fut un plaisir de partager ce bureau avec toi. Hugo, t'es arrivé le dernier mais on a déjà beaucoup échangé et collaboré sur ce projet. Merci pour tous ces échanges et pour ton esprit positif. Antoine, comment j'aurais fait ces analyses de masse sans toi ?? Merci pour ta patience et ta sympathie. Merci Marine, ça nous aura pris du temps, mais on les aura assurés ces TP ! J'ai été ravi de travailler avec toi.

Je souhaite remercier tous les enseignants, chercheurs, ingénieurs, techniciens et stagiaires que j'ai pu côtoyer pendant ces années de thèses. Merci Valérie Sopena et Thierry Nicolas pour votre bonne humeur et votre aide en salle de TP.

Un grand merci également à Laetitia Darre, Viviane Biou et Marie Chivaille pour avoir facilité ma vie administrative avec sourire et bienveillance ainsi qu'à Isabelle Hirsh et Isabelle de la Corte Gomez pour leur disponibilité et leur gentillesse.

J'adresse mes remerciements à tous les stagiaires qui ont participé à ce projet de thèse : Julien Mazaleyrat, Théo Boyer, Claire Toucheteau et Justine Bodin. Justine et Claire, vous êtes engagées dans la voie du doctorat au début de cette année et je vous souhaite toute la réussite possible.

Merci à ma famille pour leur soutien et la curiosité qu'ils ont pu montrer par rapport à mon travail. Merci à mes parents pour m'avoir toujours encouragé à faire ce qui me plaisait. Merci à tous mes amis pour leur soutien, leurs conseils et leurs messages bienveillants.

Enfin, je voudrais remercier profondément ma compagne, Marine. Nous nous sommes éloigné après le Master à cause de nos emplois respectifs, mais tu as toujours été à mes côtés dans les bons comme dans les mauvais moments. C'est une chance que de t'avoir dans ma vie et tu le sais quelque part, cette thèse, c'est aussi un peu la tienne.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES ABBREVIATIONS et UNITES.....	10
Introduction générale	13
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
1 L'angiogénèse.....	20
1.1 L'angiogénèse : un processus physiologique et pathologique.....	20
1.1.1 De la cellule endothéliale précurseur au réseau vasculaire mature	20
1.1.2 Angiogénèse pathologique : cas de l'angiogénèse tumorale.....	23
1.2 Le "Switch angiogénique" : quand la balance penche en faveur du cancer	25
1.2.1 Les facteurs anti-angiogéniques endogènes : gardiens d'un équilibre précaire. 25	
1.2.1.1 L'interféron α	26
1.2.1.2 Les thrombospondines	26
1.2.1.3 Le facteur 4 plaquettaire	26
1.2.1.4 Angiostatine et Endostatine	27
1.2.2 Les facteurs pro-angiogéniques.....	29
1.2.2.1 Facteurs de croissance et récepteurs à activité tyrosine kinase.....	29
Les VEGFs	30
Les FGFs.....	31
Les PDGF's.....	32
Les angiopoïétines	32
Les corécepteurs des facteurs de croissance.....	32
1.2.2.2 Autres facteurs pro-angiogéniques	33
Facteur de croissance transformant (TGF- β).....	33
Les cellules endothéliales circulantes.....	34

2	Traitements anti-angiogéniques : stratégies et limitations	35
2.1	Les traitements anti-angiogéniques actuels.....	35
2.1.1	Le concept des -INIB et des -MAB.....	36
2.1.2	Ciblage du VEGF	37
2.1.2.1	Le Bevacizumab.....	37
2.1.2.2	Cas d'un hybride : l'Aflibercept	39
2.1.2.3	Les inhibiteurs de kinases associées aux RTKs	39
2.2	Les traitements anti-angiogéniques : entre espoir et réalité	40
2.2.1	Le rapport bénéfices/risques inhérent aux traitements	41
2.2.2	Les phénomènes de résistance aux traitements	41
2.2.2.1	Les voies de signalisation pro-angiogéniques alternatives	43
2.2.2.2	L'infiltration par les cellules de la moelle osseuse	43
2.2.2.3	Modification du mode de vascularisation	43
2.2.2.4	Augmentation du caractère invasif des cellules tumorales	44
2.3	Perspectives et nouvelles solutions	44
3	L'Héparanase, une enzyme du microenvironnement tumoral	46
3.1	Le microenvironnement tumoral	46
3.1.1	La composante cellulaire du microenvironnement tumoral	47
3.1.1.1	Les cellules tumorales.....	47
3.1.1.2	Autres cellules du microenvironnement tumoral	49
3.1.2	La composante moléculaire du microenvironnement tumoral	50
3.1.2.1	La matrice extracellulaire	50
3.1.2.2	Les protéines de la matrice extracellulaire.....	51
3.1.2.3	Protéoglycanes et polysaccharides de la matrice extracellulaire	51
3.1.3	Les molécules solubles du microenvironnement tumoral	57
3.1.3.1	Les protéases de la matrice extracellulaire.	57
3.1.3.2	Les glycosidases de la matrice extracellulaire.	58

3.1.4	Physicochimie du microenvironnement tumoral.....	60
3.1.4.1	Hypoxie et acidose	60
3.2	L'héparanase, une cible thérapeutique prometteuse.	62
3.2.1	Biologie de l'héparanase	62
3.2.1.1	Biosynthèse et activation de l'héparanase	62
3.2.1.2	Structure, mécanisme catalytique et spécificité	64
3.2.2	Fonctions biologiques de l'héparanase.	66
3.2.3	Stratégies actuelles d'inhibition de l'héparanase.	69
3.2.3.1	Les analogues de l'héparane sulfate	69
3.2.3.2	Autres stratégies d'inhibition.....	71
3.2.4	Vers la conception de nouveaux analogues des héparanes sulfates.....	72
3.2.4.1	Les polysaccharides sulfatés de sources alternatives.....	74
3.2.4.1.1	Les Carraghénanes :.....	74
3.2.4.1.2	Les Fucoïdanes :	76
3.2.4.1.3	Les Dextrans sulfate :.....	77
3.2.4.1.4	Les chondroïtines sulfate	77
3.2.4.2	Polysaccharides sulfatés et hémostase.	78
3.2.4.3	Modification de la structure des polysaccharides.	80
3.2.4.3.1	La dépolymérisation des chaînes de polysachharides.....	80
	Voies chimiques :	81
	Voies enzymatiques :	83
	Voies physiques :	83
3.2.4.3.2	Modification des fonctions chimiques des séquences polysaccharidiques	84
	Le procédé de Glycol split.....	85
	OBJECTIFS	87
	RESULTATS	89

Chapitre I : Conception d'analogues des héparanes sulfates pour l'inhibition ciblée de l'héparanase.....	90
1. Introduction :	91
2. Matériel et méthodes	93
3. Résultats et discussion.....	101
3.1. Caractérisation physicochimique de polysaccharides sulfatés biosourcés dépolymérisés et/ou modifiés chimiquement	101
3.2. Evaluation des activités biologiques des polysaccharides sulfatés non fractionnés	108
3.3. Evaluation des activités biologiques des polysaccharides sulfatés de bas poids moléculaires.....	114
3.4. Analyse structurale par UHPLC-MS des carraghénanes- λ -DR et DR-GS	129
Conclusion du Chapitre I:	138
Chapitre II : Elaboration d'un modèle d'angiogénèse <i>in-vitro</i> pour le criblage de polysaccharides sulfatés inhibiteurs de l'héparanase et régulateurs de l'angiogénèse tumorale	144
Avant propos :	145
Conclusions générales:	166
Perspectives	175
Références Bibliographiques	179

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Maturation de la vascularisation : vasculogénèse, angiogénèse et artériogénèse.	21
Figure 2 : L'angiogénèse physiologique par bourgeonnement.....	22
Figure 3 : Comparaison des vascularisations normale et tumorale.	24
Figure 4 : Le Switch angiogénique.....	25
Figure 5 : Les facteurs anti-angiogéniques endogènes et leurs principaux récepteurs sur les cellules endothéliales.....	27
Figure 6 : Fonctionnement général d'un récepteur à activité tyrosine kinase	29
Figure 7 : Les VEGFs, leurs récepteurs et co-récepteurs	31
Figure 8 : La complexité de l'angiogénèse tumorale	33
Figure 9 : Normalisation de la vascularisation au cours d'un traitement anti-angiogénique	36
Figure 10 : Les inhibiteurs du VEGF ou de ces récepteurs	40
Figure 11 : Les types de résistances aux traitements anti-angiogéniques.	42
Figure 12 : Le microenvironnement tumoral.....	47
Figure 13 : Caractéristiques phénotypiques des cellules cancéreuses	48
Figure 14 : La matrice extracellulaire.....	50
Figure 15 : Structure des protéoglycanes, localisation et glycosaminoglycanes associés.....	53
Figure 16 : Structure des différents Glycosaminoglycanes (GAGs)	54
Figure 17 : Action anticoagulante des héparines via l'Antithrombine	56
Figure 18 : Structure et organisation des héparanes sulfates.....	57
Figure 19 : Dégradome humain et localisation des protéases (<i>Theocharis, Adv Drug Deliv Rev, 2016</i>).....	58
Figure 20 : Dégradation enzymatique des GAGs. Adapté de (Ernst et al., 1995).....	59
Figure 21 : Effets de l'hypoxie sur la production de HIF : impact sur le pH extracellulaire et la glycolyse.....	61
Figure 22 : Biosynthèse de l'héparanase, circulation intra/extracellulaire et modifications post-traductionnelles	63
Figure 23 : Mécanisme catalytique de l'héparanase.....	64
Figure 24 : Structure 3D de l'héparanase et identification des HBDs	65
Figure 25 : Spécificité de l'héparanase	66
Figure 26 : L'héparanase dans le compartiment extracellulaire	68

Figure 27 : Inhibiteurs de l'héparanase analogues des HS actuellement en essai clinique.	70
Figure 28 : Production de petites molécules inhibitrices de l'héparanase.....	72
Figure 29 : Production des héparines en industrie pharmaceutique et leur classification selon leur poids moléculaire (<i>D'après I Elalamy, 2010</i>).....	73
Figure 30 : Unités disaccharidiques des différents types de carraghénanes et leur transformation par traitement basique ou réaction enzymatique (<i>D'après Jiao et al, Marine Drugs, 2011</i>).....	75
Figure 31 : Structures identifiées pour les fucoïdanes par <i>fucus vesiculosus</i> (<i>D'après Ale et al, Marine Drugs, 2011</i>).....	76
Figure 32 : Structure des dextrans sulfate	77
Figure 33 : Structure des chondroïtines sulfate	78
Figure 34 : Cascade de la coagulation sanguine.....	79
Figure 35 : Principales méthodes de dépolymérisation des héparines et structure des HBPM obtenues.....	80
Figure 36 : Mécanismes de dépolymérisation par voie chimique des héparines.....	81
Figure 37 : Dépolymérisation en conditions basiques ou acides. <i>D'après (Linhardt and Gunay, 1999a) & (Bhaumik and Dhepe, 2015)</i>	82
Figure 38 : Mécanisme d'hydrolyse des héparines par l'héparinase I. <i>D'après (Shaya et al., 2010)</i>	83
Figure 39 : Synthèse d'héparinoïdes à partir du polysaccharide bactérien K5	85
Figure 40 : Etape de glycol split et impact sur la séquence pentasaccharidique des héparines.....	86
Figure 41 : Droites d'étalonnage pour la caractérisation du poids moléculaire de polysaccharides sulfatés analysés en SEC-HPLC. Les analyses ont été effectuées avec le matériel et les conditions spécifiées plus haut. a) droite d'étalonnage d'une gamme de dextran allant de 1 kDa à 50 kDa. b) droite d'étalonnage d'une gamme d'héparine allant de 1,2 kDa à 5,7 kDa.	95
Figure 42 : Système FRET du test fluorimétrique mesurant l'activité de l'héparanase	98
Figure 43 : Chromatogrammes SEC-HPLC des échantillons dépolymérisés par la méthode radicalaire assistée par ultrasons (DR) pour les temps de dépolymérisation entre 0 et 8h des héparines et carraghénanes- λ . Les masses molaires moyennes en nombre M_n sont indiquées pour les temps 0 et 8h. Les M_n obtenus en fonction du temps de dépolymérisation sont également exprimés sous forme de graphiques. Echantillons analysés à une concentration de 1g/L, séparés par une association de deux colonnes TSK-G5000PW et TSG-G4000PW à	

l'aide d'un éluant NaNO_3 0,1M et détectés par réfractométrie.	104
Figure 44 : Inhibition relative de l'héparanase par chaque polysaccharide non fractionné à une concentration de 40ng/ml	109
Figure 45 : Analyses chronométriques APTT, TT et PT des activités anticoagulantes des composés. Les temps de coagulation des plasmas en l'absence d'inhibiteurs (contrôle négatif NaCl 0,9%) sont de 37 s pour l'APTT, 16.2 s pour le TT et 13.1 s pour le TP. Les temps maximum de coagulation pour chaque test sont de 120 s pour l'APTT, 60 s pour le TT et 70 s pour le TP. Le double du temps de coagulation basal est indiqué sur chaque graphe par la ligne pointillée en bleu clair.	111
Figure 46 : Analyses dose/réponse des composés pour l'inhibition des facteurs Xa et IIa de la coagulation en présence d'antithrombine.	112
Figure 47 : Spectre LC-MS du carraghénane- λ -DR montrant les DP de 2 à 10 identifiés par les ions (m/z) indiqués tableau 10 (A), Spectre MS/MS du DP6 par fragmentation de l'ion (m/z) 1256,9373 (B), fragmentation dans la source observée pour l'ion (m/z) 802,2457 correspondant au DP4 (C) Spectre LC-MS montrant les dérivés du DP6 ayant perdu des fonctions sulfates pendant la dépolymérisation dont les ions sont répertoriés tableau 10 (D)	131
Figure 48 : Mécanisme de cyclisation intramoléculaire aboutissant à l'anhydroglucose d'après (Ciancia et al ,1993) (a), Structure des carraghénane- λ et - θ (b).	134
Figure 49 : Spectre LC-MS du carraghénane- λ -DR-GS montrant les DP de 2 à 10 identifiés par les ions (m/z) indiqués tableau 12 (A). Spectre LC-MS du carraghénane- λ -DR-GS montrant les dérivés du DP4 ayant perdu des fonctions sulfates et ou des ouvertures de cycle ont été détectées (1 ouverture = 1 split), les ions identifiés sont renseignés tableau 11.	135
Figure 50 : Hypothèses de glycol-split suite à des désulfatation induites par la DR	136
Figure 51 : Hypothèses de réaction par le procédé de glycol split sur un carraghénane- λ de DP4. Ouverture de l'extrémité non réductrice par le procédé de glycol-split a) formes existantes quand l'extrémité réductrice est sous forme ouverte b) ouverture de l'extrémité non réductrice et réduction de l'extrémité réductrice b1) uniquement réduction de l'extrémité réductrice b2) Ouverture de l'extrémité non réductrice et extrémité réductrice sous forme ouverte b3).....	137
Figure 52 : Effet de la diminution du poids moléculaire moyen des polysaccharides sur leur capacité à inhiber l'héparanase ou la coagulation (via le test aPTT).	140
Figure 53. Structure of the three sulfated polysaccharides studied : λ -Carrageenan, Heparin and Dextran sulfate. Concerning the heparin structure, the glucuronic acid may be epimerized as iduronic acid along the chain and bear an O-sulfatation on the C-3 position .	150

Figure 54 : Travaux envisagés pour compléter les données obtenues concernant les deux thématiques traitées dans la thèse.....	177
---	-----

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Traitements anti-angiogéniques autorisés par la FDA et/ou l'EMA	44
Tableau 2 : Les protéines de la matrice extracellulaire	51
Tableau 3 : Comparaison de l'effet inhibiteur de l'héparanase de différents polysaccharides sulfatés. (<i>D'après Parish & Snowden, patent US5541166A, 1996</i>).....	74
Tableau 4 : Polysaccharides sulfatés, origine et composition.....	101
Tableau 5 : Caractérisation physicochimique des composés non fractionnés (NF) et du Lovenox.....	102
Tableau 6 : Caractéristiques physicochimiques des polysaccharides sulfatés et leurs dérivés de bas poids moléculaires.....	106
Tableau 7 : Activités biologiques des composés non fractionnés sur l'inhibition de l'héparanase et de la coagulation sanguine.	113
Tableau 8 : Caractéristiques physicochimiques et activités biologiques des dérivés de Chondroïtine-4-sulfate	115
Tableau 9 : Caractéristiques physicochimiques et activités biologiques des dérivés de Fucoïdanes, dextrans-sulfate, carraghénanes- κ et carraghénanes- ι	116
Tableau 10 : Analyse du Carraghénane- λ -DR par ESI-UHPLC-MS. Confirmation de la structure D2S,6S-G2S par les pics extraits du spectre total, l'analyse MS-MS de l'ion 1256,9373 correspondant au DP6 ainsi que de la fragmentation dans la source observée pour le DP4 et identifications de dérivés désulfatés dans le mélange avec l'exemple du DP6.....	132
Tableau 11 : Analyse du Carraghénane- λ -DR-GS par ESI-UHPLC-MS (figure 48). Identification de chaînes allant de DP2 à DP10. Observation d'espèces montrant des pertes de sulfatation ainsi que 1 ou 2 ouvertures de cycle (split)	136

LISTE DES ABBREVIATIONS et UNITES

Les abréviations :

α -SMA	α -Smooth Muscle Actin
ADN	Acide désoxyribonucléique
AH	Acide Hyaluronique
Akt ou PKB	Proteine Kinase B
ANG	Angiopoïétine
APTT	Activated Partial Thrombin Time
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
CAF	Cancer Associated Fibroblast
CEP	Cellule Endothéliale Précurseur
C-kit	Mast/stem cell growth factor receptor ou proto-oncogène C-kit
CML	Cellules de Muscle Lisse
CMS	Cellules Myéloïdes Suppressives
CPL	Carcinôme Pulmonaires de Lewis
CS	Chondroïtine Sulfate
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DP	Degré de Polymérisation
DS	Dermatan Sulfate
EBP	Elastin Binding Protein
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FOLFIRI	acide Folinique + Fluorouracil + Irinotecan
FT	Facteur Tissulaire
GAG	Glycosaminoglycan
Gal	Galactose
GalNac	N-acétylgalactosamine
GlcA	Acide Glucuronique
GlcN	Glucosamine
GlcNac	N-acetylglucosamine
GS	Glycol split
HBD	Heparin Binding Domain
HBPM	Heparine de Bas Poids Moléculaire
HER	Human EGF related Receptor
HEP	Heparine
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HNF	Heparine Non Fractionnées
HPSE ou Hpa1	Heparanase
HS	Heparan Sulfate

HSPG	Heparan Sulfate ProteoGlycane
HUBPM	Heparine d'Ultra Bas Poids Moléculaire
Hyal	Hyaluronidase
IC ₅₀	Concentration d'un composé inhibant 50% de l'effet observé
IdoA	Acide Iduronique
IFN	Interferon
IL	Interleukine
KS	Keratan Sulfate
MAB	Monoclonal AntiBody
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MB	Membrane Basale
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MDA-MB-231	M.D.Anderson Metastatic Breast 231
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MMP	Matrix MetalloProteinase
MS	Mass Spectrometry
mTOR	mecanistic Target Of Rapamycin
NRP	Neuropiline
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
PAI-1	Plasminogène 1
PAR	Protease activated receptor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PF	Platelet Factor
pH	Potentiel Hydrogène
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase
PKC	Protein kinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
PLGF	Placental Growth Factor
PT	Prothrombine Time
RGD	Arginine-Glycine-AcideAspartique
RTK	Récepteurs à activité Tyrosine Kinase
SDF-1	Stromal cell-derived Factor-1
TAM	Tumor Associated Macrophage
TFPI	Tissu Factor Pathway Inhibitor
TGF	Transforming Growth Factor
TIE	Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains
TIMP	Tissu Inhibitor of MetalloProteinase
tPA	tissu Plasminogen Activator
TSP	Thrombospondine
TT	Thrombine Time
UHPLC	Ultra High Pressure Liquid Chromatography
uPA	Urokinase ou urokinase Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth factor Receptor

VHL	Von Hippel-Lindau
VPF	Vascular permeability Factor

Les unités :

%	Pourcentage
°C	Degrés Celsius
h	Heure
Hz	Hertz
g	Gramme
L	Litres
M	Moles par litre
m/z	Rapport de la masse atomique sur la charge d'une molécule
min	Minutes
mol	Moles

Introduction générale

D'après le dernier rapport publié par l'Institut National du Cancer (INCa) et en lien avec le rapport technique rendu par l'Institut de veille sanitaire (InVS) (Leone et al., 2015), les données pour 2015 estiment à 385 000 le nombre de nouveaux cas de cancer et 149 500 le nombre de décès associés à cette maladie, hommes et femmes confondus. Entre 2011 et 2015, l'incidence des cancers est estimée à la baisse pour les hommes et en légère hausse pour les femmes alors que le taux de mortalité reste stable pour les deux sexes. Cette stabilité du taux de mortalité est observée depuis 2005 (Bindert-Foucart et al., 2013) malgré un vieillissement de la population et une incidence des cancers qui ne diminue que très légèrement. Cela témoigne de l'efficacité des "plans cancer" qui, depuis leur création en 2003, ont permis une nette évolution des méthodes de diagnostic, de dépistage et de traitement améliorant ainsi la prise en charge précoce des patients et les taux de guérison. Pour autant, de nombreux progrès sont encore à faire et le cancer reste une préoccupation majeure concernant la santé publique.

En témoignent, les axes de recherche privilégiés par le plan cancer 2014-2019, soit : une meilleure identification des populations à risque, la modélisation des grands processus tumoraux ainsi que l'amélioration de la compréhension de l'échappement tumoral et des relations hôte-tumeur (INCa, 2014). Ces directives s'inscrivent dans la continuité d'une recherche qui, depuis une vingtaine d'années maintenant, s'attèle au développement de thérapies dites ciblées. Ces thérapies s'appuient sur la compréhension du développement tumoral. Elles visent à bloquer ou déstabiliser des processus propres aux tumeurs afin de limiter leur développement et/ou d'entraîner leur mort. Un ciblage efficace permet de minimiser l'impact des thérapies sur les cellules saines. Bien que de grand progrès aient été effectués, la majorité des traitements actuels sont encore lourds pour les patients et les phénomènes de récurrences restent présents. Améliorer notre compréhension des mécanismes développés par chaque type de cancer reste donc un enjeu primordial afin de traiter les patients plus efficacement.

L'un des mécanismes communs à de nombreux types de cancer se manifestant par des tumeurs solides est l'angiogénèse tumorale. Ce processus correspond au recrutement, par la tumeur, de nouveaux vaisseaux sanguins. Il a été mis en évidence pour la première fois par le docteur Judah Folkman en 1971 (Folkman, 1971a). Suite à diverses expériences en laboratoire et à de nombreuses observations en chirurgie, il fait le postulat qu'une tumeur ne

peux excéder une taille de quelques millimètres cubes si son approvisionnement en nutriments et en oxygène se fait uniquement par diffusion dans les tissus. Comme un organe sain, la tumeur a besoin d'être alimentée par la circulation sanguine pour continuer à proliférer. Si elle n'est pas vascularisée, la tumeur restera dans un état de dormance où un pseudo-équilibre existe entre le nombre de cellules mitotiques et le nombre de cellules apoptotiques. Cette étude donna naissance au premier concept de thérapie anti-angiogénique. Celui-ci stipule qu'en empêchant la vascularisation de la tumeur ou en détruisant les vaisseaux sanguins qui l'alimente, sa croissance peut être stoppée. C'est une des premières notions de thérapie ciblée.

Bien que critiqué au départ, ce concept a conquis de nombreuses équipes de recherches qui ont participé à décrypter le phénomène de l'angiogénèse de manière à mettre en place une stratégie efficace pour le contrer. La découverte, dans les années 1980, du facteur pro-angiogénique nommé facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), fut un nouveau pas dans l'avancée vers la compréhension du mécanisme de l'angiogénèse (Shing et al., 1984). Il fallu attendre **2004**, pour que soit mis sur le marché **le premier anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF, le bevacizumab (Avastin®)** (Ferrara et al., 2004). Utilisé chez des patients atteints de cancers du côlon métastatiques en association avec la chimiothérapie de référence (Irinotecan), ce traitement fut le premier depuis de nombreuses années à **augmenter la survie sans progression de la maladie (6 mois en moyenne)** (Hurwitz et al., 2004) et concrétisa par la même occasion ce qui fut pour le Dr Folkman, le combat d'une vie.

Aujourd'hui, le développement de nouvelles thérapies anti-angiogéniques reste un enjeu majeur dans la lutte contre le cancer. En effet, le pas en avant qu'avait marqué l'utilisation de l'**Avastin®** à sa commercialisation en 2004 est à prendre aujourd'hui avec du recul. Il **représente un coût élevé, pour un taux de survie sans progression assez faible et peut provoquer des effets secondaires conséquents** (Delage, 2015).

Cette efficacité limitée provient du fait que l'angiogénèse est bien plus complexe qu'imaginée au départ. Elle se déclenche suite à l'activation d'un "interrupteur angiogénique" qui fait passer la tumeur de la phase dormante à la phase invasive (Folkman et al., 1989). Pour déclencher ce processus, des signaux moléculaires pro-angiogéniques sont envoyés de la tumeur vers les vaisseaux sanguins les plus proches. En se fixant aux vaisseaux sanguins, ces facteurs pro-angiogéniques vont entraîner la formation de nouveaux capillaires qui viendront irriguer la tumeur. L'angiogénèse est naturellement régulée chez un individu sain, mais lors d'apparition de tumeurs, des facteurs tels que le stress hypoxique (manque d'oxygène) ou la

présence d'oncogènes vont déstabiliser l'équilibre en place. Une surproduction de molécules pro-angiogéniques peut alors être observée, allumant ainsi l' "interrupteur angiogénique" et laissant libre cours à la formation anarchique de nouveaux vaisseaux sanguins pour nourrir la tumeur (Bergers and Benjamin, 2003).

L'échange de signaux entre tissus tumoraux et tissus sains s'effectue dans **le microenvironnement tumoral**. Cet environnement bien particulier a fait l'objet de nombreuses études et semble comporter de potentielles cibles thérapeutiques et/ou marqueurs de pronostic des cancers. **Caractérisé par des conditions physicochimiques particulières (micro-acidité, faible taux d'oxygène)**, il est la zone de front entre la tumeur et l'environnement sain de l'hôte (Witz and Levy-Nissenbaum, 2006). Le microenvironnement tumoral est un territoire d'échange entre la tumeur et son hôte par le biais de signaux moléculaires produits par chacun des partis. Des petits oligosaccharides et peptides en passant par les protéines et enzymes complexes, ces signaux vont permettre à la tumeur de proliférer tout en échappant à la réponse immunitaire. **Les enzymes hydrolytiques notamment, jouent un rôle prépondérant** en régulant la disponibilité de nombreux facteurs pro-tumoraux au sein du microenvironnement. Certaines sont **largement surexprimées et/ou hypersécrétées par les tumeurs telles que des protéases et des glycosidases** (Kallunki et al., 2013).

Au sein des glycosidases, une enzyme bien particulière, **l'héparanase, est hypersécrétée dans de nombreux cas de cancers** (Parish et al., 2001a). Cette endo- β -D-glucuronidase est capable d'hydrolyser les chaînes d'héparane sulfate situées sur les protéoglycanes de la matrice extracellulaire, ou de leur membrane basale. L'héparane sulfate est un glycosaminoglycane impliqué dans la maintenance de la structure de la matrice extracellulaire ainsi que dans les phénomènes d'adhésion cellulaire et de signalisation (Sanderson, 2001). Sa structure polysulfatée offre de nombreux sites de liaison et lui confère un rôle de "stockage" de différents facteurs de croissance cellulaire impliqués dans l'angiogénèse. Par l'hydrolyse des chaînes d'héparane sulfate, **l'héparanase entraîne d'une part, un remodelage de la matrice extracellulaire et d'autre part, la libération des facteurs de croissances et des molécules de signalisation** (Barash et al., 2010). De cette manière, l'héparanase participe à des processus physiologiques tels que la réparation tissulaire ou pathologiques tels que l'inflammation, **l'angiogénèse tumorale et la dissémination métastatique** (Vlodavsky et al., 2008). Cette enzyme semble donc une cible d'intérêt en cancérologie et son inhibition est considérée comme une stratégie anti-angiogénique des plus prometteuses (Pisano et al., 2014).

Dans cette thématique de recherche d'un inhibiteur efficace de l'héparanase, les héparines, des polysaccharides sulfatés d'origine animale, se sont avérées être les cibles les plus étudiées (Parish et al., 1999). Leur structure est identique au substrat naturel de l'héparanase qu'est l'héparane sulfate, à la différence près, que les héparines possèdent plus de sites sulfatés sur leurs chaînes. Les héparines sont déjà largement utilisées en médecine pour leur activité anti-coagulante et possèdent d'autres activités biologiques qui les rendent peu spécifiques dans le cadre d'un traitement anti-héparanase (Presta et al., 2003). La recherche de molécules mimant les héparines et l'utilisation de méthodes de **modifications physicochimiques et biotechnologiques** (dépolymérisation, acétylation, glycol-split...) des héparines a permis d'obtenir des composés ayant une spécificité plus forte envers l'héparanase tels que Muparfostat® ou Roneparstat® (Naggi et al., 2005; Parish et al., 1999). Mais la difficulté d'obtention d'héparines purifiées peut apparaître comme un frein. Pour cette raison, la recherche de **nouvelles matières premières, potentielles sources d'inhibiteurs de l'héparanase et de l'angiogénèse tumorale** semble une alternative prometteuse.

C'est dans ce contexte de recherche que s'inscrit ce projet de thèse soutenu par le Comité Départemental de la Charente-Maritime de la Ligue Contre le Cancer. Ce projet vise à concevoir des polysaccharides sulfatés, analogues des héparines et ayant des propriétés anti-angiogéniques via une inhibition ciblée de l'héparanase sécrétée dans le microenvironnement tumoral. Cette stratégie s'appuie sur des précédents travaux de thèse soutenus par la Ligue Contre le Cancer et réalisés de 2011 à 2014 par le Dr Oussama Achour (Achour, 2014). Ces travaux avaient notamment permis le développement d'une méthode de dépolymérisation physicochimique appliquée aux héparines et dont les dérivés produits avaient montré une inhibition intéressante de l'héparanase pour une activité anticoagulante réduite (Achour et al., 2016, 2013).

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent donc dans la logique des précédents. Pour cela, la méthode de **dépolymérisation physicochimique** développée en 2013, **combinant les ultrasons au peroxyde d'hydrogène**, a été appliquée sur des polysaccharides sulfatés issus de **sources végétales**, animales ou **bactériennes**. Elle a été utilisée seule ou en association avec un procédé de modification chimique, le **glycol split** (Naggi et al., 2005), de manière à moduler les activités biologiques des polysaccharides de départ. Afin d'identifier des composés alternatifs aux héparines parmi les dérivés produits, les activités recherchées étaient : **une forte inhibition de l'héparanase**, **une faible toxicité envers les cellules**

endothéliales ainsi qu'un impact réduit sur la coagulation. Les meilleurs candidats ont alors été testés sur un modèle d'**angiogénèse 3D** *in vitro*, conçu pour reproduire les conditions physicochimiques du microenvironnement tumoral.

La présentation de ces travaux s'articulera donc comme suit :

Dans une étude bibliographique, nous décrirons dans un premier temps le phénomène d'angiogénèse et les étapes de son développement en conditions physiologiques et pathologiques. Dans un second temps, nous présenterons les thérapies anti-angiogéniques actuellement utilisées en clinique et nous traiterons des bénéfices et des risques associés à leur utilisation. Pour terminer, nous aborderons le microenvironnement tumoral, son hétérogénéité et nous nous intéressons de manière détaillée à l'héparanase, l'hydrolase ciblée dans ce projet, en décrivant son fonctionnement et les stratégies de conception de ses inhibiteurs.

A la suite de cette étude bibliographique, les objectifs de ces travaux de thèse seront exposés puis les principaux résultats obtenus seront déclinés en deux chapitres, chacun comportant une publication acceptée dans un journal à comité de lecture.

- Le premier chapitre concerne la conception de polysaccharides sulfatés de bas poids moléculaires potentiels inhibiteurs de l'héparanase.

Il est composé d'une étude préliminaire de "screening" effectuée sur différents polysaccharides sulfatés tels que les héparines, les chondroïtines-4-sulfate, les dextrans sulfate, les carraghénanes lambda/Kappa/Iota et les fucoïdanes. Cette étude consiste à évaluer l'effet de la dépolymérisation physicochimique et du procédé de glycol-split sur les activités anti-coagulantes et anti-héparanase des différents polysaccharides sulfatés. Ces résultats préliminaires sont suivis d'un article publié en février 2017 dans le journal "Carbohydrate polymer" présentant les meilleurs candidats obtenus via dépolymérisation couplée au glycol split d'échantillons d'héparines et carraghénanes- λ et caractérisés par une forte activité anti-héparanase et une faible activité anti-coagulante. Une étude utilisant la méthode UHPLC-MS est alors présentée à la suite de ces travaux publiés et propose une première élucidation de la structure des dérivés de carraghénanes- λ produits.

- Le second chapitre concerne l'évaluation du potentiel anti-angiogénique des composés montrant une inhibition élevée de l'héparanase. Les résultats sont regroupés dans un article accepté pour publication dans le journal "Marine Drugs" le 27 avril 2017. Cet article présente la caractérisation du phénotype d'expression de l'héparanase par différentes lignées de cancers mammaires (MCF-7) et (MDA-MB-231) dans des conditions physiologiques ou proches de celles du microenvironnement tumoral. Il décrit également l'évaluation du potentiel anti-angiogénique des meilleurs candidats inhibiteurs de l'héparanase (développés chapitre I) via utilisation d'un modèle Matrigel 3D en conditions de stress hypoxique et nutritif. L'impact sur l'angiogénèse de la supplémentation avec un milieu riche en héparanase provenant de surnageant de culture de la lignée MCF-7 y est aussi présentée.

Enfin, ces travaux seront discutés dans le contexte global du projet de conception de d'inhibiteurs spécifiques de l'héparanase pour l'inhibition de l'angiogénèse dans lequel s'intègre la thèse, puis les perspectives envisagées pour la suite du projet seront exposées et viendront clore ce manuscrit.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 L'angiogenèse

1.1 L'angiogenèse : un processus physiologique et pathologique

Tout comme les tissus normaux, les tumeurs solides ont besoin d'un apport en oxygène et en nutriments pour proliférer. Au stade primaire de leur développement, elle se contentent d'échanges par diffusion dans les tissus pour subvenir à leurs besoins, mais au-delà d'une taille de 1-3 mm³, la diffusion n'est plus suffisante pour soutenir la prolifération et un équilibre apparaît entre cellules tumorales mitotiques et apoptotiques. Pour assurer la poursuite de son développement, la tumeur devient alors dépendante de la néo-vascularisation. **Ce processus est appelé angiogenèse et correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire préexistant** (Folkman, 1971a).

Bien que très active au stade du développement embryonnaire, l'angiogenèse est ensuite strictement régulée et ne survient naturellement que dans de rares cas. L'apparition d'altérations dans la vascularisation peut être source de nombreuses pathologies et dans le cas des cancers, la réactivation de l'angiogenèse est généralement de mauvais pronostic pour le patient.

1.1.1 De la cellule endothéliale précurseur au réseau vasculaire mature

A l'étape de l'embryogenèse, l'initiation du développement vasculaire se fait par l'intermédiaire des précurseurs des cellules endothéliales appelés angioblastes (**Figure 1**). Ces derniers vont s'aggréger et débiter leur différenciation afin de former les vaisseaux sanguins primitifs dans un processus appelé vasculogénèse (Risau, 1997). L'extension du réseau vasculaire préexistant est ensuite régi par le mécanisme d'angiogenèse. Il implique l'extension de nouveaux capillaires (bourgeonnement) ou la division en de multiples capillaires, avec l'inclusion de cellules périendothéliales (intussusception) ou de cellules endothéliales ("bridging") (Hendrix et al., 2003). Le mécanisme d'angiogenèse diffère en fonction du type de tissu à vasculariser et du nombre de vaisseaux primitifs déjà présents. Mais l'angiogenèse n'est pas considérée comme complète avant l'intervention des cellules périendothéliales telles que les péricytes ou les cellules musculaires lisses (CML). Ces cellules favorisent l'intégrité vasculaire et un contrôle hémostatique dans la lumière du vaisseau (Carmeliet, 2003). Tandis que les capillaires naissants sont constitués uniquement de cellules endothéliales, leur maturation va débiter via un enserrment par les péricytes et une mobilisation de la matrice extracellulaire (MEC) pour les stabiliser. Plus les vaisseaux sont soumis à des contraintes mécaniques fortes, plus ils se recouvrent de muscles lisses. Cela leur octroie des propriétés viscoélastiques et vasomotrices nécessaires à la régulation des flux sanguins importants

(mécanisme d'artériogénèse) (Benjamin et al., 1998).

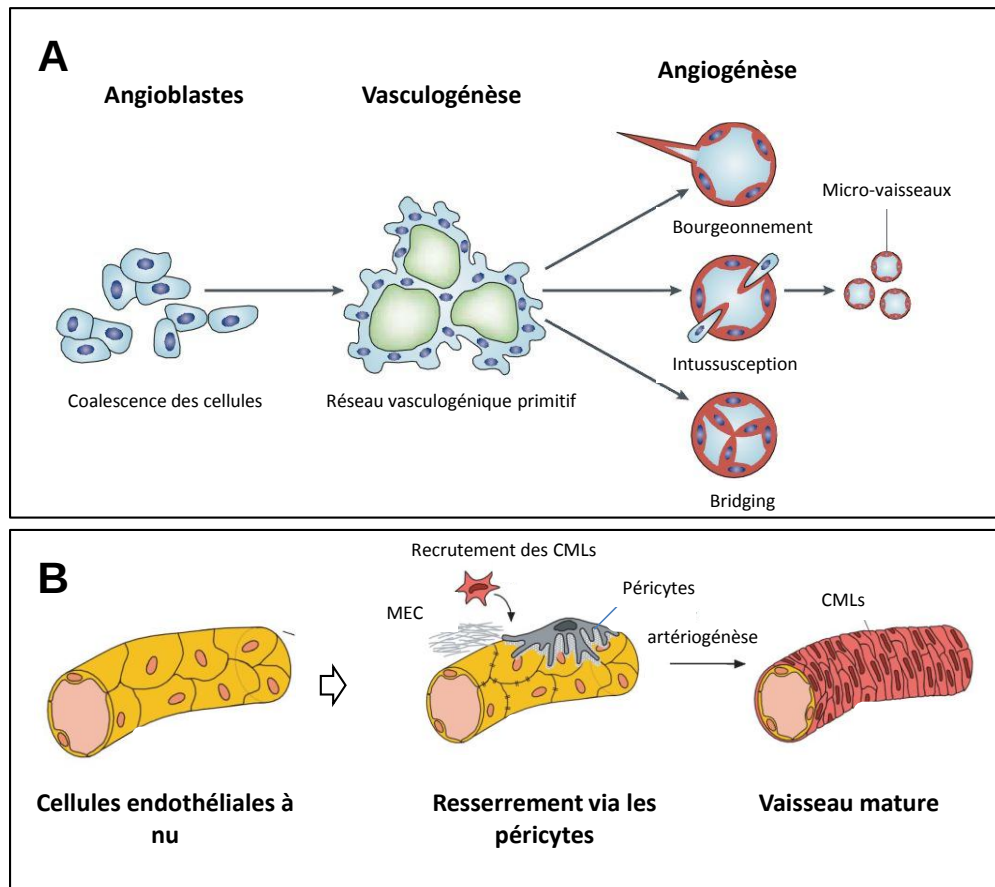


Figure 1 : Maturation de la vascularisation : vasculogénèse, angiogénèse et artériogénèse.

A. Les précurseurs de cellules endothéliales appelés angioblastes se rassemblent en amas provoquant ainsi leur différenciation en cellules endothéliales. Un réseau primitif se forme, c'est la vasculogénèse. Ce réseau préexistant va se remodeler en formant de nouveaux micro-vaisseaux par bourgeonnement, intussusception ou "bridging", c'est l'angiogénèse. **B.** Les capillaires nouvellement formés sont composés uniquement de cellules endothéliales. Leur maturation débute par un resserrement assisté par les cellules murales (péricytes) et la présence de MEC. En fonction de l'influx sanguin subit par les vaisseaux, certains vont mobiliser des cellules musculaires lisses qui vont former une gaine protectrice assurant stabilité et vaso-motilité. (D'après M.J.C Hendrix et al, *Nature reviews*, 2003 et P Carmeliet, *Nature Medicine*, 2003)

Chez un individu adulte et sain, le réseau vasculaire est abouti et comporte environ 10^{12} cellules endothéliales pouvant recouvrir une surface entre 4.000 et 7.000 m² (Aird, 2005). Les cellules endothéliales ont une des durées de vie les plus longues après les cellules nerveuses.

Dans un vaisseau sanguin seulement 1 cellule sur 10.000 est en division (Hanahan and Folkman, 1996). Ce réseau mature n'évolue qu'en de très rares cas chez un individu en bonne santé. On retrouve cependant une induction de l'angiogénèse pendant les processus de réparation tissulaire et chez la femme pendant le cycle menstruel ou la grossesse. A l'état de quiescence, les cellules endothéliales forment une mono-couche et sont reliées entre elles grâce à des molécules d'adhésions telles que les Cadhérines. Elles sont enlacées par les péricytes qui aident à réguler leur

prolifération, à maintenir l'intégrité vasculaire, et avec qui elles partagent une membrane basale (MB). Bien que quiescentes, les cellules endothéliales conservent leur capacité à répondre à des stimuli angiogéniques (Carmeliet and Jain, 2011).

En présence de signaux angiogéniques tels que l'angiopoïétine 1 et 2 (ANG-1/2), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance vaso-endothélial (VEGF), ainsi que d'enzymes de dégradation (protéases, glycosidases), l'angiogenèse peut être déclenchée (**Figure 2**).

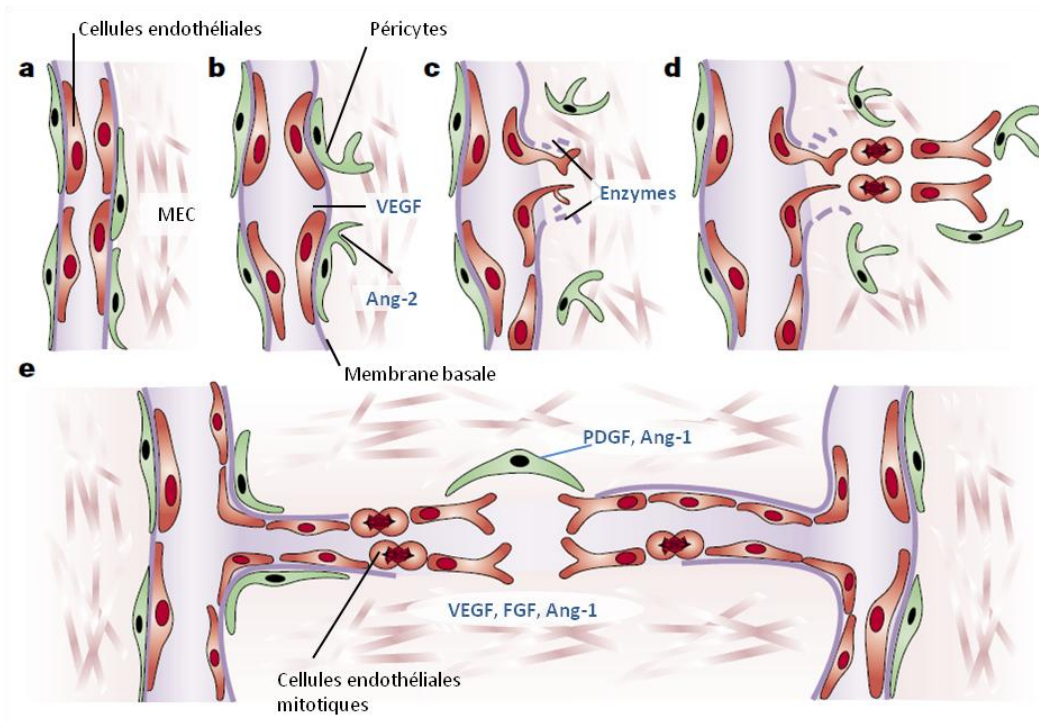


Figure 2 : L'angiogenèse physiologique par bourgeonnement

a. Vaisseau quiescent. **b.** Après stimulation par des facteurs angiogéniques, le vaisseau se dilate et les péricytes se décollent et les cellules endothéliales se détachent. **c.** La membrane basale et la MEC sont dégradées par des protéases et glycosidases afin d'entamer la phase de bourgeonnement. **d.** Les cellules endothéliales envahissent la MEC, se divisent et s'allongent formant ainsi la lumière du nouveau vaisseau. **e.** La jonction avec les ramifications voisines finalise la formation du nouveau vaisseau dont l'intégrité est assurée par le recrutement, la maturation des péricytes et la restauration de la membrane basale sous l'influence des facteurs de croissance en présence. (D'après Carmeliet & Jain, *Nature review* 2011 & Bergers et al, *Nature reviews*, 2003)

L'angiogenèse est donc un processus complexe et strictement régulé. De part cette complexité, la survenue de dysfonctionnements dans le mécanisme peut entraîner de nombreuses pathologies. Une angiogenèse insuffisante entraîne des ischémies tissulaires qui peuvent mener, entre autre, à des accidents vasculaires cérébraux, des pré-éclampsies ou des neuropathies. (Arenillas et al., 2007; Maynard et al., 2003; Oosthuyse et al., 2001). A l'inverse une angiogenèse incontrôlée se retrouve dans les maladies telles que l'obésité, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), l'arthrite ainsi que dans les cancers (Bruemmer, 2012; Maruotti et al., 2006; Moutray and Chakravarthy, 2011).

1.1.2 Angiogenèse pathologique : cas de l'angiogenèse tumorale

Dans le cas des cancers, l'angiogenèse est un processus indispensable à la croissance tumorale. C'est le Dr Judah Folkman qui fut le premier à faire ce constat au début des années 1960. Lors d'une étude sur un substitut à l'hémoglobine effectuée sur des glandes thyroïdes animales maintenues en vie par perfusion, il s'aperçoit en implantant des cellules de mélanome de souris dans ces glandes que des tumeurs se forment mais n'excèdent pas une taille de 1 mm³ (Folkman et al., 1963). Les petites tumeurs ont alors été transplantées de nouveau dans la souris donneuse et se sont cette fois développées jusqu'à atteindre 1.000 fois leur volume initial. La seule différence observée entre la tumeur sur la thyroïde perfusée et celle, présente dans la souris, est que la tumeur dans la souris était vascularisée. C'est en 1971 qu'il proposa alors son concept d'angiogenèse tumorale (Folkman, 1971a).

Une fois vascularisée, la tumeur dispose d'un accès à l'oxygène et aux nutriments favorisant son développement tout en lui permettant d'évacuer les déchets cataboliques. Cette néovascularisation permet également à des cellules issues de la tumeur primaire, de passer dans la circulation sanguine afin de coloniser les tissus voisins ou distants. L'apparition de **ces nouvelles tumeurs appelées métastases engage alors fortement le pronostic vital du patient** (Folkman, 2002; Zetter, 1998). La densité intra-tumorale de vaisseaux sanguins a par ailleurs été associée à la formation de métastases et à la survie des patients dans différents cancers (Bigler et al., 1993; Weidner et al., 1991).

L'angiogenèse déclenchée par la tumeur pour son développement est cependant différente d'une angiogenèse physiologique. Le fait est que l'angiogenèse tumorale est très mal régulée. Cela a contribué au fait que la tumeur vascularisée soit considérée comme "une blessure qui ne se referme jamais" (Dvorak, 1986). En effet, les néo-vaisseaux sont désorganisés et leur structure est anormale (**Figure 3**). Ils sont dilatés, tortueux, hémorragiques et les connections entre vaisseaux sont anarchiques (Goel et al., 2011; Jain, 2005). Les cellules endothéliales composant ces vaisseaux ont une morphologie anormale, des jonctions intercellulaires lâches et des fenestrations peuvent apparaître (McDonald and Choyke, 2003). Les péricytes qui assurent normalement l'intégrité des capillaires sont instables, voir absents. La membrane basale est également irrégulière, anormalement épaisse voir absente sur certaines portions de vaisseaux.

Toutes ces anomalies structurelles du réseau vasculaire tumoral contribuent à une grande hétérogénéité dans l'influx sanguin. De plus, les contraintes mécaniques de pressions exercées par les cellules tumorales compressent les vaisseaux et provoquent des zones d'hypertensions interstitielles, d'hypoxie et d'acidose (Padera et al., 2004). Ces conditions peuvent altérer l'intégrité des traitements chimiothérapeutiques (Helmlinger et al., 1997). La vascularisation chaotique

empêche également une bonne délivrance des molécules thérapeutiques et ne pallie pas complètement au problème de l'hypoxie. Dans ce cercle vicieux, l'hypoxie entraîne une surproduction de facteurs de croissances, dont le VEGF, qui stimule l'angiogenèse tout en contribuant à la perméabilité vasculaire qui favorise elle-même l'hypoxie... Cette chaîne sans fin favorise la prolifération de phénotypes cellulaires résistants à l'hypoxie et l'agressivité des cancers. La perméabilité des vaisseaux favorise également l'invasion des cellules tumorales et la dissémination métastatique, aggravant le pronostic des patients (Stoletov et al., 2010).

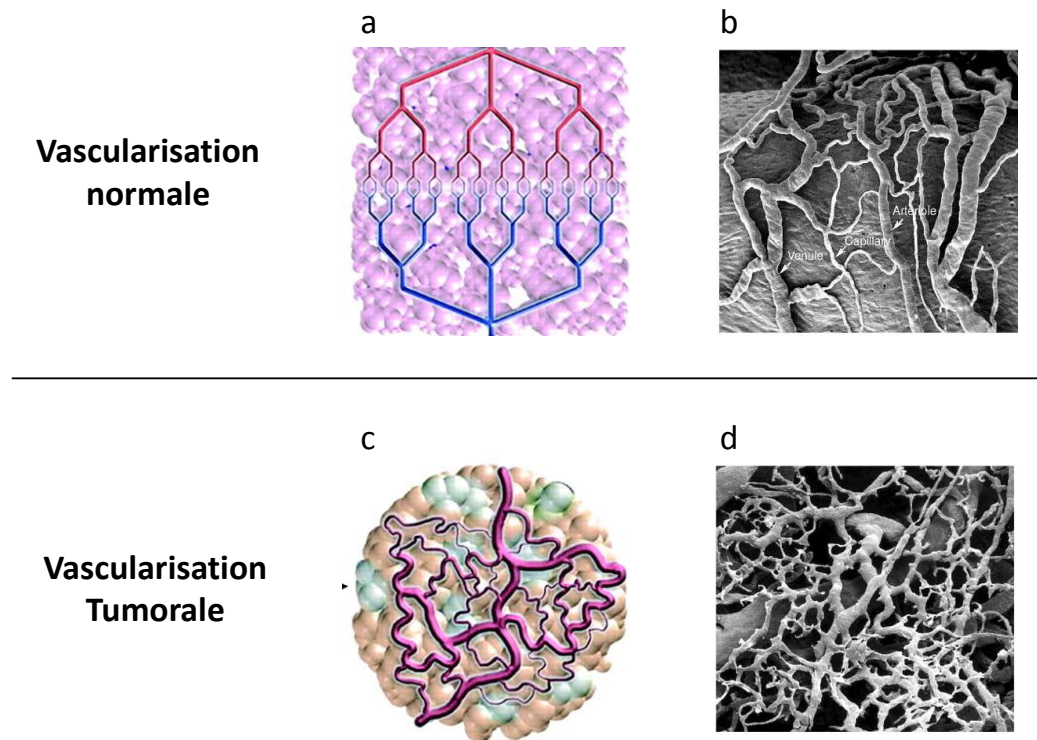


Figure 3 : Comparaison des vascularisations normale et tumorale.

(a,b) Représentation schématique et photographie au microscope électronique d'une vascularisation normale. (c,d) Représentation schématique et photographie au microscope électronique d'une vascularisation tumorale. Les vaisseaux y sont beaucoup plus nombreux, désordonnés et déformés. (Inspiré de Goel et al, *Physiological reviews* 2011, et de McDonald & Choyke, *Nature medicine*, 2003)

En conclusion, bien que déclenchée en réponse à la présence de facteurs de croissance comme l'angiogenèse physiologique, l'angiogenèse tumorale se comporte de manière totalement différente. La vascularisation anarchique et imparfaite semble ne jamais prendre fin et maintient les conditions d'hypoxie qui favorise l'agressivité, la progression et la dangerosité du cancer. En réalité, en présence de cellules tumorales, c'est l'hétérogénéité des facteurs dits pro-angiogéniques induits par la tumeur qui va déstabiliser le fragile équilibre qui contrôle normalement l'angiogenèse. Ce basculement vers une angiogenèse tumorale est communément appelé "switch angiogénique "

1.2 Le "Switch angiogénique" : quand la balance penche en faveur du cancer

Le "switch angiogénique" dépend majoritairement de la production, par les cellules néoplasiques, de facteurs de croissances dirigés vers les cellules endothéliales. Ces facteurs peuvent stimuler la croissance de vaisseaux sanguins afin d'irriguer la tumeur, et/ou provoquer une hypo-sécrétion des inhibiteurs naturels de l'angiogénèse qui maintiennent normalement la quiescence vasculaire en conditions physiologiques. L'équilibre vasculaire est ainsi déstabilisé en faveur des facteurs pro-angiogéniques et déclenche la néo-vascularisation tumorale (**Figure 4**).

1.2.1 Les facteurs anti-angiogéniques endogènes : gardiens d'un équilibre précaire.

Les inhibiteurs endogènes de l'angiogénèse comprennent différentes protéines, peptides, hormones ou métabolites (Folkman, 1995). Les mécanismes d'action des facteurs antiangiogéniques présentés ci après sont décrits (**Figure 5**)

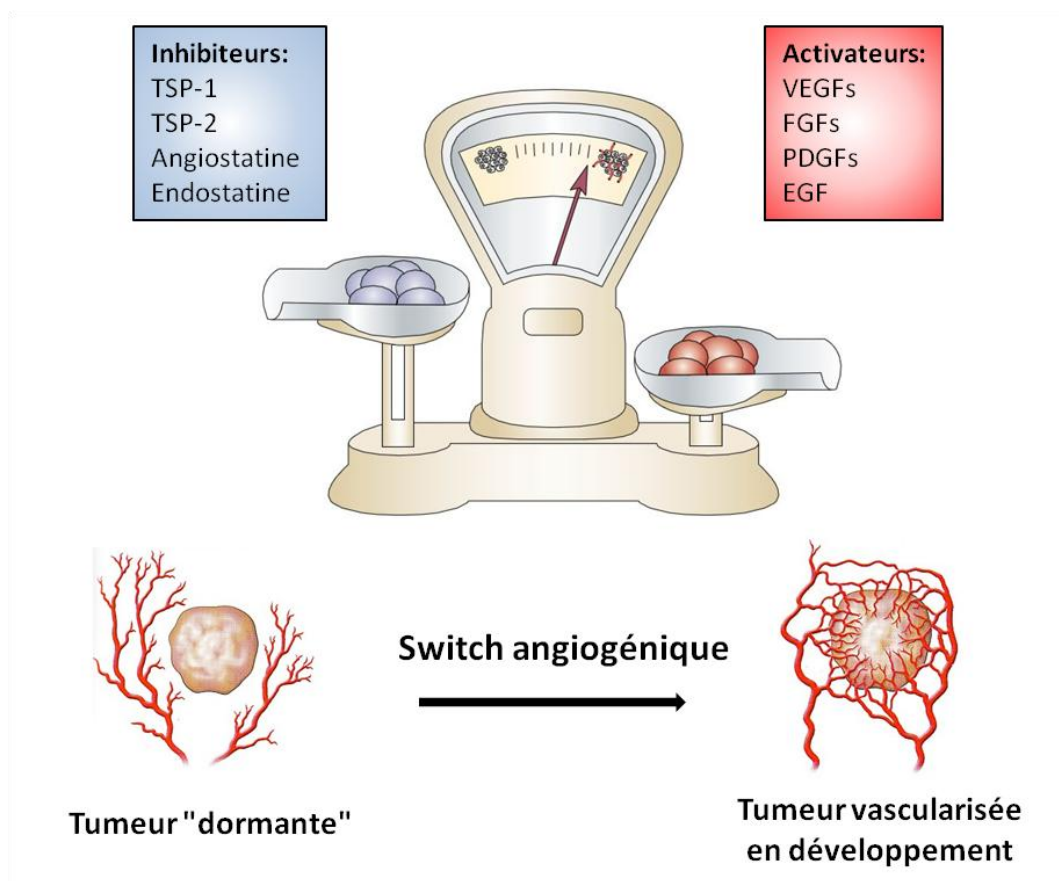


Figure 4 : Le Switch angiogénique

La production de facteurs pro-angiogéniques par la tumeur induit un déséquilibre avec les facteurs anti-angiogéniques en présence, ce qui induit le switch angiogénique. Ce phénomène active la vascularisation de la tumeur, favorisant ainsi sa croissance, son développement et la dissémination métastatique. (Inspiré de Bergers & Benjamin, *Nature reviews*, 2003)

1.2.1.1 L'interféron α

L'interféron- α est une cytokine de la famille des glycoprotéines (15-23 kDa). Elle est produite par les cellules lorsqu'elles sont infectées par un pathogène (virus, bactérie..) et augmente la réponse immunitaire (Maher et al., 2007). Elle peut également réguler d'autres fonctions comme l'apoptose, la prolifération cellulaire ainsi que l'angiogenèse. Le rôle de l'interféron- α sur l'angiogenèse tumorale a été évalué suite à des travaux ayant montré différentes activités sur la vascularisation (Heyns et al., 1985). Administré à petites doses régulières, il a permis la régression complète d'une hémangiomatose capillaire pulmonaire chez un adolescent au bout de 7 mois (Folkman, 1989; White et al., 1989). L'action anti-angiogénique de l'interféron- α dans les cancers est encore mal comprise aujourd'hui. Il semblerait qu'il puisse interagir, dans un premier temps, avec les cellules cancéreuses en diminuant leur production de facteurs de croissance VEGF et FGF-2 et dans un second temps, avec les cellules endothéliales pour moduler leur prolifération (Indraccolo, 2010).

1.2.1.2 Les thrombospondines

Parmi les plus décrits et les plus prometteurs des inhibiteurs endogènes, on retrouve les thrombospondines 1 et 2 (TSP-1 et TSP-2). Ces protéines homotrimériques (145 kDa) découvertes en 1990 sont sécrétées par les granules- α des plaquettes et possèdent une activité anti-angiogénique (Good et al., 1990). Elles possèdent différents domaines qui peuvent soit interagir avec les VEGFs ou les MMPs et permettre leur internalisation via les protéoglycanes d'héparane sulfate (HSPGs) qui agissent comme co-récepteurs des low density lipoprotein-related protein (LRP1) (**voir Figure 5**), soit se fixer sur les récepteurs CD36 des cellules endothéliales et induire des réponses anti-prolifératives ou pro-apoptotiques (Greenaway et al., 2007; Lawler and Lawler, 2012).

1.2.1.3 Le facteur 4 plaquettaire

Le facteur 4 plaquettaire (ou platelet factor 4 ; PF-4) est une protéine présente dans les granules- α des plaquettes. Elle est relarguée par les plaquettes, lors de leur aggrégation durant les processus de cicatrisation et/ou néovascularisation, sous forme d'un tétramère dont chaque sous unité de 7,8 kDa est composée de 70 acides aminés (Maione et al., 1990). Le PF-4 joue un rôle important dans les processus immunitaires. Il a également été identifié en 1982 par Folkman et Taylor comme étant un inhibiteur de l'angiogenèse, notamment grâce à sa capacité de liaison aux HS (Taylor and Folkman, 1982). Le PF-4 est caractérisé par de nombreuses interactions avec les héparines et héparanes sulfate (HS) et possède des sites avec de fortes affinités de liaisons pour les facteurs de croissance VEGF et FGF-2. En règle générale, les HS de la MEC ou de la membrane basale piègent, par

interactions ioniques, les facteurs de croissance pro-angiogéniques tels que VEGF et FGF-2 et stabilisent leur complexation avec leurs récepteurs respectifs de manière à améliorer leurs activités biologiques (Bikfalvi, 2004). Le PF-4 possède des affinités plus fortes pour le VEGF et le FGF-2 que les HS et va donc moduler leurs disponibilités et leurs activités pro-angiogéniques. De plus, indépendamment des HS, le PF-4 peut également se lier directement aux récepteurs des facteurs de croissance, inhibant leur activité (Bikfalvi, 2004). Plus récemment, PF-4 a été identifié comme ligand des récepteurs CXCR3-B que l'on peut retrouver sur les cellules endothéliales et qui induisent l'apoptose et l'autophagie des cellules (Lasagni et al., 2003) (**Figure 5**).

1.2.1.4 Angiostatine et Endostatine

Les protéines telles que l'endostatine et l'angiostatine ont montré un potentiel anti-angiogénique très intéressant (Figg and Folkman, 2008).

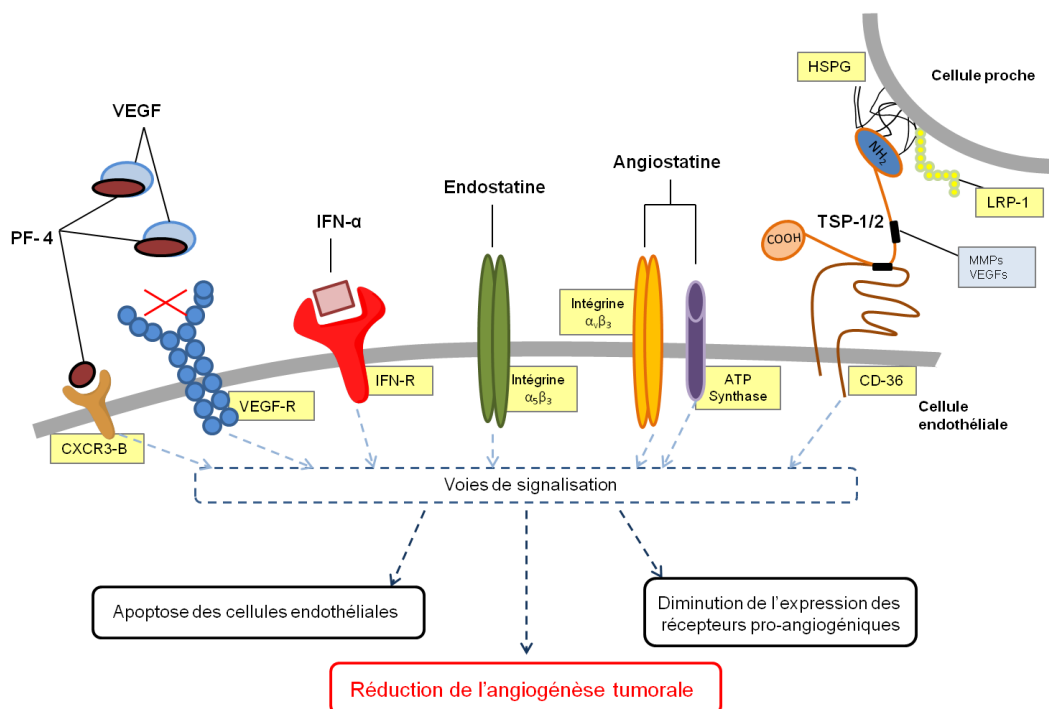


Figure 5 : Les facteurs anti-angiogéniques endogènes et leurs principaux récepteurs sur les cellules endothéliales

Le facteur plaquettaire 4 (PF-4) peut se fixer au récepteur CXCR3-B et induire une réponse anti-angiogénique. De la même manière, il exerce une activité anti-angiogénique en séquestrant les VEGFs et leur empêchant de se lier à leurs récepteurs. L'interféron-α (IFN-α), l'endostatine et l'angiostatine se lient à leurs récepteurs respectifs et déclenchent des voies de signalisation intramoléculaires anti-prolifératives ou pro-apoptotiques. Les thrombospondines 1 et 2 (TSP-1/2) possèdent un domaine qui interagit avec le récepteur CD36 qui induit une réponse anti-angiogénique. Elles peuvent également se lier à des métalloprotéases matricielles (MMPs) ou les VEGFs pro-angiogéniques et être internalisées grâce à leur extrémité N-terminale via les protéoglycanes d'héparanes sulfate (HSPGS) ou les lipoprotéines (LRP1) des cellules proches.

La découverte de l'angiostatine par l'équipe du docteur Judah Folkman dans les années 1990 découle d'observations réalisées en chirurgie où l'apparition de métastases était fréquente après

résection de la tumeur primaire. L'hypothèse a été faite que la tumeur primaire, malgré ses mutations, pourrait garder sa capacité à produire des facteurs anti-angiogéniques en quantité suffisante pour empêcher le développement de métastases. Une fois la tumeur retirée, aucun facteur anti-angiogénique ne pourrait alors prévenir la vascularisation et la croissance des métastases. L'angiostatine fut par la suite isolée à partir d'urine de souris porteuses de carcinomes pulmonaires de Lewis (CPL) (O'Reilly et al., 1994) puis administrée à d'autres souris porteuses de CPLs. Sous traitement à l'angiostatine, aucune souris ne développa de métastases une fois la tumeur primaire retirée.

L'angiostatine a été caractérisée comme étant un fragment protéique de 38 kDa issu de la protéolyse du plasminogène qui lui-même, dans son intégrité, ne présente pas d'activité anti-angiogénique (Cao and Xue, 2004). Par son association à différents récepteurs cellulaires et notamment l'ATP synthase ou l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (**Figure 5**), elle peut inhiber la prolifération ou induire l'apoptose des cellules endothéliales (Hanford et al., 2003). Cette activité anti-angiogénique a également été attribuée à ses interactions avec les récepteurs CD26, c-met et Angiomotine (Gonzalezgronow et al., 2005; Tarui et al., 2001; Troyanovsky et al., 2001).

Par une méthode analogue, l'endostatine a également été identifiée. Dans un modèle de souris porteuses d'hémangioblastomes, il a été montré que la tumeur primaire empêchait le développement d'une seconde tumeur implantée. Ce phénomène a été attribué à l'endostatine, identifiée comme étant un fragment protéique de 20 kDa du collagène XVIII (O'Reilly et al., 1997). La fixation de l'endostatine sur les cellules endothéliales via les intégrines $\alpha_5\beta_3$ (**Figure 5**) peut induire une signalisation intracellulaire qui diminue l'expression de gènes pro-angiogéniques (Abdollahi et al., 2004; Wickström et al., 2002; Yokoyama and Ramakrishnan, 2007).

Tout comme l'angiostatine et le PF-4, l'endostatine est concentrée dans les granules- α des plaquettes. Il semblerait que certaines granules- α soient concentrées en facteurs pro-angiogéniques alors que d'autres le soient en facteurs anti-angiogéniques. Ces granules pourraient être mobilisées indépendamment de manière à influencer l'angiogenèse physiologique ou pathologique (Italiano et al., 2008). Ce rôle important des plaquettes montre une forte connexion entre les processus d'angiogenèse et de coagulation sanguine. A ce jour, une trentaine de composés naturellement produits par le corps humain ont été identifiés comme inhibiteurs de l'angiogenèse et certains comme l'endostatine recombinante Endostar® sont utilisés en médecine (Dhanabal and Sethuraman, 2006).

1.2.2 Les facteurs pro-angiogéniques

La majorité des facteurs pro-angiogéniques appartiennent à la famille des facteurs de croissance. En se liant à leurs récepteurs respectifs sur les cellules endothéliales quiescentes, ils entraînent une cascade de signalisation qui mène à la prolifération, la migration des cellules et la formation de néo-vaisseaux. Bien que contrôlée chez un adulte sain, leur expression est dérégulée au sein des cellules tumorales à cause de l'altération génétique des oncogènes et suppresseurs de tumeurs. Cela entraîne leur surexpression et le déclenchement du switch angiogénique. Des facteurs physiologiques tels que l'hypoxie jouent également un rôle important dans le dérèglement de l'expression des facteurs de croissance. Les facteurs pro-angiogéniques les plus influents sont décrits ci-après.

1.2.2.1 Facteurs de croissance et récepteurs à activité tyrosine kinase

De nombreux facteurs de croissance entraînent une réaction biologique en se liant à des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) (Cook and Figg, 2010). Les RTKs sont des protéines transmembranaires dont le rôle est la transmission de signaux extracellulaires (tels que les facteurs de croissance) vers le cytoplasme (**Figure 6**). Ces signaux contrôlent de nombreuses fonctions cellulaires et peuvent déclencher des processus comme l'angiogenèse. La liaison du ligand bivalent extracellulaire entraîne une dimérisation des récepteurs suivie d'une autophosphorylation du complexe intracellulaire via le domaine kinase. Le récepteur ainsi phosphorylé va interagir avec différentes protéines cytoplasmiques et entraîner la transduction d'un ou plusieurs signaux impliqués dans des processus tels que la survie cellulaire, la prolifération, la migration ou la différenciation des cellules endothéliales (Lemmon and Schlessinger, 2010; Norden et al., 2009).

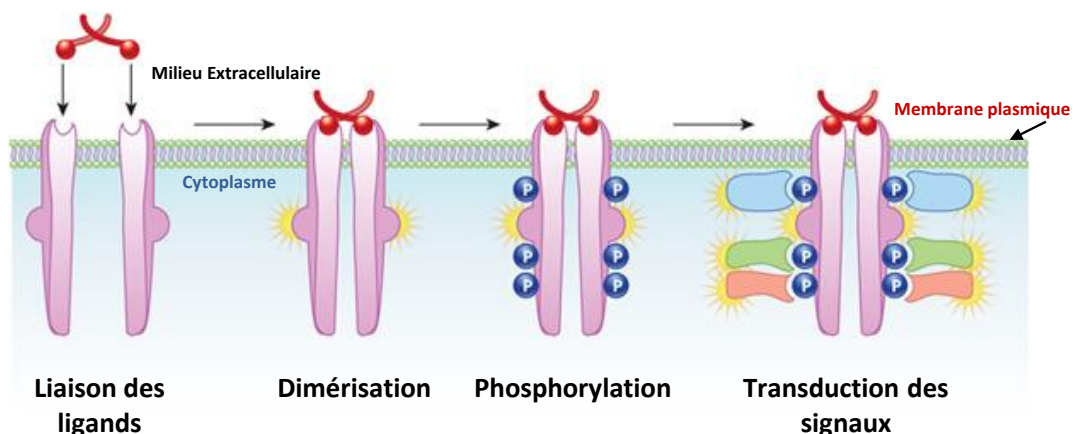


Figure 6 : Fonctionnement général d'un récepteur à activité tyrosine kinase

Quand le ligand bivalent se lie à ses récepteurs, il entraîne leur dimérisation. Cette dimérisation entraîne une phosphorylation du domaine intracellulaire via des enzymes de type tyrosine kinase. Des protéines cytoplasmiques peuvent alors venir se lier aux domaines phosphorylés et induire différentes réponses cellulaires. (Extrait de *Nature Education*, 2010)

Les voies de signalisation complexes sont souvent simplifiées et schématisées par des voies de signalisation linéaires alors que certaines voies sont interconnectées et ont des fonctions communes. Parmi les voies de signalisation les plus connues dans l'angiogenèse tumorale, on retrouve la cascade : phospholipase C γ (PLC γ) > protéine kinase C (PKC) > Raf kinase > "mitogen activated protein kinase" MAPK impliquée dans la prolifération et la migration des cellules ainsi que la cascade : PI3K > AKT impliquée dans la résistance à l'apoptose et la perméabilité vasculaire (Koch et al., 2011) (**observable Figure 7**)

Les VEGFs

Le VEGF est l'un des facteurs pro-angiogéniques ayant le plus fort impact sur l'angiogenèse tant physiologique que pathologique. Il a été découvert en parallèle par deux équipes de recherche dans les années 1980 (Ferrara and Henzel, 1989; Senger et al., 1983) qui s'accordèrent ensuite sur le nom : vascular endothelium growth factor (VEGF).

La famille des VEGFs comprend 7 protéines, les VEGF-A, B, C, D, E, F ainsi que le facteur de croissance placentaire (PLGF). La forme la plus étudiée est le VEGF-A car il est très impliqué dans l'angiogenèse. Il est communément appelé VEGF. Son activité pro-angiogénique passe par une modulation de la prolifération, la migration ainsi que la survie des cellules endothéliales (Tugues et al., 2011). On lui connaît 8 isoformes : VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆ induisant des réponses biologiques différentes (Takahashi and Shibuya, 2005). La famille des VEGFs interagit par l'intermédiaire de trois types de récepteurs : VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 (**Figure 7**). Les récepteurs VEGFR-1 et 2 sont impliqués dans l'angiogenèse tandis que VEGFR-3 est plutôt impliqué dans la lymphangiogenèse, la création de nouveaux vaisseaux lymphatiques (Koch et al., 2011). Le VEGF est capable d'interagir avec VEGFR-1 et VEGFR-2 et les rôles de ces deux récepteurs bien que distincts a été démontré comme primordial dans l'angiogenèse.

Le VEGFR-2 est majoritairement présent à la surface des cellules endothéliales. Son expression est très forte pendant l'embryogenèse puis diminue à l'âge adulte. On peut observer sa réactivation lors de phénomènes physiologiques ponctuels ou de pathologies telles que le cancer. Son activation par le VEGF induit la prolifération et la migration des cellules endothéliales tout en favorisant la perméabilité vasculaire (Olsson et al., 2006; Shibuya and Claesson-Welsh, 2006). De nombreuses tumeurs malignes surexpriment également le VEGFR-2 (Yousoufian et al., 2007).

Bien que l'action de VEGFR-1 ne soit pas encore bien élucidée, on sait qu'il a une plus forte affinité pour le VEGF que le récepteur VEGFR-2.

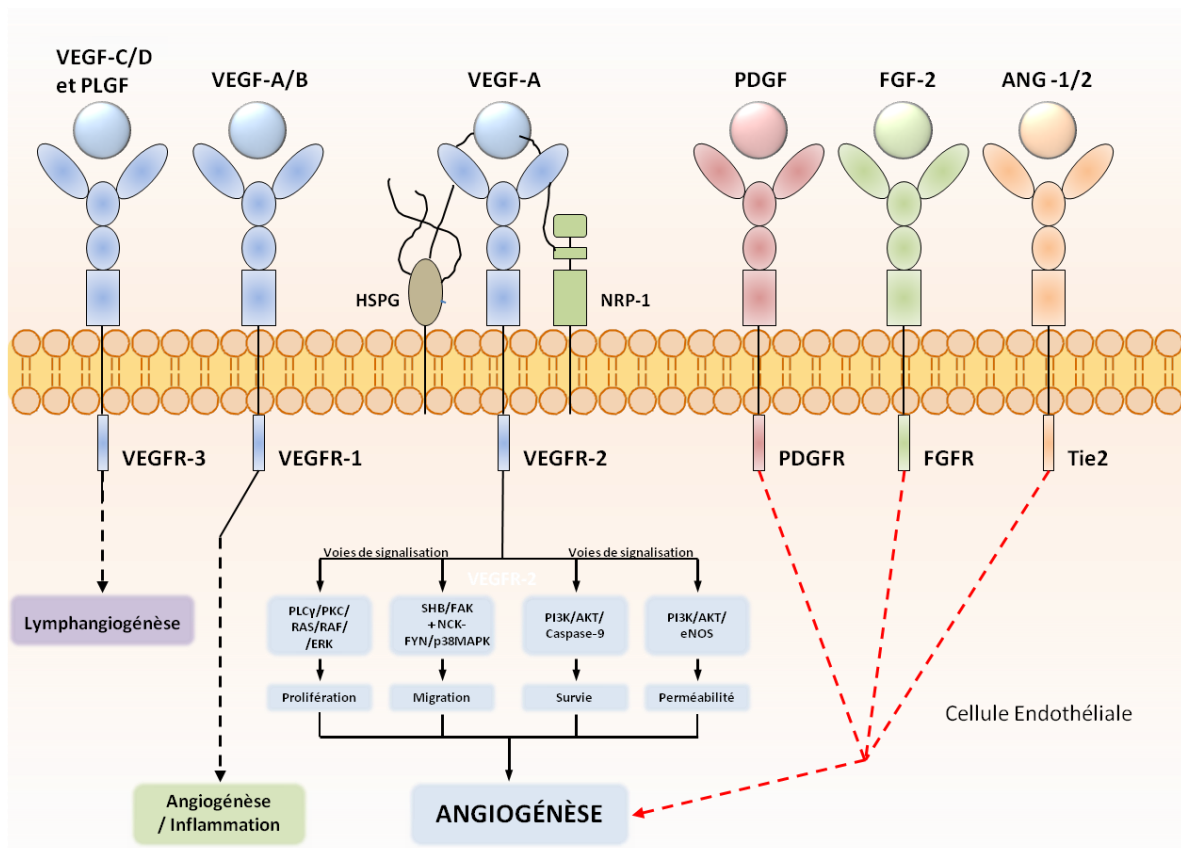


Figure 7 : Les VEGFs, leurs récepteurs et co-récepteurs

Spécificité de liaison des facteurs pro-angiogéniques de la famille des VEGFs, FGFs, PDGFs et angiopoïétines sur leurs récepteurs respectifs. Via liaison du VEGF, le récepteur VEGFR-2 est capable d'induire la prolifération, la migration ou la survie des cellules endothéliales et d'augmenter la perméabilité vasculaire. VEGFR-3 est impliqué dans la lymphangiogenèse tandis que VEGFR-1 est modérément impliqué dans l'angiogenèse via VEGF ou l'inflammation via PLGF. Les signalisations induites par les VEGFRs peuvent être modulées par l'intervention de différents corécepteurs comme les neuropilines ou les chaînes d'héparanes sulfate des HSPGs. Les complexes formés sont plus stables et influencent la réponse intracellulaire. L'angiogenèse peut également être déclenchée par la liaison du PDGF sur les PDGFRs, du FGF-2 sur les FGFRs et des angiopoïétines Ang-1 et Ang-2 sur le récepteur Tie2. Les voies de signalisation intracellulaires de l'angiogenèse sont détaillées seulement pour le VEGF. Les autres récepteurs déclenchent des voies similaires et d'autres non décrites ici qui favorisent également l'angiogenèse. (Inspiré de Norden et al, *Nature reviews*, 2009 & Olson et al, *Nature reviews*, 2006)

Les FGFs

Parmi les facteurs de croissance à activité tyrosine kinase, le premier à avoir été identifié est le FGF-2 (**Figure 7**) (Shing et al., 1984). Dès sa découverte il a été associé à la stimulation des cellules endothéliales *in vitro* et de l'angiogenèse *in vivo* (Böhlen et al., 1984). En réalité la famille des FGFs se compose de 23 protéines différentes, classifiées en 6 groupes en fonction de leur similarités. Les FGFs ont une forte affinité pour les HSPGs qui agissent comme des corécepteurs en se liant aux FGFs et à leurs récepteurs (FGFRs). On retrouve des récepteurs du FGF sur quasiment tous les types de cellules avec lesquelles ils jouent un rôle biologique différent. La surexpression de FGF a été observée dans différents cancers (Korc and Friesel, 2009). Le FGF-2 est souvent associé à l'angiogenèse tumorale et est d'ailleurs considéré comme facteur pronostique dans le cancer du poumon à petites cellules et le cancer de la vessie (Berger et al., 1999; Gazzaniga et al., 1999).

Les PDGF's

Une autre famille de facteurs de croissance à RTK est la famille des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGFs)(**Figure 7**). Cette famille est composée de 4 polypeptides solubles pouvant se lier à deux formes de RTK : PDGFR- α et PDGFR- β (Cao et al., 2008). Le PDGF est normalement produit par les cellules endothéliales et agit de manière paracrine en recrutant des cellules périendothéliales exprimant des PDGFRs, tels que les péricytes et les CML pour la maturation des vaisseaux (Lindahl et al., 1997). Le PDGF stimule l'angiogénèse *in vivo* et est surexprimé par certains cancers, notamment les gliomes et les cancers des ovaires pour qui la présence de PDGF ou PDGFR est associée à un mauvais pronostic pour le patient (Dabrow et al., 1998; Hermanson et al., 1992; Oikawa et al., 1994).

Les angiopoïétines

Les angiopoïétines (Ang-1, Ang-2 et Ang-3/-4) sont des protéines d'environ 57 kDa qui jouent un rôle de régulation de l'hémostase vasculaire tout en maintenant la quiescence des cellules endothéliales chez l'adulte. Bien qu'on leur connaisse deux récepteurs TIE-1 et TIE-2 présents sur les cellules endothéliales, aucun ligand connu ne se lie à TIE-1 (**Figure 7**). Ce dernier peut cependant former un hétérodimère avec TIE-2 et ainsi moduler son activité. ANG-1 agit comme un agoniste de TIE-2 et stimule la maturation vasculaire par recrutement des péricytes tandis que ANG-2 agit comme un antagoniste et provoque une perte d'adhérence des cellules endothéliales entre elles et avec les péricytes (Augustin et al., 2009). En présence de VEGF, ANG-2 peut promouvoir l'angiogénèse tandis que sans VEGF, ANG-2 va plutôt provoquer une régression des vaisseaux (Holash et al., 1999). L'expression d'ANG-2 est corrélée avec une angiogénèse exacerbée et de mauvais pronostic vital pour certaines tumeurs comme les mélanomes (Helfrich et al., 2009).

Les corécepteurs des facteurs de croissance

L'activation des récepteurs aux facteurs de croissance peut être influencée par la présence de corécepteurs (**figure 7**). Ces molécules aident la liaison du facteur de croissance sur son récepteur et ainsi modulent la réponse intracellulaire induite (Tugues et al., 2011). Parmi ces corécepteurs, on retrouve les HSPGs de la matrice extracellulaire. Par des mécanismes de séquestration/libération, ils peuvent créer des gradients de VEGF ou FGF-2 et participer à la réponse angiogénique (Gerhardt and Betsholtz, 2005). De plus ils ont la capacité de se lier aux VEGFRs, FGFR set PDGFRs et favorisent leurs interactions avec leurs ligands (Xu et al., 2011).

Les VEGFS possèdent d'autres corécepteurs, les neuropilines (NRP-1 et NRP-2). Ce sont des protéines transmembranaires ne possédant pas d'activité tyrosine kinase et jouant un rôle dans les activités neuronales. On les retrouve cependant exprimées par des cellules cardiaques ou

endothéliales, notamment sur des sites où l'angiogenèse est active (Staton et al., 2007).

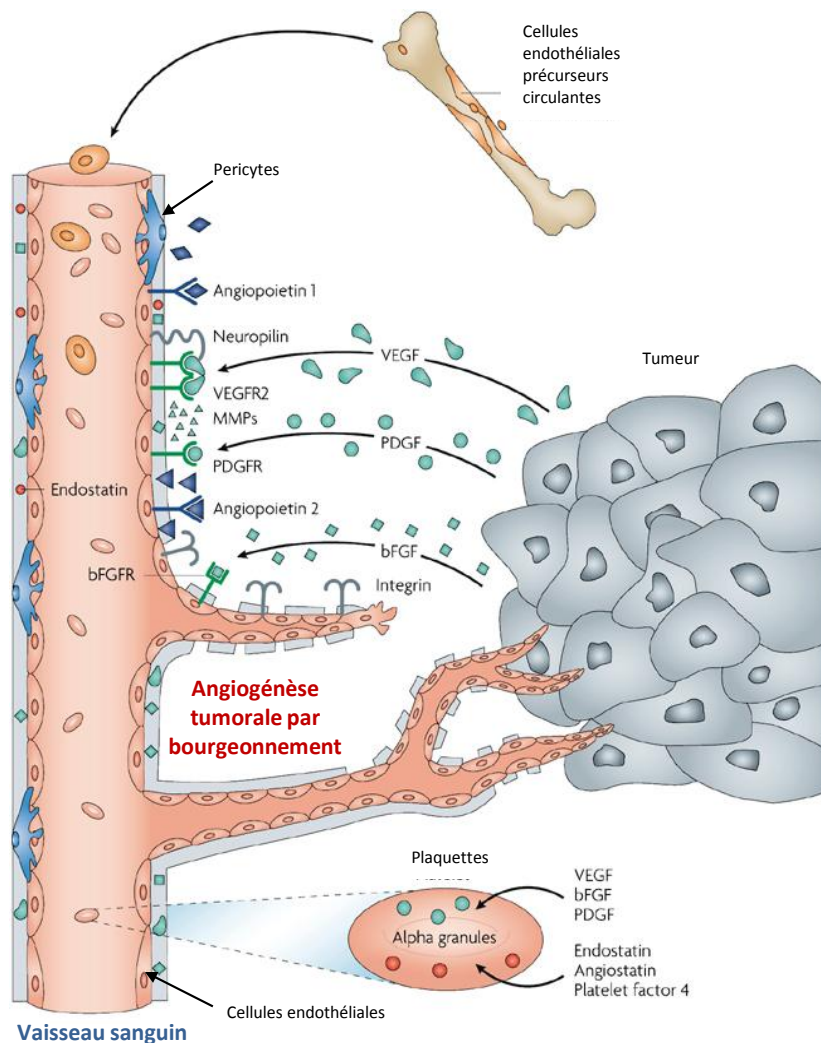


Figure 8 : La complexité de l'angiogenèse tumorale

Les tumeurs sécrètent un grand nombre de facteurs de croissances tels que FGF-2 (bFGF), VEGF ou PDGF. Ces facteurs pro-angiogéniques interagissent avec les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins proches de la tumeur. En activant leurs récepteurs ils induisent différentes réponses biologiques comme une perméabilité vasculaire accrue, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et/ou la production d'autres facteurs capables par exemple de recruter les plaquettes contenant des régulateurs de positifs ou négatifs l'angiogenèse. Les facteurs de croissance émis par la tumeur permettent aussi de recruter des cellules endothéliales circulantes issues de la moelle osseuse et participant à la formation de nouveaux capillaires. (D'après Judah Folkman, *Nature Drug discovery*, 2007)

1.2.2.2 Autres facteurs pro-angiogéniques

Facteur de croissance transformant (TGF- β)

Le facteur de croissance transformant (TGF- β) et ses récepteurs correspondants sont produits par quasiment toutes les cellules, mais les 3 isoformes (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) ne sont pas exprimés de la même manière dans les différents tissus. Les voies de signalisation induites par le TGF- β jouent un rôle important dans des processus physiologiques comme la prolifération cellulaire, la synthèse de la matrice extracellulaire, l'angiogenèse ou la réponse immunitaire (Blobe

et al., 2000). Le rôle du TGF- β dans l'angiogénèse tumorale reste ambiguë. On sait qu'à petites doses, il peut stimuler l'angiogénèse tandis qu'à hautes doses il tend à la stopper (Cook and Figg, 2010). De nombreux travaux sont encore en cours sur le TGF- β et ses récepteurs pour mieux comprendre leur impact sur l'angiogénèse tumorale.

Les cellules endothéliales circulantes

Il a été montré à la fin des années 1990 que des cellules issues de la moelle osseuse pouvaient également circuler dans le système sanguin périphérique (Asahara et al., 1997). Parmi ces cellules, on retrouve des cellules hématopoïétiques ainsi que des cellules endothéliales précurseurs (CEPs). Ces dernières ont la capacité de se différencier dans l'endothélium ou de s'accumuler dans des sites nécessitant le déclenchement du processus d'angiogénèse. Ces CEPs circulantes peuvent aussi bien être mobilisées pendant le développement embryonnaire que pendant une pathologie telle que le cancer (Rafii, 2000). Dans le cas des cancers, les cellules endothéliales et CEPs circulantes sont mobilisées sur le site de la tumeur par l'action du VEGF, du FGF-2 et du manque d'oxygène (Hypoxie).

Par l'expression de nombreux facteurs pro-angiogéniques, la tumeur est donc capable d'agir sur les différents récepteurs des cellules endothéliales et déstabiliser l'équilibre fragile qui les tenait en quiescence (**Figure 8**) (Folkman, 2007). Ce **switch angiogénique** va alors permettre à la tumeur de se vasculariser afin de se développer et potentiellement disséminer des métastases. Pour autant, bien que déjà complexe, le tableau n'est pas forcément complet.

Nous avons évoqué jusqu'à présent le comportement des cellules endothéliales dans la vascularisation et comment celles-ci interagissaient avec la tumeur. En évoquant le rôle des péricytes, des CMLs, des CEPs circulantes et brièvement celui des plaquettes, nous avons commencé à montrer que le phénomène d'angiogénèse tumorale ne se jouait pas à seulement entre deux protagonistes cellulaires. En réalité **c'est tout un microenvironnement qui se crée en présence d'une tumeur**. Celui-ci comporte d'autres acteurs cellulaires et moléculaires avec lesquels le cancer interagit et possède des conditions physicochimiques qui lui sont propres. Du fait de son hétérogénéité, le microenvironnement tumoral est donc source de nombreux facteurs capables de réguler l'angiogénèse tumorale. Avant de nous intéresser aux potentielles cibles thérapeutiques que comporte le microenvironnement tumoral pour le traitement de l'angiogénèse tumorale, nous aborderons, avec le chapitre suivant, les cibles déjà identifiées sur lesquelles reposent les traitements anti-angiogéniques actuellement utilisés en clinique.

2 Traitements anti-angiogéniques : stratégies et limitations

Depuis la découverte de l'angiogénèse tumorale par le docteur Folkman dans les années 1970, de nombreux progrès dans le domaine ont permis le développement de différents traitements anti-angiogéniques. L'autorisation de mise sur le marché en 2004 du bevacizumab (Avastin®), un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF, fut un grand pas dans l'avancée des traitements anti-angiogéniques (Ferrara et al., 2004). Ce traitement permit de prolonger la survie de nombreux patients atteints de cancer colorectal et fut une première victoire. Pour autant, comparée avec un traitement utilisant la chimiothérapie de référence seule, l'association avec le bevacizumab n'augmente la survie globale que de 1 à 6 mois en moyenne dans les cas de cancers colorectaux où il est le plus prescrit (Keating, 2014).

Par la suite le VEGF et/ou ses récepteurs restèrent une cible d'étude prioritaire pour le développement de nouveaux traitements anti-angiogéniques. Comme pour l'Avastin®, l'utilisation de ces nouveaux traitements montra vite l'apparition récurrente de phénomènes de résistance. Les bénéfices en terme de survie globale des patients sont souvent inférieurs à 6 mois et ne sont pas toujours supérieurs aux risques encourus du fait des différents effets secondaires (Jain, 2014).

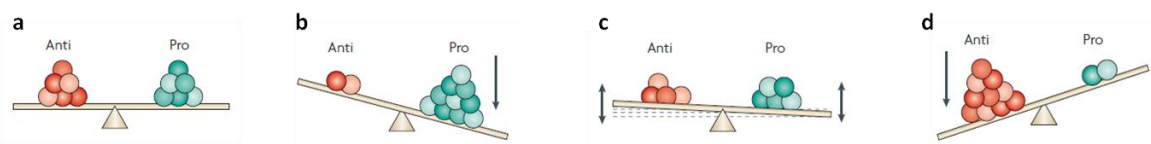
2.1 Les traitements anti-angiogéniques actuels

Parmi les stratégies anti-angiogéniques développées, certaines visaient la conception de molécules destinées à détruire la vasculature tumorale. L'utilisation de ces composés induisait une destruction des vaisseaux accompagnée d'une régression rapide de la tumeur qui devenait nécrotique et très hypoxique (El-Emir et al., 2005; Hollebecque et al., 2012). La forte hypoxie générée provoquait très généralement une récurrence avec un phénotype de cellules tumorales plus résistant et pro-métastatique (Rivera and Bergers, 2015). Actuellement, cette stratégie a été abandonnée au profit d'une normalisation de la vascularisation, considérée comme plus efficace (**Figure 9**).

La normalisation, comme son nom l'indique, ne cherche pas à détruire la vascularisation tumorale mais plutôt à la ramener à la normale. Elle favorise une meilleure maturation des vaisseaux, ce qui diminue l'hypoxie dans le microenvironnement tumoral. Des vaisseaux normalisés améliorent également la réponse immunitaire, l'acheminement des traitements chimiothérapeutiques jusqu'à la tumeur ainsi que le rétablissement d'une pression interstitielle normale diminuant alors les risques d'œdème (Jain, 2005). Depuis l'autorisation de mise sur le marché (AMM) du bevacizumab (2004), une dizaine d'autres composés agissant sur le VEGF ou

ses récepteurs ont également reçu une autorisation d'utilisation en clinique dans le traitement de différents cancers (Ye, 2016) (**voir Tableau 1**).

Equilibre des facteurs angiogéniques



Vascularisation

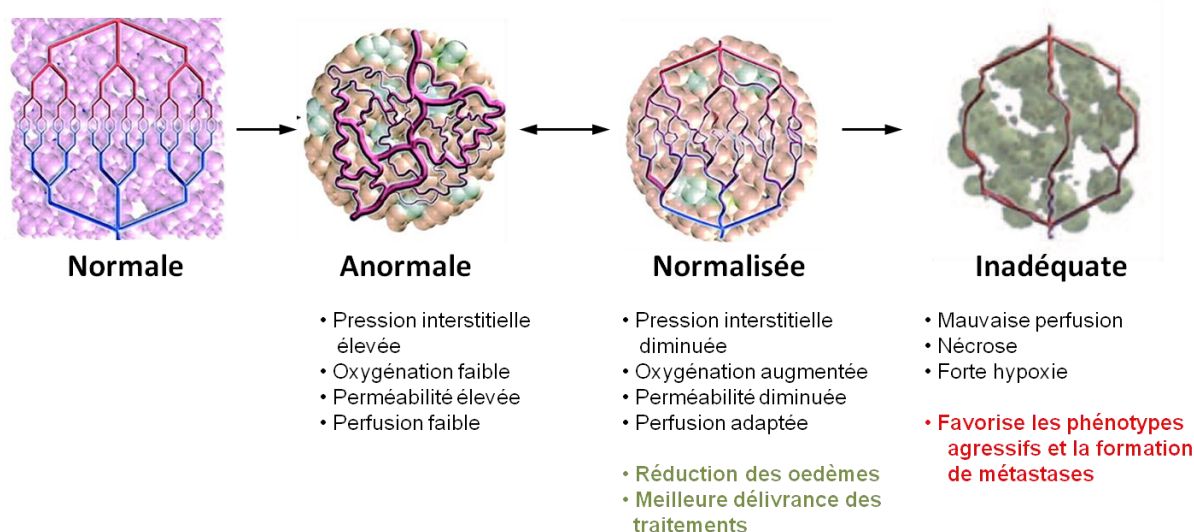


Figure 9 : Normalisation de la vascularisation au cours d'un traitement anti-angiogénique

a) En conditions physiologiques, il y a équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques de manière à maintenir le réseau vasculaire organisé et fonctionnel. **b)** La tumeur ainsi que les composants du microenvironnement tumoral produisent des facteurs pro-angiogéniques qui favorisent une vascularisation anormale, anarchique et désorganisée. **c)** La prise d'un traitement anti-angiogénique permet de rétablir un état d'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques induisant un retour partiel à une vascularisation normale. Cela améliore l'efficacité des traitements anti-cancéreux. **d)** Une inhibition trop intense ou prolongée de l'angiogénèse entraîne une destruction des vaisseaux et de la tumeur mais favorise une récurrence plus agressive. (D'après Jain RK, *Nature Reviews Neurosciences*, 2007)

2.1.1 Le concept des -INIB et des -MAB

Parmi les traitements anti-angiogéniques utilisés actuellement en clinique, on distingue deux types d'inhibiteurs, les -INIB et les -MAB.

Les -INIB sont de petites molécules capables de passer aisément la membrane plasmique. Ce sont des inhibiteurs (d'où le suffixe -inib), mimétiques de l'ATP, qui entrent en compétition avec cette dernière dans le mécanisme de phosphorylation caractéristique des kinases. Ces kinases peuvent être associées aux récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) (**revoir Figure 5**) ou simplement des kinases intracellulaires impliquées dans les voies de signalisation. L'inhibition sélective des kinases permet de cibler différentes voies de signalisation intracellulaires. Le sunitinib, par exemple, est une molécule capable d'inhiber plusieurs kinases impliquées dans les voies de transduction des

VEGFRs et PDGFRs impliquées dans la progression tumorale, la formation de métastases et l'angiogénèse tumorale.

Les –MAB sont des anticorps monoclonaux qui peuvent être chimériques homme/souris (-XIMAB), humanisés (-ZUMAB) ou entièrement humain (-MUMAB). Ils permettent de neutraliser certains récepteurs cellulaires ou leurs ligands (ex : bevacizumab/VEGF).

2.1.2 Ciblage du VEGF

2.1.2.1 Le Bevacizumab

Le bevacizumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal humanisé capable de se lier au VEGF-A, l'empêchant ainsi de se fixer à son récepteur et d'activer la cascade de signalisation qui provoque l'angiogénèse (**Figure 10**). La première preuve de concept que le ciblage du VEGF-A pouvait inhiber la croissance tumorale a été obtenu en 1993 sur un modèle murin (Kim et al., 1993). Le bevacizumab a reçu son autorisation de mise sur le marché aux Etats-unis par la "Food and Drug Administration" (FDA) en 2004 et était indiqué initialement pour le traitement des cancers colorectaux métastatiques en association avec la chimiothérapie de référence (association d'acide Folinique, Fluorouracil et Irinotecan: FOLFIRI). L'arrivée en clinique de ce nouveau traitement montra une augmentation de la survie globale des patients atteints de cancer colorectaux de 6 mois en moyenne comparé à la chimiothérapie seule. Bien que modeste, une telle amélioration n'avait pas été obtenue depuis 20 ans (Hurwitz et al., 2004).

Aujourd'hui, le Bevacizumab est toujours utilisé dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques en première et seconde ligne et son utilisation a rapidement été étendue à d'autres types de cancers métastatiques. Il est indiqué dans le traitement du cancer du rein à cellules claires métastatiques (Escudier et al., 2007), du glioblastome multiforme en seconde ligne (Friedman et al., 2009; Kreisl et al., 2009) et au cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) en première ligne (Sandler et al., 2006). Il fut brièvement autorisé pour le traitement du cancer du sein en association au taxol, mais les résultats fluctuants ont entraîné l'arrêt de cette prescription (Miller et al., 2007). Plus récemment en 2015, les laboratoires Lilly ont obtenu une autorisation de mise sur le marché pour le ramucirumab (Cyramza®), un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGFR-2 de manière à inhiber ses interactions avec les VEGFs. Il est actuellement indiqué dans les cas de cancer gastriques (ou gastro-oesophagiens) métastatiques en deuxième ligne (Javle et al., 2014) mais offre, comme ses homologues, une faible augmentation de la survie globale (environ 2 mois) pour d'éventuels effets secondaires non négligeables (Haute Autorité de Santé, 2015)

Etude Bibliographique – Les traitements anti-angiogéniques

Nom de la molécule et AMM	Cibles	Cibles secondaires	Indications thérapeutiques
Bevacizumab (Avastin®) Roche (02/2004 ; 01/2005)	VEGF-A		Cancer colorectal métastatique Carcinome pulmonaire non squameux et/ou non à petites cellules Glioblastome récurrent (FDA seulement) Cancer du rein métastatique Cancer du sein métastatique HER-2 négatif (seulement EMA) Cancer des ovaires résistant aux platines Cancer cervical
Ramucirumab (Cyramza®) Eli Lilly (04/2014 ; 12/2014)	VEGFR-2		Cancer colorectal métastatique Carcinome pulmonaire métastatique non à petites cellules résistant aux platines Cancer de la jonction gastro-oesophagienne
Ziv-Aflibercept (Zaltrap®) Sanofi-Aventis (08/2012 ; 02/2013)	VEGF-A, VEGF-B PLGF		Cancer colorectal métastatique, 2ème ligne
Axitinib (Inlyta) Pfizer (01/2012 ; 09/2012)	tous les VEGFRs	PDGFRs, cKIT	Cancer rénal avancé, 2ème ligne
Pazopanib (Votrient®) Novartis Europharm (10/2009 ; 06/2010)	tous les VEGFRs	PDGFR, cKIT, FMS, FGFR-2, FLT-3, MLK-1	Sarcome des tissus mous avancé, 2ème ligne Cancer rénal avancé, 2ème ligne
Regorafenib (Stivarga®) Bayer Pharma (09/2012 ; 08/2013)	tous les VEGFRs	PDGFRs, FGFRs, Tie2, DDR2, Trk2A, Eph2A, RAF-1, STK5	Cancer gastro-intestinal avancé Cancer colorectal métastatique, 2ème ligne
Sorafenib (Nexavar®) Bayer Pharma (12/2005 ; 07/2006)	tous les VEGFRs	cKIT, DDR2, FGFRs, FLT3, FMS, cRAF, PDGFRs, Ret,	Cancer récurrent de la thyroïde, 2ème ligne Cancer rénal avancé Carcinome hépatocellulaire inopérable
Sunitinib (Sutent®) Pfizer (01/2006 ; 07/2006)	Tous les VEGFRs	ARK5, CHK2, cKIT, cRAF, FGFR1, FLT3, Mer, PDGFR, Ret,	Cancer du pancréas avancé inopérable Cancer rénal avancé Cancer gastrointestinal
Vandetanib (Caprelsa®) Sanofi-Genzyme (04/2011; 02/2012)	Tous les VEGFRs	EGFRs, Ret	Cancer de la thyroïde avancé inopérable et/ou médullaire métastatique
Cabozantinib (Cometriq®) Ipsen Pharma (11/2012 ; 03/2014)	Tous les VEGFRs	cMET, Ret, cKIT, Axl	Cancer de la thyroïde médullaire métastatique
Lenvatinib Eisai (02/2015 ; 05/2015)	Tous les VEGFRs	PDGFRα, FGFR1, PDGFRβ	Cancer de la thyroïde (Lenvima® 2015) Cancer rénal avancé (Kisplyx® 2016)

Tableau 1 : Traitements anti-angiogéniques autorisés par la FDA et/ou l'EMA

Ce tableau représente une liste non exhaustive de traitements anti-angiogéniques actuellement utilisés en clinique. Y sont présentés : le nom de la molécule, son nom commercial, le laboratoire détenteur de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) ainsi que la date d'obtention de l'AMM aux (USA ; Europe), les cibles principales pour lesquelles les IC₅₀ sont faibles, les cibles secondaires pour lesquels des activités modérées ont été observées ainsi que les types de cancer pour lesquels ces molécules sont prescrites. FDA : Food Drug Administration ; EMA : European Medical Agency (*D'après Weilan Ye, Developmental cell, 2016; www.cancer.gov; www.ema.europa.eu*)

2.1.2.2 Cas d'un hybride : l'Aflibercept

L'aflibercept (Zaltrap®) est une protéine de fusion contenant les domaines extracellulaires des VEGFR-1 et 2 capables de reconnaître les VEGF-A et B ainsi que le PLGF. On se réfère souvent à ce médicament en parlant de piège à VEGF (VEGF trap) (**Figure 10**). Il a reçu l'approbation de la FDA en 2012 pour une utilisation en traitement du cancer colorectal en 2^{ème} ligne associé avec la chimiothérapie de référence (FOLFIRI) (Van Cutsem et al., 2012). Des essais cliniques ont été réalisés sur d'autres types de cancers comme le cancer du poumon de type NSCLC (Ramlau et al., 2012) ou celui de la prostate (Agarwal et al., 2012), mais sans succès. Son utilisation est donc pour le moment restreinte au cancer colorectal.

2.1.2.3 Les inhibiteurs de kinases associées aux RTKs

Les inhibiteurs de kinases permettent de bloquer les voies de signalisation intracellulaire induites par une activation des récepteurs transmembranaires (**Figure 10**). Dans le cas des traitements anti-angiogéniques, la voie la plus étudiée est celle induite par les VEGFRs favorisant la prolifération et la survie cellulaire, la perméabilité vasculaire et l'angiogénèse (**revoir Figure 7**). Actuellement les traitements les plus utilisés en clinique sont le sunitinib (Sutent®) et le sorafenib (Nexavar®). Ces deux inhibiteurs, sur le marché depuis 2005 et 2006 ciblent principalement les récepteurs du VEGF et PDGF. Dans une moindre mesure, ils ciblent également les récepteurs c-KIT, FLT3 et RET présents sur les cellules souches hématopoïétiques ou sur des leucocytes et dont l'activation favorise la progression tumorale (Chow and Eckhardt, 2007).

Le sunitinib (Sutent®) est utilisé comme traitement de deuxième ligne pour les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) montrant une résistance au traitement de référence, l'Imatinib (Glivec®). Son étude clinique en phase III a montré une augmentation de survie sans progression de 6,8 mois comparé à 1,6 mois pour les patients non traités (Heinrich et al., 2008). Le sunitinib est également utilisé en traitement de 1^{ère} ligne pour le cancer du rein métastatique (Motzer et al., 2009) ou pour le traitement de tumeurs métastatiques neuroendocrines du pancréas impossibles à éliminer par chirurgie (Raymond et al., 2011).

Le sorafenib (Votrient®) est indiqué dans le traitement des carcinomes hépatocellulaires avancés (Llovet et al., 2008) et en 2^{ème} ligne dans le traitement des cancers du rein métastatiques (Escudier et al., 2009). Dans une indication pour les traitements du cancer du rein, le bénéfice est limité avec une augmentation de la survie sans progression de 5,5 mois contre 2,8 mois sans traitement.

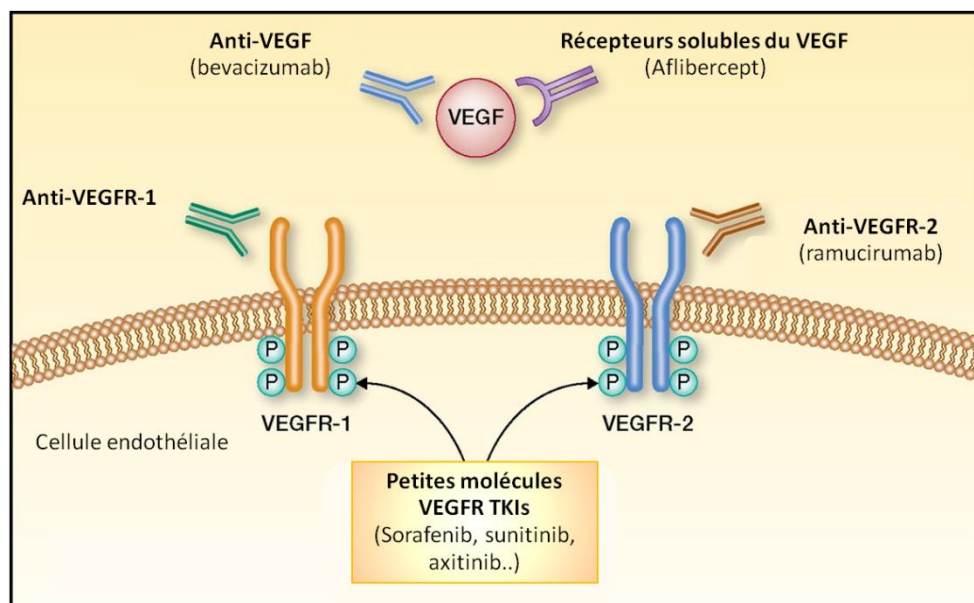


Figure 10 : Les inhibiteurs du VEGF ou de ces récepteurs

Le bevacizumab est un anticorps monoclonal qui se lie au VEGF et l'empêche de se fixer à ses récepteurs. L'aflibercept agit de la même manière mais est constitué des domaines extracellulaires des VEGFR. Le ramucirumab est un antagoniste des récepteurs VEGFR-2 et empêche la fixation des VEGFs. Le sorafenib, le sunitinib et l'axitinib sont des inhibiteurs de kinases intracellulaires impliquées dans les voies de signalisation du VEGF.

D'autres inhibiteurs de kinases sont également utilisés en clinique actuellement et sont répertoriés dans le **Tableau 1** (Ye, 2016). Les prescriptions s'orientent dans la mesure du possible vers les inhibiteurs les plus spécifiques.

A titre d'exemple, l'utilisation du sorafenib depuis 2005 dans les traitements des cancers du rein métastatiques, devrait être progressivement supplantée par celle de l'axitinib (Inlyta®) sur le marché depuis 2012 qui cible uniquement les VEGFRs, PDGFRs et C-Kit (Rini et al., 2011).

2.2 Les traitements anti-angiogéniques : entre espoir et réalité

Le développement de multiples molécules anti-angiogéniques depuis plus de 10 ans fut un domaine très actif dans la recherche d'anticancéreux. Malheureusement, l'utilisation des anti-angiogéniques en clinique ne permet d'augmenter la survie des patients que de quelques mois. Malgré l'avancée des thérapies dirigées contre le VEGF comme l'Avastin®, les résultats obtenus restent très éloignés des espoirs que suscitaient ces traitements et l'objectif de garder les tumeurs en état de dormance en les privant d'une vascularisation efficace n'est pour le moment pas atteint (Tarallo and De Falco, 2015). Bien qu'ils puissent induire une faible augmentation de la survie des patients la prise de certains de ces traitements peut représenter un risque significatif aux vues des effets secondaires possibles. De plus, les traitements font rapidement face à des phénomènes de résistance dont certains restent encore mal compris.

2.2.1 Le rapport bénéfices/risques inhérent aux traitements

Comme de nombreux médicaments, les anti-angiogéniques présentent de nombreux effets secondaires. L'utilisation du bevacizumab, par exemple, peut induire de fortes complications chez le patient. Parmi ces effets, on recense des problèmes de cicatrisation, des saignements, la formation de thromboses pouvant mener à l'obstruction des artères pulmonaires (embolies pulmonaires), des neutropénies ou même des perforations de l'intestin (Gressett and Shah, 2009). Ces effets sont considérables quand on observe que pour certains types de cancers, la prise de bevacizumab n'induit une survie sans progression que de quelques mois. **C'est par ailleurs ce qui a valu le retrait de l'utilisation du bevacizumab en association au paclitaxel pour le traitement du cancer du sein métastatique aux Etats-Unis.** Des premiers travaux en 2007 avaient montré une bonne efficacité de l'association des deux traitements, mais ils furent remis en cause en 2011 par deux études cliniques (études cliniques AVADO et RIBBON-1) ou **la survie sans progression observée n'était que de 1 à 2 mois alors que les patients subissaient des effets secondaires beaucoup plus lourds qu'avec l'utilisation du paclitaxel seul** (Petrelli and Barni, 2012).

L'utilisation des inhibiteurs de kinases est également une médication à risque. Bien que leurs activités soient plutôt sélectives des voies de signalisation liées à la migration cellulaire et l'angiogénèse, ils possèdent de nombreuses activités résiduelles qui participent à l'apparition d'effets secondaires. Les effets secondaires régulièrement observés sont des problèmes d'insuffisance cardiaque, de thrombose artérielle, de cicatrisation, d'hémorragie, d'hypertension artérielle ou d'insuffisance rénale (Je et al., 2009; Kerkela et al., 2009; Wu et al., 2008). Une étude réalisée sur le sunitinib, le sorafenib et le pazopanib montre clairement une augmentation du risque de mortalité sous traitement avec la survenue de 3 fois plus de décès liés aux effets secondaires, majoritairement des hémorragies (Choueiri et al., 2010).

L'utilisation de ces types de traitements nécessite donc un suivi régulier des patients pour étudier leur réponse à la médication et définir au mieux les conditions d'administration.

2.2.2 Les phénomènes de résistance aux traitements

Que ce soit des anticorps monoclonaux ciblant les VEGFs ou VEGFRs, des inhibiteurs de kinases ou des VEGF-trap, les anti-angiogéniques sont rarement efficaces seuls mais peuvent améliorer les chimiothérapies classiques. Les bénéfices apportés par ces traitements ont été observés sur différents types de cancers (**voir tableau 1**) et sont majoritairement visibles en terme de survie sans progression mais pas en terme de survie globale (Kindler et al., 2010; Saltz et al., 2007). Le manque d'efficacité de ces thérapies réside dans différents paramètres qui dépendent du patient, du type de cancer et de son avancement.

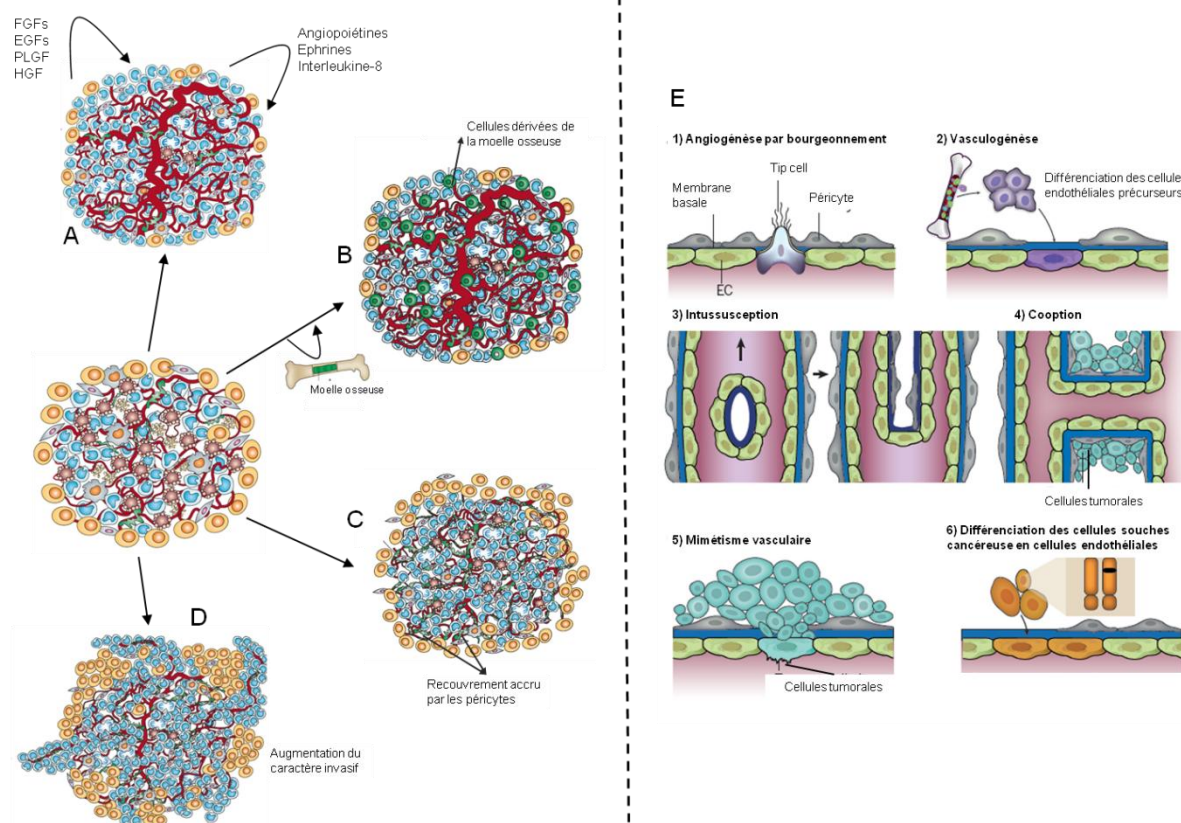


Figure 11 : Les types de résistances aux traitements anti-angiogéniques.

A. Sous traitement anti-VEGF, la tumeur peut favoriser d'autres voies de signalisations pro-angiogéniques ce qui entraîne une revascularisation de la tumeur. **B.** L'hypoxie intratumorale stimulée par la réduction des vaisseaux sanguins durant un traitement anti-angiogénique mobilise des cellules de la moelle osseuse qui vont participer à l'angiogénèse tumorale et la prolifération. **C.** La tumeur peut résister au traitement anti-angiogénique en favorisant la maturation des vaisseaux par une présence accrue de péricytes. Cela induit une normalisation de la vascularisation et permet à la tumeur de continuer à croître lentement. **D.** Sous traitement anti-angiogénique, les cellules peuvent devenir plus invasives de manière à trouver de nouvelles sources d'oxygène et de nutriments. Cela favorise la prolifération et l'apparition de métastases. **E.** Les différents types de vascularisation **1)** angiogénèse par bourgeonnement **2)** vasculogénèse par recrutement de cellules endothéliales précurseurs de la moelle osseuse **3)** intussusception par fission d'un vaisseau mère en deux vaisseaux filles **4)** Co-option des cellules avec les vaisseaux sanguins favorisant la prolifération le long de ces derniers **5)** Mimétisme vasculaire où des cellules cancéreuses peuvent prendre la place de cellules endothéliales dans le réseau vasculaire **6)** Différenciation de cellules souches cancéreuses en cellules endothéliales. (D'après Bergers & Hanahan, *Nature rev*, 2008 et Carmeliet & Jain, *Nature*, 2011)

Parmi les nombreux patients déjà traités par des anti-angiogéniques, la réponse au traitement observée est généralement de deux sortes : soit **le patient est initialement réfractaire** au traitement, soit, après une certaine durée de traitement ayant entraîné une baisse de la vascularisation, la tumeur va montrer **une forme de résistance que l'on appelle "échappement"** et continuer sa croissance (Bergers and Hanahan, 2008).

Le concept d'échappement est différent d'une résistance classique où les mutations constantes du cancer entraînent une résistance progressive à la chimiothérapie administrée. Il correspond plutôt à une adaptation au traitement de la part de la tumeur qui va s'appuyer sur les différents mécanismes ou voies de signalisations permettant de déclencher l'angiogénèse pour progressivement devenir

indépendante de la présence de VEGFs. Les principaux mécanismes décrits ci-après mettent en évidence les capacités d'adaptation sophistiquées que possèdent les tumeurs et donnent un aperçu des raisons pour lesquelles le concept de thérapie anti-angiogénique est compliqué à mettre en œuvre d'un point de vue clinique.

2.2.2.1 Les voies de signalisation pro-angiogéniques alternatives

De nombreuses voies de signalisation permettent d'induire l'angiogénèse et ne reposent pas uniquement sur le VEGF et ces récepteurs. Parmi les facteurs pro-angiogéniques décrits chapitre 1, de nombreux sont surexprimés tels que les FGF-1 et 2, les angiopoïétines, (Casanovas et al., 2005), le HGF (Shojaei et al., 2010), les EGFs (Cascone et al., 2011), le PLGF ou les interleukines (Huang et al., 2010). Ce panel de voies de signalisation peut être exploité par les tumeurs pour échapper aux traitements bloquant la voie du VEGF (**Figure 11A**). Les cancers avancés (Relf et al., 1997), exploitent déjà différentes voies de signalisation pro-angiogéniques et montrent souvent une résistance intrinsèque aux traitements.

2.2.2.2 L'infiltration par les cellules de la moelle osseuse

De nombreuses cellules issues de la moelle osseuse sont présentes sur le site de la tumeur (**Figure 11B**). Leur présence peut avoir un rôle anti-tumoral et parfois pro-tumoral. C'est généralement l'hypoxie induite (ou exacerbée) par les traitements anti-angiogéniques qui attire ces cellules sur le site tumoral (Du et al., 2008). On y retrouve, les cellules endothéliales progéniteurs ou des cellules immunitaires comme les macrophages associés aux tumeurs (TAM) ou les cellules myéloïdes suppressives (CMS)(voir **Chapitre 3**). Leur production de cytokines, enzymes hydrolytiques et de facteurs de croissances induit un échappement aux traitements anti-angiogéniques

2.2.2.3 Modification du mode de vascularisation

Les tumeurs peuvent échapper aux thérapies anti-angiogéniques en adaptant leur mode de vascularisation de manière à contourner le traitement. La régression des vaisseaux induite par les traitements peut provoquer un mécanisme visant à renforcer la vasculature par un recouvrement accru par les péricytes, (**Figure 11 D**) (Kamba and McDonald, 2007). Ce renforcement par les péricytes n'est pas forcément perçu comme un obstacle mais supporte plutôt la théorie de la normalisation vasculaire ou l'on souhaite favoriser une vascularisation stable de manière à réduire l'hypoxie, l'apparition de métastases et favoriser l'acheminement des thérapies (Jain, 2014).

L'angiogénèse par bourgeonnement très dépendante de la présence de VEGF n'est pas le seul

mécanisme observable durant l'angiogénèse tumorale (**Figure 11 E1**). La mobilisation de cellules endothéliales précurseurs issues de la moelle osseuse, représente une source alternative de cellules endothéliales (**Figure 11 E2**).

L'intussusception est également un mécanisme alternatif qui génère deux nouveaux vaisseaux via la fission d'un vaisseaux préexistant (**Figure 11 E3**) (Nico et al., 2010; Ribatti et al., 2005). Des cas de mimétisme vasculaire ont également été observés dans différents cancers. Ce mécanisme implique une inclusion de cellules cancéreuses directement dans la vasculature pour prendre le rôle des cellules endothéliales (**Figure 11 E5**). Il en est de même pour la différenciation des cellules souches cancéreuses (**Figure 11 E6**). Ces cellules possèdent à la fois les capacités de différenciation des cellules souches et les caractéristiques des cellules cancéreuses. Elles peuvent donc se différencier en cellules endothéliales pour pallier à une angiogénèse insuffisante (Vasudev and Reynolds, 2014).

2.2.2.4 Augmentation du caractère invasif des cellules tumorales

En réponse à un traitement anti-angiogénique, les cellules tumorales, plutôt que de tenter de favoriser une nouvelle vascularisation ou renforcer celle déjà existante, vont accentuer leur mobilité et leur caractère invasif (**Figure 11 D**). Cela peut se traduire par une accentuation de la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules cancéreuses favorisant l'invasivité et la dissémination métastatique ou une invasion lente associée à une co-option avec les vaisseaux sanguin (Bergers and Hanahan, 2008).. Dans un modèle de co-option, les cellules cancéreuses se multiplient le long des vaisseaux sanguins de manière à avoir un apport optimal en oxygène et nutriments sans avoir à former une nouvelle vasculature (**Figure 11 E4**). Ce mode de survie est redoutable car il couple prolifération et invasion. On le retrouve dans un grand nombre de cancers invasifs et métastatiques (Kuczynski et al., 2016; Vasudev and Reynolds, 2014).

2.3 Perspectives et nouvelles solutions

Les bénéfices apportés par les thérapies anti-angiogéniques actuelles représentent une avancée considérable depuis l'élaboration des premières théories sur l'angiogénèse. Pour autant **il s'avère que l'inhibition de l'angiogénèse est une tâche bien plus complexe qu'envisagée au départ** et ce pour de multiples raisons. Les traitements actuels permettent d'améliorer très faiblement la survie sans progression des patients mais n'impacte que très peu leur survie globale. De plus certains patients sont réfractaires à la thérapie dès le départ tandis que d'autres répondent

positivement (Bergers and Hanahan, 2008). Les thérapies ont également montré une **cytotoxicité** et **le rapport bénéfices/risques pour les patients n'est pas toujours favorable**. Certains traitements ont même des effets positifs à court terme mais finissent par aggraver le cancer sur le long terme avec l'apparition de métastases (Cooke et al., 2012).

Une administration différente des traitements anti-angiogéniques peut être envisagée pour limiter leurs effets secondaires et s'orienter vers **une normalisation de la vascularisation plutôt que sa réduction. Cette stratégie semble une option prometteuse**, et cherche avant tout à contrôler la croissance tumorale pour mieux l'éliminer. Normaliser la vascularisation tumorale permet de réduire l'hypoxie et tous ses effets néfastes tout en facilitant l'acheminement des traitements au sein de la tumeur. De cette manière, **il serait possible de contrôler la prolifération cancéreuse tout en évitant de favoriser l'invasion et la formation de métastases** (Jain, 2014)

Les thérapies anti-angiogéniques utilisées en clinique à ce jour ciblent principalement le VEGF, mais l'association d'inhibiteurs spécifiques du type VEGF/FGF semble prometteuse (Allen et al., 2011). D'autres stratégies ciblent actuellement les oncogènes associés aux voies de signalisation pro-angiogéniques, ou visent à administrer des anti-inflammatoires de manière à diminuer le rôle pro-angiogénique des cellules immunitaires (El-Kenawi and El-Remessy, 2013).

Une autre stratégie d'inhibition de l'angiogénèse envisagée est **le ciblage d'enzymes hydrolytiques exprimées par les différents acteurs du microenvironnement tumoral**. En effet, par leur rôle de dégradation de la MEC, ces enzymes participent au relargage de facteurs de croissance et à la dissémination métastatique. Les MMPs ont été largement étudiées mais les inhibiteurs proposés montraient une efficacité faible pour une forte toxicité (Coussens, 2002). Les méthodes de vectorisations actuelles pourraient cependant relancer l'intérêt pour ces inhibiteurs (Cathcart et al., 2015). Plus récemment, le rôle important d'une glycosidase dans l'angiogénèse tumorale et la formation de métastases a émergé. Cette enzyme est appelée héparanase.

3 L'Héparanase, une enzyme du microenvironnement tumoral

La présence d'une tumeur influence de manière significative les tissus sains dans la zone où elle est implantée. Cela crée un environnement singulier appelé microenvironnement tumoral. Ce microenvironnement tumoral est une zone où se concentrent de nombreux facteurs favorisant le développement des tumeurs et leur angiogénèse (Witz and Levy-Nissenbaum, 2006). Parmi ces facteurs, on retrouve une enzyme de dégradation nommée héparanase qui participe à l'angiogénèse tumorale et la dissémination des métastases. Dans ce chapitre, nous décrirons dans un premier temps le microenvironnement tumoral, sa composition et son rôle dans le cancer. Dans un second temps, nous aborderons en détail l'héparanase, comment elle participe à l'angiogénèse tumorale, et quelles stratégies sont envisagées pour cibler et inhiber cette enzyme.

3.1 Le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est un concept qui fut développé par le chirurgien Stephen Paget dans les années 1880 (Paget, 1889). Novateur, il tenta d'expliquer la manière dont un cancer se développe et peut disséminer des métastases dans l'organisme via un mécanisme dit de "seed and soil" (graine et sol). Dans cette théorie, le "sol" est représenté par le microenvironnement nécessaire au développement de la cellule cancéreuse qui est considérée comme la "graine". Au début du XXème siècle, les recherches axées sur le cancer étaient plutôt centrées sur la tumeur, mais avec une adhésion grandissante à la théorie du Dr Paget, les travaux sur le microenvironnement tumoral n'ont cessé de se multiplier. **Aujourd'hui, il est avéré que le microenvironnement tumoral joue un rôle très important dans la prolifération du cancer, la dissémination métastatique mais également dans l'angiogénèse tumorale.** Les thérapies émergentes visant des composantes précises de ce microenvironnement sont des plus prometteuses. Le microenvironnement tumoral peut être divisé en 3 composantes essentielles. La composante cellulaire, la composante moléculaire et la composante mécanique, cette dernière étant régie par les contraintes physiques subies par les cellules (**Figure 12**)

La composante cellulaire est constituée des cellules tumorales, des cellules saines, des cellules fibroblastiques, des cellules immunitaires et des cellules vasculaires.

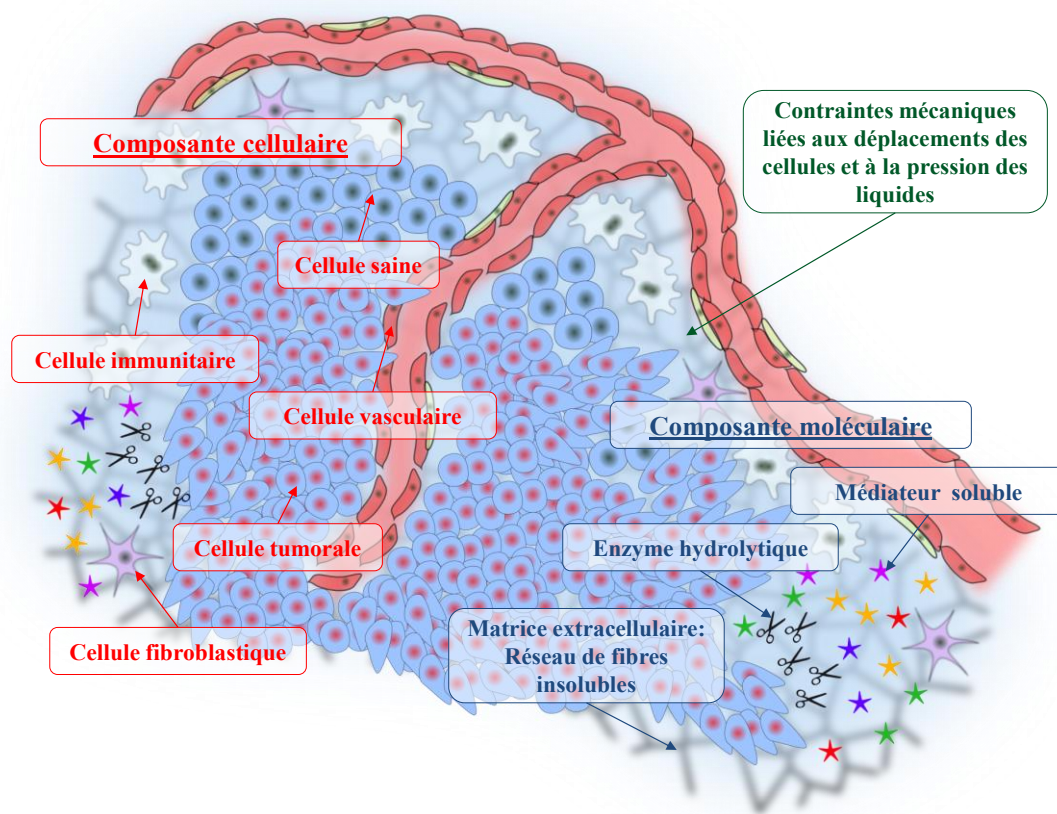


Figure 12 : Le microenvironnement tumoral

La composante moléculaire comprend les molécules solubles produites et échangées entre les différents acteurs de la composante cellulaire (chimiokines, facteurs de croissance, enzymes...). Elle comprend également la matrice extracellulaire (MEC), qui, par sa structure glyco-protéique insoluble, assure la cohésion et la stabilité du milieu extracellulaire. Cette dernière joue également un rôle de régulation des signaux moléculaires via sa capacité à capter et moduler la disponibilité de nombreux facteurs solubles (Frantz et al., 2010).

3.1.1 La composante cellulaire du microenvironnement tumoral

3.1.1.1 Les cellules tumorales

Les cellules tumorales sont caractérisées par des altérations permanentes de leur information génétique. Le processus de passage d'une cellule normale à une cellule tumorale se fait progressivement et par différentes étapes au cours desquelles la tumeur va subir un nombre grandissant de mutations et devenir de plus en plus maligne (Hanahan and Weinberg, 2000). 5 à 10% des cancers sont dus à des altérations de l'ADN qui peuvent se transmettre de manière héréditaire (Nagy et al., 2004). Les autres cas de cancers peuvent être provoqués par des mutations

induites par des métabolites endogènes (ex : Dérivés Réactifs de l'Oxygène) (De Bont, 2004), des substances chimiques exogènes provenant de l'environnement (Luch, 2005), des infections virales (Chen et al., 2014) ou l'exposition à des rayonnements ionisants (Kim and Lee, 2003). La cellule normale peut devenir maligne si les gènes mutés sont des proto-oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs (Lodish, 2000). Les proto-oncogènes sont des gènes responsables de la prolifération cellulaire normale qui, une fois mutés, deviennent oncogènes et induisent une prolifération démesurée (gain de fonctions). A l'inverse, les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes qui régissent la régulation du cycle cellulaire comme la division, l'apoptose ou la réparation de l'ADN. Une mutation de ces gènes entraîne une perte de contrôle du cycle cellulaire normal (perte de fonctions). Les mutations qui touchent les gènes responsables de la réparation de l'ADN sont d'autant plus graves qu'elles provoquent une instabilité génétique croissante qui va rendre la cellule de plus en plus maligne (Heinen et al., 2002). Hanahan et Weinberg en 2000 puis 2011 se sont attachés à mettre en évidence les caractéristiques des cellules cancéreuses acquises au cours des différentes mutations et qui leur donne un phénotype pathologique (**Figure 13**). Parmi les caractéristiques propres aux cellules cancéreuses, il est possible de dégager deux tendances : des caractéristiques liées uniquement à la cellule en mutation et des caractéristiques ayant un impact direct sur l'environnement sain.

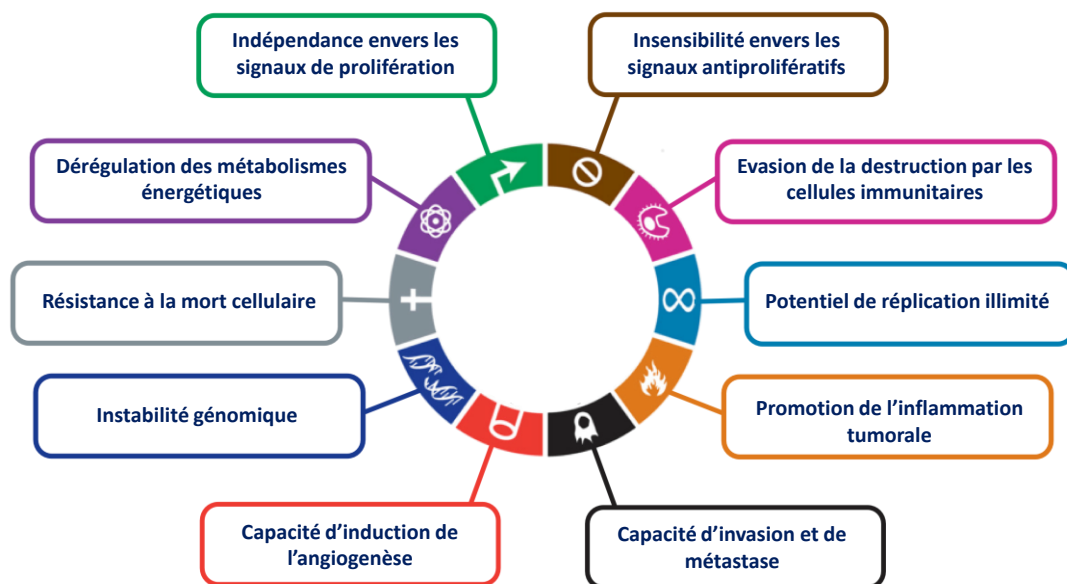


Figure 13 : Caractéristiques phénotypiques des cellules cancéreuses

Les caractéristiques des cellules tumorales acquises au cours de leurs mutations. (D'après Hanahan et Weinberg, *Cell*, 2011)

La résistance à la mort cellulaire, ou le potentiel de réplcation illimité sont des mutations qui

n'impliquent que le fonctionnement interne de la cellule cancéreuse.

En revanche, les capacités d'invasion, d'induction de l'angiogénèse ou de promotion de l'inflammation découlent d'anomalies génétiques menant à la synthèse et la sécrétion par les cellules cancéreuses, de composés (facteurs de croissances, chimiokines...) qui vont influencer et déstabiliser l'environnement sain qui les entoure (Hanahan and Weinberg, 2011, 2000).

3.1.1.2 Autres cellules du microenvironnement tumoral

Les cellules vasculaires : Elles regroupent les cellules endothéliales qui forment les capillaires sanguins ou lymphatiques ainsi que les cellules périendothéliales comme les péricytes et les CMLs qui vont assurer l'intégrité des vaisseaux formés. Le rôle de ces acteurs a déjà été décrit plus avant (Partie I-Angiogénèse).

Les cellules fibroblastiques : Elles se situent dans les tissus conjonctifs et sont dans un état de quiescence en conditions physiologiques (Tarin and Croft, 1969). Les fibroblastes participent aux phénomènes de réparation tissulaire, d'inflammation et de cancers où ils sont activés par différents stimuli (stress, facteurs de croissance, chimiokines) (Kalluri, 2016; Micallef et al., 2012).

Leur présence prolongée dans le microenvironnement tumoral peut induire chez eux des modifications épigénétiques irréversibles (Albregues et al., 2015). Ces fibroblastes modifiés sont communément appelés Fibroblastes Associés Au cancer (CAFs). Ils produisent un nombre exacerbé de facteurs de croissances (VEGFs, EGFs, FGFs, ...), d'enzymes de dégradation et possèdent ainsi un fort potentiel pro-angiogénique et pro-inflammatoire (Kalluri, 2016; Lochter et al., 1997).

Les cellules immunitaires : Elles sont aussi appelées leucocytes (ou globules blancs) et sont issues des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse (Lionel Prin et al., 2011). Leur rôle majeur est l'élimination de pathogènes, cellules parasites, déchets cellulaires et la réparation des tissus. On retrouve des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral et leur présence peut avoir un effet pro- ou anti-tumoral (Zeh and Lotze, 2005). Les plus décrites sont les macrophages qui au sein du microenvironnement tumoral sont altérés et ne produisent plus de réponse immunitaire. En revanche, ils produisent des facteurs de croissances pro-tumoraux, pro-angiogéniques (Allavena et al., 2008) et peuvent activer l'héparanase, une glycosidase connue pour son rôle pro-angiogénique. On les surnomme alors macrophages associés aux tumeurs (TAM).

De manière générale, les cellules immunitaires associées au microenvironnement tumoral telles que les cellules dendritiques (Ruffell et al., 2014), les neutrophiles (Huang et al., 2015; Lu et al., 2011) et les mastocytes (Gruber et al., 1995; Saleem et al., 2012) présentent un rôle pro-tumoral plus ou moins important. Elles ont un fort potentiel immunosuppresseur des lymphocytes ce qui leur vaut la

dénomination de cellules myéloïdes suppressives (CMS). Leur capacité d'infiltration dans les tissus, implique généralement qu'elles expriment des enzymes de dégradation qui peuvent également participer au remodelage de la matrice extracellulaire (Engblom et al., 2016).

3.1.2 La composante moléculaire du microenvironnement tumoral

La composante moléculaire du microenvironnement tumoral comprend la partie insoluble représentée par la matrice extracellulaire ainsi que les molécules solubles (facteurs de croissance, chimiokines, hormones, enzyme, etc...).

3.1.2.1 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau tridimensionnel de macromolécules assurant la structure entre les composants cellulaires (**Figure 14**).

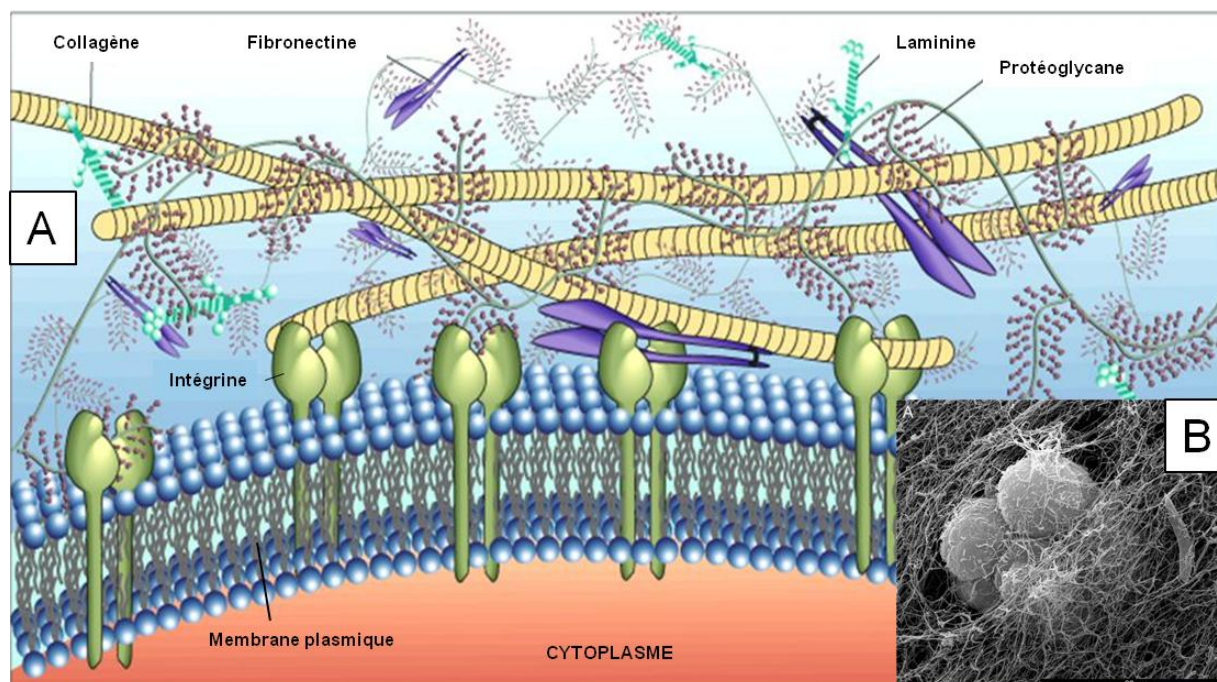


Figure 14 : La matrice extracellulaire

(A) Les principaux composants de la matrice extracellulaire dont le collagène, la fibronectine, la laminine et les protéoglycane (B) Macrophage fixé sur une matrice extracellulaire observé par microscopie électronique. Les fibres de collagène sont clairement visibles. D'après (Marieb and Hoehn, 2013)

Bien que la MEC soit toujours composée d'eau, de protéines et de polysaccharides, chaque tissu possède une matrice qui lui est propre et avec laquelle il interagit de manière dynamique. La MEC a la capacité de se lier à une grande quantité de facteurs de croissances et joue un rôle crucial dans leur régulation, leur disponibilité ainsi que dans leurs activités en interagissant avec les récepteurs cellulaires. Dans le microenvironnement tumoral, la MEC est altérée et conduit à des réponses

biochimiques et biologiques qui participent à la progression tumorale. Elle joue notamment un rôle prépondérant dans l'apparition de l'angiogénèse ainsi que dans la dissémination métastatique (Frantz et al., 2010). On peut distinguer différents types de matrices extracellulaires comme par exemple celle composant la membrane basale des cellules endothéliales ou épithéliales et celle composant le tissu interstitiel. Leur agencement et leur composition sont différents tout comme leur rôle dans le microenvironnement tumoral.

3.1.2.2 Les protéines de la matrice extracellulaire

La MEC est composée de protéines fibreuses qui assurent principalement la structuration, la résistance et la plasticité du tissu interstitiel et des membranes basales. On y retrouve (**Tableau 2**) le collagène, la fibronectine, la laminine ainsi que l'élastine. L'altération de ces protéines dans les cancers peut favoriser la progression de la maladie.

Tableau 2 : Les protéines de la matrice extracellulaire

Noms	Structure	Fonction
Collagène (Kadler et al., 2007; Khoshnoodi et al., 2006; Ricard-Blum and Ruggiero, 2005)	Glyco-protéine. Structure fibreuse de chaînes polypeptidiques assemblées en triple hélice	Confère une structure et une résistance à la tension. Participe aux phénomènes d'adhésion cellulaire et de migration via liaison aux intégrines transmembranaires
Elastine (Wise and Weiss, 2009)	Protéine fibreuse hydrophobe (60-72 kDa)	Attribue des propriétés élastiques aux membranes et tissus où elle est produite.
Fibronectine (Astrof and Hynes, 2009; Larsen, 2006)	Glyco-protéine (460 kDa) Structure dimérique	Contribue à la structure de la MEC et des membranes basales. Participe aux phénomènes d'adhésion cellulaire et de migration via liaison aux intégrines transmembranaires
Laminine (Durbeej, 2010)	Glyco-protéine (400- 900 kDa) Forme hétérodimérique composée de 3 chaînes peptidiques (α, β, γ)	Contribue à la structure des membranes basales en interagissant avec les autres protéines structurales. Participe aux phénomènes d'adhésion, de migration cellulaires et de réparation tissulaire.

3.1.2.3 Protéoglycanes et polysaccharides de la matrice extracellulaire

Les protéoglycanes représentent un large panel de molécules composées d'un noyau protéique sur lequel sont attachées, de manière covalente, des chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs) (**Figure 15**). La quasi-totalité des cellules du corps humain produisent des protéoglycanes qu'elles sécrètent dans la MEC, la membrane basale, ou qu'elles stockent dans des granules sécrétoires. Tandis que les protéines fibreuses confèrent élasticité et résistance aux tissus, les protéoglycanes

interagissent avec les différents composants de la MEC pour former un gel hydraté qui résiste aux forces de compression (Esko et al., 2009). Les fonctions des protéoglycanes sont principalement attribuées aux chaînes de GAGs capables de se lier à diverses protéines (facteurs de croissance, chimiokines) régulant des processus biologiques allant de l'organogénèse à l'apoptose ou l'angiogénèse (Sanderson et al., 2010).

Les protéoglycanes sont répartis dans 4 classes majeures en fonction de leur localisation : les protéoglycanes extracellulaires, intracellulaires, péricellulaires et ceux liés à la surface des cellules (**figure 15**) (Iozzo and Schaefer, 2015). **Les différents GAGs qu'ils portent sont de longs hétéropolysaccharides chargés négativement et formés par une répétition de disaccharides composés d'hexosamines et d'acides hexuroniques.** Les GAGs sont au nombre de 6 : les galactosaminoglycanes représentés par les chondroïtines sulfates et les dermatanes sulfates ainsi que les glucosaminoglycanes représentés par les héparanes sulfates, les héparines, les keratanes sulfates et l'acide hyaluronique. Les chaînes de GAGs ont des longueurs variables et peuvent présenter des modifications structurales telles que des N-acétylations, des N- ou O-sulfatations ainsi que des épimérisations (Esko et al., 2009).

On notera toutefois qu'il n'existe pas de protéoglycane d'acide hyaluronique car ce dernier n'est lié à aucun noyau protéique. Les kératanes sulfates sont également différents car leurs unités disaccharidiques portent un galactose au lieu d'un acide uronique (Theocharis et al., 2016).

Les GAGs, de par leurs structures distinctes (**figure 16**), participent à différents processus physiologiques et pathologiques :

Les chondroïtines sulfates (CS) sont constituées d'unités disaccharidiques d'acide glucuronique (GlcA) lié en β -1,3 à une N-acétylgalactosamine (GalNac). Ces unités disaccharidiques s'enchaînent via des liaisons β -1,4. Les chaînes de CS peuvent être O-sulfatées en position -2 des résidus GlcA et en position -4 et -6 des résidus GalNac donnant lieu aux 4 types de chondroïtines connus (A, C, D et E). Les cartilages articulaires sont majoritairement constitués d'*aggrecanes*, des protéoglycanes de CS dont ils tirent une excellente flexibilité et une forte résistance aux compressions (Baeurle et al., 2009). On retrouve également des CS dans les protéoglycanes *décorine* et *versicane* (**Figure 15**) qui modulent la disponibilité de différents facteurs de croissance. Ces deux protéoglycanes sont par ailleurs largement surexprimés dans le microenvironnement tumoral de différents cancers (Theocharis et al., 2006; Wegrowski and Maquart, 2006).

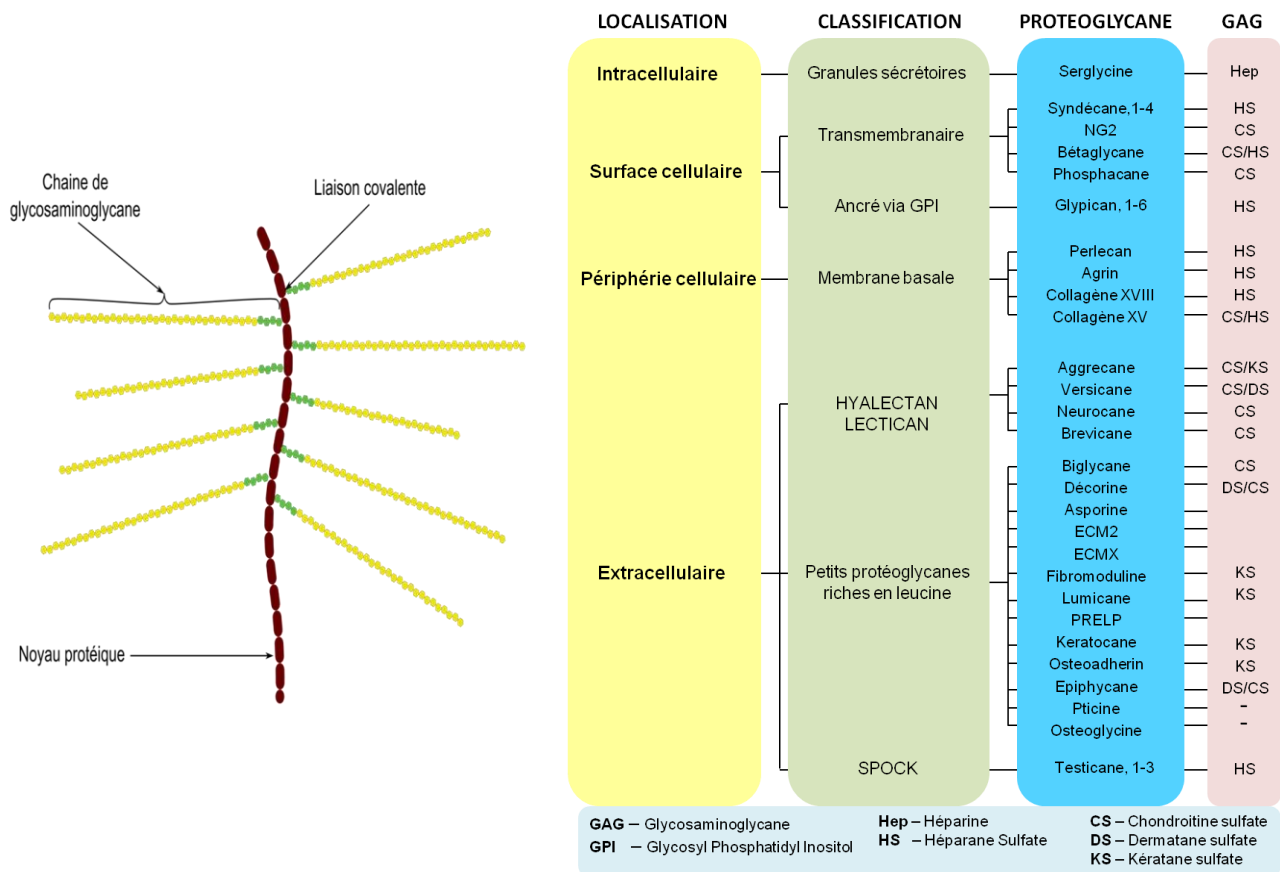


Figure 15 : Structure des protéoglycanes, localisation et glycosaminoglycanes associés
 (inspiré de de Esko et al 2009 ainsi que Iozzo & Schaefer, Matrix biol, 2015)

Les dermatanes sulfates (DS) autrefois appelés Chondroïtine B, sont constitués d'unités disaccharidiques d'acide iduronique (IdoA) ou de GlcA lié en α -1,3 à une GalNAc. Ces unités disaccharidiques s'enchaînent via des liaisons β -1,4. Tout comme pour les CS, les DS peuvent être O-sulfatés en position -2 des acides uroniques et en position -4 et -6 des résidus GalNAc (Sugahara, 2003). De part la similarité entre leurs structures, les DS se retrouvent sur les même protéoglycanes que les CS soit la *décorine* et le *versicane*. Le ratio entre les deux GAGs induit des réponses biologiques différentes. Dans le colon normal, la *décorine* et le *versicane* expriment principalement des DS tandis que dans un adénocarcinome du colon, ils expriment principalement des CS (Theocharis et al., 2006).

L'acide hyaluronique (AH) est constitué d'unités disaccharidiques de GlcA lié en β -1,3 à une N-Acetylglucosamine (GlcNAc). Ces unités disaccharidiques s'enchaînent via des liaisons β -1,4 et ne présentent pas de résidus sulfatés (Hascall and Esko, 2009). Sa nature anionique et sa structure lui donnent des propriétés semblables à celle d'un gel et on le retrouve notamment dans le liquide

synovial. Il a également un rôle structural dans le tissu conjonctif et participe à différents processus comme l'embryogénèse, la réparation tissulaire ou l'inflammation et le cancer. Sa présence en forte concentration dans les cancers est associée à un mauvais pronostic (Toole, 2004). Des fragments de sa dégradation favorisent la prolifération des cellules endothéliales et donc l'angiogénèse tumorale (Itano and Kimata, 2008; Slevin et al., 2002; West et al., 1985).

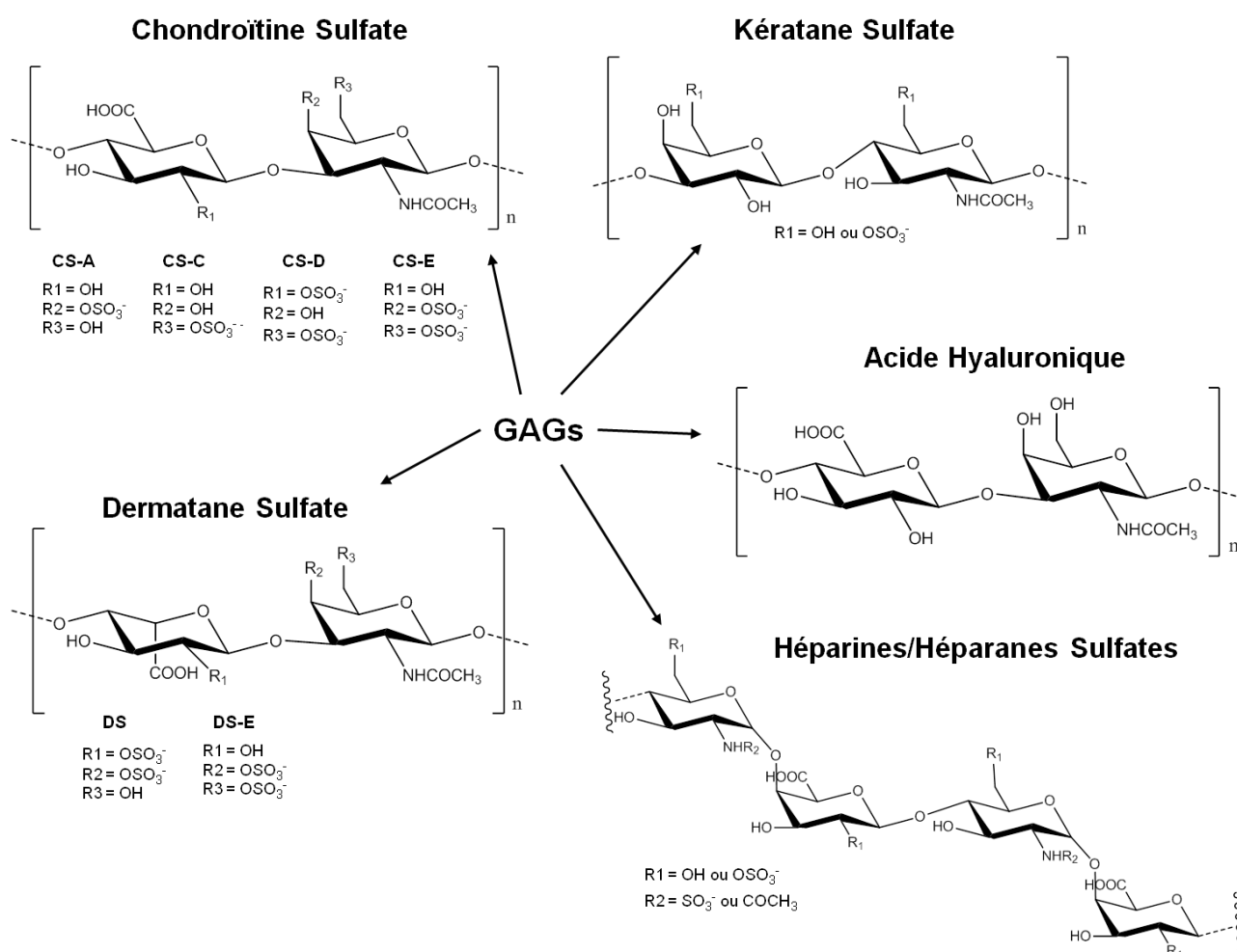


Figure 16 : Structure des différents Glycosaminoglycans (GAGs)

Les kératanes sulfates (KS) sont constitués d'unités disaccharidiques de GlcNAc liée en β-1,4 à un Galactose (Gal). Ces unités disaccharidiques s'enchaînent via des liaisons β-1,3 pour former des chaînes longues d'environ 20 à 25 KDa. Les chaînes portent des alternances de disaccharides non sulfatés, mono sulfatés (Gal-GlcNAc6S) ou disulfatés (Gal6S-GlcNAc6S) (Esko et al., 2009). Les KS sont présents dans les tissus de la cornée au sein des protéoglycanes *lumicane* et *kératocane* (**figure 15**) ou ils jouent un rôle dans le maintien de l'hydratation. On les retrouve également dans la peau et les cartilages au sein de la *fibromoduline* (Funderburgh, 2000). Différents types de cancer

surexpriment le *lumican*. Une surexpression de *fibromoduline* a également été détectée dans les cancers du poumon (Garber et al., 2001) et de la prostate (Welsh et al., 2001).

Les héparanes sulfates (HS) et héparines (HEP) sont constitués d'unités disaccharidiques de D-glucosamine (GlcN) liée en α -1,4 à un acide glucuronique (GlcA) ou un acide iduronique (IdoA). Ces unités dissaccharidiques s'enchaînent via des liaisons β -1,4. Au cours de leur biosynthèse, les héparines et héparanes sulfate bien que composés d'unités disaccharidiques de GlcN-GlcA/IdoA, subissent des modifications le long de leurs chaînes latérales. En effet, les résidus GlcN peuvent être N-acétylés, N-sulfatés, ou O-sulfatés en position 6, voir, de manière plus rare, en position 3 (**Figure 16**).

C'est la variation de ces modifications le long des chaînes latérales qui différencie les HS des HEPs. Les HS sont caractérisés par un poids moléculaire généralement élevé allant de 10 à 70 kDa tandis que celui des HEPs fluctue entre 7 et 20 kDa. La différence la plus notable se fait au niveau de la sulfatation. En effet les HEPs ont un taux de sulfatation des glucosamines de plus de 80% alors que les HS montrent un taux autour de 50%. Cette variation s'accompagne d'une augmentation des épimérisations en IdoA dans les HEPs de plus de 70% contre 30 à 50% pour les HS (Esko et al., 2009).

Les HS sont synthétisés par tous les types de cellules tandis que les HEPs sont synthétisées uniquement par les mastocytes (Sasisekharan and Venkataraman, 2000) que l'on peut retrouver dans les tissus conjonctifs ou dans le microenvironnement tumoral en cas de cancer.

Les HEPs possèdent principalement une activité anti-coagulante liée à leur capacité à se fixer avec l'antithrombine (AT III), une protéine qui intervient dans la cascade de la coagulation sanguine (**Figure 17**). Cette interaction est due à la présence, sur les chaînes d'HEPs, d'une séquence pentasaccharidique qui se lie spécifiquement à l'AT III (Jin et al., 1997) et décuple sa vitesse d'inhibition basale envers les facteurs Xa et IIa (thrombine) de la coagulation. Cette même séquence est rare sur les chaînes d'HS.

Les HEPs sont liées exclusivement à la *serglycine* au niveau des granules sécrétoires des mastocytes où elles permettent de stocker, par liaisons ioniques, différentes protéases, cytokines et chimiokines liées à l'inflammation qui seront libérées à la dégranulation. (Douaiher et al., 2014).

Les HS pour leur part font partie intégrante de différents protéoglycanes liés à la membrane cellulaire, comme les *syndécanes* et les *glypicanes*, ou liés à la membrane basale, comme les *perlécanes*, les *aggrines* ou les *collagènes XV* et *XVIII* (Iozzo and Schaefer, 2015).

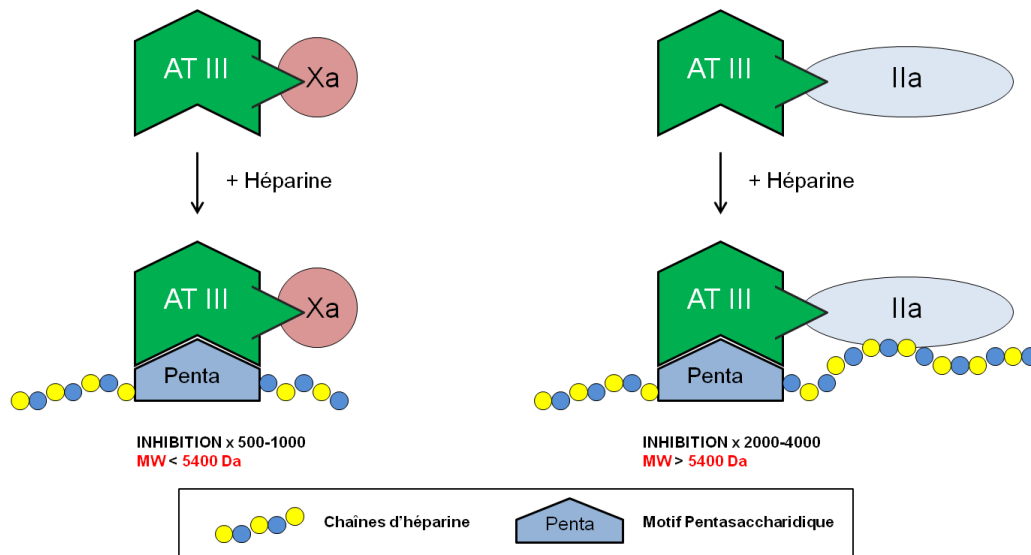


Figure 17 : Action anticoagulante des héparines via l'Antithrombine

La fixation du pentasaccharide à l'AT III multiplie par 500-1000 son inhibition basale du facteur Xa et par 2000-4000 celle du facteur IIa. Des tailles de chaînes d'héparines inférieures à 5400 Da n'ont pas d'activité d'inhibition du facteur IIa même si elle se lie au pentasaccharide. D'après (Jin *et al.*, 1997)

L'hétérogénéité des chaînes de HS en terme de sulfatations et N-Acétylations donne naissance à différents domaines (**Figure 18**) qui sont en partie responsables des activités biologiques associées aux HS :

- Un domaine (NAC) où les glucosamines sont N-acétylées, situé près du noyau protéique.
- Un domaine (NS/NAC). où les glucosamines peuvent être N-acétylées ou N-sulfatées.
- Un domaine (S) où les glucosamines sont toutes N-sulfatées et fortement O-sulfatées. Une forte proportion de 2-O-sulfatation est aussi présente sur les acides uroniques de ce domaine.

Les HS, comme les HEPs de part leur caractère électronégatif, ont la capacité de se lier à différents médiateurs solubles et peuvent ainsi moduler diverses activités biologiques (Capila and Linhardt, 2002). Leur forte propension à moduler la disponibilité de facteurs de croissance tels que les FGFs et VEGFs font que les HSPGs jouent un rôle primordial dans l'angiogénèse physiologique ou l'angiogénèse tumorale (Sanderson *et al.*, 2010).

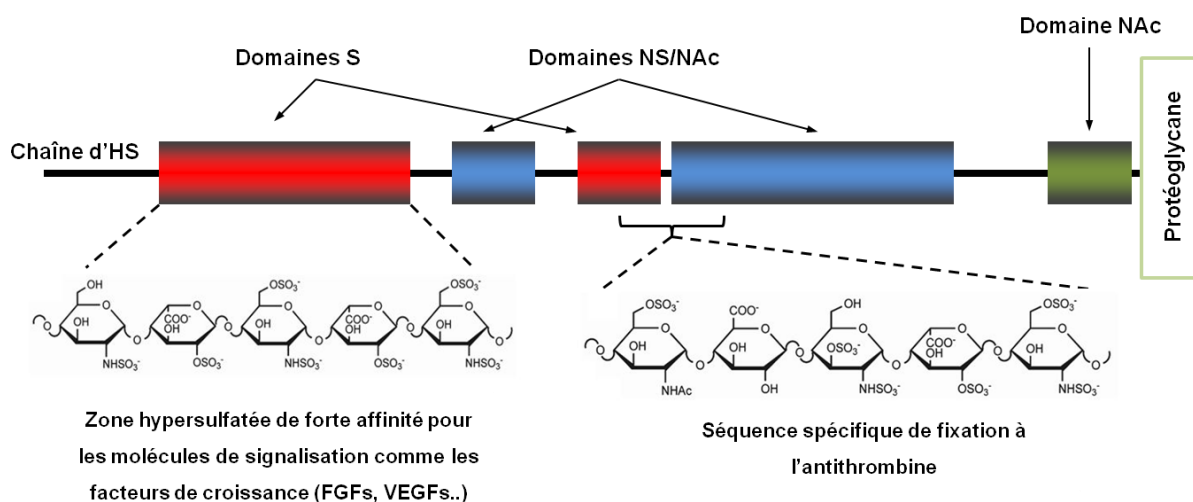


Figure 18 : Structure et organisation des héparanes sulfates

Les domaines S fortement sulfatés donnent aux HS des possibilités de liaisons avec de nombreuses protéines régulant différents processus biologiques. On retrouve également des séquences plus spécifiques entre domaines S et NS/NAc comme le pentasaccharide reconnu par l'antithrombine. Les HEPs sont plus riches que les HS en domaines S et séquences pentasaccharidiques. D'après (Esko et al., 2009)

3.1.3 Les molécules solubles du microenvironnement tumoral

Les MECs aux maillages protéiques et polysaccharidiques insolubles interagissent avec de nombreuses molécules solubles. Parmi ces molécules solubles, on retrouve les facteurs de croissance (présentés partie I) ainsi que diverses chimiokines, cytokines, hormones, enzymes etc...

Cette partie s'intéressera plus particulièrement aux enzymes présentes dans les MECs du microenvironnement tumoral. Les cellules tumorales ainsi que les cellules du microenvironnement, telles que les CAFs ou TAMs, ont une forte tendance à hypersécréter des enzymes de dégradation pour remodeler la MEC et favoriser le développement du cancer. Les enzymes produites sont généralement des protéases ou des glycosidases.

3.1.3.1 Les protéases de la matrice extracellulaire.

Les protéases de la MEC ont la capacité de dégrader les protéines de manière à remodeler la matrice. Elles sont particulièrement exprimées lors de processus physiologiques tels que la réparation tissulaire ou l'inflammation. On les retrouve également dans des pathologies comme le cancer où elles sont surexprimées dans le microenvironnement tumoral, favorisant l'invasion cellulaire, l'angiogénèse ou la formation de métastases (Koblinski et al., 2000). Les protéases matricielles peuvent être présentes à la surface des cellules ou excrétées directement dans la MEC (Sevenich and Joyce, 2014). Le dégradome humain compte 569 protéases dont 269 sont localisées dans le domaine extracellulaire et 16 dans le domaine membranaire (**Figure 19**).

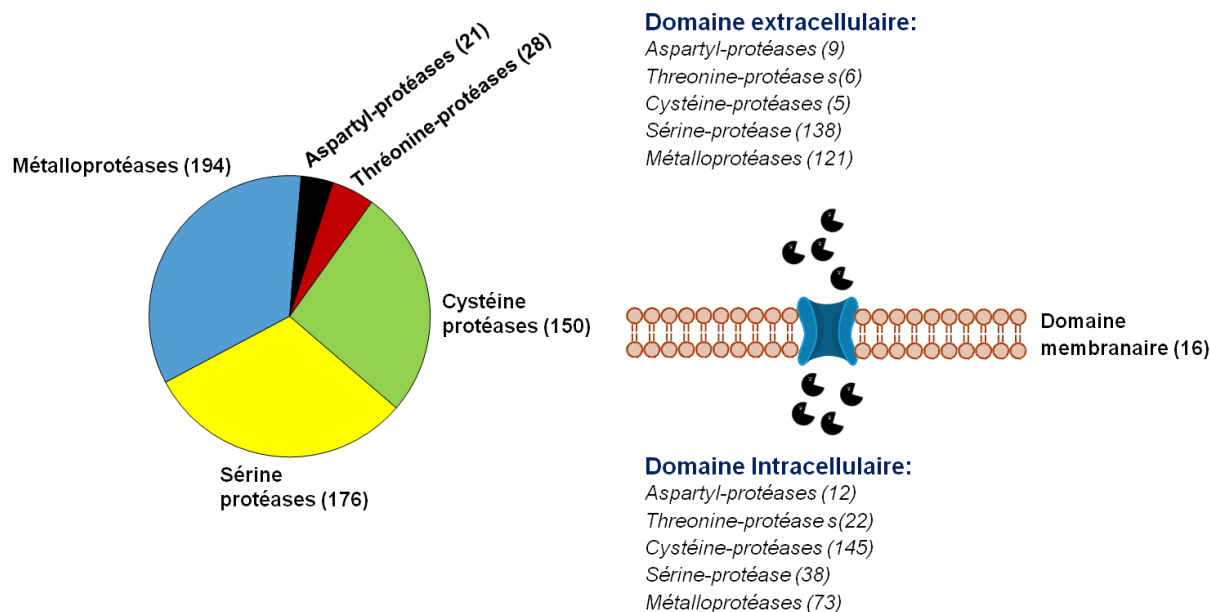


Figure 19 : Dégradome humain et localisation des protéases (Theocharis, Adv Drug Deliv Rev, 2016)

Les protéases excrétées appartiennent majoritairement aux familles des métalloprotéases et sérine-protéases, bien que l'on retrouve également des aspartyl-protéases, des cystéine-protéases ainsi que des threonines-protéase (Rawlings et al., 2010; Theocharis et al., 2016).

La stimulation des cellules stromales par les cellules cancéreuses via certains signaux chimiques entraîne une surproduction de protéases. Par exemple, les TAMs, les cellules endothéliales ou les CMS produisent des MMPs, tandis que les CAFs produisent de l'urokinase (Sevenich and Joyce, 2014). Les cellules cancéreuses expriment elles aussi plus de protéases que la normale et les échanges avec le microenvironnement peuvent augmenter ce phénomène. Les conditions de stress du microenvironnement comme l'hypoxie déclenchent la sécrétion des protéases dans le milieu extracellulaire (Gondi and Rao, 2013; Zaidi et al., 2008).

3.1.3.2 Les glycosidases de la matrice extracellulaire.

Les glycosidases de la MEC ont la capacité de dégrader les glycosaminoglycanes. On retrouve majoritairement les glycosidases dans le compartiment intracellulaire ce qui demande une étape d'internalisation des GAGs avant de pouvoir être hydrolysés (**figure 20**) (Lloyd and Mason, 1996).

Dans un premier temps les protéoglycanes sont clivés par des protéases membranaires et péricellulaires puis les GAGs sont internalisés par endocytose. Une première dépolymérisation endolytique a alors lieu au sein de l'endosome de manière à obtenir des oligosaccharides de GAGs via des hyaluronidases ou des endo- β -D-galactosidase. La dégradation des oligosaccharides se poursuit lors de la fusion endosome-lysosome où ils entrent en contact avec de nouvelles

glycosidases exolytiques ainsi que certaines sulfatases qui vont les réduire en monomères (Ernst et al., 1995). Seuls les HS sont encore sous forme de polysaccharides avant la fusion avec le lysosome car l'héparanase qui les dégrade n'est active que dans le lysosome (Shafat et al., 2006).

Tout comme pour les protéases, certaines glucosidases peuvent être excrétées dans le milieu extracellulaire en réaction à des stimuli produits par une zone inflammatoire physiologique ou tumorale. C'est le cas pour certaines hyaluronidases ainsi que pour l'héparanase.

Les hyaluronidases sont des hydrolases dont la fonction principale est la dégradation de l'AH bien qu'elles aient également une activité réduite sur les CS et les DS (El-Safory et al., 2010). La famille des hyaluronidases est composée de 5 membres (Hyal1 à Hyal4 et PH-20). Hyal1, Hyal2 et PH-20 possèdent des activités enzymatiques sur les AH tandis que Hyal4 agit majoritairement sur les CS. En revanche, aucune activité catalytique n'a été détectée pour Hyal3.

La Hyal1 est une enzyme lysosomale active à des pH acides qui clive des AH de toutes tailles et libère de petits fragments. La Hyal2 clive des AH de hauts poids moléculaires (20×10^4 kDa) et donne des fragments d'environ 20 kDa. Elle agit à des pH allant de 4 à 7,4 et est excrétée dans la MEC (Stern et al., 2007).

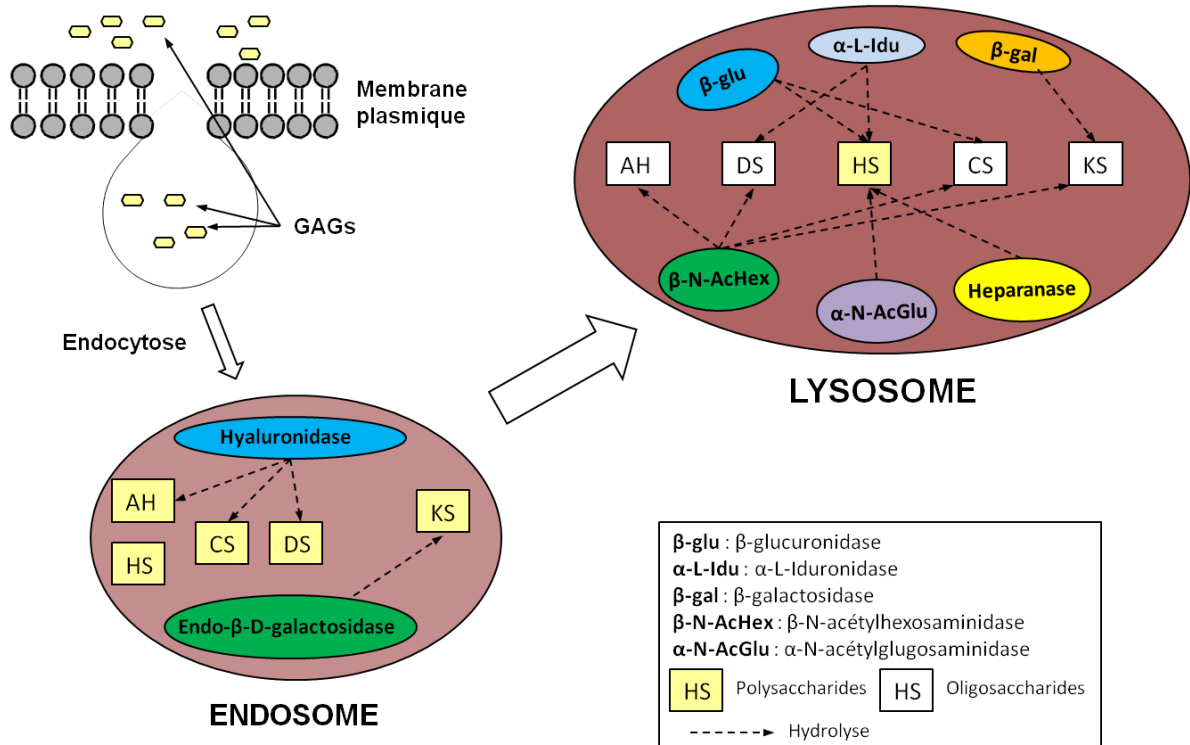


Figure 20 : Dégradation enzymatique des GAGs. Adapté de (Ernst et al., 1995)

Ces deux hyaluronidases ainsi que la PH-20 connue sous le nom de hyaluronidase testiculaire ont été observées surexprimées dans différents cas de cancer et notamment les cancers du sein, de la

prostate ou du larynx (Godin et al., 2000; Madan et al., 1999b, 1999a). Ces glycosidases sont associées à des phénotypes agressifs et invasifs et certains fragments de AH produits par l'hydrolyse tendent à favoriser l'angiogénèse tumorale (Stern et al., 2006)

L'héparanase est une endo- β -D-glucuronidase qui dégrade les chaînes d'héparanes sulfates; soit au sein des lysosomes (après endocytose) où elle est présente dans toutes les cellules en très faible quantité, soit quand elle est excrétée dans la MEC dans des conditions précises (Freeman and Parish, 1998; Parish et al., 2001a). Par exemple, cette enzyme est sécrétée par les plaquettes ou les cellules activées du système immunitaire lors du processus d'invasion des tissus conjonctifs et de réparation tissulaire. Dans un contexte pathologique, on la retrouve surexprimée et hypersécrétée par de nombreux cancers où elle est associée à l'angiogénèse tumorale et la formation de métastases (Elkin, 2001). (Le rôle de l'héparanase est détaillé dans la section 3.2)

3.1.4 Physicochimie du microenvironnement tumoral

3.1.4.1 Hypoxie et acidose

L'hypoxie se caractérise par un manque d'oxygène dans les cellules. Cela peut se produire pour les tumeurs non, ou mal vascularisées, et est l'un des principaux facteurs déclencheur de l'angiogénèse tumorale. Cette privation d'oxygène provoque une production par les cellules cancéreuses de facteurs de transcription induits par l'hypoxie (HIFs). Les HIFs vont induire l'expression d'une multitude de facteurs pro-angiogéniques, favorisant à leur tour une angiogénèse exacerbée. Parmi ces facteurs pro-angiogéniques, on retrouve le VEGF et ses récepteurs VEGFRs, les angiopoïétines, le PDGF, certaines MMPs et l'héparanase (Hickey and Simon, 2006).

Les facteurs de transcription HIF sont actifs sous formes hétérodimériques composées de deux sous unités α et β . A ce jour, trois sous unités α ont été recensées (HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α) dont l'expression est régulée par l'hypoxie et une sous unité β dont l'expression est constitutive (HIF-1 β). La réponse des cellules cancéreuses à l'hypoxie est majoritairement régulée par les facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α , HIF-1 α étant le plus décrit. L'hétérodimère HIF-1 α /HIF-1 β induit la transcription de gènes favorisant l'agressivité des cancers, l'angiogénèse et l'apparition de métastases (Birner et al., 2001; Mabeesh and Amir, 2007). Dans des conditions d'oxygénation normales, HIF-1 α est dégradé tandis qu'en hypoxie il reste intact et peut s'hétérodimériser avec HIF-1 β et induire la transcription de gènes en conséquences (**figure 21A**). (Cook and Figg, 2010).

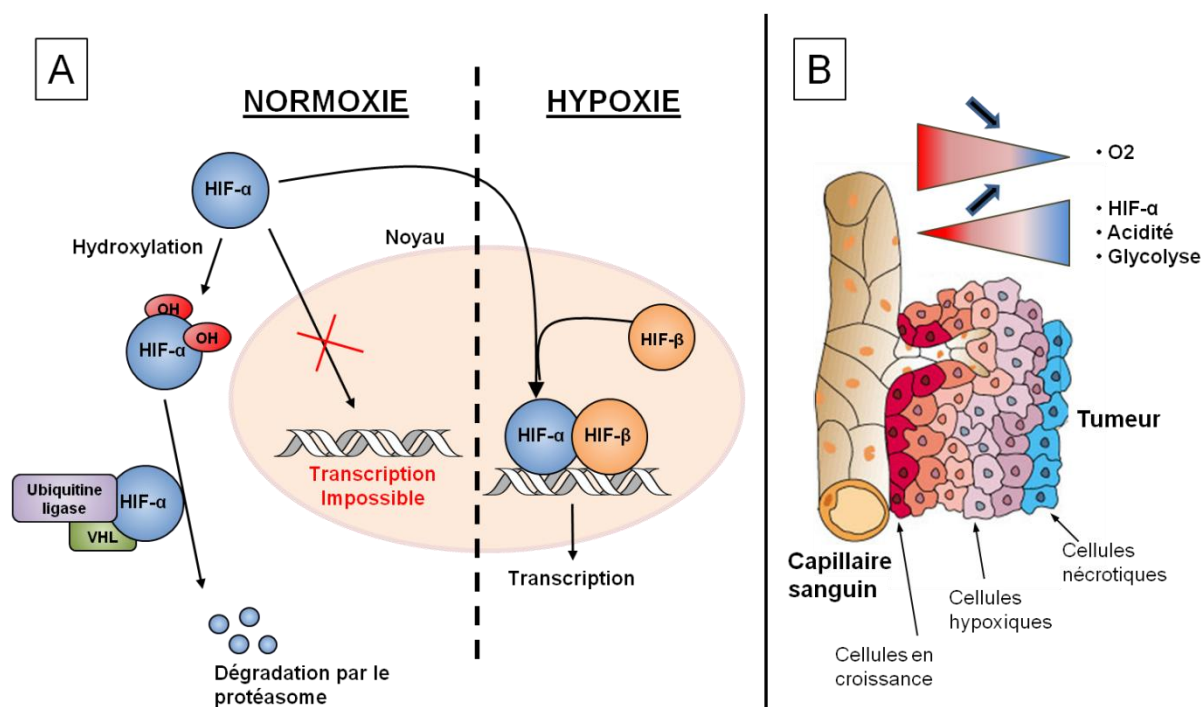


Figure 21 : Effets de l'hypoxie sur la production de HIF : impact sur le pH extracellulaire et la glycolyse

(A) En condition de normoxie, 2 prolines du HIF- α sont hydroxylées de manière à pouvoir s'associer ensuite à la protéine VHL qui est liée à une ubiquitine ligase. Cette ubiquitine ligase catalyse la polyubiquitinylation du HIF- α induisant ainsi sa dégradation par le protéasome et donc l'impossibilité de former un complexe de transcription avec HIF- β . Les conditions hypoxiques empêchent l'hydroxylation des HIF- α qui ne sont alors pas dégradés et peuvent former un complexe de transcription avec HIF- β et induire la production de multiples facteurs pro-cancéreux. (B) Plus les cellules cancéreuses sont loin d'un capillaire sanguin, plus elles sont hypoxiques et nécrotiques. L'hypoxie entraîne une surexpression d'HIF- α qui en se complexant avec HIF- β permet la transcription de différents gènes favorisant, entre autre, la glycolyse anaérobie et l'acidification du milieu extracellulaire par l'émission de lactates. (Inspiré de Cook & Figg, *Cancer j clin*, 2010 et Carmeliet & Jain, *Nature*, 2000)

Un autre rôle des HIFs réside en leur capacité à moduler le métabolisme du glucose des cellules cancéreuses. Ils favorisent grandement la glycolyse anaérobie transformant le pyruvate en lactate (effet Warburg) par rapport à la phosphorylation oxydative classique des mitochondries (figure 21B).

Cela a pour effet de considérablement augmenter la consommation de glucose par les cellules cancéreuse, mais également d'acidifier le pH extracellulaire par excrétion de lactates, et ce jusqu'à atteindre des pH de 5,6 (Brahimi-Horn et al., 2007).

La dégradation des matrices extracellulaires se voit alors favorisée par la sécrétion d'enzymes lysosomales actives à des pH acides comme les cathepsines ou l'héparanase qui induisent des phénotypes pro-angiogéniques et pro-métastatiques (Briozzo et al., 1988; Rivara et al., 2016).

3.2 L'héparanase, une cible thérapeutique prometteuse.

L'héparanase est une enzyme dotée d'un pouvoir catalytique de type **endo- β -D-glucuronidase** et qui exerce également des **fonctions biologiques non associées au caractère enzymatique**. Son activité catalytique est dirigée vers les **héparanes sulfate (HS)** des protéoglycanes d'héparane sulfate (HSPG) dont elle clive les chaînes, altérant ainsi la structure des MECs (membranes basales ou matrices interstitielles). La dégradation des HS de la MEC entraîne un **relargage de différentes chimiokines ou facteurs de croissance (VEGFs, FGF-2)** ayant un fort impact sur l'angiogénèse ou la prolifération tumorale (Voir **Chapitre I- L'angiogénèse**).

Depuis les premiers travaux référents à l'héparanase dont l'activité catalytique avait été détectée dans un cas de mélanome métastatique, cette enzyme a suscité un intérêt grandissant (Nakajima et al., 1984). Aujourd'hui, on sait qu'elle est impliquée dans de nombreuses pathologies chez l'homme comme les inflammations chroniques, les néphropathies liées aux diabètes, les thromboses ainsi que dans **la majorité des cancers où elle exerce un rôle pro-angiogénique et pro-métastatique**. Cette enzyme constitue donc une cible pharmacologique prometteuse, tant dans le cadre de traitements anti-angiogéniques que dans le traitement d'autres pathologies (Rivara et al., 2016).

3.2.1 Biologie de l'héparanase

3.2.1.1 Biosynthèse et activation de l'héparanase

Chez l'homme, l'héparanase (aussi nommée HPSE ou Hpa1) est encodée par le gène *HPSE* et est exprimée via deux types d'ARNm résultants d'un épissage alternatif (Dong et al., 2000). La protéine est traduite sous la forme d'une pré-proenzyme (pré-prohéparanase) composée de 543 acides aminés. S'en suit alors l'élimination du peptide signal N-terminal (Met1-Ala35) lors de la translocation dans le réticulum endoplasmique de manière à obtenir la proenzyme (prohéparanase) de 65 kDa. Cette dernière est ensuite transportée vers l'appareil de Golgi où elle est encapsulée dans des vésicules afin d'être sécrétée hors du cytoplasme (**Figure 22A**). Une fois hors de la cellule, la prohéparanase interagit avec différents composants liés à la membrane plasmique, tels que les récepteurs mannose-6-phosphate et les HS constituant le HSPG *syndécane* (**Figure 15**), avant d'être rapidement internalisée par endocytose dans les endosomes tardifs et lysosomes (Shteingauz et al., 2014). L'activation de l'héparanase dans les lysosomes est réalisée via l'excision d'un peptide linker de 6 kDa (Ser110-Gln157) catalysée par des cathepsines dont la cathepsine L majoritairement (Abboud-Jarrous et al., 2008) (**Figure 22B**). Cette activation génère la forme mature de l'héparanase sous la forme d'un hétérodimère non covalent composé d'une chaîne N-terminale de 8 kDa (Gln36-Glu109) et d'une chaîne C-terminale de 50 kDa (Lys158-Ile543) (Wu et al., 2015a).

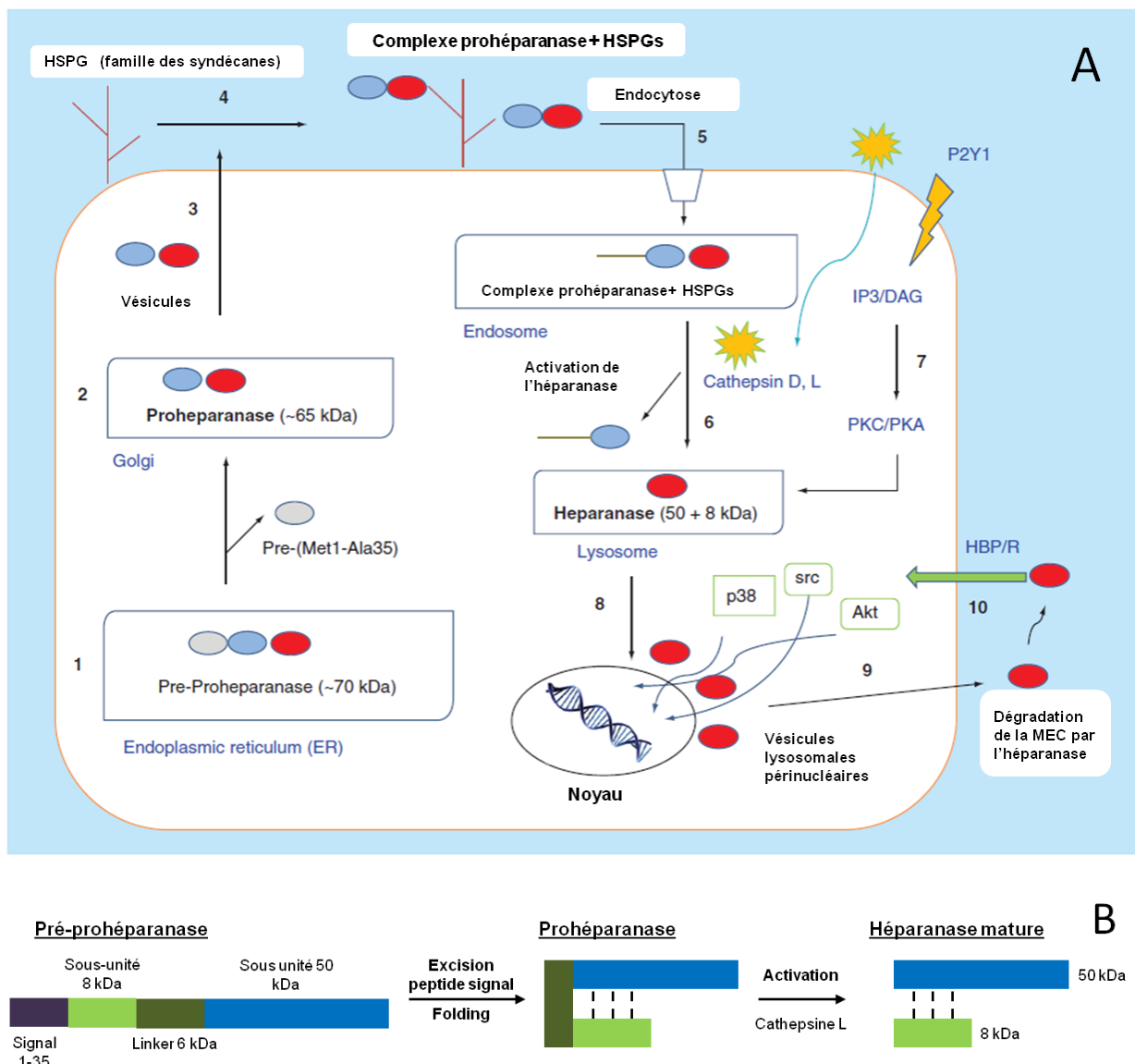


Figure 22 : Biosynthèse de l'héparanase, circulation intra/extracellulaire et modifications post-traductionnelles

(A) **Biosynthèse de l'héparanase et circulation de la protéine.** 1) Synthèse de l'enzyme dans la lumière du réticulum endoplasmique. 2) Transport de la pro-héparanase jusqu'à l'appareil de Golgi. 3) Sécrétion de la pro-héparanase via des vésicules vers le compartiment extracellulaire. 4) Interaction avec les HSPGs membranaires. 5) Endocytose des complexes HSPG + prohéparanase. 6) Fusion de l'endosome avec le lysosome et activation de l'héparanase par la Cathepsine L. 7) Sécrétion de l'héparanase favorisée par des récepteurs P2Y1. 8) Vésicules périnucléaires contenant l'héparanase mature. 9) Libération de l'héparanase mature dans le compartiment extracellulaire et dégradation de la MEC induisant la libération de facteurs de croissance pro-angiogéniques et prométastatiques. 10) Liaison de l'héparanase à des récepteurs déclenchant les voies de signalisation p38, Akt et src liées à la prolifération cellulaire et l'invasion. (B) **Modifications post traductionnelles de l'héparanase.** Le peptide signal de la pré-prohéparanase est clivé dans un premier temps induisant un folding de la prohéparanase. Dans un second temps, le peptide linker est excisé par la cathepsine L, libérant le site catalytique pour l'obtention de l'héparanase mature sous sa forme hétérodimérique. (D'après Rivara et al, *Fut Med Chem rev*, 2016 & Wu et al, *Nature*, 2015)

Il a par ailleurs été montré que la chaîne de 8 kDa était indispensable pour que l'enzyme mature ait une activité catalytique (Levy-Adam et al., 2003). **Une fois activée, l'héparanase mature reste au sein des compartiments lysosomaux** dans lesquels on la retrouve dans toutes les cellules en très

faible quantité pour assurer la dégradation des HS internalisés par endocytose (Parish et al., 2001a). On la retrouve en quantité plus importante dans les fibroblastes, les cellules cancéreuses et plus généralement dans les cellules à caractère invasif comme les plaquettes ou les cellules immunitaires. Ces cellules sont capables de sécréter l'héparanase sous l'action de **stimulis** internes ou externes comme **l'hypoxie ou l'acidification du milieu extracellulaire** (Vlodavsky et al., 2016).

3.2.1.2 Structure, mécanisme catalytique et spécificité

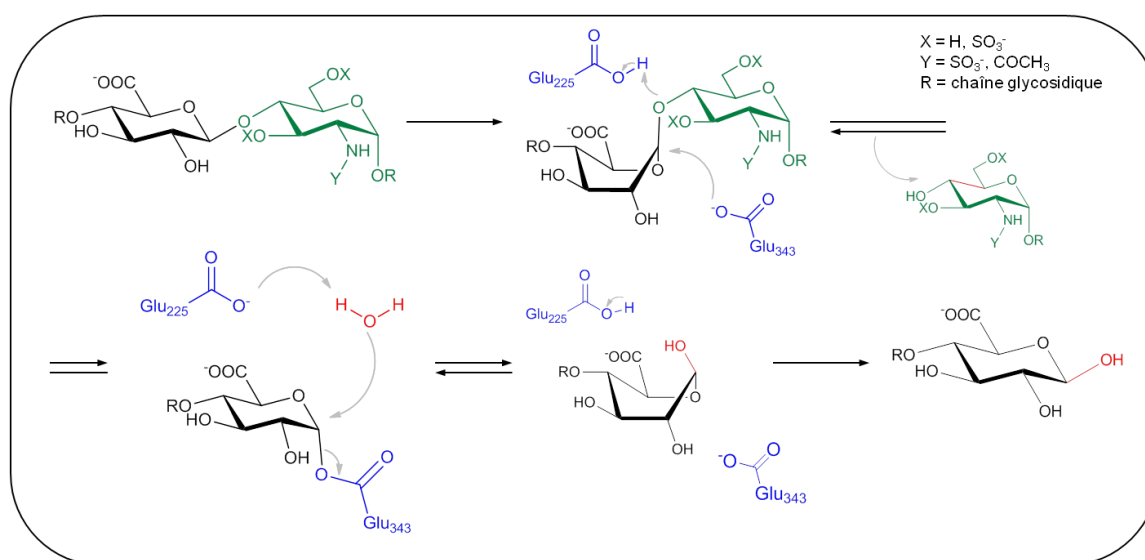


Figure 23 : Mécanisme catalytique de l'héparanase
(d'après Wilson et al, *biochem biophys Res com*, 2014)

Des études réalisées à l'aide d'alignements de séquences et de modélisation moléculaire avaient prédit une structure de l'héparanase mature en tonneau TIM (β/α)₈ (8 alternances de feuillets- β et d'hélices- α) (**Figure 24**). Ces hypothèses ont été confirmées très récemment en 2015 avec l'obtention de la structure 3D de l'héparanase (Wu et al., 2015a). Au-delà de la structure en tonneau TIM, la sous unité de 50 kDa possède un domaine C terminal composé de 8 feuillets- β essentiel à la sécrétion et l'activité enzymatique tout en jouant un rôle dans l'activité non enzymatique de l'héparanase (L. Fux et al., 2009).

L'héparanase est une endo- β -D-glucuronidase qui catalyse l'hydrolyse d'une liaison β -glycosidique entre un acide glucuronique/iduronique et une glucosamine. Elle appartient à la famille CAZY des Glycosyl Hydrolases et est identifiée comme GH79. Le mécanisme catalytique fait appel à deux acides aminés identifiés par mutagenèse dirigée : Glu225 et Glu343. Ils ont respectivement le rôle de donneur de proton et de nucléophile (**figure 23**). Le site catalytique

produit une hydrolyse avec un mécanisme de rétention de configuration qui permet de garder la configuration du carbone anomérique après hydrolyse (Wilson et al., 2014).

L'analyse séquentielle de la protéine a permis l'identification de trois zones fortement concentrées en acides aminés basiques. Parmi elles, deux zones : Lys158 à Asp162 et Gln270 à Lys280 ont montré de fortes interactions avec les HS et ont été nommées respectivement par la suite HBD-1 et HBD-2 (HBD pour Heparin Binding Domain) (**Figure 24**).

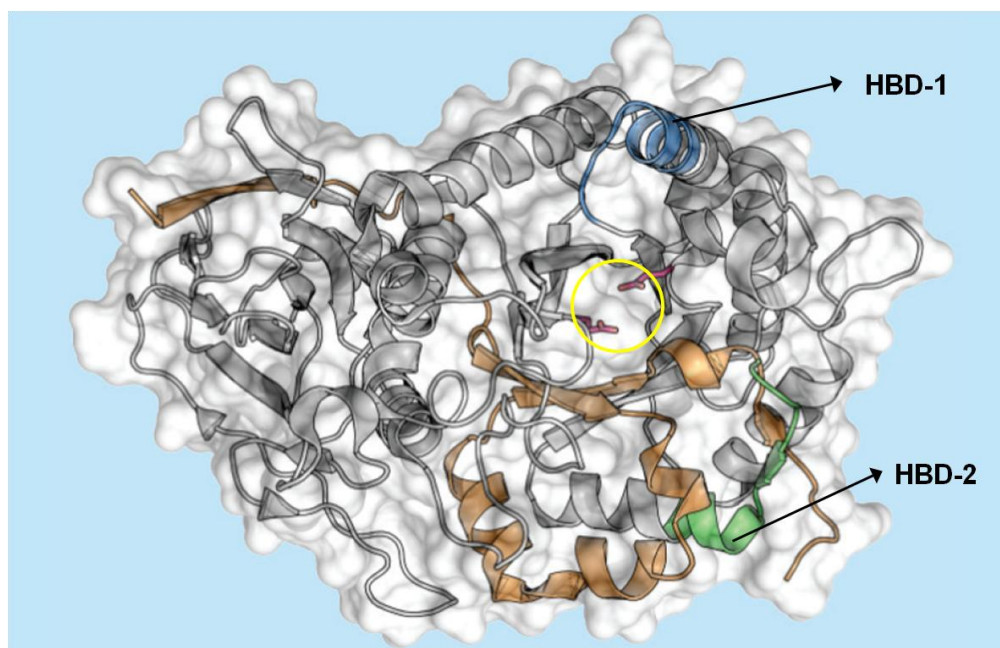


Figure 24 : Structure 3D de l'héparanase et identification des HBDs

Structure identifiable en tonneau TIM avec identification des HBDs en bleu et en vert. Les acides aminés Glu225 et Glu343 du site actif sont visibles dans le cercle jaune. (D'après Rivara et al, *Fut Med Chem rev*, 2016)

Le fait que les HS soient fortement chargés négativement, dû aux nombreuses fonctions sulfate, leur octroie une forte affinité avec les acides aminés basiques. HBD-1 et HBD-2 sont situés de part et d'autre du site actif et aident à l'adhésion des chaînes d'HS sur l'héparanase de manière à favoriser l'accès au site catalytique et l'hydrolyse qui s'en suit (Gandhi et al., 2012). Dans le cas où l'enzyme ne montre pas d'activité catalytique, c'est via HBD-1 et HBD-2 qu'elle interagit avec d'autres composés et exerce une activité biologique (Levy-Adam et al., 2005).

La spécificité de l'héparanase a été étudiée depuis longtemps à l'aide de substrats naturels et synthétiques. Bien que cette spécificité ne soit pas encore bien élucidée, il est avéré que la structure minimum de reconnaissance pour l'héparanase est un trisaccharide. De plus il a été montré que l'hydrolyse n'était pas dépendante d'une séquence saccharidique spéciale mais plutôt du profil de sulfatation des saccharides adjacents au site actif. L'obtention de la structure 3D de l'héparanase (Wu et al., 2015a) a pu confirmer les précédentes hypothèses concernant le profil de sulfatation

requis (Peterson and Liu, 2010). La N-sulfatation en position -2 et la 6-O-sulfatation en position +1 sont déterminantes pour la reconnaissance dans le site actif car elles interagissent directement avec l'enzyme par liaisons hydrogène (**Figure 25**). Les 6-O- sulfatations en position -2 et N-sulfatation en position +1 ne sont pas indispensables, mais peuvent aider à stabiliser le trisaccharide dans le site actif par interaction avec les acides aminés basiques qui le composent. Il a été remarqué que l'héparanase pouvait s'adapter à différents type de substrats. Aux vues de l'hétérogénéité des chaînes de HS, il semblerait qu'elle puisse **cliver les chaînes sur des positions sélectives** de manières à produire des fragments composés des domaines les plus sulfatés déjà porteurs de facteurs de croissances, ou non-liés, et libres d'interagir avec d'autres cibles (Peterson and Liu, 2013)

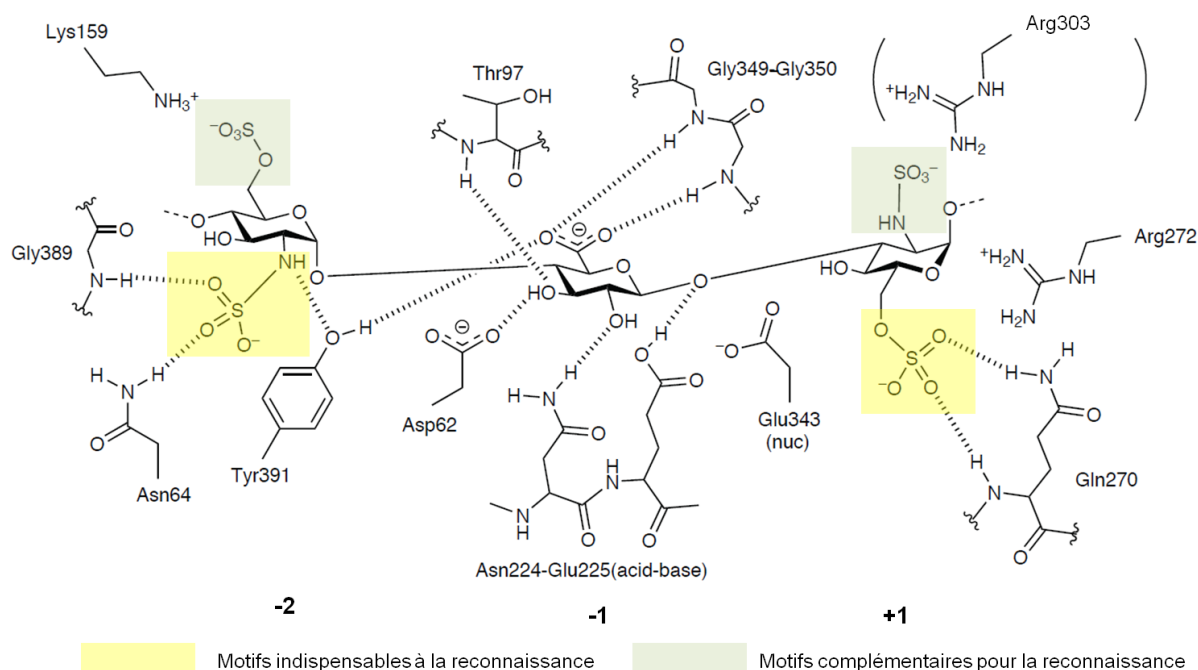


Figure 25 : Spécificité de l'héparanase

Résultats obtenus après co-cristallisation entre l'héparanase et un fragment d'héparine constitué de 4 monomères (DP4) (D'après Wu et al, Nature, 2015)

3.2.2 Fonctions biologiques de l'héparanase.

En conditions physiologiques, l'héparanase est peu exprimée dans le corps humain et on ne la retrouve en quantité significative que dans des processus précis tels que la réparation tissulaire ou l'inflammation. Elle est alors exprimée par les plaquettes et les cellules immunitaires qui l'utilisent pour dégrader la membrane basale des vaisseaux sanguins et envahir les tissus conjonctifs. En revanche l'héparanase est largement surexprimée lors de pathologies comme les cancers ou les maladies liées aux troubles inflammatoires chroniques.

Les fonctions biologiques de l'héparanase découlent principalement de son activité de dégradation des HS situés sur les HSPGs. En effet, dans le microenvironnement tumoral ou dans

des cas d'inflammation chronique, l'héparanase active est sécrétée dans le compartiment extracellulaire (**Figure 26**). Elle peut alors dégrader les HS des HSPGs liés à la membrane plasmique comme le *glypicane* et les *syndécanes*, ou ceux présents dans la membrane basale tel que le *perlecan* (**revoir fig 15**). La dégradation des chaînes de HS entraîne des réponses biologiques via divers mécanismes qui sont généralement pro-tumoraux ou pro-inflammatoires :

L'angiogénèse tumorale : L'héparanase favorise l'angiogénèse tumorale en participant à la dégradation de la membrane basale ce qui facilite l'invasion des cellules endothéliales et l'angiogénèse par bourgeonnement. Parallèlement, la dégradation des chaînes de HS des HSPGs de la membrane basale entraîne le relargage de nombreux facteurs de croissances liés aux HS tels que le VEGF, le FGF2, le PDGF ou le HGF (Heyman and Yang, 2016; Peterson and Liu, 2013). (**Voir Chapitre I**).

La dissémination métastatique : Parmi les premières études réalisées, celles effectuées sur des cellules de mélanomes ont montré une activité héparanase plus élevée dans la lignée métastatique que non métastatique (Nakajima et al., 1988). Cela a également été observé sur différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires où plus la lignée avait un potentiel invasif, plus l'activité héparanase était exacerbée (Zcharia et al., 2001). Une autre étude réalisée sur un grand nombre de cancers est venue corréler ces résultats en montrant que les cancers les plus agressifs exprimaient l'héparanase qui était, de plus, localisée sur le front entre les tissus sains et tumoraux (Ilan et al., 2006). **Un marqueur prédictif de la dangérosité d'une tumeur peut être la localisation de l'héparanase. En effet si l'héparanase reste dans le compartiment cellulaire, les chances de survie sont plus élevées que si l'héparanase est largement excrétée** (Takaoka et al., 2003).

L'inflammation : Que ce soit pour les inflammations chroniques ou les inflammations liées au cancer, l'héparanase joue un rôle aggravant. Les HS sont largement impliqués dans l'inflammation et notamment les HS de la membrane basale des cellules endothéliales vasculaires (Vlodavsky et al., 2016). En sécrétant de l'héparanase, les leucocytes dégradent les chaînes de HS et entament leur extravasation vers les tissus conjonctifs.

Tout comme pour les facteurs de croissances, les chaînes de HS peuvent séquestrer des cytokines pro-inflammatoires. La dégradation des HS par l'héparanase peut donc également activer le recrutement des cellules inflammatoires. De plus, les fragments de HS générés peuvent se lier à des récepteurs sur les macrophages. Cela déclenche la voie de signalisation NF- κ B qui active ces macrophages, leur faisant produire de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (en majorité des

interleukines) et leur donnant la capacité d'activer l'héparanase (Goodall et al., 2014).

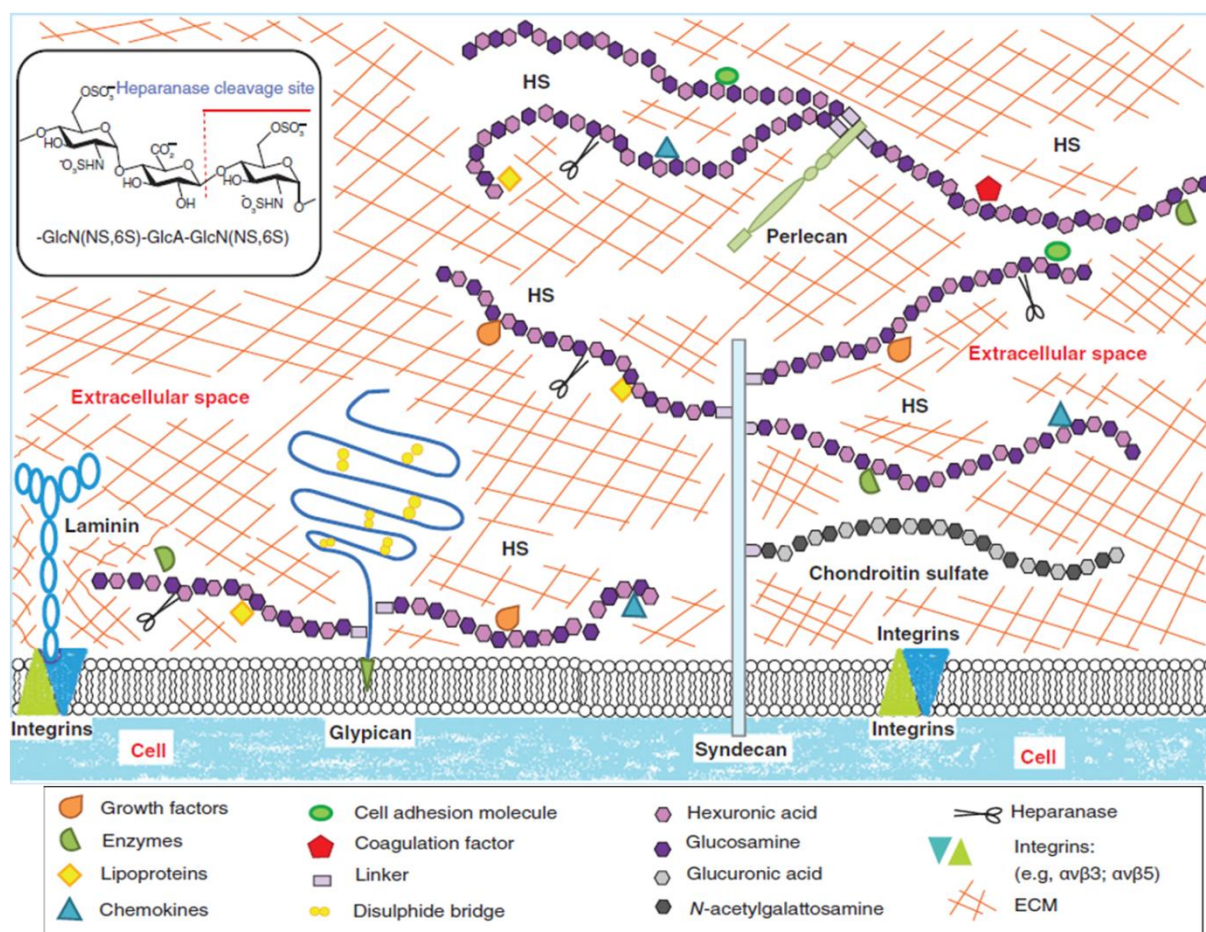


Figure 26 : L'héparanase dans le compartiment extracellulaire

L'héparanase peut dégrader les HS des HSPGs liés à la membrane plasmique tels que le syndécan ou le glypican ou ceux faisant partie de la membrane basale tel que le perlécan. Un rappel du site de coupure enzymatique est indiqué dans l'encadré en haut à gauche. (D'après Rivara et al, *Fut Med Chem rev*, 2016)

L'héparanase est une enzyme très mobile, qui s'adapte parfaitement au microenvironnement tumoral, et qui contribue à son caractère dynamique. Elle peut en effet être sécrétée sous sa forme pro-héparanase dans le microenvironnement et être endocytée par des fibroblastes ou des macrophages dans lesquels elle sera activée au sein des lysosomes puis sécrétée sous sa forme active (Nadav et al., 2002; Vlodavsky et al., 2016). L'affinité de l'héparanase avec les HSPGs *syndécans*, plus particulièrement le syndécan-1, a également un rôle important dans les cancers (Liu et al., 1998). Dans un premier temps, la liaison avec le syndécan-1 permet à l'héparanase d'être internalisée dans les cellules et dans un second temps, elle participe avec des protéases, aussi appelées "shedase", à la dégradation du syndécan-1. Cela permet de détacher de long fragments porteurs de facteurs de croissances ou de molécules pro-inflammatoires qui peuvent alors migrer vers d'autres types de cellules (Ramani et al., 2013).

Il a également été montré que, de par sa liaison avec des récepteurs extracellulaires encore mal

définis, l'héparanase induit des voies de signalisation intracellulaires de manière indépendante de son activité catalytique. Parmi ces voies, on retrouve les voies Akt, p38 et Src impliquées dans la prolifération cellulaire (Levy-Adam et al., 2010).

3.2.3 Stratégies actuelles d'inhibition de l'héparanase.

De par ses différentes fonctions, l'héparanase est associée à de nombreuses pathologies. Au sein des cancers, elle exerce un rôle pro-angiogénique et pro-métastatique mais elle participe aussi aux processus d'inflammation chronique, aux pathologies vasculaires ou à d'autres maladies plus rares. L'héparanase est donc une cible pharmacologique prometteuse dans le cadre de thérapies anti-angiogéniques mais également pour le traitement de différentes maladies (Pisano et al., 2014).

3.2.3.1 Les analogues de l'héparane sulfate

L'une des premières stratégies adoptées pour développer des inhibiteurs de l'héparanase a été de concevoir des analogues de son substrat naturel, soit l'héparane sulfate.

C'est l'équipe du Professeur Parish qui élaborait l'un des premiers inhibiteurs de l'héparanase en 1999 dénommé PI-88 (Parish et al., 1999). Le **PI-88** est dorénavant développé par la société australienne *Progen pharmaceuticals* sous le nom de muparfostat (**figure 27**). Il correspond à un mélange d'oligosaccharides de mannose hautement sulfatés et monophosphorylés dérivés de phosphomannanes produits par la levure *Pichia (hansenula) holstii* (Kudchadkar et al., 2008). Il possède des propriétés anti-angiogéniques via l'inhibition de l'héparanase et des interactions avec le VEGF et FGF-1 et 2. Le muparfostat est pour le moment en phase III d'un essai clinique pour le traitement d'hépatocarcinomes après résection de la tumeur. Il semblerait que pour le moment il ne valide pas le premier critère de l'essai, soit une augmentation de la survie sans progression de la maladie.

Un autre analogue de l'héparane sulfate est développé par la société *Progen pharmaceuticals* sous le nom de **PG545**. Il est constitué d'une partie oligosaccharidique hautement sulfatée reliée à une partie lipophile. Les tests précliniques ont montré que le PG545 exerçait une activité anti-angiogénique et anti-métastatique par l'inhibition de l'héparanase mais également par ses interactions avec le VEGF ainsi que FGF-1 et FGF-2. Il est actuellement en phase 1 des essais cliniques pour des traitements de tumeurs solides (Ferro et al., 2012; Hammond et al., 2013).

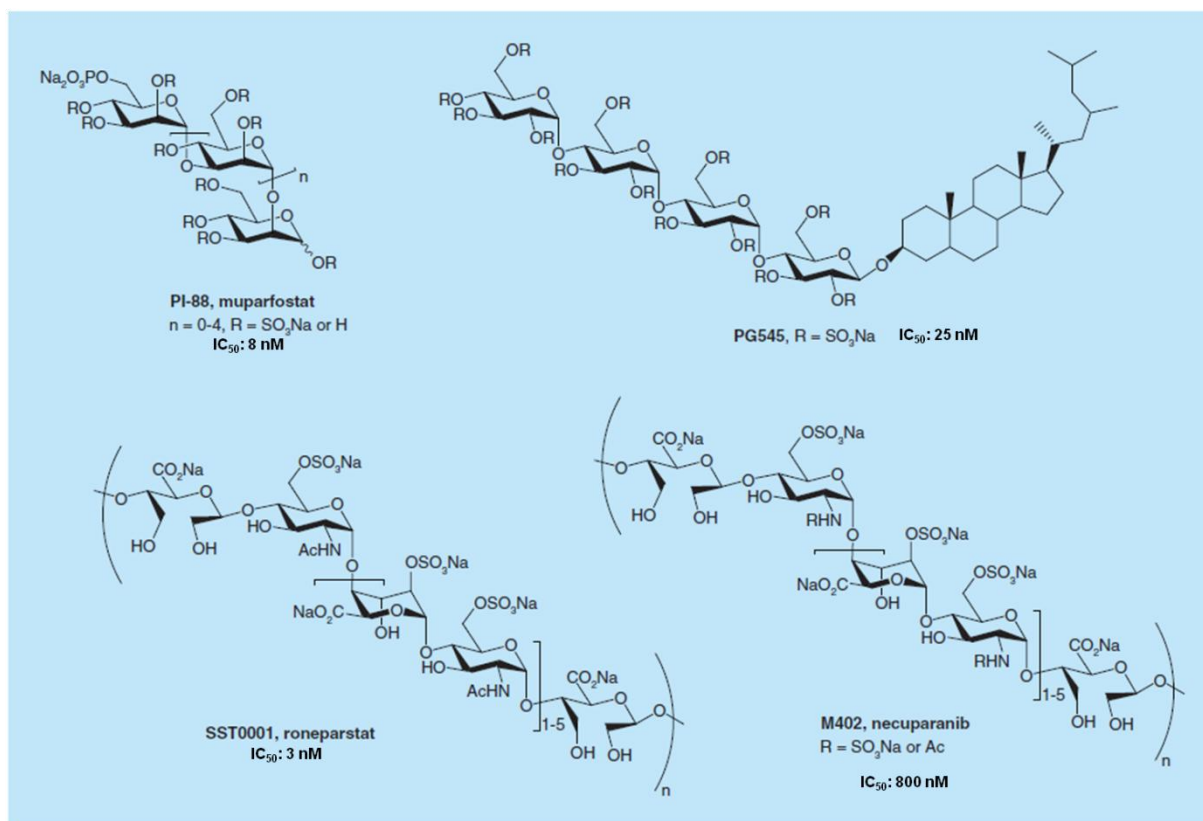


Figure 27 : Inhibiteurs de l'héparanase analogues des HS actuellement en essai clinique.

Structure des composés polysaccharidiques inhibiteurs de l'héparanase actuellement en phase d'essais cliniques. L'IC₅₀ sur l'activité héparanase est renseignée. (D'après Rivara et al, *Fut Med Chem rev*, 2016)

Deux autres composés possédant une structure analogue aux HS ont montré des résultats prometteurs. Il s'agit du SST0001 et du M402, qui ont pour point commun d'être des dérivés du composé le plus proche structuralement des HS, soit, les héparines. Le **SST0001** est produit par la société suisse *Sigma Tau research* sous le nom roneparstat. Il s'agit d'une héparine 100% N-acétylée et 25% glycol splittée (ouverture des acides uroniques par un procédé d'oxydation puis réduction, voir **figure 40**) d'un poids oscillant entre 15 et 25 kDa (Naggi et al., 2005). Les tests précliniques ont montré que le roneparstat ne possédait pas d'activité anti-coagulante, comparé aux héparines classiques. Ils ont également montré une forte activité anti-héparanase associée à des capacités de modulation des niveaux de HGF, VEGF et MMP-9 ainsi qu'une réduction de la dégradation du syndécan-1 dans le microenvironnement, lui octroyant ainsi des propriétés anti-angiogéniques et anti-métastatiques (Ritchie et al., 2011). Il est actuellement en phase I d'essai clinique dans le traitement du myélome multiple qui exprime fortement l'héparanase. Il y est associé à la dexaméthasone et les premiers résultats sont très encourageants.

Le **M402** est également un composé dérivé des héparines. Il est produit par la société américaine *Momenta Pharmaceuticals* sous le nom de necuparanib. Il s'agit d'une héparine dépolymérisée (de

manière contrôlée) par un procédé à l'acide nitrique puis glycol splitée par un procédé d'oxydation puis réduction (Zhou et al., 2011). Le composé final possède une masse autour de 5-8 kDa et une faible activité anticoagulante. Les essais précliniques ont montré des activités anti-angiogéniques et anti-métastatiques par l'inhibition de l'héparanase et l'interaction avec le VEGF, FGF-2 et SDF-1. Il est actuellement en phase II des essais cliniques pour le traitement des cancers pancréatiques en association avec le paclitaxel et la gemcitabine. Les résultats sont encourageants même si des cas de troubles thrombotiques ont pu être observés chez certains patients. C'est un moins bon inhibiteur de l'héparanase (IC_{50} : 800 nM) que le PI-88, le PG545 ou le SST0001 dont les IC_{50} se situent entre 3 et 25 nM.

3.2.3.2 Autres stratégies d'inhibition

Avec la compréhension de la structure de l'héparanase, d'autres inhibiteurs ont été isolés ou conçus et notamment sous la forme de petites molécules. L'un des premiers isolé fut l'acide trachyspique, une molécule produite par *Talaromyces trachyspermus* qui montra des capacités d'inhibition de l'héparanase intéressantes (**Figure 28. 1**) (Shiozawa et al., 1995).

Des travaux sur la suramine, une naphtylurée polysulfatée initialement synthétisée en 1916 pour le traitement de la maladie de Chagas (ou trypanosomiase) montrèrent également une inhibition de l'héparanase. Cependant les premiers essais de cette molécule mirent en évidence de sérieux effets secondaires qui menèrent à un arrêt des essais pour cette molécule (Nakajima et al., 1991)(**Figure 28. 2**). En 2002 la société *Insight* breveta de nombreuses petites molécules polycycliques présentant des activités anti-héparanase (Insight strategy and marketing, 2002) (**Figure 28. 3-6**). Les IC_{50} des molécules présentées **figure 31** sont tous de l'ordre du micromolaire tandis que les analogues des HS sont de l'ordre du nanomolaire. A l'heure actuelle ils semblent moins intéressants et aucune de ces molécules n'est d'ailleurs testée en essai clinique.

D'autres stratégies ont également été mises en place pour inhiber l'héparanase mais ne seront pas détaillées dans ce manuscrit. Parmi ces stratégies, la production d'anticorps monoclonaux a montré des résultats intéressants et ils devraient être soumis prochainement à des essais cliniques. Le développement d'acides nucléiques inhibant l'expression du gène HPSE est également en cours et les résultats montrent des effets anti-métastatiques prometteurs (Rivara et al., 2016)

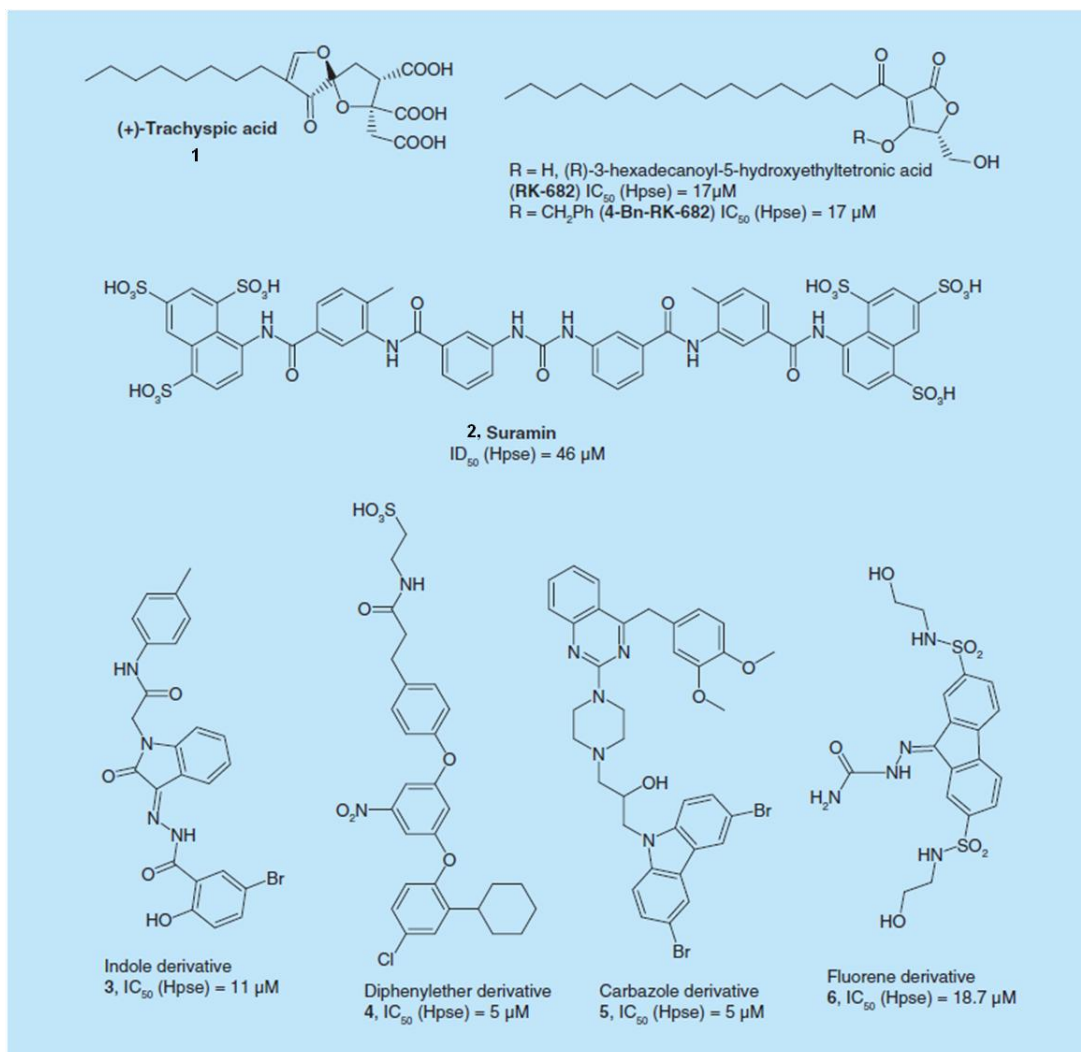


Figure 28 : Production de petites molécules inhibitrices de l'héparanase

3.2.4 Vers la conception de nouveaux analogues des héparanes sulfates

La modification physicochimique d'héparines a permis l'obtention de deux des composés actuellement en essai clinique pour des traitements anti-cancéreux par inhibition de l'héparanase (SST0001 et M402). Cela s'explique par le fait que les héparines partagent une structure quasi identique avec les HS à la différence près qu'elles possèdent plus de domaines sulfatés (**revoir Figure 18**). L'utilisation d'héparines est d'autant plus intéressante qu'elles sont déjà largement décrites de part leur utilisation en médecine comme anticoagulant.

Les héparines commercialisées sont extraites à partir de la muqueuse intestinale porcine (Elalamy, 2010). Elles sont purifiées sous formes sodiques ou calciques et sont distribuées en solutions administrables en intraveineuse ou par voie sous-cutanée. Elles peuvent être utilisées sous leur forme non fractionnée standard (HNF) ou de bas poids moléculaire (HBPM). Les HNFs sont caractérisées par un poids moléculaire moyen de 15 kDa avec des chaînes allant de 3 à 30 kDa (**Figure 29**). Les HBPMs sont, elles, caractérisées par un poids moléculaire moyen de 6 kDa. Des

héparines d'ultra bas poids moléculaire (HUBPM) au poids moléculaire moyen inférieur à 3 kDa ont également été développées et se sont par ailleurs montrées efficaces en tant qu'anti-angiogéniques (Agnelli and Turpi, 2012). Le développement au sein de notre laboratoire d'une méthode de dépolymérisation physicochimique a également permis l'obtention d'héparines de bas poids moléculaire possédant un pouvoir inhibiteur de l'héparanase intéressant pour des activités anticoagulantes réduites (Achour et al., 2016, 2013).

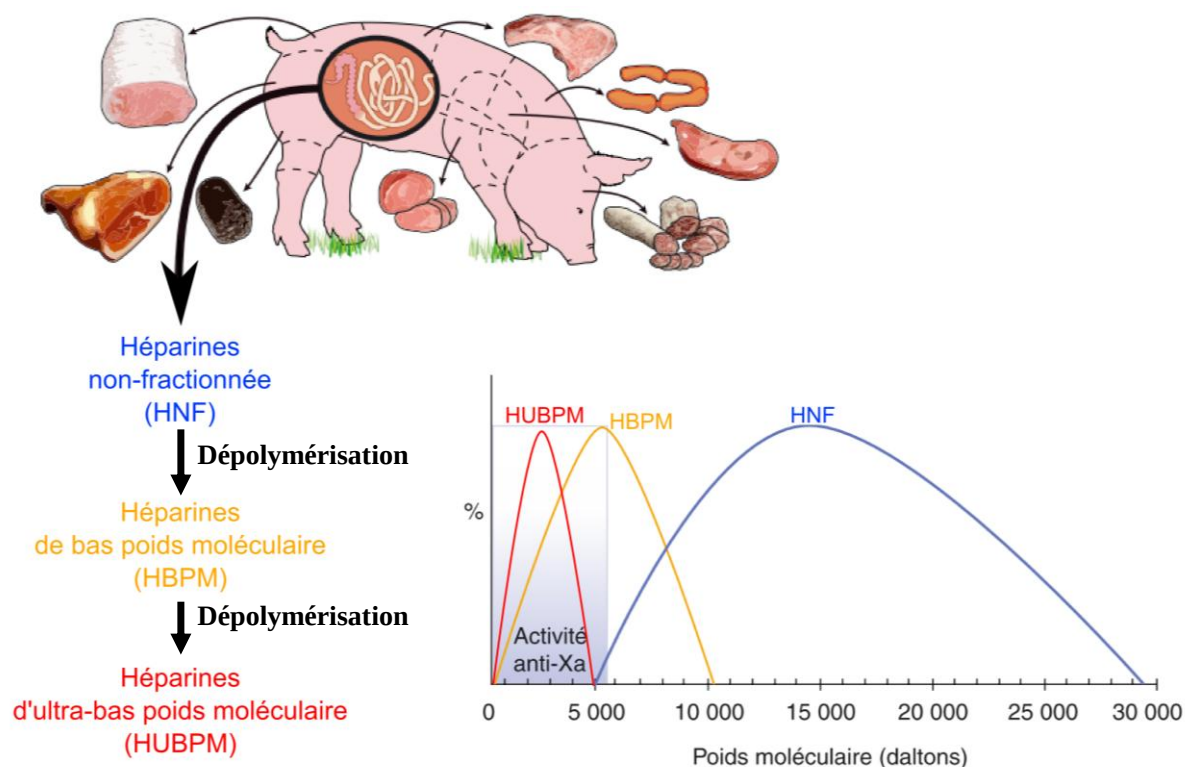


Figure 29 : Production des héparines en industrie pharmaceutique et leur classification selon leur poids moléculaire (D'après I Elalamy, 2010)

Pour autant, **l'utilisation des héparines a ses limitations**. D'une part car elles peuvent provoquer des effets secondaires graves tels que les thrombocytopénies ou des hémorragies, et d'autre part car leur moyen de production sont limités. Les héparines sont obtenues à partir d'intestins de porc et il est possible d'obtenir 1 dose d'HNF ou 3 doses de HBPM par animal (Linhardt and Liu, 2012a) ce qui en fait **un composé coûteux**. Pour subvenir aux besoins mondiaux en héparines 500 millions de porcs sont nécessaires, dont plus de 50% proviennent de Chine (ANSM, 2014). Du fait que la matière première soit d'origine animale, le processus de purification est coûteux et très contrôlé pour éviter d'éventuelles contaminations virales ou à prions. Une crise a d'ailleurs éclatée en 2007 avec la mise sur le marché d'héparines contaminées par des chondroïtines sulfates (Guerrini et al.,

2009). Cette tentative de fraude a engendré la mort de nombreux patients à travers le monde.

Aujourd'hui les processus de contrôle et de purification sont toujours plus drastiques et les sources d'approvisionnement en héparines restent limitées et sujettes à pénuries (Szajek et al., 2016). **La recherche d'alternatives aux héparines constitue donc un défi important.**

Tableau 3 : Comparaison de l'effet inhibiteur de l'héparanase de différents polysaccharides sulfatés. (D'après Parish & Snowden, patent US5541166A, 1996)

Polysaccharide	Activité inhibitrice de l'héparanase (IC ₅₀) µg/mL
Acide hyaluronique	> 50
Chondroïtine-4- sulfate	> 50
Chondroïtine-6- sulfate	> 50
Carrageenan-Kappa	10
Carrageenan-lambda	1,5
Dextran sulfate	1,6
Fucoidan	2,8
Pentosan sulfate	2,4
Heparin	1,5

Dans cette recherche d'inhibiteurs de l'héparanase alternatifs aux héparines, plusieurs candidats semblent intéressants, dont certains avaient été révélés par Parish et al (Parish et al, 1996) (**Tableau 3**). Notamment, l'utilisation de polysaccharides sulfatés biosourcés issus de plantes (fucoïdanes, Carraghénanes) ou de productions microbiennes (dextrans sulfate) semblent particulièrement intéressante pour la conception d'inhibiteurs de l'héparanase analogues des héparanes sulfates. De plus, certains sont déjà commercialisés pour différentes utilisations et pourraient être aisément valorisables s'ils s'avèrent de bons candidats anti-angiogéniques.

3.2.4.1 Les polysaccharides sulfatés de sources alternatives

3.2.4.1.1 Les Carraghénanes :

Les carraghénanes sont des polysaccharides de galactanes sulfatés de haut poids moléculaires produits par des macroalgues rouges. Ils sont composés d'unités disaccharidiques de D-galactopyranose (**unité D**) lié en $\alpha(1\rightarrow3)$ à un galactopyranose (**unité G**). Ces unités disaccharidiques s'enchaînent via des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$. L'unité D peut également être un 3,6-anhydro- α -galactopyranose (**unité DA**). Il existe diverses structures de carraghénanes plus ou moins sulfatées (Lahaye, 2001) (**Figure 30**). Leur structure leur confère des propriétés gélifiantes et texturantes qui sont largement exploitées par l'industrie agro-alimentaire et cosmétique (crème

glacée, dentifrice, gel douche...). Les plus utilisés en agro-industrie sont les carraghénanes kappa, iota et lambda (κ, ι, λ). Les carraghénanes- ι et κ ont des propriétés gélifiantes car ils forment des structures en double hélice semi-rigides en solution. Les carraghénanes- λ , quant à eux ne peuvent former de gel, mais ont des propriétés épaississantes. La production de carraghénane avoisinait les 56000 T/an en 2013 (supérieure aux agars et alginates) et le marché a été estimé à 760 million de dollars en 2016 (Mordor Intelligence, 2017).

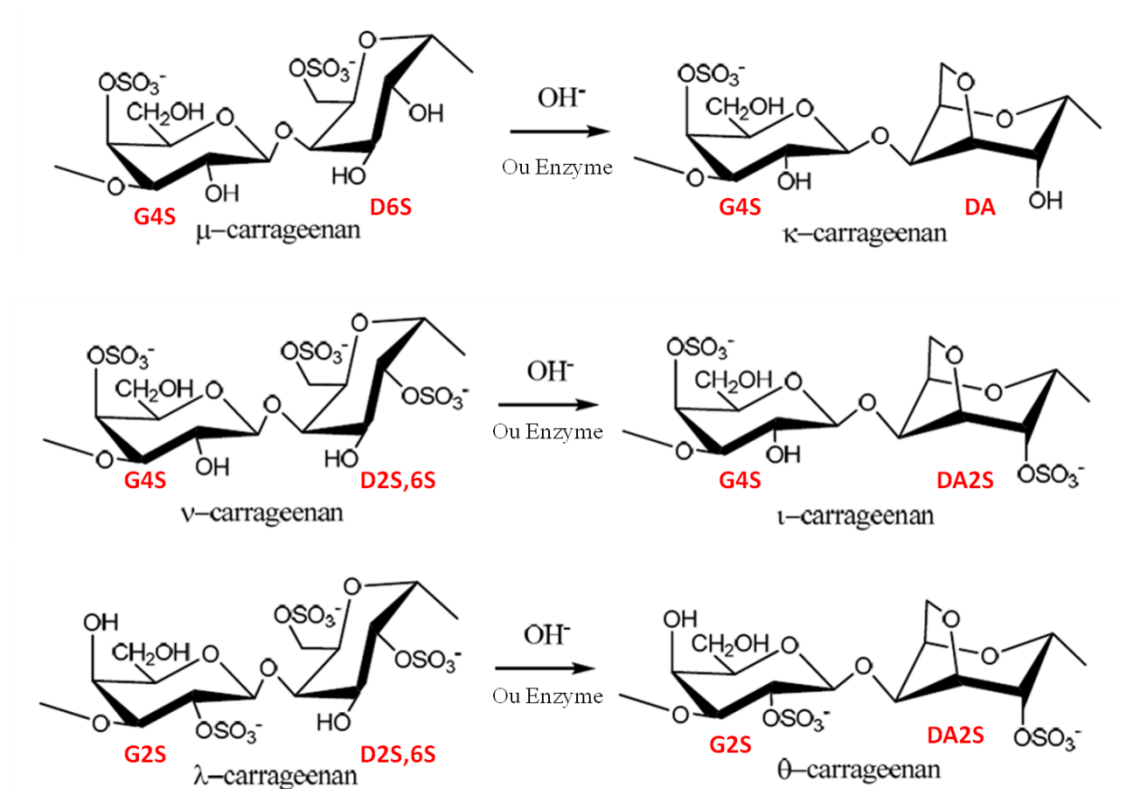


Figure 30 : Unités disaccharidiques des différents types de carraghénanes et leur transformation par traitement basique ou réaction enzymatique (D'après Jiao et al, Mar Drugs, 2011)

Les carraghénanes sont utilisés également pour diverses applications pharmaceutiques. Les - κ et - ι , de part leurs propriétés gélifiantes, peuvent être utilisés pour encapsuler des actifs avec relargage contrôlé ou sensibilité au pH (Liu et al., 2015). Ils peuvent également être utilisés pour induire une inflammation quand injecté sous la peau. Les carraghénanes- λ possèdent des activités anticoagulantes de part leur forte sulfatation (Yamada et al., 1997). Ils ont été étudiés dans le domaine de l'angiogénèse et des fragments dépolymérisés ont montré une activité anti-angiogénique par interaction avec l'héparanase et le FGF-2 (Chen et al., 2007; Niu et al., 2015). Très récemment, une étude par modélisation moléculaire a montré qu'un oligosaccharide de carraghénane- λ pouvait se lier au site actif de l'héparanase, confirmant son potentiel comme analogue d'héparane sulfate (Rabelink et al., 2017).

3.2.4.1.2 Les Fucoïdanes :

Les fucoïdanes sont des polysaccharides sulfatés issus de macroalgues brunes. Le premier fucoïdane isolé fut celui provenant de *fucus vesiculosus*. Les fucoïdanes provenant de cette espèce possèdent sont composés d'unités de fucopyranose 2-O-sulfatés liées entre elle par des alternances de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ ou $\alpha(1\rightarrow4)$ (Chevolot et al., 1999). Les monosaccharides liés en position C4 sont généralement 2-O-sulfatés et 3-O-sulfatés (**Figure 31**). L'observation de branchements d'autres chaînes de fucose sulfatés est observable tous les 2-3 monosaccharides. La structure des fucoïdanes peut varier selon les espèces d'algues (Ale et al., 2011).

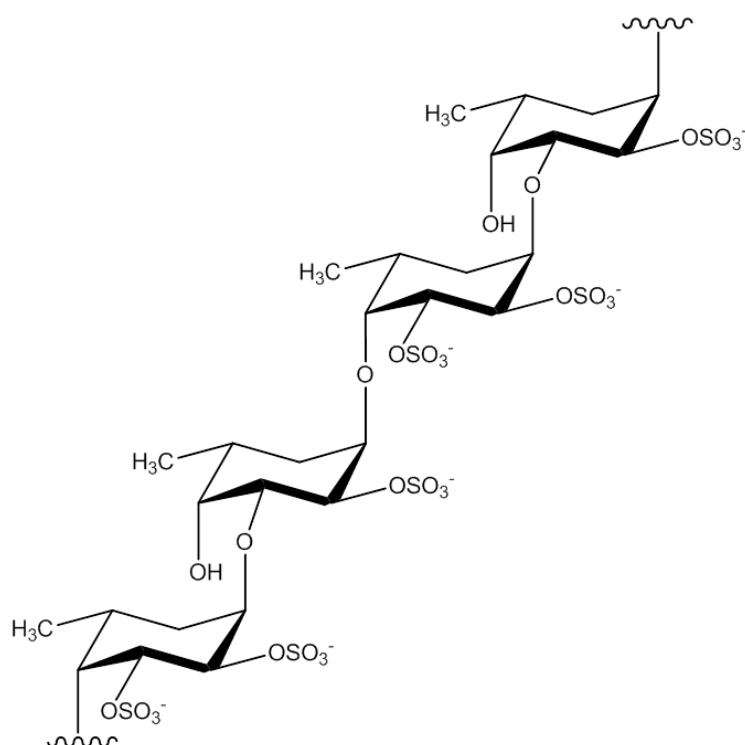


Figure 31 : Structures identifiées pour les fucoïdanes par *fucus vesiculosus* (D'après Ale et al, Marine Drugs, 2011)

Des activités antivirales, anti-inflammatoires, anti-oxydantes et anti-tumorales ont également été répertoriées (Li et al., 2008). Les fucoïdanes possèdent également une activité sur l'angiogénèse tumorale mais les résultats sont aujourd'hui contradictoires. En fonction de leur taille et de leur sulfatation, les fucoïdanes peuvent avoir une activité anti-angiogénique en interférant avec les FGF-2 (Soeda et al., 2000) ou pro-angiogénique en stimulant la production de VEGF, de neuropiline (Lake et al., 2006) et de syndécane-1 (Haddad et al., 2015).

Bien que les fucoïdanes semblent avoir de nombreuses propriétés bénéfiques sur la santé, leur mécanismes d'action restent encore mal compris et à confirmer. A l'heure actuelle, ils sont accessible à la consommation en tant que compléments alimentaires sous forme de gélules et sont

plutôt prisées des populations asiatiques déjà grandes consommatrices d'algues pour leur alimentation.

3.2.4.1.3 Les Dextrans sulfate :

Les dextrans sulfates sont des polysaccharides produits par hypersulfatation de dextranes produits par la bactérie *leuconostoc mesenteroide*. Ils sont composés de chaînes d'anhydroglucose sulfatées liées en α -1,6 avec certains branchements en α -1,3 (**Figure 32**). Bien que leur obtention nécessite une étape de sulfatation, la provenance bactérienne des dextranes en fait un composé facile à produire.

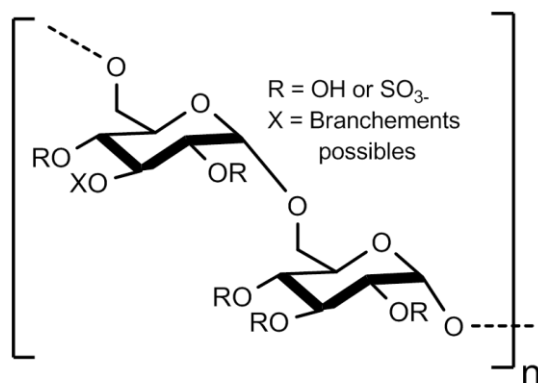


Figure 32 : Structure des dextrans sulfate

Les dextrans sulfates sont peu décrits dans la littérature et ne sont pas exploités à très grande échelle. Ils possèdent une activité anticoagulante en interagissant avec les plaquettes (Zeerleder et al., 2002) et semblent exercer un rôle pro-inflammatoire car ils sont utilisés pour déclencher des colites dans des modèles d'étude de cette pathologie (Cooper et al., 2000). Certaines préparations cosmétiques pour la peau incluent du dextran sulfate pour ses propriétés d'absorption de l'eau et une potentielle inhibition des hyaluronidases (Renault, 2003). L'étude de Parish *et al* avait également mis en évidence son rôle anticoagulant ainsi qu'un pouvoir inhibiteur de l'héparanase. Cela en fait un candidat anti-angiogénique potentiel (Parish and Snowden, 1996).

3.2.4.1.4 Les chondroïtines sulfate

Les chondroïtines sulfate (CS) sont des glycosaminoglycanes constitués d'unité disaccharidiques d'acide glucuronique et de N-acetylgalactosamine. Comme déjà évoqué plus avant (p- 52), on les retrouve majoritairement chez les mammifères dans la peau, les cartilages et les tendons où elles participent à la flexibilité et à la résistance des tissus. Les CS existent sous différentes formes plus ou moins sulfatées (**Figure 33**). Les CS-A et B sont retrouvées dans les cartilages et différents tissus

humains. Les CS-D et E sont plutôt présentes dans le règne animal et notamment dans les cartilages de requins (Esko et al., 2009). On reconnaît des propriétés anticoagulantes et anti-oxydantes aux chondroïtines et elles sont aussi utilisées en laboratoire pour confectionner des nanosystèmes de délivrement d'actifs (Zhao et al., 2015).

Au-delà de ces aspects, elles sont surtout connues pour lutter contre les problèmes d'arthrose. De part leur rôle naturel dans les tendons et cartilage, la consommation de chondroïtine sulfate en association à la glucosamine aide à renforcer les articulations. Ces traitements montrent des résultats variables et ne semblent pas très efficaces pour soulager les douleurs articulaires importantes (Clegg et al., 2006). Ils sont plutôt prescrits comme compléments nutraceutiques pour les personnes souffrant d'arthrose ou sujettes à des problèmes articulaires

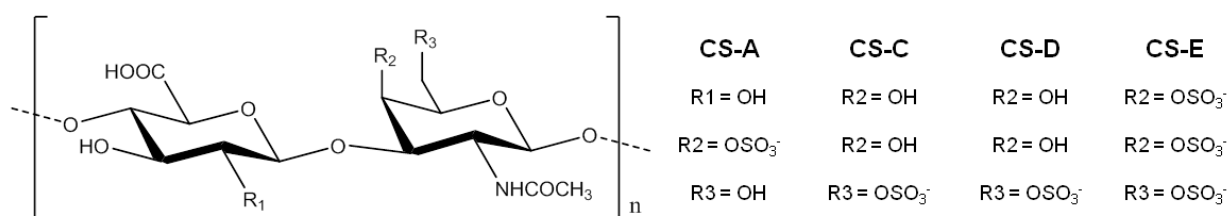


Figure 33 : Structure des chondroïtines sulfate

Les chondroïtines sulfate commercialisées en nutraceutique représentaient l'équivalent d'environ 10 000 tonnes en 2014 dans le monde (ASKCI Consulting Co. Ltd, 2015). La majorité des chondroïtine sulfate sont actuellement extraites et purifiées à partir de tissus animaux (cartilage de requin, trachée de bœuf...) (Jo et al., 2005) ce qui comme les héparines peut poser à la fois des problème d'éthique, de disponibilité et de sécurité sanitaire. La production de CS par voie microbienne est actuellement à l'étude pour pallier ce problème (Schiraldi et al., 2010).

3.2.4.2 Polysaccharides sulfatés et hémotase.

Les héparines sont connues pour leur activités anticoagulantes et parmi les polysaccharides présentés ci-avant, la majorité est décrite comme possédant également des activités sur l'hémotase. Ce processus physiologique associe l'ensemble des phénomènes déclenchés par une lésion des tissus ou des vaisseaux sanguins. Le rôle de l'hémotase est de stopper les hémorragies en bouchant les lésions occasionnées ou même de dissoudre un thrombus qui serait susceptible d'obstruer un vaisseau sanguin. Classiquement, l'hémotase est divisée en trois étapes (Schved, 2007) :

L'hémostase primaire est caractérisée par la formation du clou plaquettaire. Celui-ci se forme en réaction à une lésion tissulaire ou vasculaire qui déclenche l'adhésion, l'activation et l'aggrégation des plaquettes de manière à refermer les brèches.

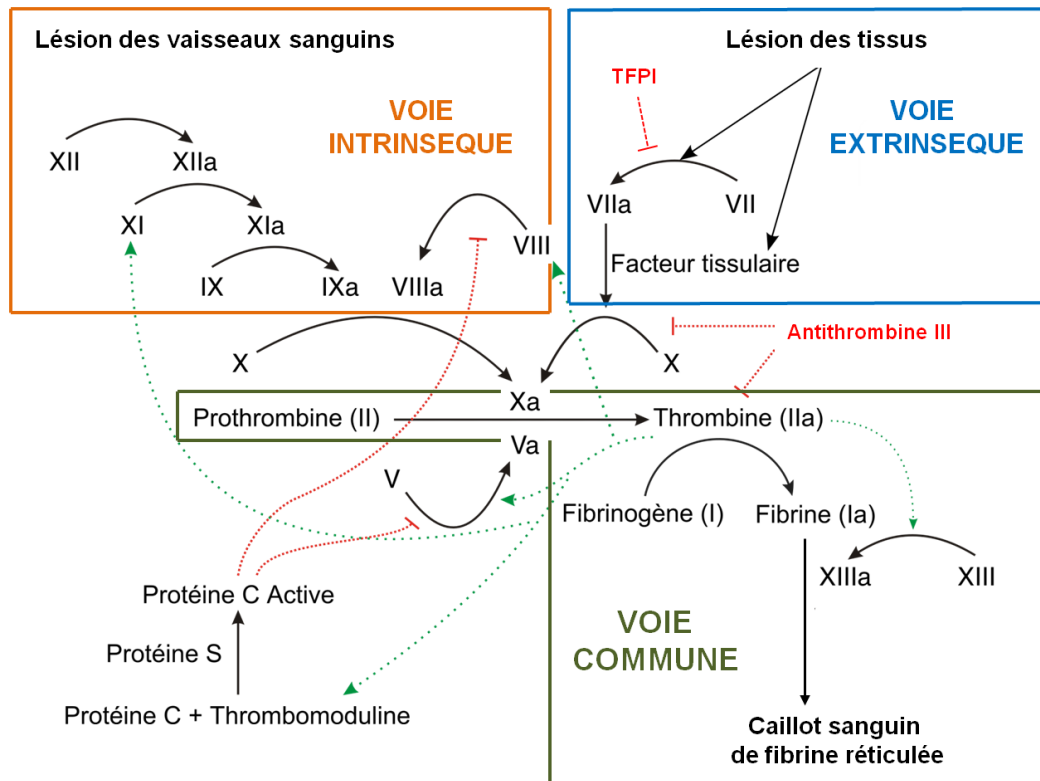


Figure 34 : Cascade de la coagulation sanguine

La coagulation ou hémostase secondaire se distingue par le renforcement du thrombus formé lors de l'hémostase primaire. Elle est déclenchée par le contact entre le facteur XII, qui est une protéine plasmatique, et les tissus. La cascade de facteurs de coagulation qui en découle se termine par la transformation du fibrinogène soluble (Facteur I) en fibrine (Facteur Ia) insoluble qui vient consolider l'aggrégat plaquettaire déjà présent (**Figure 34**).

La fibrinolyse est l'étape qui permet de réguler et/ou stopper le processus en limitant la propagation du caillot en formation, ou en dissolvant celui-ci une fois la lésion réparée. La dissolution du caillot se fait par l'intermédiaire du plasminogène, une enzyme inactive intégrée dans le caillot qui est activée par des enzymes protéolytiques telles que l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) ou l'urokinase (uPA) (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005). Bien que les connaissances sur ces processus aient évoluées, les notions de "voies de la coagulation" sont encore utilisées aujourd'hui et notamment pour la mise en place de tests *in vitro* de la coagulation.

La **voie intrinsèque** est déclenchée par le contact avec une substance chargée (ions calcium) quand tous les éléments nécessaires à la coagulation sont présents dans le plasma. La **voie extrinsèque** est activée par la libération de facteur tissulaire et nécessite la présence de

thromboplastine tissulaire. Ces deux voies se rejoignent ensuite en une **voie commune** aboutissant à la formation du complexe de fibrine (**Figure 34**).

3.2.4.3 Modification de la structure des polysaccharides.

Dans la recherche d'analogues aux héparanes sulfate pour l'inhibition ciblée de l'héparanase, il apparaît capital de modifier la structure des polysaccharides sulfatés afin de moduler certaines de leurs activités biologiques naturelles, et notamment leur activité anticoagulante qui n'est pas recherchée dans ce contexte. Afin de moduler les activités biologiques des polysaccharides sulfatés, différents procédés peuvent être appliqués par voie chimique ou catalyse enzymatique. Parmi ces procédés, la dépolymérisation ou la modification des fonctions chimiques du squelette polysaccharidique sont réalisables.

3.2.4.3.1 La dépolymérisation des chaînes de polysaccharides

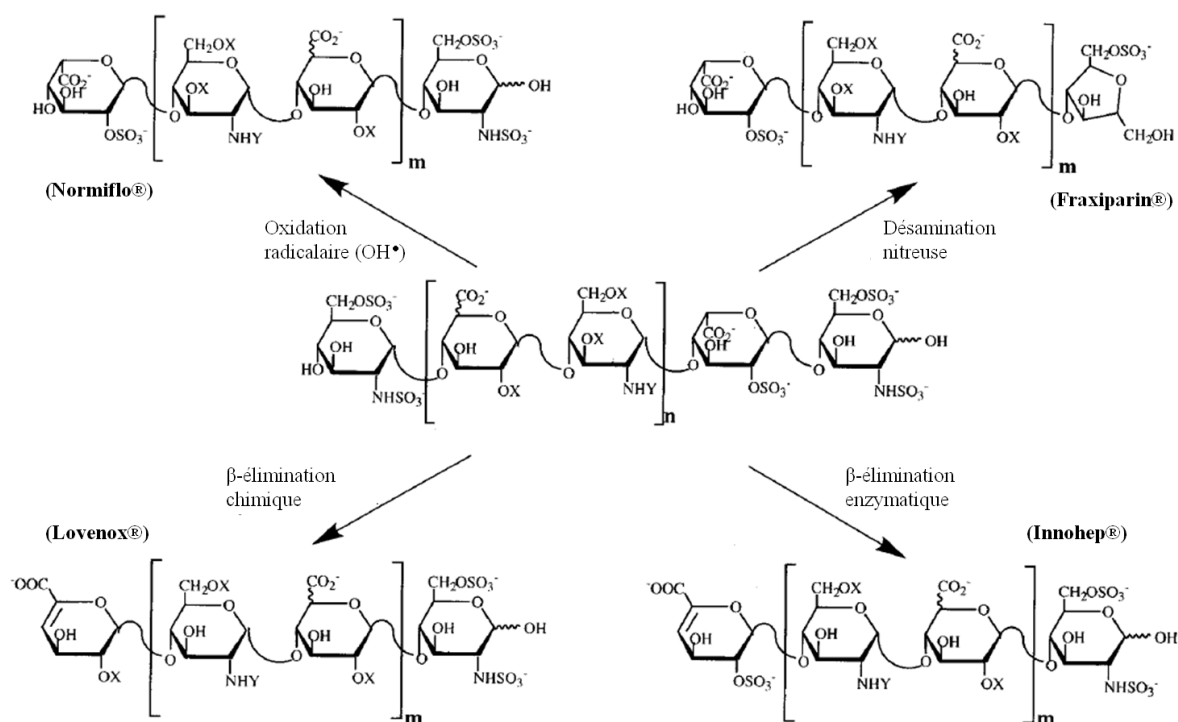


Figure 35 : Principales méthodes de dépolymérisation des héparines et structure des HBPM obtenues

L'oxydation radicalaire est utilisée pour produire l'HBPM commerciale Normiflo®. La désamination nitreuse est utilisée pour produire l'HBPM Fraxiparin®. La β-élimination chimique est utilisée pour produire l'HBPM lovenox®. La β-élimination enzymatique est utilisée pour produire l'HBPM Innohep®. (D'après Linhardt & Gunay, *Semin Thromb Hemost*, 1999)

La dépolymérisation permet de réduire la taille des chaînes de polysaccharides présents dans un mélange. Si l'on reprend l'exemple des héparines, la dépolymérisation est le procédé phare pour la production d'HBPM ou HUBPM. Différentes méthodes de dépolymérisation sont actuellement

utilisées par les industries pharmaceutiques et parmi elles on retrouve : **la β -élimination par voie enzymatique** (utilisant les héparinases), **la β -élimination par voie chimique** (conditions alcalines), la dépolymérisation par **procédé radicalaire** et la dépolymérisation par **désamination nitreuse** (**Figure 35**) (Linhardt and Gunay, 1999a). Cette dernière est d'ailleurs également utilisée pour la conception de l'inhibiteur de l'héparanase M402.

La taille des chaînes joue un rôle très important dans les activités biologiques des polysaccharides. La dépolymérisation réduit la taille de ces chaînes et module les activités biologiques en conséquence. Une méthode de dépolymérisation optimisée permet de contrôler la production de polysaccharides de tailles moyennes homogènes en solution, et par la même, d'obtenir des actifs aux propriétés maîtrisées.

Voies chimiques :

Parmi les voies de dépolymérisation chimique des héparines, la désamination nitreuse (**Figure 36 a**) est réalisée via la préparation in-situ d'acide nitrique ($\text{NaNO}_2 + \text{H}^+$) dans une solution de polysaccharide.

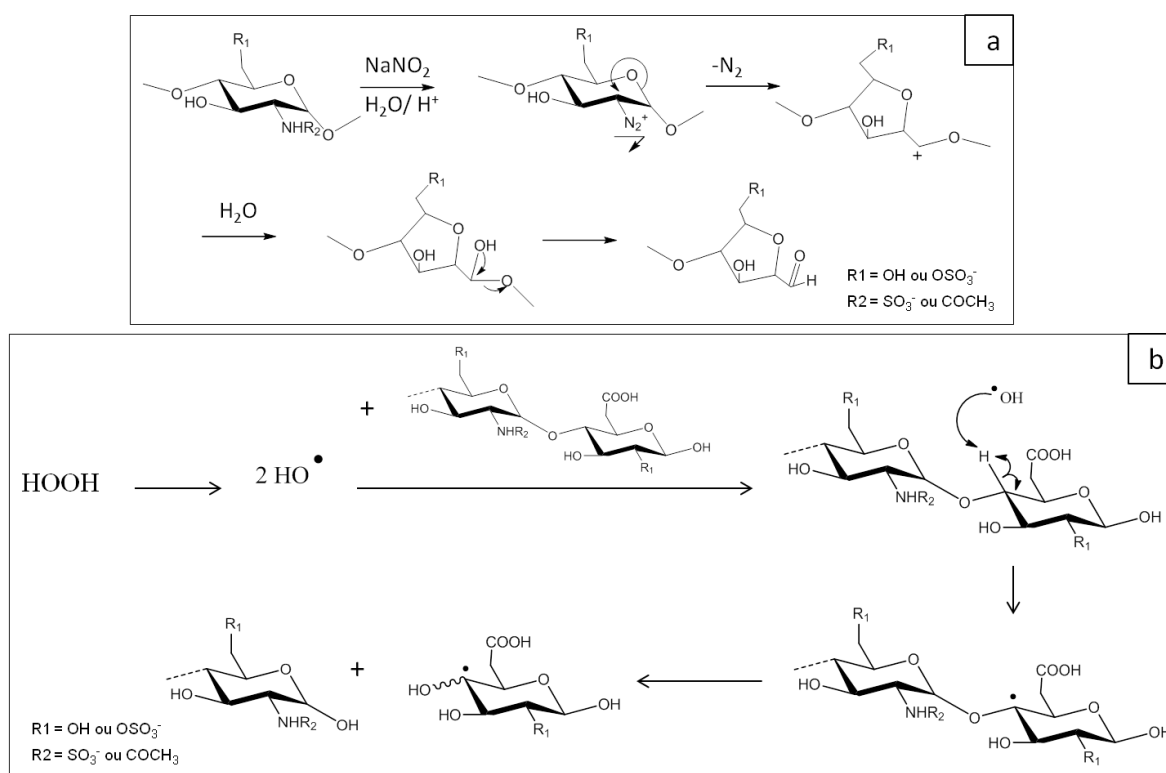


Figure 36 : Mécanismes de dépolymérisation par voie chimique des héparines

a. Désamination nitreuse d'après (David, 1995) **b. Dépolymérisation radicalaire au peroxyde d'hydrogène d'après (von Sonntag, 1980)**

Les amines libres ou sulfatées subissent alors une nitrosation. Cette étape est suivie d'une élimination de diazote via une contraction du cycle à 6 carbones puis à l'hydrolyse de la liaison

glycosidique, générant par la même occasion une fonction aldéhyde (David, 1995).

Une seconde méthode de dépolymérisation chimique consiste en l'ajout de peroxyde d'hydrogène qui en se dissociant, va créer deux radicaux $\text{-OH}^\bullet$ capable d'attaquer les liaisons glycosidiques. Le mécanisme est assez aléatoire et n'est pas décrit en détail dans la littérature. Celui indiqué (**Figure 36 b**) est une hypothèse de mécanisme qui découle d'observations faites dans la littérature sur la dépolymérisation radicalaire du cellobiose (von Sonntag, 1980).

Une troisième méthode décrite pour dépolymériser les héparines est la β -élimination chimique en conditions basiques (**Figure 37**). La base en solution arrache l'hydrogène le plus labile situé sur le carbone 5 des acides uroniques ce qui entraîne la formation d'une insaturation entre les carbones C4-C5 des acides uroniques et la rupture de la liaison glycosidique adjacente (Linhardt and Gunay, 1999a). La dépolymérisation peut également s'effectuer en milieu acide (**Figure 37**) via la formation d'un intermédiaire à 6 centres comprenant un ion hydroxonium (H_3O^+), l'atome d'oxygène intracyclique d'un monosaccharide ainsi que l'oxygène de la liaison glycosidique (Bhaumik and Dhepe, 2015).

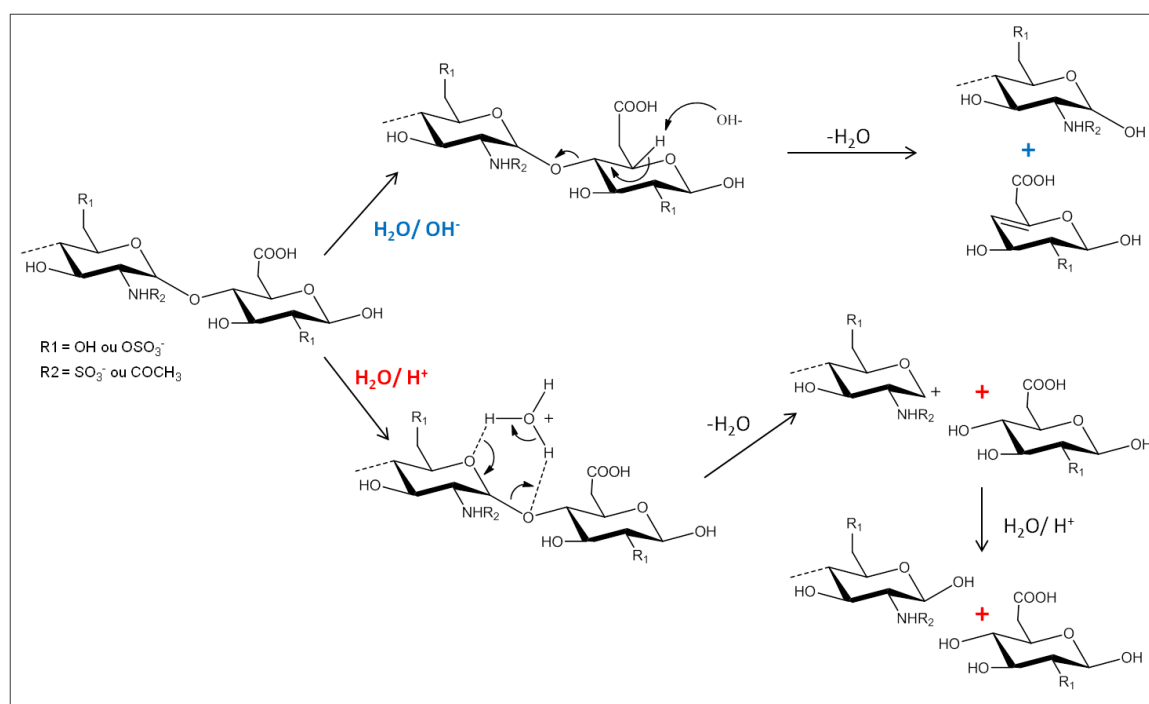


Figure 37 : Dépolymérisation en conditions basiques ou acides. D'après (Linhardt and Gunay, 1999a) & (Bhaumik and Dhepe, 2015)

L'hydrolyse se fait alors sans formation d'insaturations comme pour la β -élimination. Cette méthode n'est pas utilisée dans l'industrie car elle induit des désulfatations. Les voies de dépolymérisation décrites ci-dessus pour les héparines sont également valables pour leurs analogues et même pour une large gamme de polysaccharides.

Voies enzymatiques :

Les héparines peuvent être dépolymérisées par des enzymes de type héparinase ou bien par l'héparanase. L'héparinase I bactérienne est utilisée dans l'industrie pour la dépolymérisation d'héparines (Linhardt and Gunay, 1999a). C'est une endoglycosidase dont le mécanisme d'hydrolyse est une β -élimination entre une glucosamine et un acide iduronique (**Figure 38**). Les voies de dépolymérisation enzymatiques sont particulièrement intéressantes car elles se font dans l'eau et dans le respect des principes de la chimie verte. Un autre intérêt est la sélectivité des enzymes qui peut être recherchée par l'utilisateur.

Ici, l'héparinase I bactérienne est sélective des liaisons entre glucosamine et acide iduronique alors que la β -élimination chimique ne fait pas la distinction entre acide glucuronique ou iduronique (Shaya et al., 2010).

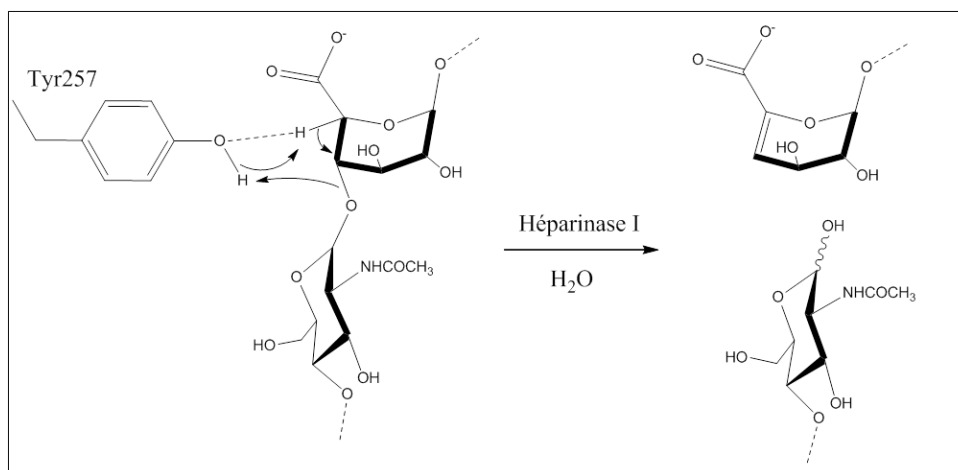


Figure 38 : Mécanisme d'hydrolyse des héparines par l'héparinase I. D'après (Shaya et al., 2010)

Cependant, l'utilisation de catalyseurs enzymatiques peut représenter des difficultés. Certaines enzymes sont coûteuses à produire et peuvent être limitantes quand à leur rapidité d'hydrolyse, leur stabilité, ou les conditions de pH et de température auxquelles elles sont les plus efficaces. Tous ces aspects font que l'utilisation d'enzymes pour des dépolymérisations (ou d'autres réactions) à l'échelle industrielle nécessite une optimisation poussée qui représente un coût très élevé. Cela freine généralement leur utilisation au profit de méthodes chimiques.

Voies physiques :

Des méthodes physiques existent pour dépolymériser les polysaccharides et l'utilisation des ultrasons est un procédé relativement efficace. La génération d'ultrasons au sein d'une solution induit des fréquences de vibration moléculaire qui n'impactent pas directement les polysaccharides

mais provoquent un phénomène dit de cavitation (Pestman et al., 2010). Ce phénomène correspond à la formation de microbulles de gaz en solution provoquées par les compressions et décompressions successives engendrées par les vibrations acoustiques. Ces microbulles sont instables et leur implosion ou leur fragmentation génère de très hautes températures localement (jusqu'à 5000 K) capables d'induire une thermolyse des liaisons chimiques. De plus, la fragmentation des bulles provoque de fortes tensions électriques qui influent sur la formation de radicaux capables de réagir sur les polysaccharides (Mason and Peters, 2011).

C'est par ces deux mécanismes que **la cavitation induite par les ultrasons peut entraîner une dépolymérisation**. Ce procédé semble très efficace pour les longs polysaccharides et permet l'obtention de fragments de faible polydispersité. Cependant, en utilisation seule, l'utilisation d'ultrasons a montré une incapacité à réduire la taille des chaînes en dessous de 50 kDa pour des dextrans (Portenlänger and Heusinger, 1997).

Cette dernière observation a été confirmée au sein de notre laboratoire. En effet, après 6h d'exposition aux ultrasons, aucune dépolymérisation significative n'a été détectée sur des héparines d'environ 15kDa (Achour et al., 2013). Le couplage des ultrasons avec des radicaux, induits in-situ par l'ajout de peroxyde d'hydrogène, a permis par la suite d'obtenir des HBPM aux activités anticoagulantes réduites et capable d'inhiber l'héparanase (Achour et al., 2016).

Ce procédé combinant ultrasons et radicaux issus du peroxyde d'hydrogène pourrait s'avérer utile pour notre étude afin de dépolymériser certains des analogues des héparanes sulfates présentés plus avant.

3.2.4.3.2 Modification des fonctions chimiques des séquences polysaccharidiques

Au-delà de la structure tridimensionnelle que peuvent posséder les polysaccharides, ce sont les fonctions chimiques portées par leurs squelettes qui sont responsables de leurs activités biologiques. Dans l'optique de concevoir des analogues aux héparanes sulfates, ce sont les fonctions sulfates qui sont d'une importance primordiale. Des fonctions subsidiaires comme les acides carboxyliques ou les N-acétylation peuvent également avoir leur importance.

De nombreux procédés chimiques ou enzymatiques existent pour sulfater ou désulfater des positions de manières sélectives sur les polysaccharides et il en est de même pour les acétylations. Il serait trop long de les détailler tous, mais ils sont parfaitement résumés dans les travaux concernant la synthèse d'héparinoïdes à partir du polysaccharide K5. Ce polysaccharide a été isolé à partir de la souche 010:K5:H4 de la bactérie *Escherichia Coli* et possède la même structure que le précurseur naturel de la biosynthèse des héparines (Vann et al., 1981). De nombreux travaux ont été réalisés sur ce polysaccharide et ont conduit à la synthèse d'héparinoïdes à l'aide de successions d'étapes

chimiques de sulfatation/désulfatation, acétylation/déacétylation et une étape enzymatique faisant intervenir une épimérase (**Figure 39**) (Oreste and Zoppetti, 2012).

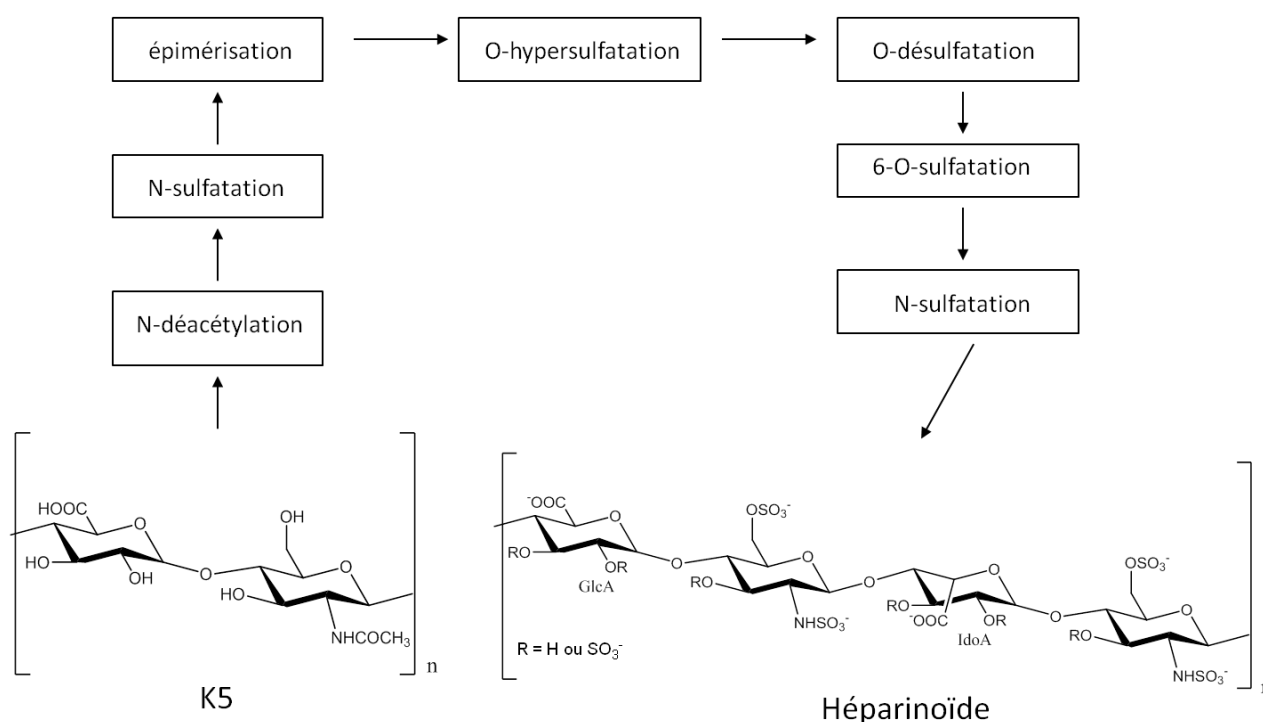


Figure 39 : Synthèse d'héparinoïdes à partir du polysaccharide bactérien K5

Ces travaux montrent bien le panel de modifications chimiques ou enzymatiques connues pour la modification des fonctions caractéristiques des héparines et héparanes sulfates.

Le procédé de Glycol split

Nous avons évoqués précédemment les inhibiteurs de l'héparanase et le SST0001, un dérivé direct des héparines associé à une IC_{50} la plus intéressante, soit 3nM. Le SST0001 est une héparine non dépolymérisée, 100% N-acétylée et 25 % glycol-splitée.

Au-delà de l'intérêt porté à des modifications chimiques comme les N,O-désulfatation ou les N-acétylations, le glycol-split est une modification chimique originale qui impacte largement l'activité des dérivés d'héparines.

Cette étape correspond à une oxydation réalisée par du périodate de sodium suivie d'une réduction au borohydrure de sodium (Naggi et al., 2005). Elle permet l'ouverture des cycles d'acides uroniques sur les chaînes d'héparines (**Figure 40**). Ces modifications ont deux impacts majeurs : le premier, crucial, est l'altération de la séquence pentasaccharidique des héparines nécessaire à la reconnaissance avec l'antithrombine (**revoir Fig 17**). **Cela induit une perte quasi-totale de l'activité anti-coagulante.** Le deuxième correspond à un gain de degrés de liberté sur les chaînes par l'ouverture des cycles uroniques et qui semble améliorer la reconnaissance par

l'héparanase (Vlodavsky et al., 2007).

La séquence de reconnaissance à l'antithrombine est spécifique des héparines, mais **le gain de degrés de liberté** sur la chaîne associé à une meilleure inhibition de l'héparanase, peut être particulièrement intéressant **pour améliorer** l'activité anti-héparanase de différents polysaccharides sulfatés.

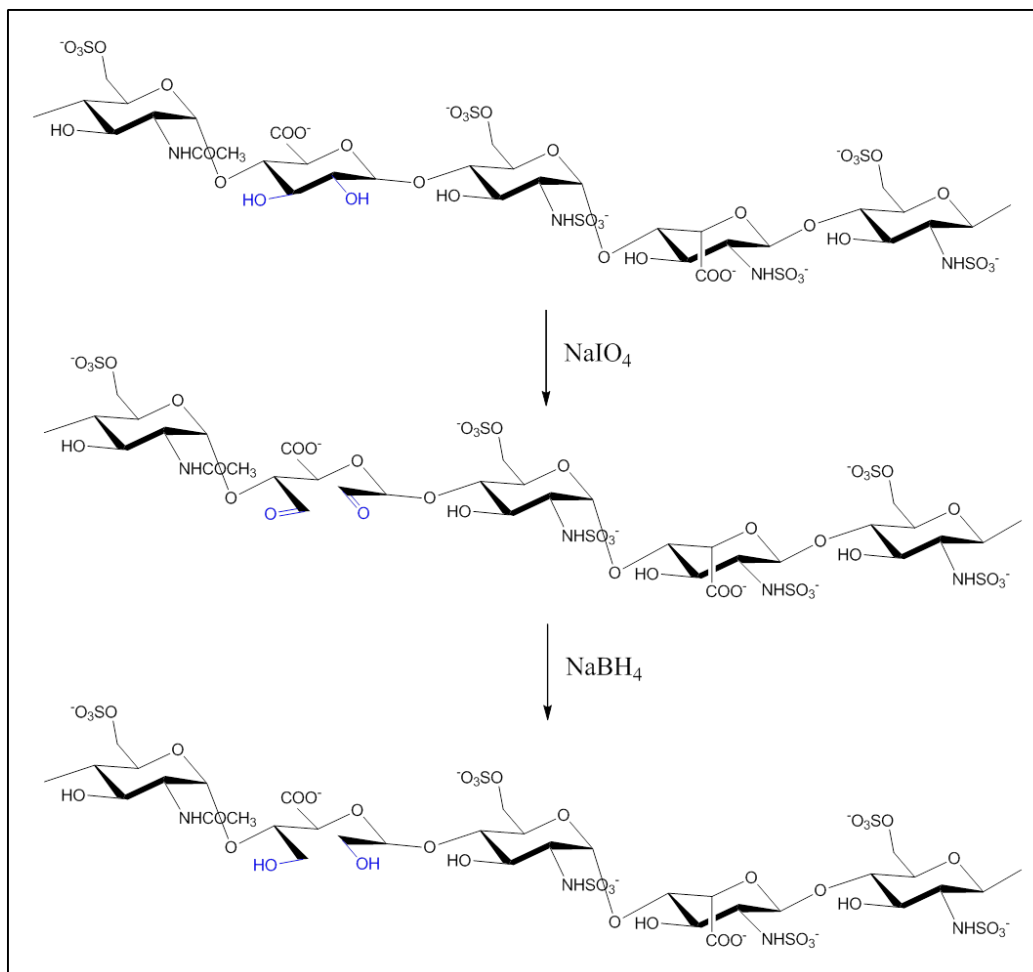


Figure 40 : Etape de glycol split et impact sur la séquence pentasaccharidique des héparines

L'oxydation par NaIO_4 permet l'ouverture du cycle d'acide uronique en oxydant les diols vicinaux en aldéhydes. La réduction par NaBH_4 permet de retrouver les deux fonctions alcool tout en gardant le cycle ouvert. La séquence pentasaccharidique ne peut plus se lier à l'antithrombine et la chaîne est plus flexible

OBJECTIFS

Ces travaux de thèse s'intègrent dans la thématique de développement de thérapies ciblées destinées aux traitements anti-cancéreux. L'héparanase y est étudiée comme cible thérapeutique dans une stratégie de traitement anti-angiogénique.

L'objectif principal de ces travaux est la valorisation de polysaccharides sulfatés biosourcés comme alternative aux dérivés d'héparines pour une inhibition ciblée de l'héparanase. Pour cela, des polysaccharides d'origines différentes ont été étudiés :

- **les carraghénanes ι , κ , λ et les fucoïdanes** d'origine algale
- **les dextrans sulfate** (obtenus par hypersulfatation de dextrans produits par la bactérie *leuconostoc mesenteroides*).
- les **héparines** et les **chondroïtines sulfates** d'origine animale.

Dans un premier temps, deux méthodes de modification structurale des polysaccharides ont été appliquées, seules ou en association, sur chacun des polysaccharides étudiés afin d'évaluer leur capacité à moduler leurs activités biologiques. Les méthodes qui ont été utilisées sont :

- la **dépolymérisation radicalaire assistée par ultrasons**, pour diminuer la taille des chaînes de polysaccharides.
- le procédé de **glycol split**, capable d'ouvrir des hexoses possédant des diols vicinaux afin d'améliorer la flexibilité des chaînes et modifier leurs capacités d'interaction avec les cibles biologiques.

Les activités biologiques qui ont été mesurées pour chacun des dérivés sont **l'inhibition de l'héparanase** ainsi que **l'inhibition de la coagulation**. Le but principal étant **l'obtention d'un inhibiteur spécifique de l'héparanase dont l'activité anticoagulante serait absente ou minime**.

Dans un second temps, vis-à-vis du rôle clé que joue l'héparanase sur l'angiogénèse tumorale, nous avons étudié l'activité anti-angiogénique des meilleurs composés inhibiteurs de l'héparanase. Nous avons choisi de conduire cette étude sur un modèle d'angiogénèse en Matrigel 3D utilisant des **cellules microvasculaires** de peau, dans des conditions physico-

chimiques **mimant au mieux** celles du **microenvironnement tumoral**. Cette recherche d'activités régulatrices de l'angiogénèse via l'inhibition de l'héparanase a été complétée, en amont, par des analyses plus fondamentales concernant notre modèle d'angiogénèse. L'impact des conditions du microenvironnement tumoral sur la production d'héparanase par des cellules de cancers mammaires non métastatiques (MCF-7) ou modérément métastatiques (MDA-MB-231) a été étudié. Pour cela, l'influence de la concentration en oxygène et en nutriments a été évaluée vis-à-vis de la production et de la **sécrétion d'héparanase** dans sa forme pro-enzyme ou sa forme mature.

Les **surnameants** obtenus ont alors été évalués pour leur capacité à stimuler ou non l'angiogénèse *in vitro* des cellules microvasculaires (Hsk-MEC). Ces tests ont également été appliqués en présence des meilleurs inhibiteurs de l'héparanase de notre étude.

Les travaux de cette thèse s'inscrivent donc dans les objectifs suivants :

- Valider ou infirmer l'utilisation de la dépolymérisation radicalaire assistée par ultrasons seule, ou en association, avec le procédé de glycol split pour la modulation des activités biologiques de polysaccharides sulfatés d'origine algale, bactérienne et animale.
- Mieux appréhender les rôles de la sulfatation et/ou de la taille des chaînes des polysaccharides dans leurs activités anti-coagulantes et anti-héparanase.
- Confirmer le rôle de l'héparanase dans l'angiogénèse, et par là même, la stratégie de thérapie anti-angiogénique par inhibition ciblée de l'héparanase.
- Mesurer l'impact des conditions de stress du microenvironnement tumoral, telles que l'hypoxie ou le manque de nutriments, sur la production de l'héparanase et la stimulation de l'angiogénèse utilisant un **modèle de cancer mammaire**.

RESULTATS

**Chapitre I : Conception d’analogues des héparanes sulfates pour
l’inhibition ciblée de l’héparanase.**

1. Introduction :

Les traitements anti-angiogéniques utilisés aujourd'hui en clinique (ex : bevacizumab, sorafenib, sunitinib) ciblent principalement le facteur de croissance vasculaire (VEGF), très présent dans les tumeurs (Ferrara and Henzel, 1989), ou ses récepteurs VEGFR (Ye, 2016).

Cependant, ces thérapies souffrent d'une efficacité limitée, augmentant la survie sans progression des patients de seulement quelques mois alors que les risques d'effets secondaires graves sont très présents (Jain, 2014; Vasudev and Reynolds, 2014). Le coût de ces thérapies ciblées est également très élevé et régulièrement dénoncé.

L'héparanase, une enzyme exprimée en grande quantité dans le microenvironnement tumoral, participe à l'angiogénèse tumorale et semble une cible thérapeutique prometteuse. (Vlodavsky et al., 2008). Son action pro-angiogénique passe par la dégradation des héparanes sulfates (HS) de la matrice extracellulaire. Des inhibiteurs de cette enzyme sont actuellement en phase d'essai clinique, parmi lesquels on retrouve le Muparfostat ou le Roneparstat (Rivara et al., 2016) qui sont des oligosaccharides sulfatés analogues structuraux des HS, le substrat naturel de l'héparanase. Le Roneparstat notamment, est une héparine modifiée chimiquement.

Les héparines sont les polysaccharides sulfatés les plus proches structuralement des HS et sont déjà largement utilisées en médecine pour leur activité anticoagulante.

Dans le cadre d'une inhibition ciblée de l'héparanase, cette activité anti-coagulante devient donc un effet secondaire. De plus, les héparines sont extraites à partir de muqueuses intestinales porcines, ce qui pose des problèmes de disponibilité de la ressource et impose des mesures drastiques de purification pour éliminer la présence de pathogènes potentiels comme les prions (ANSM, 2014; Linhardt and Liu, 2012a; Szajek et al., 2016). Il est donc important de pouvoir disposer d'autres analogues des HS dans une stratégie d'inhibition ciblée de l'héparanase.

Des polysaccharides sulfatés d'origines algales ont déjà montré un intérêt dans le domaine de l'angiogénèse et particulièrement les fucoïdanes ou certains carraghénanes comme les carraghénanes- λ . Les propriétés des fucoïdanes semblent dépendantes de la taille des chaînes car des activités pro- (Haddad et al., 2015) et anti-angiogéniques (Soeda et al., 2000) ont été observées dans différentes études. Concernant les carraghénanes- λ , des activités anti-angiogéniques ont été mesurées pour des oligosaccharides d'environ 3000 Da (Chen et al., 2007) et semblaient liées à l'inhibition de l'héparanase (Niu et al., 2015). D'autres

polysaccharides sulfatés comme les dextrans sulfate obtenus par hypersulfatation de dextrans bactériens pourraient s'avérer être de bons candidats (Parish et al., 1987), de même que les chondroïtines sulfates, déjà commercialisées pour soulager les problèmes articulaires (Clegg et al., 2006). De part leur profil sulfaté, la plupart de ces polysaccharides possèdent des activités anticoagulantes qu'il serait nécessaire de diminuer ou de supprimer si l'on envisage de les utiliser comme des actifs ciblant l'héparanase.

La dépolymérisation des polysaccharides est très utilisée pour diminuer leurs poids moléculaires afin de modifier leurs activités biologiques ou leurs propriétés physiques. Les nombreux travaux sur les héparines ont permis le développement de plusieurs conditions de dépolymérisations (radicalaire, enzymatique, acide) utilisées dans l'industrie afin de modifier les propriétés natives de ce composé (Linhardt and Gunay, 1999a).

Des travaux récents au sein du laboratoire ont mis au point une méthode de dépolymérisation radicalaire assistée par ultrasons, simple d'utilisation et permettant d'obtenir de façon maîtrisée, des héparines de bas poids moléculaires (Achour et al., 2013).

L'association de ce procédé à celui du glycol-split, une modification chimique capable d'apporter plus de flexibilité aux chaînes d'héparines pourrait s'avérer utile pour moduler les activités biologiques d'autres polysaccharides sulfatés (Naggi et al., 2005).

Les travaux présentés dans ce chapitre décrivent l'utilisation de procédés de dépolymérisation et/ou de modifications chimiques sur des polysaccharides sulfatés d'origine différente, dans le but de moduler leurs activités biologiques. Les procédés étudiés dans ce chapitre sont la dépolymérisation radicalaire assistée par ultrasons (DR), le glycol-split (GS) ainsi que l'association des deux méthodes dans les deux ordres possibles : dépolymérisation puis glycol-split (DR-GS) ou glycol-split puis dépolymérisation (GS-DR).

Dans l'optique d'isoler des candidats montrant un forte activité anti-héparanase pour une faible activité anticoagulante, un criblage a été effectué sur chacun des dérivés produits vis-à-vis des activités biologiques suivantes :

- L'inhibition spécifique de l'héparanase par un test enzymatique *in-vitro* utilisant l'enzyme sous sa forme recombinante.
- L'inhibition de la coagulation sanguine, via des tests *in vitro* en coagulométrie explorant les trois voies principales de la coagulation, et des tests enzymatiques concernant les deux enzymes centrales de la coagulation, le facteur Xa et le facteur IIa (thrombine).

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel et réactifs

Sauf indications contraires, tous les réactifs ont été achetés à la société Sigma Aldrich. Les fucoïdanes, dextrans sulfate et chondroïtine-4-sulfate proviennent de la société Sigma Aldrich. Les héparines non fractionnées (NF) ont été achetées à la société Alfa Aesar (Porcine mucosal heparin sodium salt ≥ 100 IU/mg, batch 10160803). Le Lovenox[®] (4,000 anti-factor Xa IU/0,4 mL) a été fourni par le centre Hospitalier de La Rochelle.

Les carraghénanes lambda (λ), Iota(ι) et kappa(κ) proviennent de la société FMC Biopolymer.

L'antithrombine III, les facteur Xa et IIa ainsi que les substrats chromogéniques (CBS 31,39 et CBS 61,50) ont été achetés à la société Stago Diagnostica (France) sous forme de kits de réactifs Stachrom[®] ATIII et Stachrom[®] Heparin. Les réactifs pour la mesure de l'Activated partial thrombin time (APTT), le temps de thrombine (TT) et le temps de prothrombine (PT) proviennent également de la société Stago et sont fournis au sein des kits de réactifs STA[®]-PTT Automate 5, STA[®]-Thrombin 2, STA[®]-Néoplastine CI 5 respectivement, de même que les échantillons de plasma humain lyophilisés (Pool norm[®]).

L'héparanase recombinante active HPSE1 (pureté $\geq 95\%$) provient de la société R&D system. Les mesures d'inhibition de l'héparanase ont été réalisées à l'aide du kit heparanase de la société Cisbio Assay. Ce kit contient un mélange d'héparanes sulfate de 11 kDa biotinylés et portant un cryptate d'Europium, ainsi qu'une streptavidine de 60 kDa portant un fluorophore d2.

2.2. Dépolymérisation des polysaccharides par voie radicalaire assistée par ultrasons

Les polysaccharides ont été dissouts dans l'eau à une concentration finale de 25 mg/ml pour les héparines, fucoïdanes et dextrans sulfates et 5 mg/ml pour les carraghénanes (en raison de leur faible solubilité). La solution peut être chauffée à 40-50°C pour améliorer la solubilisation des carraghénanes. Le peroxyde d'hydrogène (solution à 30%) a été ajouté de manière à obtenir un ratio massique de 0,15 (H₂O₂/polysaccharide; m/m). Le mélange réactionnel a ensuite été soumis aux ultrasons à l'aide d'un sonicateur UP50H (Hielscher, Allemagne). Cet appareil est muni d'une sonde ultrasonique de 3 mm de diamètre et d'une amplitude de 180 μ m. Le processeur génère des vibrations mécaniques longitudinales par le

biais d'excitations électriques d'une fréquence de 30 kHz. Les ultrasons ont été appliqués sous forme de pulsations alternatives toutes les 0,5s, évitant ainsi la surchauffe du mélange réactionnel qui avec l'énergie de la sonde se maintient à 60°C. Dans le but de maximiser l'efficacité des ultrasons, les réactions ont été réalisées dans des volumes finaux de 4 ml et dans des tubes en verre de 6 ml. Des prélèvements d'un volume de 50µL ont été réalisés au cours du temps sur une durée de 8h. Après les phases de dépolymérisation, les échantillons ont été lyophilisés et stockés à -20 °C.

2.3. Préparation des dérivés "glycol-splités"

Les polysaccharides dits "glycol splités" ont été préparés selon le procédé de glycol split décrit par (Naggi et al., 2005). Ce procédé consiste en une oxydation au periodate de sodium suivie d'une réduction au borohydrure de sodium.

Les mélanges réactionnels contenaient 40 mg de polysaccharides dans 3mL de NaIO₄ 0,1M. Le volume final a pu être ajusté pour pallier au manque de solubilité des carraghénanes tout en gardant une concentration en NaIO₄ de 0,1 M. Les mélanges réactionnels ont alors été placés sous agitation à 4°C et dans le noir pendant 15h puis les réactions ont été stoppées en neutralisant l'excès de periodate de sodium par l'ajout en excès de 120 µL d'éthylène glycol. La neutralisation à l'éthylène glycol est laissée pendant 1h à 4°C. Toujours à 4°C, l'étape de réduction est alors déclenchée par l'ajout progressif de 26mg de NaBH₄ pendant que le mélange reste sous agitation. L'ajout de NaBH₄ terminé, la réduction est laissée pendant 4h sous agitation en laissant revenir à température ambiante, puis la réaction est stoppée en ajustant le pH à 4 à l'aide d'une solution de HCl 1M avant d'être ramené à pH = 7 à l'aide d'une solution de NaOH 0,1M. Pour finir et éliminer les réactifs et potentiels produits réactionnels de petite taille, les solutions obtenues ont été dialysées à l'aide de membranes d'ester de cellulose possédant un seuil de coupure de 1 kDa (spectra/Por Dialysis membrane MWCO : 1000). Les échantillons ont été dialysés pendant 36h dans 4L d'eau ultra-pure en effectuant 3 changements d'eau.

2.4. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC-HPLC)

La chromatographie d'exclusion stérique (ou Size Exclusion Chromatography, SEC-HPLC) permet de séparer les composés d'un mélange en fonction de leur volume hydrodynamique. Ces analyses ont été effectuées sur un appareil HPLC Agilent technologies LC/RID system (1100 LC/RID) avec une colonne TSK-GEL-G5000PW (30 cm x 7,5mm) mise en série avec

une colonne TSK-GEL-G4000PW (30cm x 7,5 mm). Les colonnes ont été maintenues à 30 °C et les produits ont été élués avec une solution de Nitrate de Sodium NaNO_3 0,1M à un débit de 0,8 mL/min. Chaque échantillon a été dilué dans l'eau ultra-pure à une concentration de 1g/L et préalablement filtré à l'aide de filtres en PVDF de porosité 0,22 μm avant d'être injecté à hauteur de 20 μL pour l'analyse. Les composés ont été identifiés et quantifiés par réfractométrie différentielle à l'aide du logiciel HP-Chemstation. La température interne du réfractomètre a été fixée à 35°C.

De manière pratique, l'utilisation de standards de masses moléculaires connues permet la détermination d'une équation étalon de type :

$$Mi = ax^2 - bx + c$$

Où Mi correspond à la masse moléculaire de la chaîne de polymère détectée (Da), x correspond au temps d'éluion du composé (min) et les coefficients a, b et c correspondent aux coefficient de la droite d'étalonnage de type polynomiale d'ordre 2. Les droites d'étalonnages obtenues sont présentées (**figure 41**)

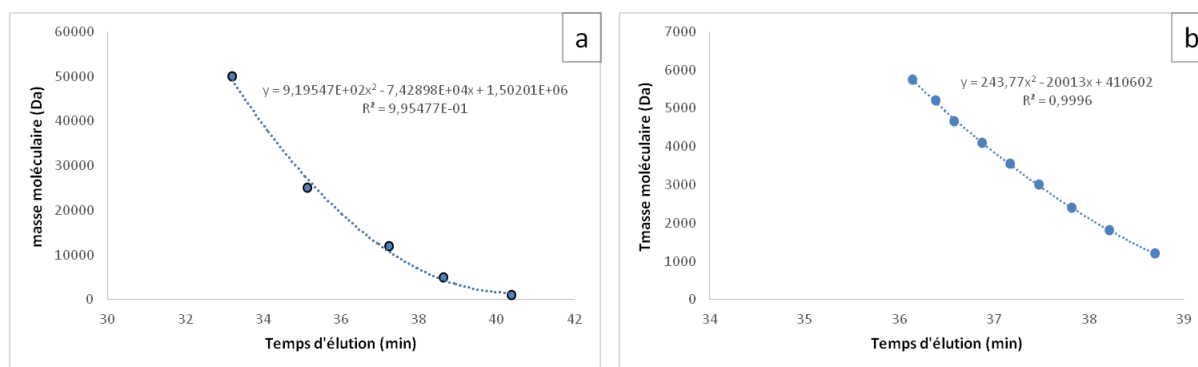


Figure 41 : Droites d'étalonnage pour la caractérisation du poids moléculaire de polysaccharides sulfatés analysés en SEC-HPLC. Les analyses ont été effectuées avec le matériel et les conditions spécifiées plus haut. a) droite d'étalonnage d'une gamme de dextran allant de 1 kDa à 50 kDa. b) droite d'étalonnage d'une gamme d'héparine allant de 1,2 kDa à 5,7 kDa.

Des oligosaccharides standards d'héparines de tailles moléculaires allant de DP-4 (1200 Da) à DP-20 (5750 Da) provenant de la société Iduron (Manchester, UK) ont été utilisés pour effectuer la courbe de calibration servant à la détermination des poids moléculaires des dérivés d'héparines. De la même manière, des standards de dextrans de poids moléculaires entre 1 kDa et 670 kDa ont été obtenus auprès de la société Sigma Aldrich et utilisés pour effectuer la courbe de calibration servant à la détermination des poids moléculaires des dérivés de Fucoïdanes, Chondroïtines sulfates, Dextrans sulfates et Carraghénanes. Pour plus

de précision, les polymères élués après 34 min ont été caractérisés à l'aide d'une gamme d'étalonnage réalisée avec les dextrans allant de 1 kDa à 50 kDa tandis que ceux élués avant 34 min ont été caractérisés à l'aide d'une droite d'étalonnage réalisées avec des dextrans allant de 50 kDa à 670 kDa.

Les masses moléculaire moyennes en nombre (M_n), en masse (M_w), le degré de polymérisation (DP) ainsi que l'indice de polydispersité (IP) ont été calculés selon la méthode détaillée dans (Mulloy and Hogwood, 2015):

$$M_n = \frac{(\sum N_i \times M_i)}{\sum N_i} \quad (1)$$

$$M_w = \frac{(\sum N_i \times M_i^2)}{(\sum N_i \times M_i)} \quad (2)$$

$$DP = \frac{M_n}{M_0} \quad (3)$$

$$IP = \frac{M_w}{M_n} \quad (4)$$

Avec N_i représentant le nombre de moles d'espèces de polymères, M_i la masse moléculaire de l'espèce de polymère et M_0 la masse moléculaire d'un monomère du polymère. Par rapport aux données obtenues, le M_i est déterminé grâce aux droites d'étalonnages tandis que le N_i est proportionnel à l'intensité des pics obtenus en réfractométrie et correspond donc à l'aire intégrée sous ces pics.

2.5. Détermination du taux de sulfate :

La stabilité des fonctions sulfates liées à la structure des polysaccharides a été mesurée en utilisant le chlorure de (7-aminophenothiazin-3-ylidene)-dimethylazanium (Azure A) qui se lie aux fonctions sulfates présentes sur les chaînes de polysaccharides (Klein et al., 1982a). Brièvement, 200 μ L d'une solution aqueuse d'Azure A à 10 mg/L ont été ajoutés à 20 μ L d'échantillons de polysaccharides dilués. L'absorbance a ensuite été mesurée à 620 nm. Un dextran sulfate caractérisé par un pourcentage massique de soufre de 17% a été utilisé pour établir une courbe de calibration. La composition en soufre a ensuite été transposée en sulfates de la manière suivante ($m\text{Sulfates} = 3,22 \times m\text{Soufre}$).

2.6. Mesure de l'inhibition des facteurs Xa et IIa médiée par l'antithrombine :

Les dérivés de polysaccharides ont été mis en mélange avec l'antithrombine III (0,125 g/L

d'AT III pour le test anti-Xa et 0,625 g/L pour le test anti-IIa) puis incubés dans un premier temps à 37°C dans une plaque 96 puits pendant 2 minutes. Les facteurs Xa ou IIa ont par la suite été ajoutés de manière à obtenir une concentration finale de 11,25 nKat/mL. Une pré-incubation de 30 s à 37°C a ensuite été effectuée avant l'addition de 3,25 nM du substrat chromogène du facteur Xa (CBS 31.39; CH₂SO₂-d-Leu-Gly-Arg-pNA, AcOH) pour le test anti-Xa ou 1,4 nM du substrat chromogénique du facteur IIa (CBS 61.50; EtM-SPro-Arg-pNA, AcOH) pour le test anti-IIa. Le milieu réactionnel a été incubé pendant 5 min pour terminer, et les valeurs d'absorbance ont été mesurées à 405 nm toutes les 10 sec. La vitesse initiale a, par la suite, été évaluée par la pente du segment linéaire de la courbe de cinétique.

2.7. Mesure en coagulométrie:

L'activité anticoagulante des polysaccharides a été évaluée en mesurant les APTT, PT et TT. Tous les tests chronométriques ont été réalisés suivant les instructions du fournisseur à l'aide d'un coagulomètre Start 4 et des kits provenant de Stago Diagnostica (France). Ces tests sont dits chronométriques car ils évaluent le mouvement d'une bille magnétique dans une solution de plasma humain au cours du temps. Les temps de coagulations mesurés représentent le temps nécessaire au plasma pour coaguler et ainsi stopper tout mouvement de la bille. Brièvement, 90µL de plasma humain (Stago, France) ont été mélangés à 10µL de solution d'échantillons dilués dans du NaCl 0,9% pour chaque test. Pour le test APTT, 100µL de réactif APTT ont été ajoutés au mélange (plasma + échantillon) avant une incubation à 37°C pendant 3min. Ensuite 100µL d'une solution de CaCl₂ à 25mM ont été ajoutés et le temps de coagulation du plasma a été mesuré. Pour les tests TT et PT, le mélange (plasma + échantillon) a dans un premier temps été incubé à 37°C pendant 2 min (PT) ou 1 min (TT) avant l'addition de 200µL de réactif PT ou 100µL de réactif TT et la mesure du temps de coagulation du plasma. Le contrôle négatif utilisé dans ces 3 tests est une solution de NaCl à 0,9%.

2.8. Mesure de l'inhibition de l'héparanase:

Les tests d'inhibition de l'héparanase ont été réalisés à l'aide du kit héparanase (Cisbio Assay, France) et de l'héparanase provenant de la société R&D system (human recombinant heparanase 7570-GH). Le substrat utilisé dans ce kit consiste en une molécule de sulfate d'héparane (Biotin-HS-Eu(K)) d'une taille de 11 kDa marqué par une molécule de biotine (Biotin) d'un côté, et par une molécule fluorogène de cryptate d'euporium (Eu(K)) de l'autre.

Le kit inclue également une streptavidine marquée par une autre molécule fluorogène (d2). La streptavidine possède une forte affinité avec la biotine du substrat (Biotin-HS-Eu(K)), et se liera avec lors de son ajout en solution. Les deux molécules fluorogènes Eu(K) et d2 constitue un système de transfert de fluorescence (FRET)(voir **figure 42**). L'excitation du cryptate d'euporium par une longueur d'onde d'excitation de 337 nm induit l'émission d'un signal d'une longueur d'onde de 620nm. Si le fluorogène d2 est a proximité de Eu(K), la fluorescence émise par Eu(K) est transmise à d2 qui émet alors un signal à 665 nm. Pour ce test, cela se traduit par la mesure d'intensités de fluorescence à 620 et 665 nm, proportionnelles à la quantité de substrat hydrolysé dans le milieu réactionnel (Enomoto et al., 2006).

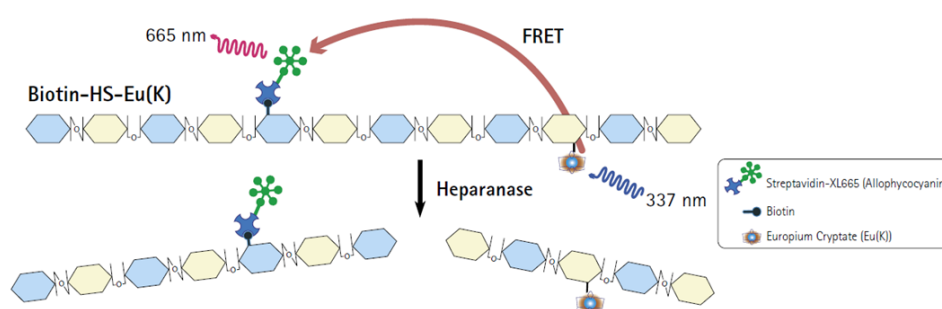


Figure 42 : Système FRET du test fluorimétrique mesurant l'activité de l'héparanase

L'hydrolyse du substrat Biotin-Hs-Eu(K) a été réalisée dans une plaque de 96 puits (demi-puits ; Corning® #3693) et les mesures de fluorescence ont été effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre BMG Labtech Fluostar Omega équipé d'un module HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence). Les réactions ont été réalisées à 37°C, et dans un volume final de 80µL. Les intensités de fluorescence à 665 nm et 620 nm ont été mesurées dans un puits en absence d'héparanase pour l'obtention d'un ratio $I(665/620)_{HydrolyseNulle}$, et dans un puits contenant l'héparanase sans inhibiteurs pour l'obtention d'un ratio $I(665/620)_{HydrolyseMax}$. La suramine a été utilisée comme témoin positif d'inhibition de l'héparanase. Brièvement, 15µL des solutions d'échantillons solubilisés dans l'eau ultra-pure ont été déposés dans les puits, suivis par 15µL de solution d'héparanase (400 ng/mL d'héparanase dans un tampon Tris-HCl pH 7.5, 0.15M NaCl et 0,1% CHAPS). Après 10 minutes de pré-incubation à 37°C, la réaction enzymatique a été déclenchée par l'ajout de 30µL de substrat Biotin-HS-Eu(K) (4.4 ng/µL dans un tampon d'acétate de sodium 0,2M ; pH 5.5) puis la plaque a été incubée à 37°C pendant 15 min. Ces 15 min d'incubation ont été suivies par l'ajout de 20µL de streptavidine-d2 (10 ng/µL dans un tampon NaPO₄ 0.1M à pH = 7,7 ; 0.8M KF ; 0,1% BSA ; 1mg/ml héparine) et une incubation de 2 min à 37°C avant mesure de la fluorescence. La fluorescence

a été mesurée à $\lambda_{em1} = 620$ nm et $\lambda_{em2} = 665$ nm après 60 μ s d'excitation à $\lambda_{ex} = 337$ nm. L'inhibition relative de l'héparanase est alors obtenue par les calculs suivants :

$$\text{Substrat hydrolysé Max (\%)} = 1 - \frac{(F665 / F620)_{HydrolyseMax}}{(F665/F620)_{HydrolyseNulle}} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{Substrat hydrolysé Ec (\%)} = 1 - \frac{(F665 / F620)_{\text{échantillon}}}{(F665/F620)_{HydrolyseNulle}} \times 100 \quad (6)$$

$$\text{Inhibition relative (\%)} = 1 - \frac{\%SubstratHydrolyséEc}{\%SubstratHydrolyséMax} \times 100 \quad (7)$$

L'équation (5) permet de calculer le pourcentage maximum de substrat hydrolysé par l'enzyme. L'équation (6) permet de calculer le pourcentage de substrat hydrolysé en présence d'un échantillon inhibiteur de l'héparanase. Enfin, l'équation 7 permet de calculer l'inhibition relative de l'héparanase en présence d'un échantillon inhibiteur. F665 and F620 correspondent aux intensités de fluorescence mesurées, respectivement, à 665 nm and 620 nm.

2.9. Chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse

La composition osidique des carraghénanes- λ -DR ou DR-GS, a été évaluée par chromatographie liquide ultra haute pression couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (UHPLC-MS HR).

Les analyses ont été réalisées au moyen d'un système chromatographique à très haute pression (UHPLC) "Acquity UPLC H-CLASS" (Waters, milford, USA) couplé à un spectromètre de masse haute résolution Xevo G2 S Q-TOF comprenant une source d'ionisation par électrospray (ESI) (Waters, Manchester, Angleterre). Le système UHPLC était constitué d'une pompe quaternaire (Quaternary solvent manager, Waters) et d'un injecteur automatique (sample manager-FTN, Waters) équipé d'une boucle d'injection de 10 μ L. 5 μ L d'échantillon ont été injectés et percolés à un débit de 350 μ L/min au travers d'une colonne "Acquity UPLC BEH C18" (Waters) (2,1 x 500 mm, 1,7 μ m). Afin de séparer nos échantillons portant de nombreuses fonctions sulfates via l'utilisation d'une colonne apolaire C18, les charges négatives ont été appariées à des ions heptylammonium. Ces ions améliorent la rétention des carraghénanes sur la colonne et possèdent une chaîne alkyle assez courte pour être encore volatiles. Ce masquage des charges négatives permet également de limiter la fragmentation des oligosaccharides dans la source. Pour réaliser l'appariement d'ions, l'ajout d'un pourcentage volumique d'une solution de formate d'heptylammonium (20mM) a été réalisé dans les deux solvants utilisés pour la séparation (Acétonitrile et eau) (Antonopoulos et

al., 2004). Le gradient d'élution appliqué était un mélange (v/v) de solution A (eau/formate d'heptylammonium 20mM ; 80/20) (v/v)) et B (acétonitrile/ formate d'heptylammonium 20mM ; 80/20) : 0- 4 min, 10-50% B ; 4-6 min, 50% B ; 6 – 10 min, 50-80% B ; 10-15 min, 80% B ; 15- 16min, 100% B ; 16- 35min, 100% B ; 35- 36min, 10% ; 36- 40min, 10% B. La colonne et l'injecteur automatique ont été maintenus respectivement à 45°C et 7°C pendant l'analyse.

Les conditions finales appliquées dans la source ESI ont été : une température de la source de 120°C, une température de désolvatation de 500°C, débit de gaz du cône de 50L/h, débit du gaz de désolvatation de 800L/h, voltage du capillaire de 2,5 kV, sampling cône fixé à 35V et source offset à 80V. La calibration de l'appareil a été réalisée avec du formate de sodium à 1mg/L et la "Lockmass" (leucine Enkephaline) est utilisée comme calibrant interne dans chaque analyse pour corriger en temps réel l'erreur de masse.

Les données ont été obtenues en mode d'ionisation négatif (ESI⁻). Les expériences de MS ont été menées en mode centroïde, avec un temps de scan égal à 0,15 sec et une gamme de masse sélectionnée allant de 200 à 4000 m/z.

2.10. Analyses Statistiques:

Les données ont été présentées comme les moyennes $\pm$ Ecart type d'au moins un triplicat.

Les IC₅₀ ont été déterminés en utilisant les équations obtenues par des régressions linéaires de type logistiques à 4 paramètres réalisées avec le logiciel sigma plot 12.5 (Systat Software Inc, San Jose, USA).

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisation physicochimique de polysaccharides sulfatés biosourcés dépolymérisés et/ou modifiés chimiquement

3.1.1. *Polysaccharides sulfatés natifs*

Dans la recherche d'inhibiteurs de l'héparanase, nous nous sommes intéressé dans notre étude, à des polysaccharides sulfatés commerciaux provenant de sources diverses (**tableau 4**):

Tableau 4 : Polysaccharides sulfatés, origine et composition

Polysaccharides sulfatés commerciaux	Origine	Détails	Monomères
Héparine	Animale	Intestins de porc	Glucosamine, acide glucuronique/Iduronique
Chondroïtine-4-sulfate	Animale	Trachée de bœuf	N-acetylglucosamine, acide glucuronique
Dextran sulfate	Bactérienne	Hypersulfatation de dextrans produits par la souche <i>leuconostoc mesenteroïde</i>	Anhydroglucose
Fucoïdanes	Algale	Extraits de <i>fucus vesiculosus</i>	Fucose
Carraghénane-ι	Algale	Mélange d'extraits d'algues de types Chondrus, Eucheuma et	Galactose, Anhydrogalactose
Carraghénane-κ	Algale	Gigartina	Galactose, Anhydrogalactose
Carraghénane-λ	Algale		Galactose

Parmi les composés choisis, on retrouve des polysaccharides sulfatés d'origines animales tels que les héparines et les chondroïtines-4-sulfate, d'autres, extraits d'algues marines comme les différents carraghénanes ou les fucoïdanes, ou encore des polysaccharides sulfatés productibles à partir de polysaccharides bactériens comme les dextrans sulfate.

Nous avons pu voir dans l'étude bibliographique qu'ils étaient tous composés de monomères différents. Pour autant, leur profil de sulfatation en fait de potentiels inhibiteurs de l'héparanase valorisables pour des traitements anti-angiogéniques.

Dans un premier temps, nous nous sommes attaché dans ces travaux à caractériser les composés commerciaux choisis. Pour cela, les masses moléculaires en nombre (M_n) ou en masse (M_w) des composés bruts, que l'on nommera non fractionnés (NF), ont été déterminées par SEC-HPLC ainsi que leur degré de polymérisation (DP) et leur indice de polydispersité (IP). Leurs taux de sulfates ont également été évalués par dosage colorimétrique à l'Azure A. Les caractéristiques obtenues sont comparées dans le **tableau 5** avec le lovenox, un mélange

commercial d'héparines de bas poids moléculaire (HBPM) à la pharmacocinétique connue et maîtrisée que nous utiliserons comme référence.

Tableau 5 : Caractérisation physicochimique des composés non fractionnés (NF) et du Lovenox.

	Caractérisation physicochimique					
	<i>Mn</i> (Da)	<i>Mw</i> (Da)	DP	IP	Taux de sulfatation % ^a	Degré de sulfatation ^b
Enoxaparine (Lovenox)	4137	5476	13	1,32	40	2
Héparine-NF	16 412	20 770	43	1,27	50	2,5
Fucoïdane-NF	46 858	62 099	147	1,33	39,3	1,9
Dextran Sulfate-NF	15 793	18 700	38,1	1,18	42,3	3,7
Chondroïtine-4-sulfate-NF	73 564	86 384	284,4	1,17	18,3	1
Carraghénane-NF	>1 000 000	>1 000 000	929	1,04	30,4	1,45
Carraghénane-NF	>1 000 000	>1 000 000	928,9	1,27	26,2	1,1
Carraghénane-NF	>1 000 000	>1 000 000	1215	1,1	20,6	0,9

Mn, la masse moléculaire moyenne en nombre, *Mw* la masse moléculaire moyenne en masse, DP le degré de dépolymérisation, IP l'indice de polydispersité.

^a le taux de sulfatation massique exprimé par (masse sulfate/ masse échantillon).

^b le degré de sulfatation indique le nombre de fonctions sulfate par motif disaccharidique.

nd : non déterminé

Il ressort de cette évaluation, que tous possèdent un taux de sulfatation massique élevé supérieur à 18%. Les héparines, fucoïdanes et dextrans sulfate montrent le taux de sulfate le plus élevé autour des 40%, similaire au lovenox. Rapporté en degré de sulfatation, cela correspond à la présence d'environ 2,5 fonctions sulfate par disaccharide pour les héparines-NF et presque 4 fonctions sulfate par disaccharide pour le dextran sulfate, ce qui en fait un composé fortement chargé négativement. Si l'on se concentre sur les masses moléculaires moyennes des composés, celles-ci sont plus hétérogènes. Les carraghénanes montrent des *Mn* très élevées supérieures au million de Dalton. Les fucoïdanes et chondroïtines sulfates ont des tailles de chaînes plus modérées entre 46 et 73 kDa tandis que les héparines et les dextrans sulfate sont autour de 16 kDa.

Les héparines non fractionnées d'une *Mn* de 16 kDa sont injectées par voie intraveineuse ou sous-cutanée en médecine mais provoquent des effets secondaires bien plus importants que les HBPM comme le lovenox, d'une *Mn* de 4,1 kDa (Elalamy, 2010). Pour cette raison, l'obtention de composés de tailles inférieures à 10 kDa semble primordiale pour limiter les interactions avec de trop nombreuses cibles biologiques.

Bien qu'ils présentent des indices de polydispersité assez proches de 1, ce qui atteste d'une distribution homogène des chaînes de polymères, la grande majorité de nos composés

possèdent des chaînes trop longues pour une application médicale. En l'état, un nombre d'interactions avec de multiples cibles biologiques serait source de nombreux effets secondaires. Par exemple, l'injection en sous cutané de carraghénanes non fractionnés provoque des inflammations (Silva et al., 2010).

De même, un trop fort degré de sulfatation pourrait être source d'effets indésirables. A titre d'exemple, le dextran sulfate qui est très sulfaté, peut déclencher des colites (Cooper et al., 2000).

En rapport avec les nombreux travaux déjà réalisés sur les héparines, une dépolymérisation de nos composés nous a semblé une solution indispensable pour réduire leur taille, moduler leurs activités biologiques et mieux contrôler leur pharmacocinétique.

La modification chimique par le procédé de **glycol-split** nous est également apparue d'un intérêt particulier et notamment par le fait que cette technique puisse **induire une plus grande flexibilité des chaînes** de polysaccharides ce qui favoriserait l'interaction avec l'héparanase et améliorerait le potentiel d'inhibition de l'enzyme (Vlodavsky et al., 2007).

3.1.2. Dépolymérisation et modification chimique des polysaccharides sulfatés

3.1.2.1. Dépolymérisation radicalaire assistée par ultrasons

Afin de diminuer la taille des chaînes de polysaccharides sulfatés de notre étude, nous avons fait le choix d'utiliser la méthode de dépolymérisation radicalaire assistée par ultrasons que nous nommerons par la suite : (DR). Cette méthode associant la dépolymérisation radicalaire à celle par ultrasons, a été développée en 2013 au sein de notre laboratoire (Achour et al., 2013) pour produire des HBPM à partir d'héparines-NF et nous a semblé particulièrement adaptée pour ces nouveaux travaux. Elle fait appel au mécanisme chimique de dépolymérisation radicalaire en utilisant le peroxyde d'hydrogène, et au mécanisme physique de la cavitation par l'utilisation des ultrasons. La combinaison de ces mécanismes entraîne une rupture des liaisons glycosidiques et une dépolymérisation en conséquence.

Nous avons donc appliqué ces conditions de dépolymérisation à nos composés, tout en réalisant un suivi de la taille des chaînes au cours du temps par SEC-HPLC. Pour illustrer cela, les résultats obtenus pour les héparines et carraghénanes- λ sont présentés (**figure 43**). Au regard des chromatogrammes obtenus, on observe une diminution de la taille des chaînes avec le temps de dépolymérisation.

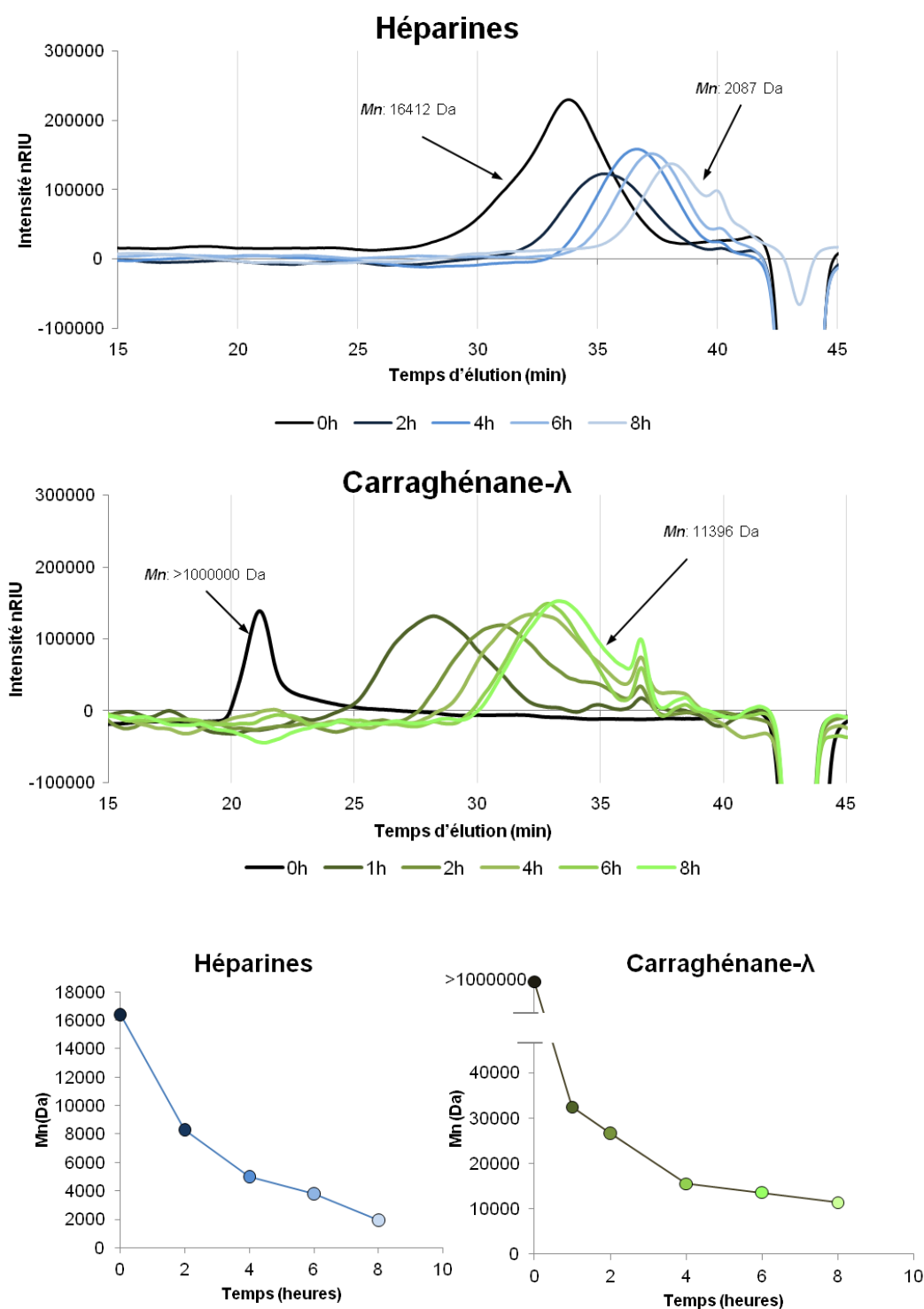


Figure 43 : Chromatogrammes SEC-HPLC des échantillons dépolymérisés par la méthode radicalaire assistées par ultrasons (DR) pour les temps de dépolymérisation entre 0 et 8h des héparines et carraghénanes-à. Les masses molaires moyennes en nombre M_n sont indiquées pour les temps 0 et 8h. Les M_n obtenus en fonction du temps de dépolymérisation sont également exprimés sous forme de graphiques. Les échantillons ont été analysés à une concentration de 1g/L, séparés par une association de deux colonnes TSK-G5000PW et TSG-G4000PW à l'aide d'un éluant NaNO_3 0,1M et détectés par réfractométrie différentielle.

Un pic majoritaire est observé pour les dépolymérisations de 0   4h, mais aux temps 6h et 8h, on peut apercevoir un second pic moins intense regroupant des espèces de plus bas poids moléculaires que le pic majoritaire.

La dépolymérisation semble s'effectuer rapidement dans la première heure puis lentement dans les heures qui suivent. Cela est bien montré par le cas des carraghénanes- λ , où l'on débute avec une M_n proche du million de Da au temps zéro, pour chuter à 32000 Da à 1h et finalement 11000 Da à 8h de dépolymérisation. Ce constat est moins flagrant, mais reste observable concernant les polysaccharides dont les masses moyennes de départ sont plus faibles comme c'est le cas des héparines.

Cette meilleure efficacité de dépolymérisation dans les premières heures avait déjà été observée pour les héparines dans l'étude précédente réalisée au laboratoire (Achour et al., 2013) et serait caractéristique des dépolymérisations utilisant les ultrasons, notamment sur des polysaccharides à longues chaînes, comme l'a montré une étude réalisée sur des dextrans (Portenlänger and Heusinger, 1997).

Un temps de dépolymérisation de 8h, avec la méthode de DR, permet d'obtenir de très bas poids moléculaires autour de 2000 Da comme on l'observe pour les héparines ou d'environ 11000 Da comme c'est le cas pour les carraghénanes- λ . Cette gamme de masses se situe entre des HBPM et des héparines-NF. Ce temps de dépolymérisation a donc été retenu pour produire des dérivés de bas poids moléculaires des différents polysaccharides de cette étude.

3.1.2.2. Application du procédé de glycol split

Le procédé de glycol split repose sur une réaction d'oxydation au periodate de sodium (NaIO_4) suivie d'une réduction au borohydrure de sodium (NaBH_4) (Naggi et al., 2005). Afin de n'altérer que partiellement la structure des polysaccharides sulfatés, nous avons réalisé l'oxydation à 4°C pendant 15h avant de réaliser l'étape de réduction.

Dans ces travaux, nous avons appliqué le procédé de glycol split aux polysaccharides sulfatés de diverses manières, soit seul, soit en association avec la dépolymérisation. Les dérivés glycol splités seuls seront nommés GS, ceux dépolymérisés puis glycol splités seront nommés DR-GS tandis que ceux glycol-splités puis dépolymérisés seront nommés GS-DR.

3.1.2.3. Impact de la dépolymérisation et/ou du procédé de glycol split sur la structure des polysaccharides sulfatés

Les 7 polysaccharides sulfatés ont tous été soumis aux procédés de DR, GS, DR-GS et GS-DR. Nous les avons par la suite caractérisé de la même manière que les polysaccharides-NF en définissant la taille des composés par SEC-HPLC et le taux de sulfate par test

colorimétrique à l'Azure A. Ces résultats sont rassemblés dans le **tableau 6**. Les masses moléculaires moyennes inférieures à 10 kDa sont spécifiées en vert, celles entre 10 kDa et 16kDa sont spécifiées en bleu et les pertes de sulfatation les plus significatives sont indiquées en rouge pâle.

Tableau 6 : Caractéristiques physicochimiques des polysaccharides sulfatés et leurs dérivés de bas poids moléculaires

Caractérisation physicochimique				Caractérisation physicochimique			
	Mn (Da)	I.P	% sulfates (m/m)		Mn (Da)	P.I	% sulfates (m/m)
Enoxaparin(Lovenox)	4137	1,32	40	Enoxaparin(Lovenox)	4137	1,32	40
Héparine-NF	16412	1,27	50	Carraghénane-λ-NF	>1000000	nd	30,4
Héparine-GS	13272	1,21	45,2	Carraghénane-λ-GS	>1000000	nd	29,6
Héparine-DR	2087	1,91	28,7	Carraghénane-λ-DR	9240	1,06	19,8
Héparine-DGS-DR	4684	1,42	37,9	Carraghénane-λ-GS-DR	16639	1,79	23,2
Héparine-DR-GS	2716	1,27	28	Carraghénane-λ-DR-GS	11396	1,51	19
Fucoïdane-NF	46858	1,33	39,3	Carraghénane-ι-NF	>1000000	nd	26,2
Fucoïdane-GS	42185	1,39	38,9	Carraghénane-ι-GS	>1000000	nd	26
Fucoïdane-DR	4152	2,11	17,2	Carraghénane-ι-DR	77745	1,37	24,2
Fucoïdane-GS-DR	8262	1,64	6,6	Carraghénane-ι-GS-DR	43854	1,61	23,3
Fucoïdane-DR-GS	nd	nd	nd	Carraghénane-ι-DR-GS	6073	1,5	16,2
Dextran sulfate-NF	15793	1,18	53,2	Carraghénane-κ-NF	>1000000	nd	20,6
Dextran sulfate-GS	14887	1,19	50,4	Carraghénane-κ-GS	>1000000	nd	20
Dextran sulfate-DR	7673	1,46	50,2	Carraghénane-κ-DR	29409	1,45	19,1
Dextran sulfate-GS-DR	8183	1,47	47,6	Carraghénane-κ-GS-DR	10340	1,72	17,6
Dextran sulfate-DR-GS	4710	1,21	17,2	Carraghénane-κ-DR-GS	14319	2,08	18,8
Chondroïtine-4S-NF	73564	1,17	18,3				
Chondroïtine-4S-GS	60777	1,21	18,5				
Chondroïtine-4S-DR	16200	1,2	15,3				
Chondroïtine-4S-GS-DR	43026	1,32	8,8				
Chondroïtine-4S-DR-GS	13341	2,25	17,7				

Mn, la masse moléculaire moyenne en nombre. Les cases vertes correspondent à des poids moléculaire moyens inférieurs a 10 kDa. Les cases bleues correspondent à des poids moléculaires moyens entre 10 et 16 kDa. Les cases rouges correspondent à des pertes de sulfates importantes

L'analyse de ces données a permis de ressortir quelques tendances générales.

Dans un premier temps, nous observons que la DR est efficace pour réduire la taille des chaînes de tous les polysaccharides testés. On notera cependant quelques nuances.

La dépolymérisation n'a permis d'obtenir des tailles de chaînes inférieures à 10 kDa que

pour les héparines, fucoïdanes, dextrans sulfate et carraghénane- λ . Les tailles de chaînes obtenues pour les chondroïtines-4S-DR sont autour de 16 kDa tandis que les carraghénanes- κ et ι ne descendent pas en dessous de 29 kDa. Concernant ces deux carraghénanes, nous avons émis l'hypothèse que leurs propriétés gelifiantes pourraient rendre plus difficile leur dépolymérisation (Liu et al., 2015).

Bien que la DR semble efficace pour tous les polysaccharides, l'attention doit également être portée sur la sulfatation des composés. En effet, la DR tend à dégrader les fonctions sulfates des squelettes polysaccharidiques comme nous l'avons remarqué de manière importante sur les héparines, fucoïdanes et carraghénane- λ . Une baisse de 21,3%, 22,1% et 10,6% en pourcentage massique de sulfates est observée pour ces trois composés respectivement. Les autres polysaccharides perdent également des sulfates mais dans une moindre mesure. Cette désulfatation était attendue car elle avait déjà été observée au laboratoire lors de travaux utilisant cette méthode de dépolymérisation sur des héparines (Achour et al., 2013). Nous évoquerons plus loin les conséquences que ces pertes de fonctions sulfates peuvent avoir sur les activités biologiques.

Dans un second temps, nous remarquons que l'utilisation du GS seul induit très peu de changements. Une légère dépolymérisation de 1 à 4 kDa est observée pour les héparines, fucoïdanes, dextrans sulfates et jusqu'à 13 kDa pour les chondroïtines-4S. Un impact faible sur la sulfatation a aussi été observé par une baisse de 3 à 5% de celle-ci uniquement pour les héparines et dextrans sulfates.

En revanche, son association avec la dépolymérisation produit des effets différents. L'utilisation du GS avant la DR diminue l'efficacité de la DR de manière plus ou moins importante sur chaque polysaccharide excepté pour le carraghénane- κ et ι . A titre d'exemple, la *Mn* de l'héparine-DR est de 2087 Da tandis que celle de l'héparine GS-DR est de 4684. L'exemple de la chondroïtine-4S est plus marquant avec une chondroïtine-4S-DR à 16200 Da et une chondroïtine-4S-GS-DR à 43026 Da. On notera également que l'association GS-DR semble diminuer la perte de sulfates induite par la DR pour les héparines et carraghénanes- λ alors qu'elle l'accroît pour les fucoïdanes et chondroïtine-4S.

Dans l'autre cas où le GS est employé après la DR, les chaînes obtenues sont globalement plus courtes que celles obtenues avec la DR seule. La légère dépolymérisation observée avec le GS seul pourrait donc s'ajouter à celle déjà effectuée par le procédé DR. L'exemple illustrant le mieux ce constat est celui du carraghénane- ι . Alors que le carraghénane- ι -DR a une masse moléculaire moyenne de l'ordre de 77 kDa, celle du carraghénane- ι -DR-GS

avoisine les 6 kDa. Seuls les carraghénanes- λ et héparines montrent des dérivés DR-GS aux masses moléculaires légèrement plus élevées que les dérivés DR. Cela peut s'expliquer par le fait que le procédé de glycol split est suivi d'une étape de dialyse avec un seuil de coupure de 1 kDa, ce qui n'est pas le cas avec la DR seule. Si beaucoup de petites chaînes sont éliminées pendant la dialyse, cela peut alors augmenter la masse molaire moyenne. Cela a notamment rendu impossible la récupération d'un dérivé Fucoïdane DR-GS. Les chaînes obtenues étaient certainement très courtes et ont toutes été éliminées avec la dialyse.

L'association DR-GS provoque également de fortes diminutions de la sulfatation comme celles observées avec la DR seule. Les indices de polydispersités obtenus avec l'association DR-GS sont relativement élevés, à hauteur de 2,25 et 2,08 pour les chondroïtines-4S-DR-GS et carraghénanes- κ -DR-GS respectivement. La dépolymérisation radicalaire peut provoquer diverses réactions d'hydrolyse ce qui peut expliquer cette hétérogénéité dans les chaînes. L'utilisation de la DR seule, montrait également un IP proche de 2 pour les fucoïdanes et héparines.

Les procédés DR, DR-GS et GS-DR sont donc efficaces pour réduire les tailles de chaînes des polysaccharides sulfatés étudiés. Ils induisent également des pertes de sulfates plus ou moins importantes en fonction du type de polysaccharide.

La prochaine étape de ce travail est de mesurer l'impact de ces changements structuraux sur les activités biologiques des dérivés produits.

3.2. Evaluation des activités biologiques des polysaccharides sulfatés non fractionnés

Le principal objectif de ces travaux est d'isoler des composés inhibiteurs de l'héparanase. Les 7 composés étudiés ici possèdent des similarités de structure avec l'héparane sulfate, qui est le substrat naturel de l'héparanase, ce qui devrait en faire de bons inhibiteurs (Presta et al., 2003). Cependant nombreux des polysaccharides choisis pour ces travaux possèdent des activités anticoagulantes reconnues. La recherche d'activités anticoagulantes est donc également un objectif de notre travail, de manière à identifier parmi les dérivés de bas poids moléculaires produits, les composés montrant une forte inhibition de l'héparanase pour une faible inhibition de la coagulation.

L'évaluation des différentes activités biologiques sera décrite de manière plus détaillée pour les polysaccharides sulfatés NF, puis les résultats obtenus pour chaque polysaccharide et

ses dérivés de bas poids moléculaires seront présentés.

3.2.1. Inhibition de l'héparanase

Les mesures d'inhibition de l'héparanase ont été effectuées par le suivi en spectrofluorimétrie du clivage par l'enzyme d'un heparane sulfate substitué avec un système FRET en présence ou non d'inhibiteur en solution à 40 ng/ml. Comme pour l'évaluation des caractéristiques physicochimiques, nous avons utilisé le lovenox comme témoin.

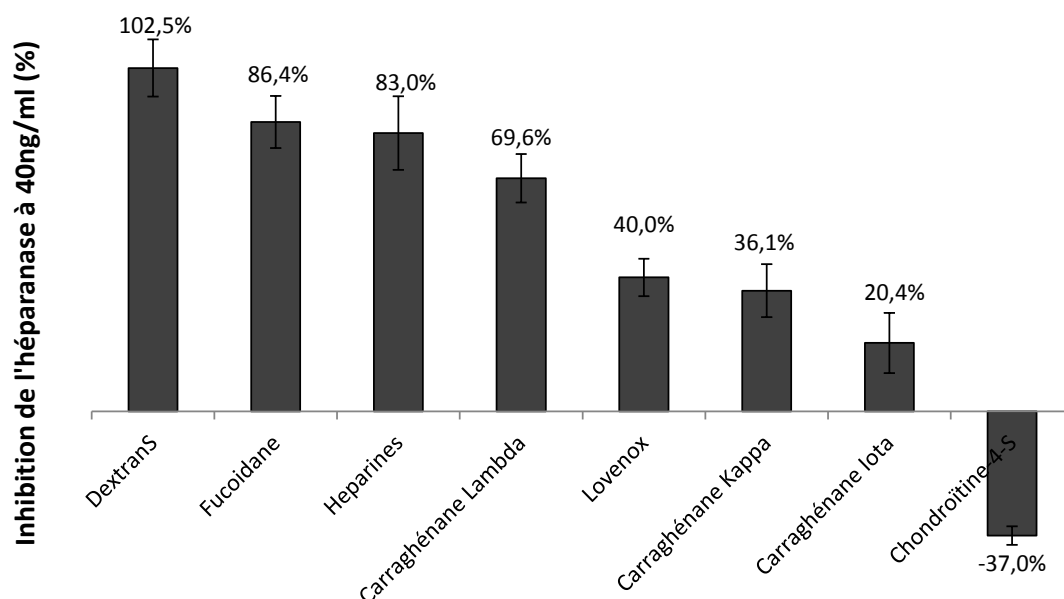


Figure 44 : Inhibition relative de l'héparanase par chaque polysaccharide non fractionné à une concentration de 40ng/ml

Les résultats présentés **figure 44** montrent que l'ensemble des polysaccharides sulfatés commerciaux de cette étude inhibent plus ou moins fortement l'héparanase, excepté les chondroïtines-4S qui semblent plutôt être activatrices de l'enzyme. Les inhibitions obtenues montrent que les dextrans sulfate-NF sont de puissants inhibiteurs avec un taux d'inhibition autour des 100%. Les fucoïdanes montrent également une forte inhibition de l'héparanase d'environ 86%, légèrement supérieure aux héparines dont l'inhibition mesurée est de 83%. Les carraghénanes semblent aussi une famille de composés intéressants avec des inhibitions d'environ 69%, 36% et 20% mesurées respectivement pour les carraghénanes- λ , - κ et - ι . Ces données semblent confirmer que la présence de nombreuses fonctions sulfates favorise une forte inhibition de l'héparanase, car au sein d'une famille de composés structurellement très proches et de poids moléculaires similaires comme les carraghénanes, le carraghénane- λ qui est le plus sulfaté (**tableau 5**) est le meilleur inhibiteur.

Pour autant, la taille des chaînes semble également impliquée dans l'inhibition de l'héparanase. En effet, l'HBPM commerciale Lovenox montre une inhibition deux fois inférieure à son précurseur non fractionné avec pourtant le même degré de sulfatation. Cela s'accorde avec de récents travaux effectués sur l'héparine non-anticoagulante Roneparstat (Pala et al., 2016) qui émettent l'hypothèse que les longues chaînes permettraient une interaction avec plusieurs enzymes simultanément via les domaines de liaison HBD1 et HBD2 (**revoir figure 27**) augmentant ainsi le potentiel d'inhibition.

Nos résultats obtenus sont donc en accord avec l'étude de Parish et al de 1987 qui avait mis en évidence la capacité de la majeure partie des polysaccharides étudiés ici à inhiber la dégradation de la MEC par l'héparanase (Parish et al., 1987). Depuis, l'inhibition de l'héparanase par les héparines a été largement décrite (Vlodavsky et al., 2016) et des travaux ont confirmé le potentiel des carraghénanes- λ ou des fucoïdanes (Niu et al., 2015; Wang and Miao, 2013). En revanche, depuis 1987 peu de nouvelles données ont été obtenues concernant les dextrans sulfate, leur rôle sur l'angiogénèse ou l'héparanase, et les résultats présentés dans ce manuscrit pourront donner de nouvelles perspectives à ce composé en ce sens.

Concernant maintenant les chondroïtines sulfate, nos résultats semblent montrer qu'elles induisent une activation de l'enzyme. Bien qu'elles ne soient pas effectivement caractérisées comme inhibitrices de l'héparanase dans la littérature ; on les retrouve sur des protéoglycanes portant également des HS qui sont sélectivement clivés par l'héparanase ; aucune référence à ce jour ne semble stipuler pour autant un rôle activateur.

3.2.2. Inhibition de la coagulation sanguine

Parallèlement à l'évaluation des activités d'inhibition de l'héparanase, les activités anticoagulantes ont été mesurées via des tests chronométriques en coagulométrie à l'aide de trois types d'analyses (**revoir figure 34**):

1) Mesure de l'APTT ("activated partial thromboplastin time"). Ce test prend en compte les facteurs de la coagulation impliqués dans les voies intrinsèque et commune de la coagulation sanguine.

2) Mesure du temps de prothrombine TP. Ce test prend en compte la voie extrinsèque de la coagulation.

3) Mesure du temps de thrombine TT. Ce test prend en compte la voie commune de la coagulation, soit la fibrinoformation.

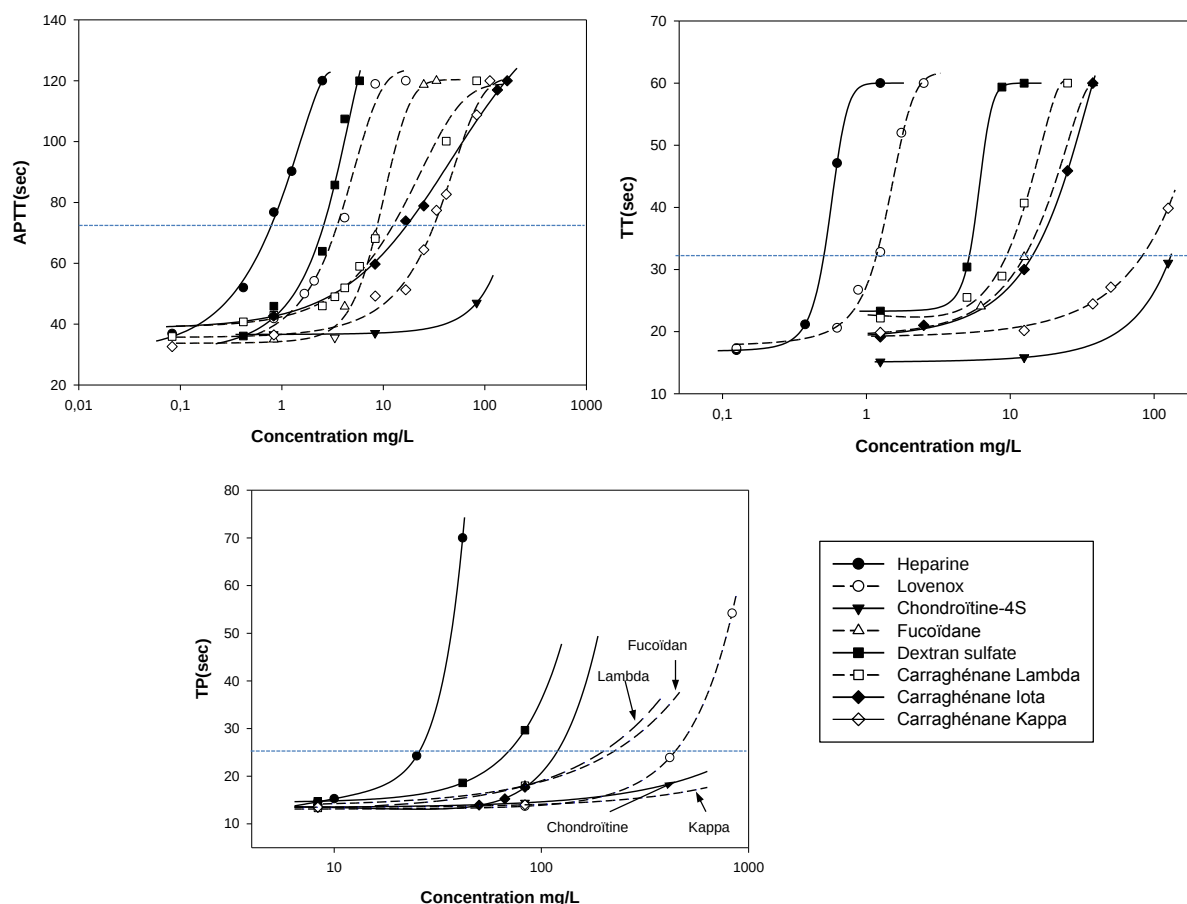


Figure 45 : Analyses chronométriques APTT, TT et TP des activités anticoagulantes des composés NF. Les temps de coagulation des plasmas en l'absence d'inhibiteurs (contrôle négatif NaCl 0,9%) sont de 37 s pour l'APTT, 16,2 s pour le TT et 13,1 s pour le TP. Les temps maximum de coagulation pour chaque test sont de 120 s pour l'APTT, 60 s pour le TT et 70 s pour le TP. Le double du temps de coagulation basal est indiqué sur chaque graphe par la ligne pointillée en bleu clair.

Afin de comparer les résultats obtenus, l'action des différents polysaccharides sur les voies de la coagulation est représentée sous forme de courbes (**Figure 45**).

Le test APTT confirme la forte activité anticoagulante des héparines-NF, avec une concentration nécessaire pour doubler le temps de coagulation du témoin négatif de 0,6 mg/L, suivie de près par les dextrans sulfate-NF et l'HBPM commerciale lovenox dont les concentrations nécessaires pour doubler le temps de coagulation sont respectivement de 2,8 mg/L et 3,5 mg/L (**Tableau 7**). Les autres polysaccharides sulfatés ont une activité moindre avec des concentrations nécessaires pour doubler le temps de coagulation supérieures à 8 mg/L, les chondroïtines-4S-NF ne montrant quasiment aucune activité même après 83 mg/L.

Le test TT (**Figure 45**) montre des résultats similaires au test APTT, avec l'héparine comme meilleur inhibiteur nécessitant une concentration de 0,65 mg/L pour doubler le temps de coagulation (**Tableau 7**). Les concentrations nécessaires pour les autres polysaccharides se situent entre 6 et >125 mg/L, la chondroïtine-4S étant, à nouveau, la moins anticoagulante.

Le test PT (**Figure 45**) affirme toujours la forte activité anticoagulante des héparines avec

une concentration nécessaire pour doubler le temps de coagulation de 22 mg/L (**Tableau 7**), les autres polysaccharides nécessitant tous des concentrations supérieures à 83,3 mg/L pour exercer une activité, sauf pour le dextran sulfate-NF à hauteur de 72 mg/L.

Ces mesures d'activités anticoagulantes ont été complétées par des mesures d'inhibitions de facteurs spécifiques de la coagulation tels que les facteurs Xa et IIa. Ces tests enzymatiques sont réalisés *in vitro* en présence d'antithrombine (**Figure 46**). Les IC_{50} déterminés pour chaque polysaccharide sont répertoriés **Tableau 7**.

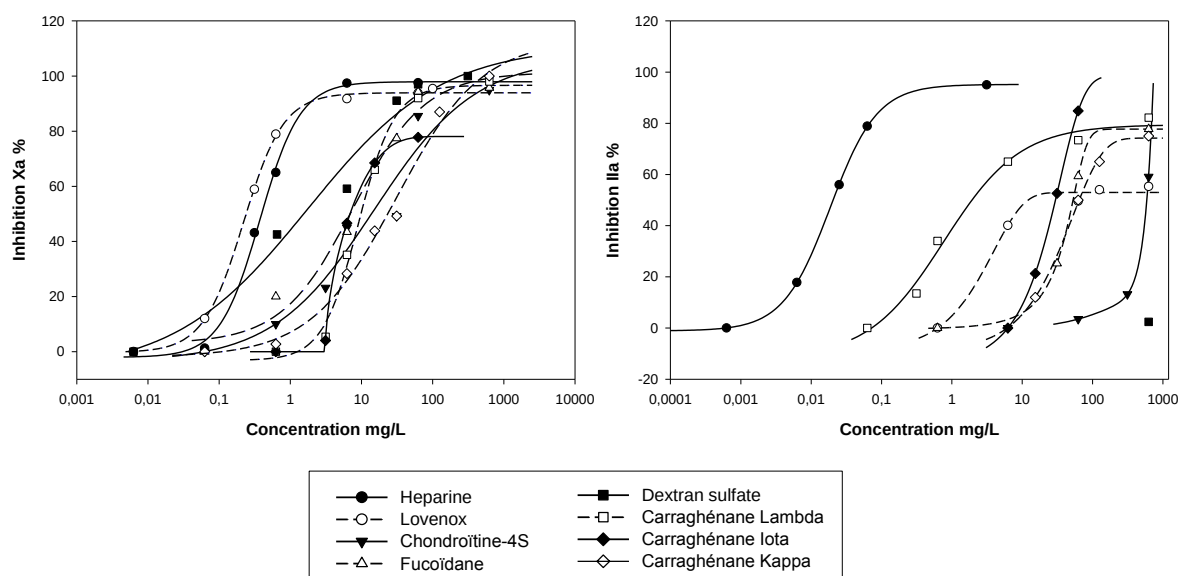


Figure 46 : Analyses dose/réponse des composés-NF pour l'inhibition des facteurs Xa et IIa de la coagulation en présence d'antithrombine.

Si l'on regarde les activités sur le facteur Xa de la coagulation (**Figure 46**), on remarque que l'héparine et le lovenox sont les plus anticoagulants avec des IC_{50} respectifs de 0,4 et 0,22 mg/L (**Tableau 7**). La différence d'inhibition avec les autres polysaccharides est de l'ordre du facteur 10, leurs IC_{50} se situant entre 2 et 25 mg/L avec le dextran sulfate comme 3^{ème} meilleurs inhibiteur.

Les activités sur le facteurs IIa sont plus disparates (**Figure 46**). On retrouve l'héparine comme meilleur inhibiteur avec un IC_{50} de 0,02 mg/L. Le carraghénane- λ occupe cette fois la seconde place avec un IC_{50} de 1 mg/L tandis que les fucoïdanes, lovenox et carraghénanes- κ et ι ont des IC_{50} entre 10 et 60 mg/L. Les dextrans sulfates et chondroïtine-4S ne semblent que très peu actifs sur le facteur IIa.

Tableau 7 : Activités biologiques des composés non fractionnés sur l'inhibition de l'héparanase et de la coagulation sanguine.

	Propriétés anticoagulantes					Inhibition 40µg/L
	CDT (mg/L)			IC50 (mg/L)		
	TT	apTT	TP	Xa	Ila	
						Héparanase
Enoxaparin(Lovenox)	9,5	3,5	495	0,22	70	40,0%
Héparine-NF	0,65	0,6	22	0,4	0,02	83,0%
Chondroïtine-4S-NF	>125	>83	>83	175	300	-37,0%
Dextran sulfate-NF	6	2,8	72	3,5	>625	100,0%
Fucoïdane-NF	16	8	>83	9,5	10	86,4%
Carraghénane-κ-NF	95	13	>83	25	52	36,0%
Carraghénane-ι-NF	11	1,5	>83	8	13	20,0%
Carraghénane-λ-NF	13	8,3	>83	10	1	69,0%

CDT : Concentration nécessaire pour doubler le temps de coagulation basal en présence de NaCl 0,9%.

Si l'on observe plus globalement toutes ces activités anticoagulantes, on s'aperçoit que pour les tests APTT et TT qui reprennent les voies intrinsèques et commune de la coagulation, l'inhibition reste assez dépendante de la sulfatation des composés. Les héparines-NF sont les meilleurs inhibiteurs tandis le lovenox et le dextran sulfate, fortement sulfaté, se placent comme 2^{ème} ou 3^{ème} plus fort inhibiteurs. De plus, si l'on regarde au sein de la famille des carraghénanes, on s'aperçoit que plus ils sont sulfatés, plus ils montrent d'inhibition (**tableau 7**). On retrouve un comportement similaire vis-à-vis de l'inhibition du facteur Xa de la coagulation.

En revanche, pour le facteur IIa, le comportement est très différent. L'inhibition du facteur IIa par le lovenox est bien moindre que celle de l'héparine NF. Cela s'explique par le fait que l'inhibition du facteur IIa nécessite une séquence de reconnaissance pentasaccharidique ainsi qu'une longueur de chaîne supérieure à 5400 Da (**revoir figure 17**)(Jin et al., 1997). Cette activité réduite sur le facteur IIa est d'ailleurs tout l'intérêt des héparines de bas poids moléculaire (Linhardt and Gunay, 1999a).

Bien que les chaînes des autres polysaccharides étudiées soient longues, voire très longues pour le cas des carraghénanes, les activités anti-IIa mesurées sont environ 1000 fois inférieures à celle de l'héparine (seulement 100 fois pour le carraghénane-λ). L'inhibition spécifique du facteur IIa est donc plus difficilement prévisible que celle du Xa et est dépendante à la fois de la sulfatation ainsi que de la longueur des chaînes.

Cette analyse préliminaire concernant les activités *in-vitro* des polysaccharides sulfatés non fractionnés a mis en avant que tous les composés, exceptée la chondroïtine-4-sulfate, présentaient une activité d'inhibition de l'héparanase plus ou moins importante. A ce stade, des composés comme le dextran sulfate ou le fucoïdane semblaient de bons concurrents par rapport aux héparines.

En revanche, comme le suggérait déjà la littérature (Li et al., 2008; Yamada et al., 1997), tous ont également des activités anticoagulantes, tant sur la voie intrinsèque que sur la voie commune qui comporte les facteurs Xa et IIa.

Que ce soit pour la coagulation sanguine ou l'héparanase, les plus fortes inhibitions corrélaient généralement avec un fort degré de sulfatation. Pour autant, la taille des chaînes reste importante dans ces activités et notamment quand il s'agit de facteurs spécifiques comme le IIa.

L'étape suivante de ce travail est d'évaluer les activités biologiques des dérivés de bas poids moléculaires produits pour chaque polysaccharide sulfaté.

3.3. Evaluation des activités biologiques des polysaccharides sulfatés de bas poids moléculaires

En appliquant les mêmes méthodes d'analyse décrites juste avant pour les polysaccharides non fractionnés, nous avons déterminé les activités anticoagulantes et anti-héparanase des dérivés GS, DR, GS-DR et DR-GS de nos 7 polysaccharides sulfatés. Celles-ci seront présentées aux côtés des caractéristiques physicochimiques de chaque composé pour une meilleure interprétation des résultats.

3.3.1. Cas des chondroïtines-4-sulfates

Du fait de ces résultats singuliers, nous allons traiter séparément de la chondroïtine-4-sulfate (**tableau 8**). En effet, ce composé sous sa forme non fractionnée présentait une capacité à activer l'héparanase (37%) et disposait d'activités anticoagulantes extrêmement faibles comparée au lovenox. Cela apparaît comme un avantage pour le ciblage de l'héparanase mais aucun des dérivés produits ne possède de capacité d'inhibition de l'héparanase.

Tableau 8 : Caractéristiques physicochimiques et activités biologiques des dérivés de Chondroïtine-4-sulfate

Caractérisation physicochimique				Propriétés anticoagulantes					Inhibition 40µg/L
				CDT (mg/L)			IC50 (mg/L)		
	Mn (Da)	IP	% sulfates (m/m)	TT	apTT	TP	Xa	Ila	Héparanase
Enoxaparin(Lovenox)	4137	1,32	40	9,5	3,5	495	0,22	70	40,0%
Chondroïtine-4S-NF	73564	1,17	18,3	>125	>83	>83	175	300	-37,0%
Chondroïtine-4S-GS	60777	1,21	18,5	>125	>83	>83	625	>625	8,6%
Chondroïtine-4S-DR	16200	1,2	15,3	>125	>83	>166	400	350	-4,5%
Chondroïtine-4S-GS-DR	43026	1,32	8,8	>125	>83	>833	>625	>625	-19,3%
Chondroïtine-4S-DR-GS	13341	2,25	17,7	>125	>83	>83	120	>625	0,6%

Les modifications apportées par dépolymérisation associée ou non au glycol-split auront bien permises de modifier la structure avec la réduction des chaînes jusqu'à 16,2 kDa avec la DR et un taux de sulfatation divisé de moitié pour la Chondroïtine-4S-GS-DR mais cela n'aura entraîné aucun changement notable sur les activités biologiques.

3.3.2. *Fucoïdanes, dextrans sulfates, Carraghénanes-κ et -ι*

L'étude sur les fucoïdanes, dextrans sulfates et carraghénanes-κ et -ι permet de dégager quelques tendances tout en relevant des comportements propres à chaque type de polysaccharide (**tableau 9**).

Dans un premier temps, on peut remarquer pour chaque polysaccharide que l'utilisation du GS seul, dont nous avons vu plus avant qu'il n'induisait que peu de changement structuraux, n'induit pas non plus de changements très importants sur les activités biologiques. Les modifications les plus notables sont une baisse de l'inhibition de l'héparanase de 8% pour le dextran sulfate et un IC₅₀ sur le facteur IIa multiplié par 2 pour le Carraghénane-κ.

Dans un second temps, il est possible d'observer que la diminution de la taille des chaînes corrèle avec une perte d'inhibition de l'héparanase. Peu importe la capacité du polysaccharide NF de départ à inhiber l'héparanase, sa dépolymérisation entraîne une perte d'inhibition de l'héparanase. A titre d'exemple, le dextran sulfate-NF de 15 kDa montre une inhibition de 100% de l'héparanase à 40µg/L alors que le Dextran sulfate-DR-GS de 4,7 kDa n'inhibe plus l'enzyme qu'à 1,3%. Le carraghénane-κ-NF qui n'inhibe que 36% de l'héparanase pour une taille de chaîne moyenne avoisinant le million de Da n'inhibe plus l'enzyme qu'à 0,8% après application de la DR et l'obtention de masses moléculaires moyennes de 29,4 kDa.

Tableau 9 : Caractéristiques physicochimiques et activités biologiques des dérivés de Fucoïdanes, dextran-sulfate, carraghénanes- κ et carraghénanes- ι .

Caractérisation physicochimique				Propriétés anticoagulantes					Inhibition 40µg/L
				CDT (mg/L)			IC50 (mg/L)		
	Mn (Da)	IP	% sulfates (m/m)	TT	apTT	TP	Xa	Ila	
Enoxaparin(Lovenox)	4137	1,32	40	9,5	3,5	495	0,22	70	40,0%
Fucoïdane-NF	46858	1,33	39,3	16	8	>83	9,5	10	86,4%
Fucoïdane-GS	42185	1,39	38,9	15	8	>83	87,5	10	87,5%
Fucoïdane-DR	4152	2,11	17,2	>125	>83	>83	150	120	-2,3%
Fucoïdane-GS-DR	8262	1,64	6,6	80	31	>833	112	300	28,9%
Fucoïdane-DR-GS	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dextran sulfate-NF	15793	1,18	53,2	6	2,8	72	3,5	>625	100,0%
Dextran sulfate-GS	14887	1,19	50,4	6	2,8	>83,3	25	>625	92,0%
Dextran sulfate-DR	7673	1,46	50,2	18	7,5	170	100	200	75,0%
Dextran sulfate-GS-DR	8183	1,47	47,6	22	5	540	62,5	180	67,0%
Dextran sulfate-DR-GS	4710	1,21	17,2	>125	>83,3	>83	100	>625	1,3%
Carraghénane-κ-NF	>1000000	nd	20,6	95	13	>83	25	52	36,0%
Carraghénane-κ-GS	>1000000	nd	22,5	100	11,8	>83	41	120	31,0%
Carraghénane-κ-DR	29409	1,45	19,1	>125	>83	>83	175	>500	0,8%
Carraghénane-κ-GS-DR	10340	1,72	17,6	>125	>83	>83	250	240	-0,7%
Carraghénane-κ-DR-GS	14319	2,08	18,8	>125	>83	>83	>625	>125	-11,2%
Carraghénane-ι-NF	>1000000	nd	26,2	11	1,5	>83	8	13	20,0%
Carraghénane-ι-GS	>1000000	nd	26	8	1,2	80	15	22	23,0%
Carraghénane-ι-DR	77745	1,37	24,2	28	2,3	>83	42,5	120	21,2%
Carraghénane-ι-GS-DR	43854	1,61	23,3	45	5	>83	75	120	13,3%
Carraghénane-ι-DR-GS	6073	1,5	16,2	>125	>83	>83	125	625	7,0%

Mn, la masse moléculaire moyenne en nombre. Les cases vertes correspondent à des poids moléculaire moyens inférieurs a 10 kDa. Les cases bleues correspondent à des poids moléculaires moyens entre 10 et 16 kDa. Les cases rouges correspondent à des pertes de sulfates importantes tandis que les lignes orange montrent les composés pour lesquels les activités anticoagulantes sont faibles sur les 5 tests, APTT, TT, PT, Xa et Ila.

Certains composés paraissent sensibles à de faibles variations de tailles de chaînes. C'est le cas du fucoïdane dont le dérivé GS-DR de 8,2 kDa montre une inhibition de l'héparanase de 28% alors que le dérivé DR de 4,1 kDa n'inhibe plus l'enzyme. Cette perte d'inhibition semble d'autant plus dépendante de la taille que le composé le plus petit, fucoïdane-DR, est le plus sulfaté des deux. Cette perte d'inhibition ne serait donc pas liée à une perte de sulfatation. Ces résultats s'accordent avec ceux d'autres travaux qui avaient mis en évidence

que les fucoïdanes montraient des activités pro-angiogéniques ou anti-angiogéniques en fonction de leurs tailles (Haddad et al., 2015; Lake et al., 2006; Soeda et al., 2000). La chute d'activité sur l'héparanase associée à la diminution de la masse moléculaire moyenne a également été observée pour les dérivés DR, GS-DR et DR-GS des carraghénanes- κ . Cette diminution d'activité semble dépendante de la taille des chaînes car la perte de sulfatation n'excède pas 3% sur les 20,6% initiaux. En revanche, pour les dextran-sulfate-DR-GS et les carraghénanes- ι DR-GS la diminution du poids moléculaire s'accompagne d'une désulfatation importante donc il est difficile de statuer sur quelle modification structurale a le plus impacté l'activité biologique.

Pour terminer, nous observons que l'activité anticoagulante évaluée par les 5 tests semble diminuer de paire avec l'inhibition de l'héparanase lors des modifications structurale comme on le voit avec les lignes marquées en orange. Par exemple, le dextran sulfate-NF montre des activités anticoagulantes sur les tests APTT, TP et TP très proches, sinon plus forte que le lovenox. En revanche, le dérivé dextran sulfate DR-GS qui a perdu sa capacité à inhiber l'héparanase a également perdu sa capacité à inhiber les voies communes et intrinsèques de la coagulation aux vues des concentrations nécessaires qui sont au minimum 10 fois supérieurs à celle de départ.

Dans la recherche d'un inhibiteur spécifique de l'héparanase parmi tous ces composés, le fucoïdane-GS-DR semble être un bon candidat car il allie une faible masse moléculaire moyenne de 8,2 kDa, une inhibition de l'héparanase de 28% et des activités anti-coagulantes 10 fois inférieures à celle du lovenox sur les tests APTT, TT, TP et le facteur Xa.

Si la formulation tolère une activité anti-coagulante, les dérivés dextran sulfate-DR et dextran sulfate-GS-DR pourraient convenir avec des poids moléculaires proches des 8 kDa, montrent une inhibition de l'héparanase de 67 à 75% et possèdent une activité anticoagulante importante, bien que deux fois moins intense que le lovenox sur les voies intrinsèques et communes de la coagulation.

3.3.3. *Héparines et Carraghénanes- λ*

Les données obtenues pour les dérivés de bas poids moléculaires d'héparines et de carraghénanes- λ ont montré un excellent potentiel d'inhibition de l'héparanase pour une faible activité anti-coagulante.

Une étude plus complète a été réalisée sur ces polysaccharides sulfatés avec l'évaluation de l'impact de la quantité de peroxyde d'hydrogène dans la dépolymérisation des carraghénanes- λ , le calcul des IC₅₀ pour l'inhibition de l'héparanase ainsi que l'évaluation de la cytotoxicité des composés d'intérêt sur de cellules endothéliales.

L'ensemble des résultats de ces travaux sont regroupés dans un article publié en février 2017 dans le journal "Carbohydrate Polymer" sous le titre "Production of heparin and λ -carrageenan anti-heparanase derivatives using a combination of physicochemical depolymerization and glycol splitting."



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol


Production of heparin and λ -carrageenan anti-heparanase derivatives using a combination of physicochemical depolymerization and glycol splitting

Nicolas Poupard, Hugo Groult, Justine Bodin, Nicolas Bridiau, Stéphanie Bordenave-Juchereau, Frédéric Sannier, Jean--Marie Piot, Ingrid Fruitier-Arnaudin, Thierry Maugard*

Université de La Rochelle, UMR CNRS 7266, LIENSs, Equipe Approches Moléculaires Environnement-Santé, Département de Biotechnologies, Avenue Michel Cr peau, 17042, La Rochelle, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 October 2016

Received in revised form 23 January 2017

Accepted 12 February 2017

Available online 16 February 2017

Keywords:

Heparin

Carrageenan

Heparanase

Glycol split

Angiogenesis

Depolymerization

ABSTRACT

Strongly associated with tumor angiogenesis and metastasis, the enzyme heparanase is an endo- β -D-glucuronidase which is overexpressed in the tumor microenvironment. Its inhibition could be one of the most promising anti-angiogenic approaches to date. Although heparin is known as a good heparanase inhibitor, it also possesses major anticoagulant properties that may be incompatible with its use as an anti-angiogenic agent, hence the considerable interest for other sources of sulfated polysaccharides. Recent investigations point to λ -carrageenans, highly sulfated galactans with a tremendous potential that are found in red algae.

This study describes the production of low-molecular-weight (LMW) heparins and λ -carrageenans, using a combination of glycol splitting and ultrasonically-assisted radical hydrolysis using hydrogen-peroxide. The structural characteristics, as well as the anticoagulant and antiheparanase activities of the resulting products were assessed. The best candidate was a LMW glycol-split λ -carrageenan that displayed major anti-heparanase properties, with an IC_{50} of 7.32 ng/mL and a close-to-zero anticoagulant activity.

  2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tumor angiogenesis (neovascularization) is essential to cancer progression. Indeed, the lack of oxygen and nutrients resulting from a defective blood supply hinders tumor growth, thus maintaining the cancer in a dormant and innocuous state (Folkman, 2006). Tumor angiogenesis is triggered by a variety of proangiogenic factors such as the vascular endothelial growth factor (VEGF) (Ferrara & Henzel, 1989) or certain members of the fibroblast growth factors family (FGFs) (Esch et al., 1985; Yancopoulos et al., 2000). Given its key role in angiogenesis, the VEGF rapidly became a

preferred target for pharmaceutical and biotechnology companies and three anti-angiogenic drugs were developed between 2003 and 2006: erlotinib (Tarceva ), an indirect inhibitor of VEGF production; bevacizumab (Avastin ), a monoclonal antibody directed against the VEGF and sunitinib (Sutent ), a VEGF's receptor blocker (Folkman, 2008). Unfortunately, a number of patients rapidly showed signs of treatment failure, with an overexpression by the tumor of other proangiogenic factors (Abdollahi & Folkman, 2010). More effective anti-angiogenic strategies are therefore required, based on either mono- or combination therapy (Dorrell et al., 2007).

With its cleavage of the substrate heparan sulfate (HS), the endo- β -D-glucuronidase heparanase plays a major role in angiogenesis and metastatic processes (Parish, Freeman, & Hulett, 2001). Found on the basement membrane of endothelial cells and in the extracellular matrix (ECM), HS contributes to supramolecular structure stability (Bernfield et al., 1999). Due to its highly anionic nature, it is able to bind and store several growth factors, chemokines and enzymes. The cleavage of HS by heparanase enables ECM remodeling and promotes the release in the tumor microenvironment of

Abbreviations: LMW, low molecular weight; HS, heparan sulfate; ECM, extracellular matrix; UF, unfractionated; RD, depolymerized with radical hydrolysis assisted by ultrasound; HexA, hexuronic acid; GS, glycol split; RD-GS, depolymerized then glycol splitted; GS-RD, glycol splitted then depolymerized; Mn, number average molecular weight; Mw, weight average molecular weight; HsKMEC, human skin microendothelial cells.

* Corresponding author.

E-mail address: tmaugard@univ-lr.fr (T. Maugard).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.040>

0144-8617/  2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

such sequestered growth factors as VEGF and FGFs, thus promoting angiogenesis and metastatic dissemination (Elkin et al., 2001).

Since heparanase activity is upregulated in several tumor types, its inhibition is regarded as a promising anticancer strategy. To date, several heparanase inhibitors belonging to different chemical classes have been developed (Pisano, Vlodavsky, Ilan, & Zunino, 2014). Among these, HS mimetics such as the highly sulfated phosphomanno-pentaose PI88 (Kudchadkar, Gonzalez, & Lewis, 2008), the polysulfated gluco-tetraose-based PG545 (Dredge et al., 2010) and the heparin derived SST0001 (Ritchie et al., 2011), have shown promising results and are currently in different phases of clinical trials. SST0001 (roneparstat, Sigma-Tau research, Switzerland SA) is a non-anticoagulant 100% N-acetylated heparin, with a 25% “glycol-split” (Naggi et al., 2005). The glycol split process consist of an oxidation process of hexose’s available vicinal diols followed by a reduction. It is particularly interesting when used on heparin because it suppresses the anticoagulant potential of the glycosaminoglycan. By the opening of certain hexuronic acid (HexA) rings, the action of glycol splitting disrupts the heparin pentasaccharide recognition pattern for antithrombin III (Fig. 1a) responsible for its widely known anticoagulant properties (Torri & Naggi, 2016). This step was also shown to improve polymer chain flexibility, thus enhancing heparanase inhibition (Vlodavsky et al., 2007). The development of non-anticoagulant heparin species and their applications represents a huge step forward, however, heparin does have a major disadvantage, i.e. a lack of molecular specificity due to its capacity to bind multiple proteins (Hirsh & Levine, 1992). Moreover, the recent crisis involving heparin batches contaminated with oversulfated chondroitin sulfates that lead to multiple patients death (Guerrini et al., 2009), emphasize the difficulty to provide a safe worldwide supply of heparins (Szajek et al., 2016). Different sources of sulfated polysaccharides, notably those offered by certain plants or seaweeds may represent an alternative to produce heparin mimics. (Jiao, Yu, Zhang, & Ewart, 2011; Shanmugam & Mody, 2000).

Carrageenans are a family of sulfated polysaccharides found in red algae. Among them and with an ester sulfate content approaching 35% (wt/wt), λ -carrageenan is the most sulfated plant-based polysaccharide. It has a repeating basic structure that alternates 3-linked β -D-galactopyranose (G-units) with 4-linked α -D-galactopyranose (D-units) to form the repeating disaccharide unit shown Fig. 1b. The disaccharide D2S,6S-G2S bears 3 sulfate groups (Liu, Zhan, Wan, Wang, & Wang, 2015) thus conferring structural properties that are similar to heparin. However, the advantages of high-molecular-weight carrageenans are limited by their pro-inflammatory properties (Silva et al., 2010). As with many other sulfated polysaccharides, the molecular weight and sulfo-group location play an important role in bioactivity. λ -carrageenans are endowed with multiple activities such as anticoagulant, antiviral and anti-tumoral (Campo, Kawano, Silva, & Carvalho, 2009; Jiao et al., 2011; Shanmugam & Mody, 2000). More recently, studies on low-molecular-weight (LMW) λ -carrageenans and on a λ -carrageenan heptasaccharide have demonstrated their action on heparanase, their anti-angiogenic properties, and their ability to bind to bFGF (Chen, Yan, Lin, Wang, & Xu, 2007; Niu, Zhang, Chen, & Yan, 2015).

The depolymerization of λ -carrageenan has been proven useful for modulating its biological activities and especially concerning coagulation (Yamada et al., 1997). Reducing its chain length should also help us to potentiate its activity against heparanase. In addition, smaller polysaccharides should improve products’ homogeneity and ease their excretion *in vivo*.

We have previously reported an innovative method that combines radical hydrolysis and ultrasounds for the depolymerization of heparin. It resulted in low molecular weight heparins exhibiting anti-coagulant activity similar to commercial lovenoxTM (Achour

et al., 2013). A study showing the association of ultrasonic depolymerization with ferrous ions and ascorbic acid on λ -carrageenan lead to the obtention of LMW λ -carrageenan species with anti-HIV activity (Yamada et al., 1997). Then our physicochemical method combining radical hydrolysis and ultrasounds using fewer reagents should be effective for reducing λ -carrageenan chain length as well.

As λ -carrageenans derivatives may constitute a new source of heparin analogs, the present study was designed to apply physicochemical depolymerization to heparins and λ -carrageenan and further more, to combine it with the glycol splitting procedure. The derivatives produced by each process were biochemically characterized. Because the resulting products are intended to serve as heparanase-mediated anti-angiogenic agents in cancer treatment, their actions on heparanase and coagulation were assessed to determine which candidate exhibited the best ratio between potent heparanase inhibition and minimal anticoagulant activity. All results were then compared to those obtained with a commercial LMWH, i.e. enoxaparin sodium (Lovenox[®]).

2. Material and methods

Unless otherwise specified, all products were purchased from sigma Aldrich.

The unfractionated heparin (UFH) was purchased from Alfa Aesar (Porcine mucosal heparin sodium salt ≥ 100 IU/mg, batch 10160803). Lovenox[®] (4000 anti-factor Xa IU/0.4 mL) was kindly supplied by the La Rochelle hospital.

The unfractionated λ -carrageenan (UF- λ -carrageenan) were purchased from FMC Biopolymer.

The antithrombin III, factor Xa, factor IIa and chromogenic substrates (CBS 31.39 and CBS 61.50) were purchased from Diagnostica Stago (France), as part of the Stachrom[®] ATIII and Stachrom[®] Heparin kits. Activated partial thrombin time (APTT), thrombin time (TT) and prothrombin time (PT) reagents were also purchased from Diagnostica Stago (France) as part of the STA[®]-PTT Automate 5, STA[®]-Thrombin 2, STA[®]-N opl stine CI 5 kits, respectively, along with the human plasma pool (Pool norm[®]).

Human recombinant active heparanase I (purity $\geq 95\%$) was purchased from R&D system.

Antiheparanase activity was measured using the heparanase assay toolbox supplied by Cisbio assays. This includes an 11-kDa HS substrate labeled with biotin and Europium cryptate, as well as a 60-kDa Streptavidin labeled with d2 fluorophore.

The Opti-MEM[®] reduced serum medium, glutaMAXTM, fungizone, gentamicin and Alamar Blue[®] were all purchased from Life Technologies (France).

2.1. Elaboration of sulfated polysaccharides

Polysaccharides subjected to ultrasonically-assisted radical depolymerization was termed “RD” and those submitted to glycol splitting, “GS”.

When depolymerization was followed by glycol splitting, the appended suffix was “RD-GS” and when glycol splitting preceded depolymerization, “GS-RD”.

2.1.1. Physicochemical depolymerization of polysaccharides by ultrasonically-assisted radical depolymerization

Polysaccharides were dissolved in water to a final concentration of 25 mg/mL for heparin and 5 mg/mL for λ -carrageenan (given its low solubility). The solution can be heated to 40–50 °C to improve λ -carrageenan solubility. Hydrogen peroxide 30% was added to achieve the desired ratio of hydrogen peroxide/polysaccharide (w/w). The reaction mixture was sonicated using a 3-mm diameter UP50H ultrasonic probe (Hielscher Germany) (MS3 micro tip) which provided an amplitude of 180 μ m. The processor generated

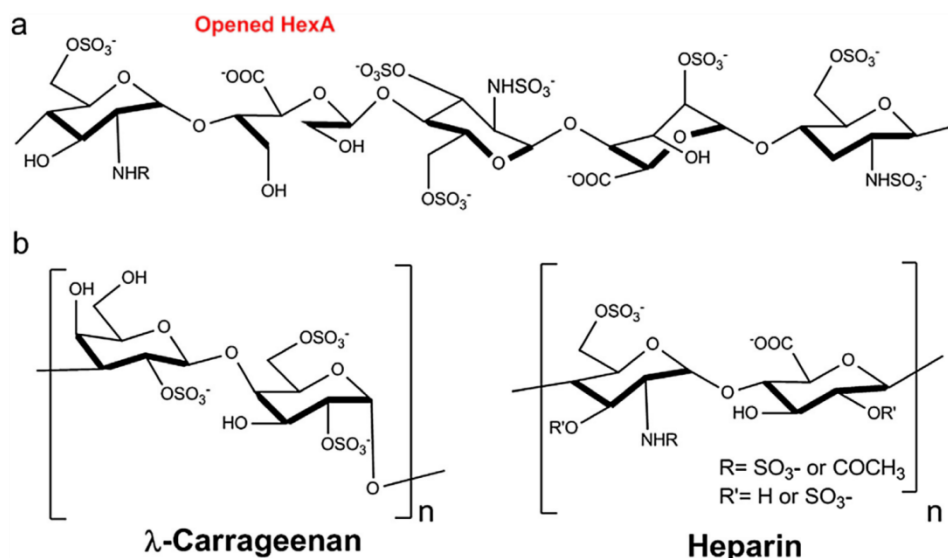


Fig. 1. Polysaccharide structure and impact of glycol splitting procedure. a) Glycol-split heparin pentasaccharide with opened hexuronic acid ring disrupt anticoagulant properties, b) Structure of λ -carrageenan and heparin. Both of these polysaccharide chains are sulfated and polyanionic, showing highly similar structures when the heparin disaccharides are sulfated at the R and R' positions.

30-kHz frequency mechanical longitudinal vibrations by means of electrical excitation. Reactions were made in a final volume of up to 4 mL in a 6 mL glass tube in order to maximize the ultrasound efficiency. With the reaction mixture at room temperature, the sonic pulses maintained a temperature of 60 °C in the reactor. After 8 h of depolymerization, the reaction mixture was freeze-dried prior to analysis or glycol splitting.

2.1.2. Glycol-split polysaccharide preparation

Glycol-split polysaccharides were prepared by exhaustive sodium periodate oxidation, followed by sodium borohydride reduction (Naggi et al., 2005). Reaction mixtures (3 mL) containing 40 mg of polysaccharides in 0.1 M NaIO₄ were incubated in the dark, at a temperature of 4 °C, and stirred at a rate of 500 rpm. After 15 h of incubation, 120 μ L of ethylene glycol were added to neutralize any excess periodate. The same incubating conditions were maintained for one hour, after which 26 mg of solid NaBH₄ were slowly added to the 4 °C mixture and the reaction was stirred during the four hours at room temperature. The pH was then adjusted to 4, using 1 M HCl, prior to neutralization with 1 M NaOH. Lastly, mixtures were desalted by dialysis with a 1-kDa porous cellulose ester membrane (spectra/Por Dialysis membrane MWCO: 1000). Twelve-hour dialysis was undertaken 3 times, at a temperature of 4 °C and against 4 L of ultrapure water.

2.2. SEC-HPLC analysis

Size exclusion chromatography (SEC) analyses of the reaction products, were achieved using an Agilent Technologies LC/RID system (1100 LC/RID) with one TSK-GEL G5000PW (30 cm $\times$ 7.5 mm) column in line with a TSK-GEL G4000PW (30 cm $\times$ 7.5 mm). The columns were maintained at 30 °C and products were eluted with 0.1 M sodium nitrate (NaNO₃) with a flow rate of 0.5 mL/min. Products were identified and quantified by differential refractometry using off-line HP Chemstation software for the processing.

Heparin oligosaccharides of different molecular weights purchased from Iduron (Manchester, UK) were used as calibrants for the standard curve and the determination of the size of the heparin derivatives. Dextran of different molecular weights, purchased

from Sigma Aldrich, were used as calibrants for the standard curve and calculation of the size of λ -carrageenan derivatives.

Number-average molecular weights (M_n), weight-average molecular weights (M_w), the degree of polymerization (DP) and the polydispersity index (PI) were calculated using the calibration method detailed in (Mulloy & Hogwood, 2015):

$$M_n = \frac{\sum N_i \times M_i}{\sum N_i} \quad (1)$$

$$M_w = \frac{\sum N_i \times M_i^2}{\sum N_i \times M_i} \quad (2)$$

$$DP = \frac{M_n}{M_0} \quad (3)$$

$$PI = \frac{M_w}{M_n} \quad (4)$$

with N_i representing the number of moles of polymer species, M_i the polymer molecular weight and M_0 the monomer-unit molecular weight.

2.3. Sulfate determination

The stability of the sulfate groups on the sugar backbone was monitored using (7-aminophenothiazin-3-ylidene)-dimethylazanium chloride (Azure A), which binds the sulfated groups in the polysaccharide chains (Klein, Drongowski, Linhardt, & Langer, 1982). In brief, 200 μ L of a 10-mg/L solution of aqueous Azure A were added to 20 μ L of diluted sulfated polysaccharide samples. Absorbance was then measured at 620 nm. Dextran sulfate with a characterized sulfur content was used to build the calibration curve. The sulfur content was then transposed into sulfate content.

2.4. Assays of antithrombin-mediated inhibition of factors Xa and IIa

Polysaccharide derivatives and anti-thrombin III (0.125 g/L for anti-factor Xa assay and 0.625 g/L for anti-factor IIa assay) were

first incubated at 37 °C in 96-well plates for 2 min. Factor Xa or factor IIa were then added to achieve a final concentration of 11.25 nKat/mL. This was followed by a 30-s incubation, prior to the addition of 3.25 nM of factor Xa chromogenic substrate (CBS 31.39; CH₂SO₂-D-Leu-Gly-Arg-pNA, AcOH) for the anti-factor Xa assay or 1.4 nM of factor IIa chromogenic substrate (CBS 61.50; EtM-SPro-Arg-pNA, AcOH) for the anti-factor IIa assay. The reaction mixture was incubated for 5 min and absorbance was read at 405 nm, every ten seconds. Initial velocity was indicated by the slope of the linear segment of the kinetic curve.

2.5. Clotting time assays

The anticoagulant activity of the polysaccharides was determined by measuring the APTT, PT or TT. All assays were carried out according to the manufacturer's instructions, using a Start4 coagulometer with assay kits from Stago Diagnostica (France). In brief, 90 µL of normal human plasma (Stago, France) were mixed with 10 µL of a 0.9% NaCl solution containing various amounts of samples for each assay. For the APTT assay, 100 µL of APTT reagent were added to the mixture, prior to incubation for 3 min at 37 °C. Then 100 µL of a 0.025 M CaCl₂ solution were added and the clotting time (APTT) was recorded. For TT and PT assays, the mixture was first incubated at 37 °C for 2 (PT) or 1 min (TT), prior to the addition of 200 µL of PT assay reagent or 100 µL of TT assay reagent, followed by the recording of clotting time. The negative control used in all the assays was a 0.9% NaCl solution.

2.6. Heparanase inhibition assay

Heparanase inhibition assays were performed using the heparanase assay toolbox (Cisbio Assay, France) with heparanase purchased from R&D systems (human recombinant heparanase 7570-GH). The hydrolysis of Biotin-H-Eu(K) (HS labeled with both biotin and Eu³⁺ cryptate) was performed in white 96-well half-area plates (Corning® #3693) using a BMG Labtech Fluostar Omega spectrofluorometer with a high time-resolved fluorescence (HTRF) module. The reaction was performed in the presence or the absence of polysaccharide products, at 37 °C, with a final volume of 80 µL. Initially, 15 µL of inhibitor solutions in ultrapure water were added into the wells, followed by 15 µL of heparanase solution (400 ng/mL of heparanase in Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl and 0.1% CHAPS). After a 10-min pre-incubation at 37 °C, an enzyme reaction was triggered by adding 30 µL of Bio-HS-Eu(K) (4.4 ng/µL in 0.2 M sodium acetate buffer, pH 5.5) and the plate was incubated at 37 °C for 15 min. This was followed by the addition of 20 µL of streptavidin-d2 (10 ng/µL in 0.1 M NaPO₄ buffer, pH 7.4, 0.8 M KF, 0.1% BSA, 1 mg/mL heparin) and incubation at 37 °C for 2 min. The fluorescence was measured at λ_{em1} = 620 nm and λ_{em2} = 665 nm after 60 µs of excitation at λ_{ex} = 337 nm. Delta F (%) was calculated using the following equation, as indicated by the suppliers:

$$\text{Delta F (\%)} = \frac{(F_{665}/F_{620})_{\text{sample}} - (F_{665}/F_{620})_{\text{blank}}}{(F_{665}/F_{620})_{\text{blank}}} \times 100 \quad (5)$$

where F665 and F620 were fluorescence signals measured, respectively, at 665 nm and 620 nm.

2.7. Cell culture

Human skin microvascular endothelial cells (HskMEC) were kindly supplied by Dr Catherine Grillon (Centre de Biophysique moléculaire, Orléans, France).

HskMEC were cultured in OptiMEM® with GlutaMAX-I™, supplemented with 2% fetal bovine serum, 40 µg/mL of gentamycin

and 0.05 µg/mL of fungizone, and maintained at 37 °C in a 5% CO₂/95% air atmosphere.

2.8. Cell viability assay

Sulfated polysaccharides were tested on HskMEC cultures to measure their impact on cell viability using Alamar Blue® assay. This assay was performed over 4 days. On day 1, cells were seeded into a 96-well plate, at a density of 500 cells/well, in 50 µL of complete OptiMEM® medium, supplemented with 2% FBS and incubated for 24 h at 37 °C. On day 2, 40 µL of complete OptiMEM® medium containing different concentrations of sulfated polysaccharides were added into the wells. Concentrations were tested in 8 replicates. The plate was incubated for a further 24 h at 37 °C. On day 3, 10 µL of commercial Alamar Blue® solution (Life technology) was added into each well and the plate was incubated for a further 24 h at 37 °C. On day 4, each well supernatant was transferred into a black polystyrene plate (Corning® #3915) and measurements were made using a BMG Labtech Fluostar Omega spectrofluorometer at λ_{ex} = 544 nm and λ_{em} = 590 nm.

2.9. Statistical analysis

Data were presented as means ± SE from at least one triplicate run.

IC₅₀ was determined by finding a 4-parameter logistic equation that fitted our inhibition data, using the non-linear least-squares regression analysis feature of the SigmaPlot 12.5 software (Systat Software Inc, San Jose, USA).

3. Results and discussions

The aim of this study was to fractionate heparin and λ-carrageenans to modulate their anticoagulant and antiheparanase activities, using a combination of a physicochemical depolymerization method and chemical modification. The processes applied, alone or in combination, were ultrasonically-assisted radical depolymerization and glycol splitting.

This study takes part of a whole project where other sulfated polysaccharides were tested the same way (κ-Carrageenan; ι-Carrageenan; Fucoidans and Dextran sulfate). As their obtained derivatives showed no relevant bioactivities, only λ-Carrageenan and Heparins are presented here.

3.1. Optimizing λ-carrageenan depolymerization

Depolymerization by means of our radical-assisted ultrasonic method, which produces LMWH from UFH, has already been described and discussed in previous works (Achour et al., 2013, 2016). The present experiment repeated the process on a different batch of heparin. Observations were similar, with the M_n dropping from 16 kDa to 1.9 kDa after 8 h of depolymerization when the previous study had shown a drop from 11 kDa to 3 kDa after 5 h of depolymerization (Achour et al., 2013). The process was then applied to λ-carrageenan. The ultrasonic degradation of macromolecules is mainly attributed to cavitation effects that can induce shear forces in the liquid and break the polymer chains (Grönroos et al., 2001). Moreover, the association of hydrogen peroxide with ultrasounds was found capable of enhancing the production of radicals that attack polysaccharide chains. We thus hypothesized that this method would also be successful concerning λ-carrageenan. As a result, the process did reduce chain length, but we found that conditions needed to be optimized if we wanted to obtain LMW-λ-carrageenans. With a hydrogen peroxide/λ-carrageenan (w/w) ratio of 0.15, the M_n of the initial λ-carrageenan decreased

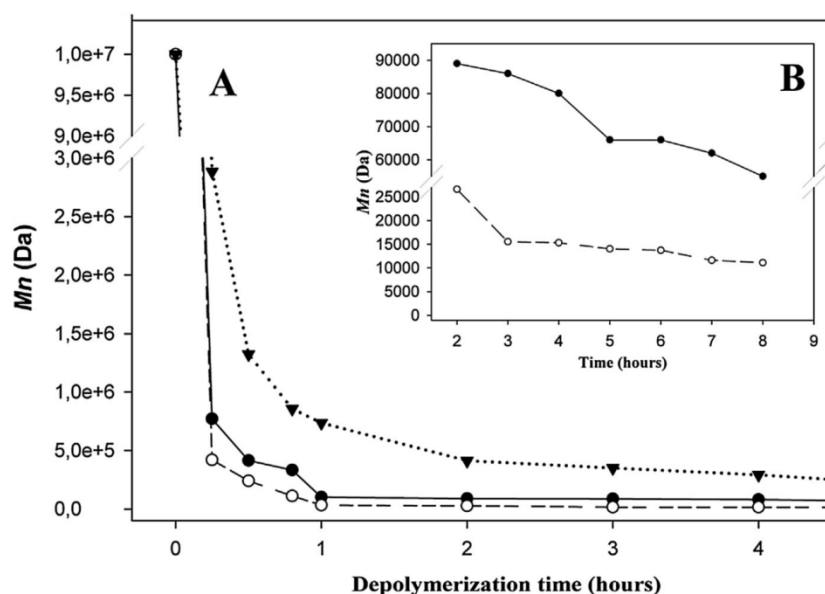


Fig. 2. (A) Effect of the H₂O₂ ultrasonically-assisted radical depolymerization method on λ-carrageenan number-average molecular weight (Mn) with three different concentrations of H₂O₂. (B) Enlarged view showing the most effective depolymerization that was observed after 2–8 h. λ-carrageenan depolymerization in the presence of 0.75 mg/mL of H₂O₂ (▲), 1.5 mg/mL of H₂O₂ (●), and 7.5 mg/mL of H₂O₂ (○).

from over 10 MDa to 150 kDa in 8 h that is still a high molecular weight. We therefore decided to use higher concentrations of hydrogen peroxide to test whether this could improve depolymerization (Fig. 2A). The new hydrogen peroxide/λ-carrageenan ratios achieved were 0.3 and 1.5. In fact, the more hydrogen peroxide we added, the greater the chain length reduction was. The 1.5 ratio enabled us to produce LMW-λ-carrageenans weighing approximately 10 kDa, an acceptable biocompatibility threshold for a potential therapeutic use (Fig. 2B). Moreover, we demonstrated that depolymerization was considerably greater within the first two hours, with a drop from 10 MDa to <100 kDa. During the remaining 6 h, the molecular weight continued to drop, but less significantly. For instance, with a ratio of 1.5, the average molecular weight decreased from 26 kDa to 11 kDa between the 2- and 8-h time points.

These observations differ from those of other experiments performed with an exopolysaccharide (Petit, Noiret, Guezennec, Gondrexon, & Collic-Jouault, 2007) where the addition of hydrogen peroxide had little impact on depolymerization. The composition of this exopolysaccharide included different sugar monomers and uronic acid, all of which most probably impaired depolymerization, particularly compared to the more regular structure of λ-carrageenans which involved galactopyranose disaccharide units (G and D) sulfated in a D2S,6S-G2S pattern.

3.2. Combining depolymerisation with glycol splitting

After having determined the best depolymerization conditions for λ-carrageenans, we tested a combination of depolymerization and glycol splitting to observe its impact on polysaccharide structure.

The glycol-split part involved a NaIO₄ oxidation followed by a NaBH₄ reduction. A controlled use of this technique on heparin has previously been reported (Naggi et al., 2005) and a drastic reduction in anticoagulant activity was evidenced. This chemical modification was also found to enhance antiheparanase activity. Although the use of this process may have dramatic effect on conformational flexibility by the breaking of C–C bond and opening of cycles, we hope

that the increased flexibility will enhance the heparanase binding as hypothesized by Vlodavsky et al. (Vlodavsky et al., 2007).

This led us to investigate the potential modulation of biological activity due to increased λ-carrageenan flexibility resulting from glycol splitting. Using UFH and UF-λ-carrageenans as a starting material, we performed glycol splitting (GS), ultrasonically-assisted radical depolymerization (RD), glycol splitting followed by depolymerization (GS-RD) and depolymerization followed by glycol splitting (RD-GS). Table 1 shows the impact of each method on the number average molecular weight (Mn), the weight average molecular weight (Mw), the polydispersity index (PI), the degree of polymerisation (DP) and the sulfation rate. Results were compared to those obtained with the commercial LMWH, Lovenox®.

UFH and UF-λ-carrageenan starting material had a Mn of respectively 16 kDa and over 5 MDa and their sulfation rate was respectively of 50% and 30.4% (weight sulfate/weight polysaccharide). Glycol splitting induced a slight reduction in molecular weight and sulfation rate for both polysaccharides. The oxidation phase of the reaction was performed overnight in the dark, at a temperature of 4 °C, as described in the literature (Naggi et al., 2005), thus limiting the depolymerization of both UFH and UF-λ-carrageenans.

When subjected to 8 h of ultrasonically-assisted radical depolymerization, the Mn dropped drastically for both polysaccharides tested. It decreased to 1931 Da for RD-heparin and 9676 Da for RD-λ-carrageenans. A loss of sulfation was also observed. In fact, this type of depolymerization is not selective and seems to trigger random scissions of glycosidic linkages. In addition to the cavitation mechanism induced by ultrasounds, polymers in solution can undergo pyrolysis in the interfacial region between the cavities and the surrounding liquid, where temperatures increase transitorily when cavities collapse (Kawasaki, Takeda, & Arakawa, 2007). Consequently, these non-specific mechanisms are capable of cleaving glycosidic bonds as well as sulfate groups.

The combination of the two methods, either GS-RD or RD-GS considerably reduced the sulfation rate of the two polysaccharides. Regarding glycol splitting prior to depolymerization (GS-RD), it seemed to reduce the efficacy of depolymerization, with a resulting

Table 1

Molecular weight and sulfation rate (wt sulfate/wt polysaccharide) of unfractionated (UF) and fractionated heparin and λ -carrageenan using glycol splitting (GS), H_2O_2 catalyzed ultrasonically-assisted depolymerization (RD) and/or a combination of both: (RD-GS) or (GS-RD). Nd, not determined.

	Physicochemical characterization				
	Mn (Da)	Mw (Da)	DP	PI	Sulfation rate%
Enoxaparin (Lovenox [®])	4137	5476	13	1.32	40
UF-Heparin	16,412	20,770	43	1.27	50.0
GS-Heparin	13,272	16,003	38	1.21	45.2
RD-Heparin	1931	3421	7	1.79	28.7
GS-RD-Heparin	4684	6662	15	1.42	37.9
RD-GS-Heparin	2716	3444	10	1.27	28.0
UF- λ -carrageenan	$\leq 10,000,000$	6,054,914	nd	nd	30.4
GS- λ -carrageenan	3,230,538	4,840,866	nd	nd	29.6
RD- λ -carrageenan	9676	14,152	45	1.46	19.8
GS-RD- λ -carrageenan	16,639	29,817	74	1.79	23.2
RD-GS- λ -carrageenan	11,396	17,185	53	1.51	19

Mn slightly superior to that resulting from RD alone. In addition to a small hydrolysis effect, glycol splitting may induce enough minor changes in the chains to disrupt the impact of the ultrasounds, thus impairing depolymerization. Moreover, a study on hyaluronic acid showed that when starting with shorter chains, ultrasonically-assisted depolymerization was less effective (Miyazaki, Yomota, & Okada, 2001). When glycol splitting followed depolymerization (RD-GS), the resulting Mn for both polysaccharides was really close to that achieved with the RD process, even if one could have expected similar or at least shorter chains. Nevertheless, we assumed that the raised Mn values were due to the 1 kDa cutoff dialysis performed after the glycol-split resulting in the elimination of the smallest chains.

Regarding SEC analysis of heparin species (Fig. 3), RD-heparins showed heterogeneous LMW populations with a PI of 1.79 as previously observed (Achour et al., 2016) while RD-GS- or GS-RD-heparins led to more homogeneous profiles with molecular weights close to that of Lovenox[®].

SEC analysis of λ -carrageenan species clearly showed that the use of GS alone did not reduce the chain length efficiently. However, with Mn around 10 kDa and PIs of respectively 1.46 and 1.56, RD- and RD-GS- λ -carrageenan profiles were close to that of Lovenox[®], making them putative biocompatible candidates. Reducing the chain length and the polydispersity of a biopolymer is indeed crucial to better control its pharmacokinetics and side effects (Sundaram et al., 2003).

3.3. Impact of depolymerization methods on coagulation and heparanase activities

The main aim of this study was to determine how the fractionation methods used could modulate the native action of heparin and λ -carrageenans on coagulation process and heparanase enzymatic activity.

The anticoagulant activity was measured using various tests. The APTT for exploring the intrinsic and/or common pathway of coagulation, the PT for exploring the extrinsic pathway of coagulation and the TT for exploring the common pathway of coagulation were assessed using a coagulometer. Values presented (Table 2) correspond to the concentration of heparin and λ -carrageenan derivatives needed to double the coagulation time obtained with control NaCl 0.9%. The inhibition of factors Xa and IIa was measured using a colorimetric enzymatic test and expressed as an IC₅₀.

The inhibition of heparanase was studied using a HTRF test with recombinant heparanase. Compounds were tested at 40 μ g/L with 100 μ g/L of heparanase. The concentration of 400 μ g/L was only tested for RD-GS species.

UFH anticoagulant properties are well known for a century (Torri & Naggi, 2016) and their antiheparanase activity has been

described many years ago (Parish, Freeman, Brown, Francis, & Cowden, 1999). UF- λ -carrageenan anticoagulant properties have been shown in other studies although these properties are less potent than those of heparins (Sokolova et al., 2014). Their anti-heparanase activity is however of high interest: they can inhibit 76% of heparanase while UFH inhibition is of 87% when they are used at the same concentrations. Structural similarities between λ -carrageenans and heparins (Fig. 1) are likely to contribute to this observed inhibition.

When comparing how GS impacted these activities, it clearly had a higher impact on heparins than on λ -carrageenans. As expected, GS induced a loss in heparin anticoagulant activity, mainly through an action on factor Xa, as previously described (Naggi et al., 2005) but no enhancement in heparanase inhibition was observed. Through the opening of non-sulfated iduronic acid rings between the C2 and C3 positions, GS disrupts the heparin pentasaccharide sequence necessary for its binding to antithrombin III and its anti-coagulant activity (Carrell, Skinner, Wardell, & Whisstock, 1995).

Regarding λ -carrageenans, GS did not impair their anticoagulant and antiheparanase activities. Even if depolymerization was observed (Table 1), their 3-linked G2S, 4-linked D2S-6S structure don't allow the opening of galactopyranose rings, so no major changes occurred. Moreover, the Mn remained very high (3.2 MDa) and only 0.8% of the sulfation rate was lost which could explain why no real changes in activities were observed.

When subjected to ultrasonically-assisted radical depolymerization for 8 h, heparin showed a significant loss in anticoagulant activity with a concentration needed to double the coagulation time 50 times higher than that of UFH in APTT and TT tests. The antiheparanase activity also dropped from 83% to 17%. For GS-RD-heparins, a slightly less important loss in anticoagulant activity was observed but the anti-factor Xa activity was more specific, with an IC₅₀ over 1000 times higher than that of UFH. Moreover, an interesting 72.6% inhibition of heparanase was maintained. For RD-GS-heparins, the impact on the common coagulation pathway and on factor IIa specifically was lesser. A concentration of 400 μ g/L was needed to achieve a 61.3% inhibition of heparanase. These results also showed that for heparins, performing glycol splitting prior to depolymerization was more effective to decrease the anti-factor Xa activity than performing depolymerization followed by glycol splitting. Although, RD-GS was more effective to reduce the anti-factor IIa activity and to inhibit the common coagulation pathway. The sulfation loss observed for RD-GS and GS-RD-heparins were respectively 22% and 12%, and between both, GS-RD-heparins had the stronger antiheparanase activity. We hypothesized that this stronger activity could be due to the higher sulfation rate, and a more effective glycol splitting. The presence of longer chains with a Mn of 4800 Da compared to RD-GS-heparins whose Mn was of

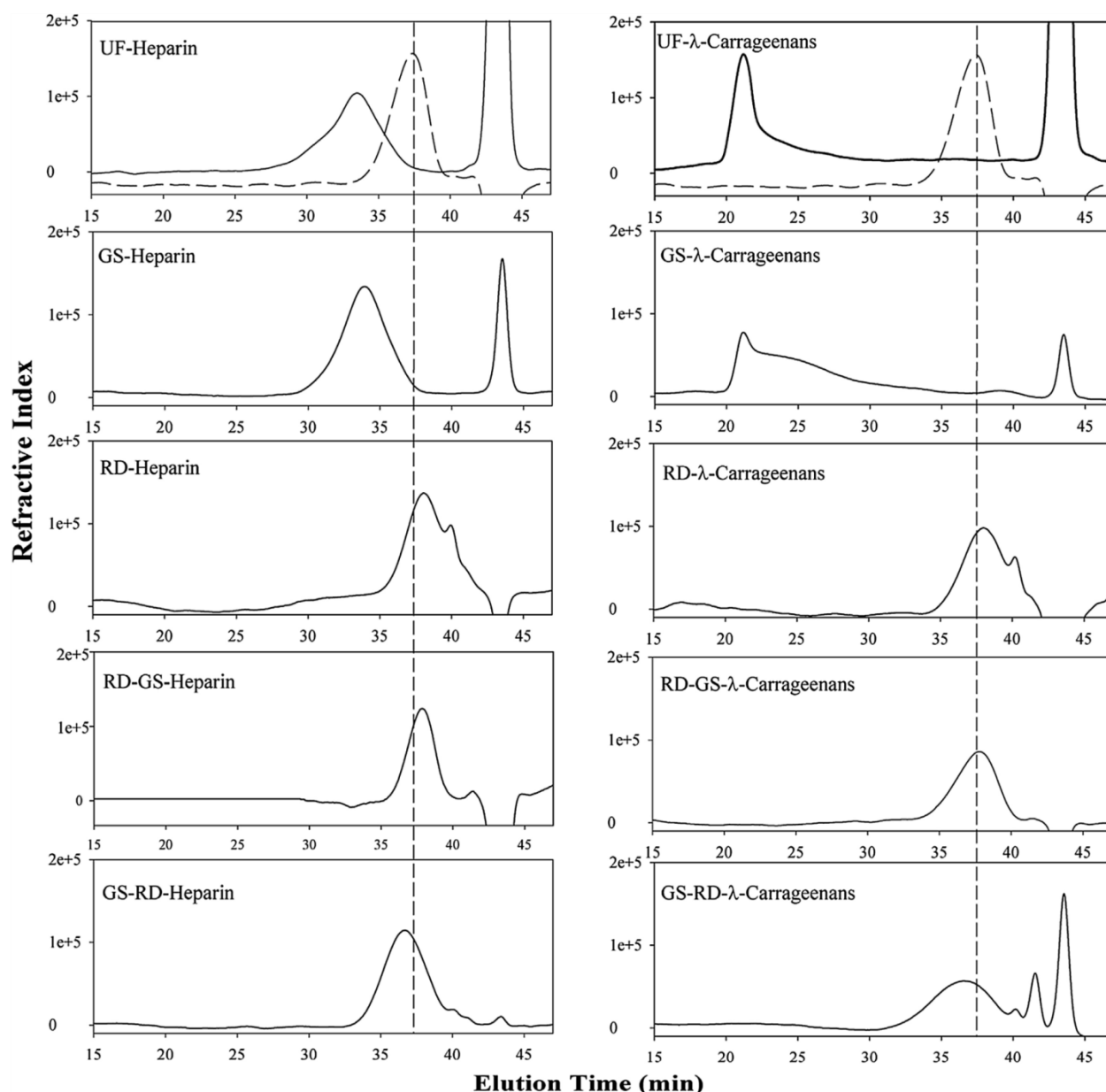


Fig. 3. SEC analysis of heparins and λ -carrageenans before and after different fractionation processes: glycol splitting (GS), ultrasonically-assisted radical depolymerization (RD) and the combination of both. RD-GS meaning depolymerization then glycol splitting, GS-RD meaning glycol splitting then depolymerization. Dashed chromatogram superimposed on UFH and UF- λ -carrageenans corresponds to the chromatogram of Lovenox[®] and the dashed vertical line indicates its elution time. SEC separation was performed on a TSK-GEL G5000PW column in series with a TSK-GEL G4000PW at a flow rate of 0.5 mL/min using 0.1 M sodium nitrate (NaNO₃) as the eluent.

2700 Da also contributed to a better activity against heparanase. This would correlate to the capacity of longer chains to bind two enzymes at the same time as it was discovered recently (Pala et al., 2016). Thus, as the aim of this study was to identify compounds with both a strong antiheparanase activity and a low anticoagulant potential, RD-GS or GS-RD-heparins appeared quite interesting.

Regarding λ -carrageenans, ultrasonically-assisted radical depolymerization did not impair the anticoagulant activity as strongly as for heparins. The higher loss in activity was observed for specific factors and the IC₅₀ measured were respectively 10 and 1000 times higher for factor Xa and factor IIa compared to UF- λ -carrageenans. For RD- λ -carrageenans, the antiheparanase activity was also dramatically reduced. Conversely, GS-RD and

RD-GS- λ -carrageenans still had a good antiheparanase activity with a 45% inhibition. However, the anticoagulant activity of RD-GS- λ -carrageenans was lower with low anti-factor Xa and anti-factor IIa activities and a slight inhibition of the different coagulation pathways. Interestingly, the chain length of DR-GS- λ -carrageenans was similar to that of RD- λ -carrageenans as well as their sulfation rate but the antiheparanase activity was stronger and the anticoagulant activity was lesser. As discussed above, the glycol splitting had probably no impact on UF- λ -carrageenans because their structure contains no vicinal diols making the subsequent opening of a galactopyranose ring quite unlikely. It could be assumed that the loss of about 10,6% in sulfation rate from UF- λ -carrageenans to RD- λ -carrageenans led to free hydroxyl groups

Table 2

Action of fractionated or unfractionated heparins and λ -carrageenan on coagulation process and heparanase activities. The anticoagulant activity was assessed using TT, APTT and TP chronometric tests and the concentrations needed to double the coagulation time were assessed. The anti-factor Xa and anti-factor IIa activities were assessed through binding of antithrombin III using defined IC₅₀. The antiheparanase activity was assessed using 40 μ g/L or 400 μ g/L of polysaccharides and a heparanase concentration of 100 μ g/L. (>) are indicated when the higher concentration induced precipitation or gelling. Nd: not determined. CDT: Concentration needed to double the coagulation time.

	Anti-coagulant activity					Anti-heparanase activity	
	CDT (mg/L)			IC ₅₀ (g/L)		Inhibition 40 μ g/L	Inhibition 400 μ g/L
	TT	APTT	TP	Factor Xa	Factor IIa	Heparanase (100 μ g/L)	
Enoxaparin (Lovenox [®])	9.5	3.5	>83	0.00022	0.07	40.0%	nd
UF-Heparin	0.65	0.6	22	0.0004	0.00002	83.0%	nd
GS-Heparin	1.8	3.5	>83	0.01	0.00062	83.0%	nd
RD-Heparin	30	27	>833	0.001	0.7	17.3%	nd
GS-RD-Heparin	16	24	>833	0.61	0.8	72.6%	nd
RD-GS-Heparin	>125	>16	>833	0.05	>2.5	0%	61.3%
UF- λ -carrageenan	13	8.3	>83	0.01	0.001	69.0%	nd
GS- λ -carrageenan	13	6	>83	0.02	0.003	65%	nd
RD- λ -carrageenan	>12.5	>8	>833	0.12	>0.25	1.0%	nd
GS-RD- λ -carrageenan	35	>83	>833	0.01	0.33	45.0%	nd
RD-GS- λ -carrageenan	105	>83	>833	0.4	>0.25	44.0%	81.0%

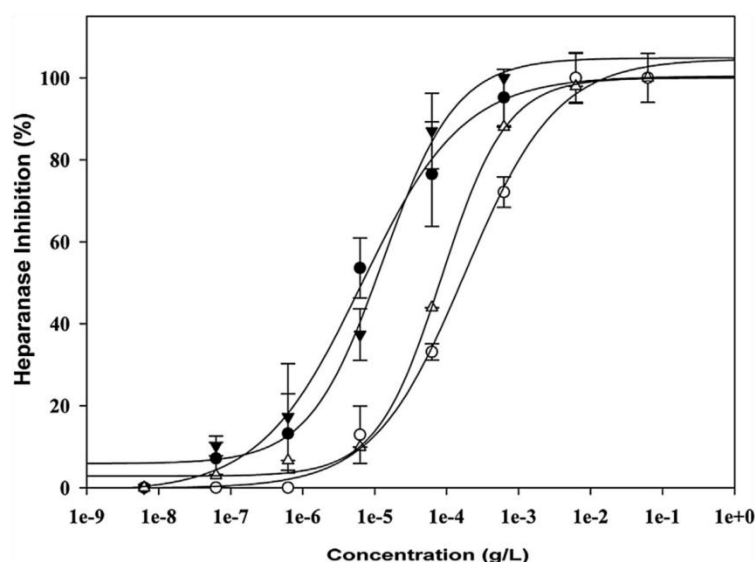


Fig. 4. Dose-response curves obtained for UF-heparin ($\blacktriangledown$), (Lovenox[®]) ($\triangle$), RD-GS-heparin ($\circ$) and RD-GS- λ -carrageenan ($\bullet$) using 100 ng/mL of heparanase, to determine the respective IC₅₀.

(hypothetic D2OH,6S-G2S) on the derivative backbone, thus allowing glycol splitting to generate RD-GS- λ -carrageenan species with some open D2OH,6S-G2S galactopyranose ring. Just like heparins (Vlodavsky et al., 2007), opened rings would produce higher chain flexibility that could account for better interaction with heparanase and subsequent inhibition. RD-GS- λ -carrageenans had the same antiheparanase activity but a close-to-zero anticoagulant activity compared to Lovenox[®].

In an attempt to generate LMW compounds exhibiting low anticoagulant and high antiheparanase activities, RD-GS- λ -carrageenans or RD-GS-heparins would be preferred. However, for cancer patients experiencing hemostasis troubles (Letai & Kuter, 1999), GS-RD- λ -carrageenans or GS-RD-heparins could be envisaged depending on their need for anticoagulants.

Although the use of radical-assisted ultrasonic depolymerization associated (or not) to the glycol-split process helped to modulate the biological activities of heparins and carrageenans in an interesting way, the precise obtained structures that led to these activities were not investigated in the present work.

3.4. Antiheparanase activity and cytotoxicity of RD-GS species

Compounds with an antiheparanase activity are potent anti-angiogenic agents as this enzyme plays an important role in neovascularization (Pisano et al., 2014). We showed that RD-GS- λ -carrageenans or RD-GS-heparins could be interesting angiostatic candidates as they have an interesting antiheparanase activity and a low anticoagulant activity. In anticipation of future antiangiogenic tests, we further investigated their antiheparanase activity and assessed their potential cytotoxicity on the microvascular endothelial cells HsK-MEC (Carreau, Kieda, & Grillon, 2011).

As shown in Fig. 4, the IC₅₀ of RD-GS compounds for heparanase were compared to those of UFH and Lovenox[®]. The results obtained clearly showed two pairing on the curves. The IC₅₀ of UFH and RD-GS- λ -carrageenans were respectively of 10.7 ng/mL and 7.32 ng/mL while the IC₅₀ of Lovenox[®] and RD-GS-heparins were respectively of 82 ng/mL and 147 ng/mL. Thus, the RD-GS process allowed the production of LMW- λ -carrageenan whose antiheparanase activity was similar to that of UFH but with ultra

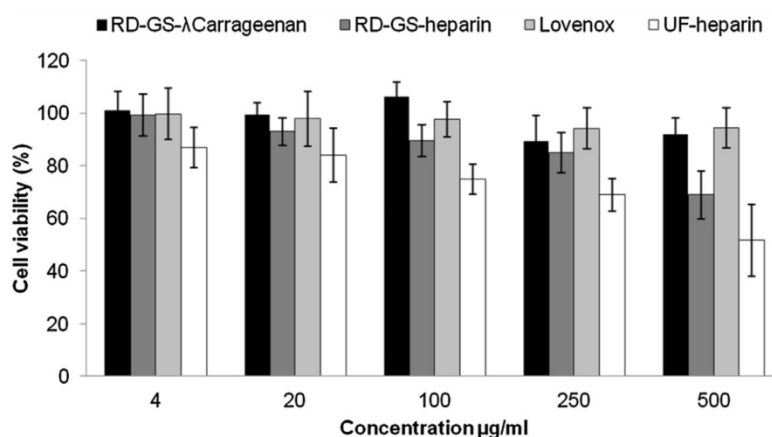


Fig. 5. Viability of HskMEC after incubation with RD-GS-heparins, RD-GS- -carrageenans, UFH and Lovenox[ ]. Cell viability was assessed using the Alamar blue test and calculated as a percentage of unexposed control cells from seven separate experiments.

low anticoagulant potential. Recent studies on heparanase crystal structure with heparin revealed the importance of substrate sulfation pattern for recognition (Wu, Viola, Brzozowski, & Davies, 2015). It has been shown that around the cleavage site, the 2-N sulfation and 6-O sulfation of motifs in –1 and +1 position are mandatory for recognition. This can explain the better inhibition observed for RD-GS- -Carrageenans, possessing a D2S,6S-G2S disaccharides that are certainly well recognized by the enzyme. This suggest that beside a usefull depolymerization effect, RD-GS process did not impair severely the structure of  -Carrageenans. We also produced LMWH whose antiheparanase activity was similar to that of Lovenox[ ], except that their anticoagulant activity was strongly reduced. At the moment, this study does not provide informations about the number of glucuronic acids or iduronic acids in our RD-GS-heparin species. This point would be interesting to further elucidate has iduronic acid are constraint in a skewboat conformation in the active site of heparanase thus acting as competitive inhibitors (Wu et al., 2015).

Finally, we investigated the potential cytotoxicity of the different compounds on the microvascular cell line HskMEC (see Fig. 5). After 48 h of stimulation with UFH, cell viability dropped to 83% when a concentration of 20  g/mL was used and to 51% when a concentration of 500  g/mL was used. Heparin toxicity has already been discussed in other studies (Gurbuz et al., 2013) and our results were not surprising. Regarding RD-GS-heparins, cell viability was less than 85% when a concentration of 250  g/mL was tested. This cell viability was better than the one obtained with UFH and RD-GS-heparins could be of interest for future studies. RD-GS- -carrageenans and Lovenox[ ] had no impact on endothelial cell survival. Combined to their low anticoagulant properties and strong inhibition of heparanase, the new RD-GS- -carrageenans derivatives showed promising results to be further investigated.

4. Conclusion

First, this study showed that using ultrasonically-assisted radical depolymerization allowed the obtention of LMW- -carrageenans and that increasing the dose of hydrogen peroxide helped produce smaller chains. Combining this depolymerization method with glycol splitting was useful as both the anticoagulant and antiheparanase activities were modulated. Performing glycol splitting before depolymerization reduced the efficacy of the depolymerization. Moreover, although the depolymerization induced desulfation, it remains useful for producing RD- -carrageenans as it enhances its sensitivity to glycol splitting.

Second, the RD-GS- or GS-RD-heparins and  -carrageenans produced had an interesting antiheparanase activity and, depending on the process used, the anticoagulant activity could be reduced for specific factors or for an entire coagulation pathway. Then, performing RD-GS and GS-RD allows producing a toolbox of compounds that could be used as an antiheparanase treatment with a potential of adaptation to patients suffering from hemostasis disorders.

Finally, the good candidates produced, i.e. RD-GS- -carrageenans or RD-GS-heparins, had a strong antiheparanase activity with a very low anticoagulant activity. The best compounds seem to be RD-GS- -carrageenans as they had the same antiheparanase potential as UFH but a near-to-zero anticoagulant activity. Moreover, they were not cytotoxic for endothelial cells even at a concentration greater than 500  g/mL.

As a next step to this work, we plan to further investigate the structure of RD-GS species to understand their mechanism of action. In particular determining if the activities are dependant of sulfation patterns, monosaccharide composition or conformation would be of great interest in future drug design. Interactions with other macromolecules such as growth factors should be assessed as well as their in vitro anti-angiogenic properties.

Acknowledgments

This study was supported by a PhD grant from the Ligue Contre le Cancer de Charente-Maritime for N. POUPARD (2014–2017). The Ligue Contre le Cancer de Charente-Maritime is acknowledged for providing financial support through the research project “Conception de nanovecteurs intelligents pour la thérapeutique des tumeurs”. We are also grateful to the La Rochelle hospital that kindly provided us commercial LMWH and to Doctor Catherine Grillon who provided us the microvascular cell line HskMEC.

References

- Abdollahi, A., & Folkman, J. (2010). Evading tumor evasion: Current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. *Drug Resistance Updates*, 13(1–2), 16–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2009.12.001>
- Achour, O., Bridiau, N., Godhmani, A., Le Joubiou, F., Juchereau, S. B., Sannier, F., ... & Maugard, T. (2013). Ultrasonic-assisted preparation of a low molecular weight heparin (LMWH) with anticoagulant activity. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 684–689. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.046>
- Achour, O., Poupard, N., Bridiau, N., Juchereau, S. B., Sannier, F., Piot, J.-M., ... & Maugard, T. (2016). Anti-heparanase activity of ultra-low-molecular-weight heparin produced by physicochemical depolymerization. *Carbohydrate Polymers*, 135, 316–323. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.041>

- Bernfield, M., G tte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., & Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 729–777. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.729>
- Campo, V. L., Kawano, D. F., da Silva, D. B., & Carvalho, I. (2009). Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 167–180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.020>
- Carreau, A., Kieda, C., & Grillon, C. (2011). Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. *Experimental Cell Research*, 317(1), 29–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.08.011>
- Carrell, R., Skinner, R., Wardell, M., & Whistock, J. (1995). Antithrombin and heparin. *Molecular Medicine Today*, 1(5), 226–231. [http://dx.doi.org/10.1016/s1357-4310\(95\)91494-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1357-4310(95)91494-3)
- Chen, H., Yan, X., Lin, J., Wang, F., & Xu, W. (2007). Depolymerized products of lambda-carrageenan as a potent angiogenesis inhibitor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 6910–6917. <http://dx.doi.org/10.1021/jf070183>
- Dorrell, M. I., Aguilar, E., Schepke, L., Barnett, F. H., & Friedlander, M. (2007). Combination angiostatic therapy completely inhibits ocular and tumor angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), 967–972. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0607542104>
- Dredge, K., Hammond, E., Davis, K., Li, C. P., Liu, L., Johnstone, K., ... & Bytheway, I. (2010). The PG500 series: Novel heparan sulfate mimetics as potent angiogenesis and heparanase inhibitors for cancer therapy. *Investigational New Drugs*, 28(3), 276–283. <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-009-9245-5>
- Elkin, M., Ilan, N., Ishai-Michaeli, R., Friedmann, Y., Papo, O., Pecker, I., & Vlodavsky, I. (2001). Heparanase as mediator of angiogenesis: Mode of action. *FASEB Journal*, 15(9), 1661–1663.
- Esch, F., Baird, A., Ling, N., Ueno, N., Hill, F., Denoroy, L., ... & Guillemin, R. (1985). Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(19), 6507–6511.
- Ferrara, N., & Henzel, W. J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 161(2), 851–858.
- Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annual Review of Medicine*, 57(1), 1–18. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.57.1.1>
- Folkman, J. (2008). History of angiogenesis. In W. D. Figg, & J. Folkman (Eds.), *Angiogenesis* (pp. 1–14). Boston, MA: Springer US. Retrieved from: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-71518-6_1
- Grönroos, A., Pirkonen, P., Heikkinen, J., Ihalainen, J., Mursunen, H., & Sekki, H. (2001). Ultrasonic depolymerization of aqueous polyvinyl alcohol. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 259–264. [http://dx.doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00086-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00086-4)
- Guerrini, M., Shriver, Z., Bisio, A., Naggi, A., Casu, B., Sasisekharan, R., & Torri, G. (2009). The tainted heparin story: An update. *Thrombosis and Haemostasis*, 102(5), 907–911. <http://dx.doi.org/10.1160/th09-02-0079>
- Gurbuz, H. A., Durukan, A. B., Sevim, H., Ergin, E., Gurbuz, A., & Yorgancioglu, C. (2013). Heparin toxicity in cell culture: A critical link in translation of basic science to clinical practice. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 24(7), 742–745. <http://dx.doi.org/10.1097/mbc.0b013e3283629bbc>
- Hirsh, J., & Levine, M. N. (1992). Low molecular weight heparin. *Blood*, 79(1), 1–17.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., & Ewart, H. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs*, 9(12), 196–223. <http://dx.doi.org/10.3390/md9020196>
- Kawasaki, H., Takeda, Y., & Arakawa, R. (2007). Mass spectrometric analysis for high molecular weight synthetic polymers using ultrasonic degradation and the mechanism of degradation. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4182–4187. <http://dx.doi.org/10.1021/ac062304v>
- Klein, M. D., Drongowski, R. A., Linhardt, R. J., & Langer, R. S. (1982). A colorimetric assay for chemical heparin in plasma. *Analytical Biochemistry*, 124(1), 59–64. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90219-6](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(82)90219-6)
- Kudchadkar, R., Gonzalez, R., & Lewis, K. D. (2008). PI-88: A novel inhibitor of angiogenesis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17(11), 1769–1776. <http://dx.doi.org/10.1517/13543784.17.11.1769>
- Letai, A., & Kuter, D. J. (1999). Cancer, coagulation, and anticoagulation. *The Oncologist*, 4(6), 443–449.
- Liu, J., Zhan, X., Wan, J., Wang, Y., & Wang, C. (2015). Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features versus adverse biological effects. *Carbohydrate Polymers*, 121, 27–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.063>
- Miyazaki, T., Yomota, C., & Okada, S. (2001). Ultrasonic depolymerization of hyaluronic acid. *Polymer Degradation and Stability*, 74(1), 77–85. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-3910\(01\)00104-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-3910(01)00104-5)
- Mulloy, B., & Hogwood, J. (2015). Chromatographic molecular weight measurements for heparin, its fragments and fractions, and other glycosaminoglycans. In K. Balagurunathan, H. Nakato, & U. R. Desai (Eds.), *Glycosaminoglycans* (Vol. 1229) (pp. 105–118). New York, NY: Springer New York. Retrieved from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1714-3_11
- Naggi, A., Casu, B., Perez, M., Torri, G., Cassinelli, G., Penco, S., ... & Vlodavsky, I. (2005). Modulation of the heparanase-inhibiting activity of heparin through selective desulfation, graded N-acetylation, and glycol splitting. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12103–12113. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M414217200>
- Niu, T.-T., Zhang, D.-S., Chen, H.-M., & Yan, X.-J. (2015). Modulation of the binding of basic fibroblast growth factor and heparanase activity by purified lambda-carrageenan oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 125, 76–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.069>
- Pala, D., Rivara, S., Mor, M., Milazzo, F. M., Roscilli, G., Pavoni, E., & Giannini, G. (2016). Kinetic analysis and molecular modeling of the inhibition mechanism of roneparstat (SST0001) on human heparanase. *Glycobiology*, 26(6), 640–654. <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cww003>
- Parish, C. R., Freeman, C., Brown, K. J., Francis, D. J., & Cowden, W. B. (1999). Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity. *Cancer Research*, 59(14), 3433–3441.
- Parish, C. R., Freeman, C., & Hulett, M. D. (2001). Heparanase: A key enzyme involved in cell invasion. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1471(3), M99–M108.
- Petit, A.-C., Noiret, N., Guezennec, J., Gondrexon, N., & Collic-Jouault, S. (2007). Ultrasonic depolymerization of an exopolysaccharide produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(2), 107–112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.03.010>
- Pisano, C., Vlodavsky, I., Ilan, N., & Zunino, F. (2014). The potential of heparanase as a therapeutic target in cancer. *Biochemical Pharmacology*, 89(1), 12–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2014.02.010>
- Ritchie, J. P., Ramani, V. C., Ren, Y., Naggi, A., Torri, G., Casu, B., ... & Yang, Y. (2011). SST0001, a chemically modified heparin, inhibits myeloma growth and angiogenesis via disruption of the heparanase/syndecan-1 axis. *Clinical Cancer Research*, 17(6), 1382–1393. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2476>
- Shanmugam, M., & Mody, K. (2000). Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current Science*, 79(12), 1672–1683.
- Silva, F. R. F., Dore, C. M. P. G., Marques, C. T., Nascimento, M. S., Benevides, N. M. B., Rocha, H. A. O., ... & Leite, E. L. (2010). Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 26–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.010>
- Sokolova, E. V., Byankina, A. O., Kalitnik, A. A., Kim, Y. H., Bogdanovich, L. N., Solov'eva, T. F., & Yermak, I. M. (2014). Influence of red algal sulfated polysaccharides on blood coagulation and platelets activation in vitro: Influence of Red Algal Sulfated Polysaccharides. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(5), 1431–1438. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.34827>
- Sundaram, M., Qi, Y., Shriver, Z., Liu, D., Zhao, G., Venkataraman, G., ... & Sasisekharan, R. (2003). Rational design of low-molecular weight heparins with improved in vivo activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(2), 651–656. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.252643299>
- Szajek, A. Y., Chess, E., Johansen, K., Gratzl, G., Gray, E., Keire, D., ... & Al-Hakim, A. (2016). The US regulatory and pharmacopeia response to the global heparin contamination crisis. *Nature Biotechnology*, 34(6), 625–630. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3606>
- Torri, G., & Naggi, A. (2016). Heparin centenary – An ever-young life-saving drug. *International Journal of Cardiology*, 212, S1–S4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5273\(16\)12001-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5273(16)12001-7)
- Vlodavsky, I., Ilan, N., Nadir, Y., Brenner, B., Katz, B.-Z., Naggi, A., ... & Sasisekharan, R. (2007). Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer progression. *Thrombosis Research*, 120(Suppl. 2), S112–S120. [http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848\(07\)70139-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(07)70139-1)
- Wu, L., Viola, C. M., Brzozowski, A. M., & Davies, G. J. (2015). Structural characterization of human heparanase reveals insights into substrate recognition. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(12), 1016–1022. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.3136>
- Yamada, T., Ogamo, A., Saito, T., Watanabe, J., Uchiyama, H., & Nakagawa, Y. (1997). Preparation and anti-HIV activity of low-molecular-weight carrageenans and their sulfated derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 32(1), 51–55. [http://dx.doi.org/10.1016/s0144-8617\(96\)00128-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0144-8617(96)00128-2)
- Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., & Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407(6801), 242–248. <http://dx.doi.org/10.1038/35025215>

3.4. Analyse structurale par UHPLC-MS des carraghénanes-λ-DR et DR-GS

Afin de compléter les travaux présentés dans l'article publié dans le journal *Carbohydrate polymer*, et notamment concernant l'effet du procédé de glycol-split sur le carraghénane-λ, nous avons réalisé des analyses par chromatographie liquide d'ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-MS).

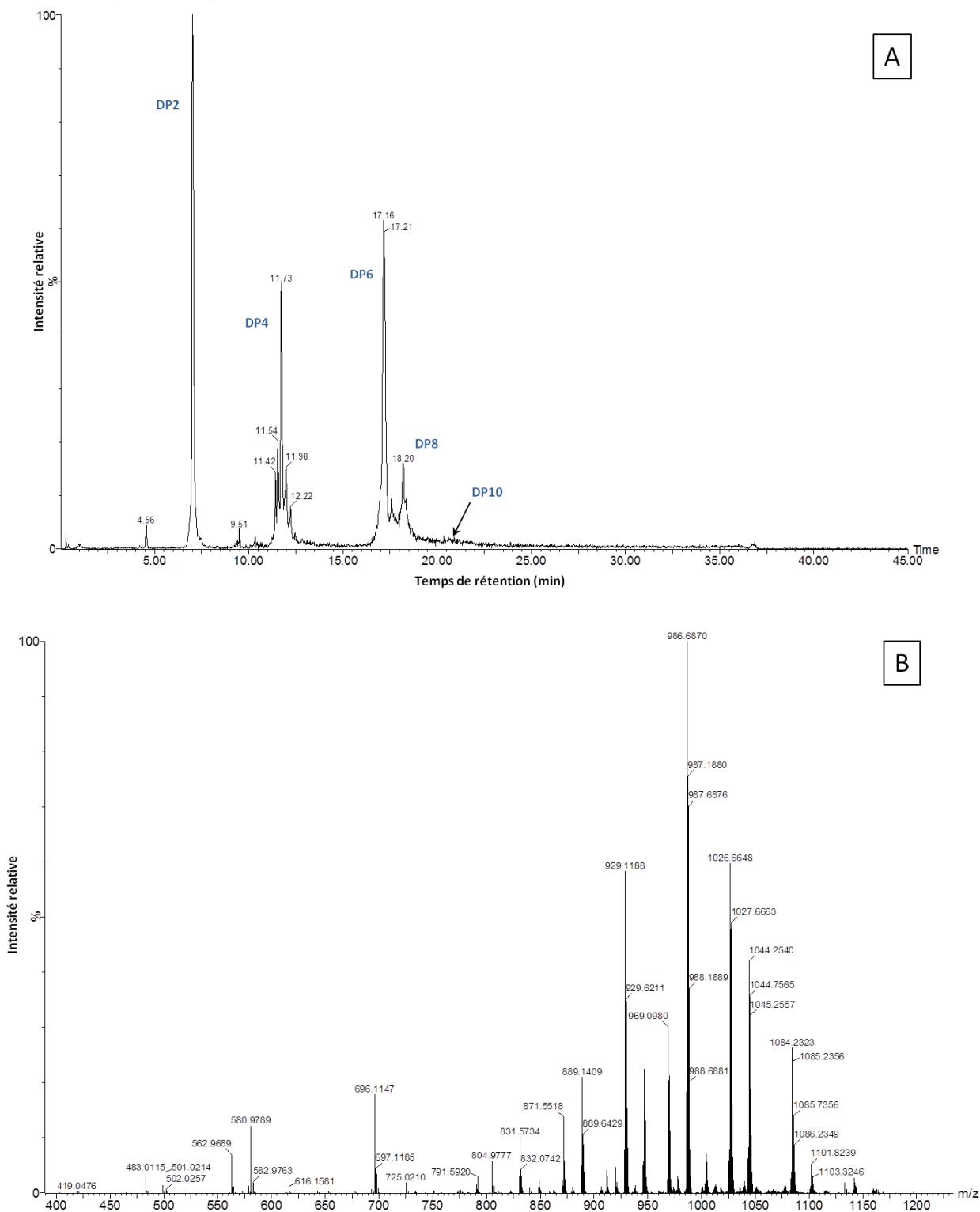
Ces expériences de MS ont été effectuées sur les carraghénanes-λ-DR et carraghénanes-λ-DR-GS à l'aide d'une source d'ionisation par électrospray (ESI). La méthode utilisée a permis de caractériser des enchaînements oligosaccharidiques de degrés de polymérisation allant jusqu'à 10, présentés **figures 47**. Le poids moléculaire moyen en nombre évalué par SEC-HPLC pour ces deux mélanges de carraghénanes-λ étant autour de 10 kDa, des enchaînements plus longs sont présents en solution mais sont probablement très difficiles à ioniser par méthode ESI, et par conséquent difficiles à détecter.

3.4.1. *Analyses du carraghénane-λ-DR*

Les premières analyses effectuées sur le carraghénane-λ-DR présentées **figure 47-A** et **tableau 10** ont mis en évidence qu'un mélange hétérogène d'espèces de degrés de polymérisation allant de 2 à 10 était présent en solution. Dans le même temps l'analyse MS-MS réalisée sur le carraghénane-λ-DR de DP6 (**figure 47-B**) ainsi que l'analyse de fragmentations ayant eu lieu dans la source de l'appareil (**figure 47-C**) ont permis de confirmer la structure de base du carraghénane-λ soit l'enchaînement de disaccharides D2S,6S-G2S (**revoir Figure 30**). L'analyse MS-MS d'un DP6 montre en effet des pertes de fonctions sulfates, des pertes de contre-ions heptylammonium puis la perte d'un fragment important correspondant à un carraghénane-λ de DP4. Une perte de 9 fonctions sulfate est observée au cours de la fragmentation MS-MS ce qui correspond bien au nombre de fonctions sulfate d'un carraghénane-λ de DP6. Les pertes de fonctions sulfates ont été détectées par une perte d'ion (SO₃⁻)(**tableau 10**). Cela suggère que le carbone initialement porteur de la fonction sulfate porte désormais une fonction alcool.

En s'appuyant sur des travaux effectués par Antonopoulos *et al* (Antonopoulos et al., 2005), l'étude approfondie du spectre total a révélé la présence d'ions correspondant à des espèces assimilables à des carraghénanes-ι ou κ. Ces espèces correspondent très probablement à des chaînes de carraghénane-λ ayant perdu des fonctions sulfates lors de la dépolymérisation radicalaire assistée par ultrasons, ce qui corrèle avec la perte de sulfatation proche de 10%

observée par le dosage à l'azure A. La perte de fonctions sulfates observable avec la spectrométrie de masse est majoritairement accompagnée d'une perte des contre-ions heptylammonium. Cette perte de sulfate est illustrée (**figure 47-D**) avec l'exemple du DP6 mais a été observée de manière plus ou moins abondante sur tous les DP analysés.



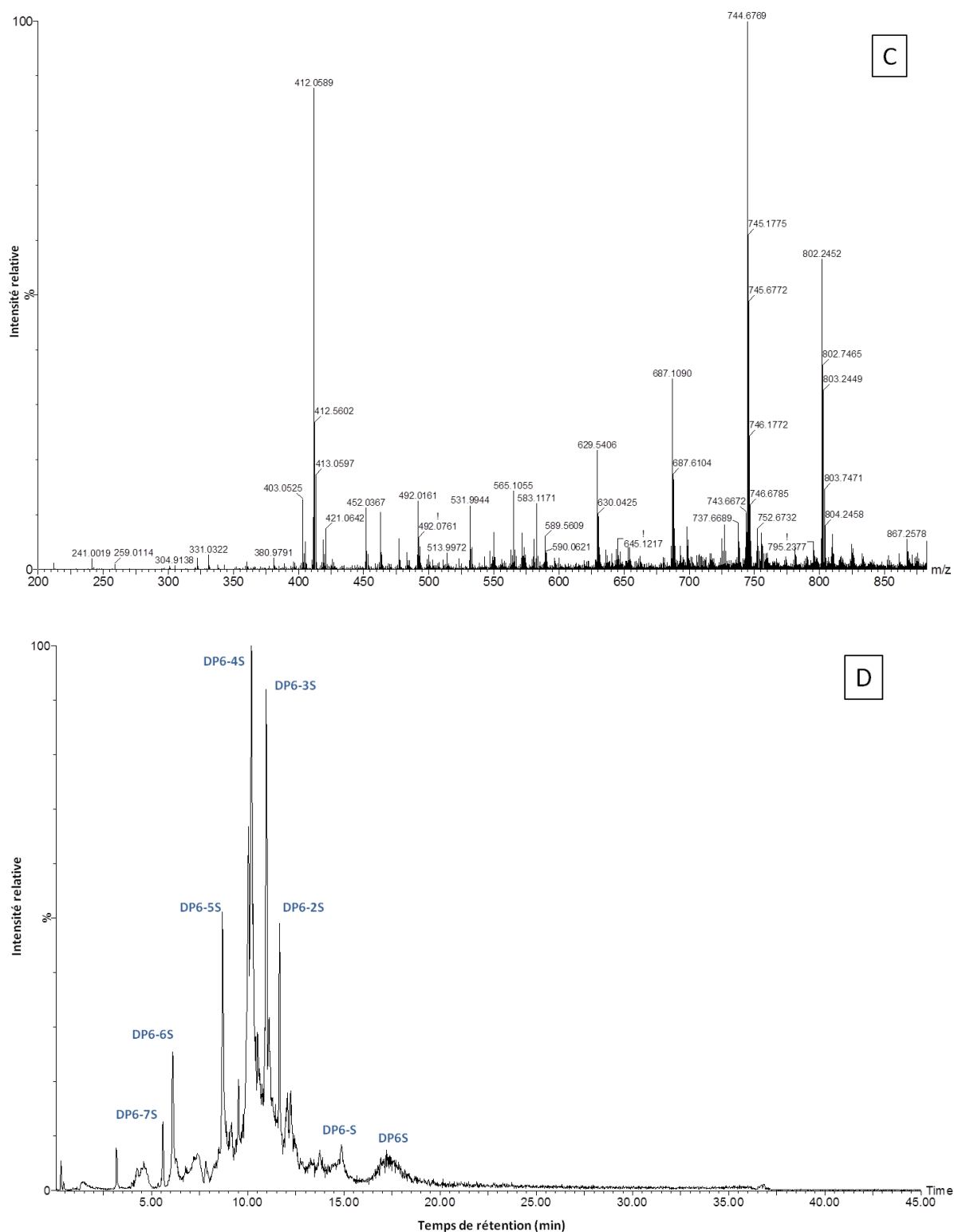


Figure 47 : Spectre LC-MS du carraghénane-à-DR montrant les DP de 2 à 10 identifiés par les ions (m/z) indiqués tableau 10 (A), Spectre MS/MS du DP6 par fragmentation de l'ion (m/z) 1256,9373 (B), fragmentation dans la source observée pour l'ion (m/z) 802,2457 correspondant au DP4 (C) Spectre LC-MS montrant les dérivés du DP6 ayant perdu des fonctions sulfates pendant la dépolymérisation dont les ions sont répertorié tableau 10 (D)

Tableau 10 : Analyse du Carraghénane- λ -DR par ESI-UHPLC-MS. Confirmation de la structure D2S,6S-G2S par les pics extraits du spectre total, l'analyse MS-MS de l'ion 1256,9373 correspondant au DP6 ainsi que de la fragmentation dans la source observée pour le DP4 et identifications de dérivés désulfatés dans le mélange avec l'exemple du DP6.

Identification des ions correspondants aux différents DP du Carraghénane- λ -DR (spectre A)					
Temps rétention (min)	(m/z) mesurée	Résolution (ppm)	adduit	formule brute	Degré de polymérisation
7,05	696,1147	0,40	$[(D2S,6S-G2S) + (C_7H_{15}NH_3^+) + H]^+$	$[C_{19}H_{38}NO_{20}S_3]^+$	DP2
	811,251	0,09	$[(D2S,6S-G2S) + (C_7H_{15}NH_3^+)_2]^+$	$[C_{26}H_{55}N_2O_{20}S_3]^+$	DP2
11,73	744,6761	2,12	$[(D2S,6S-G2S)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_3 + H]^+$	$[C_{45}H_{91}N_3O_{39}S_6]^+$	DP4
	802,2459	0,22	$[(D2S,6S-G2S)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_4]^+$	$[C_{52}H_{108}N_4O_{39}S_6]^+$	DP4
	1720,635	0,22	$[(D2S,6S-G2S)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_5]^+$	$[C_{59}H_{126}N_5O_{39}S_6]^+$	DP4
17,23	1199,3683	1,31	$[(D2S,6S-G2S)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_6 + H]^+$	$[C_{78}H_{162}N_6O_{58}S_9]^+$	DP6
	1256,9373	0,50	$[(D2S,6S-G2S)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_7]^+$	$[C_{85}H_{179}N_7O_{58}S_9]^+$	DP6
18,19	1102,3687	3,09	$[(D2S,6S-G2S)_4 + (C_7H_{15}NH_3^+)_9]^+$	$[C_{111}H_{232}N_9O_{77}S_{12}]^+$	DP8
20,8	1405,1643	0,01	$[(D2S,6S-G2S)_5 + (C_7H_{15}NH_3^+)^{3+}]^{3+}$	$[C_{144}H_{302}N_{12}O_{96}S_{15}]^{3+}$	DP10
Analyse MS/MS du DP6 (spectre B)					
Temps rétention (min)	(m/z) mesurée	Résolution (ppm)	adduit	formule brute	Fragments perdus par l'ion parent
15 à 17,7	1084,2323	1,36	$[(D2S6S-G2S)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_4 + 3H]^+$	$[C_{64}H_{128}N_4O_{58}S_9]^+$	3 heptylamines
	1044,254	1,32	$[(D2S6S-G2S)_3 - SO_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_4 + 3H]^+$	$[C_{64}H_{128}N_4O_{55}S_8]^+$	3 heptylamines et 1 SO ₃
	1026,6648	0,90	$[(D2S6S-G2S)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_3 + 4H]^+$	$[C_{57}H_{111}N_3O_{58}S_9]^+$	4 heptylamines
	986,687	0,33	$[(D2S6S-G2S)_3 - SO_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_3 + 4H]^+$	$[C_{57}H_{111}N_3O_{55}S_8]^+$	4 heptylamines et SO ₃
	969,098	0,34	$[(D2S6S-G2S)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_2 + 5H]^+$	$[C_{50}H_{94}N_2O_{58}S_9]^+$	5 heptylamines
	946,7088	0,13	$[(D2S6S-G2S)_3 - 2SO_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_3 + 4H]^+$	$[C_{57}H_{111}N_3O_{52}S_7]^+$	4 heptylamines et 2 SO ₃
	929,1188	0,51	$[(D2S6S-G2S)_3 - SO_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_2 + 5H]^+$	$[C_{50}H_{94}N_2O_{55}S_8]^+$	5 heptylamines et 1 SO ₃
	889,1409	0,03	$[(D2S6S-G2S)_3 - 2SO_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_2 + 5H]^+$	$[C_{50}H_{94}N_2O_{52}S_7]^+$	5 heptylamines et 2 SO ₃
	871,5518	0,66	$[(D2S6S-G2S)_3 - SO_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_6 + H]^+$	$[C_{43}H_{77}NO_{55}S_8]^+$	6 heptylamines et 1 SO ₃
	831,5734	0,69	$[(D2S6S-G2S)_3 - 2SO_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_6 + H]^+$	$[C_{43}H_{77}NO_{52}S_7]^+$	6 heptylamines et 2 SO ₃
	791,592	3,06	$[(D2S6S-G2S)_3 - 3SO_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_6 + H]^+$	$[C_{43}H_{77}NO_{49}S_6]^+$	6 heptylamines et 3 SO ₃
	696,1147	0,40	$[(D2S6S-G2S) + (C_7H_{15}NH_3^+) + H]^+$	$[C_{19}H_{38}NO_2O_3S_3]^+$	6 heptylamines + 2 unités (D2S,6S-G2S)
	580,9789	0,04	$[(D2S6S-G2S) - SO_3 + 2H]^+$	$[C_{12}H_{21}O_{20}S_3]^+$	7 heptylamines + 2 unités (D2S,6S-G2S)
	501,0214	1,15	$[(D2S6S-G2S) - SO_3 + (C_7H_{15}NH_3^+) + H]^+$	$[C_{12}H_{21}O_{17}S_2]^+$	7 heptylamines + SO ₃ + 2 unités (D2S,6S-G2S)
	421,0641	2,55	$[(D2S6S-G2S) - SO_3 + (C_7H_{15}NH_3^+) + H]^+$	$[C_{12}H_{21}O_{14}S]^+$	7 heptylamines + 2SO ₃ + 2 unités (D2S,6S-G2S)
Fragmentations observées du DP4 dans la source (Spectre C)					
Temps rétention (min)	(m/z) mesurée	Résolution (ppm)	adduit	formule brute	Fragments perdus par l'ion parent
11,73	802,2459	0,22	$[(D2S,6S-G2S)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_4]^+$	$[C_{52}H_{108}N_4O_{39}S_6]^+$	-
	744,6769	1,04	$[(D2S,6S-G2S)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_3 + H]^+$	$[C_{45}H_{91}N_3O_{39}S_6]^+$	1 Heptylamine
	687,109	0,91	$[(D2S,6S-G2S)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_2 + 2H]^+$	$[C_{38}H_{74}N_2O_{39}S_6]^+$	2 Heptylamines
	629,5406	1,55	$[(D2S,6S-G2S)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_3 + 3H]^+$	$[C_{31}H_{57}NO_{39}S_6]^+$	3 Heptylamines
	571,9723	2,14	$[(D2S,6S-G2S)_2 + 4H]^+$	$[C_{24}H_{40}O_{39}S_6]^+$	4 Heptylamines
	531,9944	1,36	$[(D2S,6S-G2S)_2 + 4H - SO_3]^+$	$[C_{24}H_{40}O_{36}S_5]^+$	4 Heptylamines + 1 SO ₃
	492,0161	1,27	$[(D2S,6S-G2S)_2 + 4H - 2SO_3]^+$	$[C_{24}H_{40}O_{33}S_4]^+$	4 Heptylamines + 2 SO ₃

	452,0367	3,59	$[(D2S,6S-G2S)_2 + 4H - 3SO_3]^{2-}$	$[C_{24}H_{40}O_{30}S_3]^{2-}$	4 Heptylaminse + 3 SO ₃
	412,0599	0,06	$[(D2S,6S-G2S)_2 + 4H - 4SO_3]^{2-}$	$[C_{24}H_{40}O_{27}S_2]^{2-}$	4 Heptylaminse + 4 SO ₃
Identification des espèces désulfatées issues du DP6 du Carraghénane-λ-DR (spectre D)					
Temps rétention (min)	(m/z) mesurée	Résolution (ppm)	adduit	formule brute	Espèces désulfatées identifiées
17,23	1256,9373	0,50	$[(D2S6S-G2S)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_7]^{2-}$	$[C_{85}H_{179}N_7O_{58}S_9]^{2-}$	DP6
17,23	1199,3683	1,31	$[(D2S6S-G2S)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_6 + H]^{2-}$	$[C_{78}H_{162}N_6O_{58}S_9]^{2-}$	DP6
14,86	1158,3818	1,62	$[(D2S,6S-G2S)_3 - (SO_3) + (C_7H_{15}NH_3^+)_5 - H]^{2-}$	$[C_{78}H_{162}N_6O_{55}S_8]^{2-}$	DP6 - SO ₃
11,62	1060,8357	1,44	$[(D2S,6S-G2S)_3 - (SO_3)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_5 + 2H]^{2-}$	$[C_{71}H_{145}N_5O_{52}S_7]^{2-}$	DP6 - 2SO ₃
10,97	954,2845	1,02	$[(D2S,6S-G2S)_3 - (SO_3)_3 - (H_2O)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_4 + 3H]^{2-}$	$[C_{64}H_{124}N_4O_{48}S_6]^{2-}$	DP6 - 3SO ₃
10,97	937,281	1,84	$[(D2S,6S-G2S)_3 - (SO_3)_3 - (H_2O)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_4 + 3H]^{2-}$	$[C_{64}H_{122}N_4O_{46}S_6]^{2-}$	DP6 - 3SO ₃
10,17	856,7391	0,09	$[(D2S,6S-G2S)_3 - (SO_3)_4 - (H_2O)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_3 + 4H]^{2-}$	$[C_{57}H_{107}N_3O_{45}S_5]^{2-}$	DP6 - 4SO ₃
10,17	847,7332	0,62	$[(D2S,6S-G2S)_3 - (SO_3)_4 - (H_2O)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_3 + 4H]^{2-}$	$[C_{57}H_{105}N_3O_{44}S_5]^{2-}$	DP6 - 4SO ₃
8,69	742,1884	1,92	$[(D2S,6S-G2S)_3 - (SO_3)_5 - (H_2O)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_2 + 5H]^{2-}$	$[C_{50}H_{88}N_2O_{40}S_4]^{2-}$	DP6 - 5SO ₃
8,69	684,6224	0,91	$[(D2S,6S-G2S)_3 - (SO_3)_5 - (H_2O)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_2 + 6H]^{2-}$	$[C_{43}H_{71}NO_{40}S_4]^{2-}$	DP6 - 5SO ₃
6,1	1405,4318	0,80	$[(D2S,6S-G2S)_3 - (SO_3)_6 - (H_2O)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_2 + 6H]^{2-}$	$[C_{50}H_{89}N_2O_{37}S_3]^{2-}$	DP6 - 6SO ₃
6,1	644,6434	0,04	$[(D2S,6S-G2S)_3 - (SO_3)_6 - (H_2O)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_2 + 6H]^{2-}$	$[C_{43}H_{71}NO_{37}S_3]^{2-}$	DP6 - 6SO ₃
5,59	547,0961	1,42	$[(D2S,6S-G2S)_3 - (SO_3)_7 - (H_2O)_3 + 7H]^{2-}$	$[C_{36}H_{54}O_{34}S_2]^{2-}$	DP6 - 7SO ₃

Le carraghénane-λ-DR correspondrait donc à un mélange hétérogène de chaînes de carraghénane-λ plus ou moins désulfatées. De plus, parmi les espèces ayant perdu des fonctions (SO₃⁻), certaines perdent semblent perdre la totalité de la fonction sulfate soit (SO₄²⁻). Cela pourrait s'expliquer par la cyclisation intramoléculaire illustrée (**figure 48-a**) du fragment D2S,6S entre les carbones C3 et C6 formant un anhydrogalactose, induisant alors une perte totale de la fonction sulfate en position C6. Les chaînes pourraient alors comporter des zones avec des structures de types carraghénane-θ (**figure 48-b**). Pendant notre étape de DR, la solution est portée à 60°C par l'énergie de la sonde à ultrason et des ions hydroxyde peuvent être formés par la dissociation du peroxyde d'hydrogène ce qui pourrait alors favoriser cette cyclisation (Ciancia et al., 1993)(**figure 48-a**). Ce phénomène est particulièrement intéressant car la présence de potentielles structures de type carraghénane-θ au sein de la structure majoritaire de carraghénane-λ implique très certainement des changements de conformations dus à une répulsion différente entre les fonctions sulfates (Doyle et al., 2010). Ces changements de conformations participent probablement à la perte de l'inhibition de la coagulation sanguine ainsi que de l'héparanase observée pour le carraghénane-λ-DR, comparé au carraghénane-λ-NF, mais l'étude structurale actuelle ne permet pour le moment pas d'évaluer cet impact.

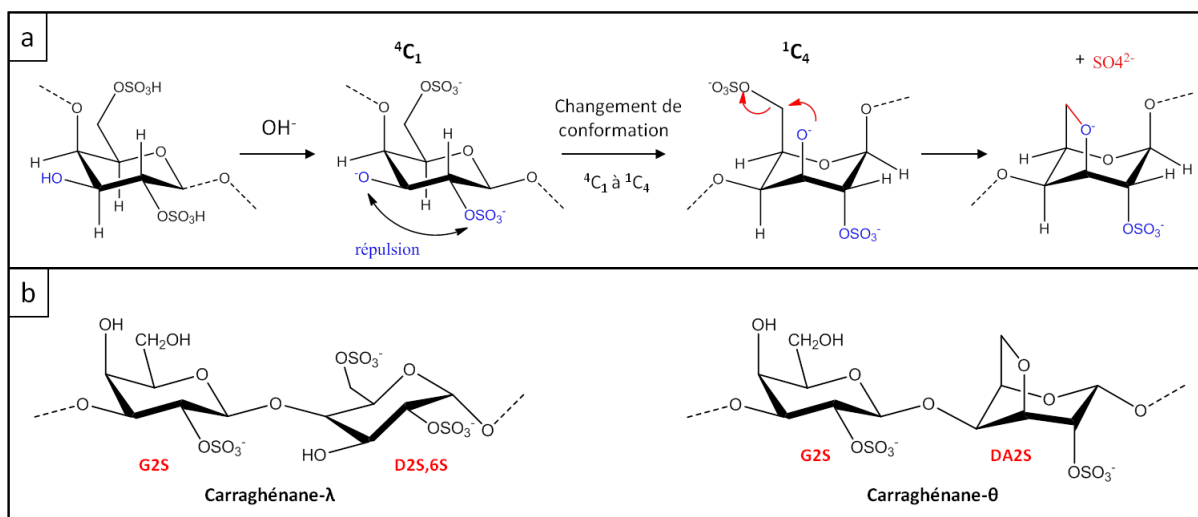


Figure 48 : Mécanisme de cyclisation intramoléculaire aboutissant à l’anhydroglucose d’après (Ciancia et al ,1993)
(a), Structure des carraghénane-à et -   (b).

3.4.2. Analyses du carraghénane-à-DR-GS

Les analyses en LC-MS se sont ensuite portées sur le carraghénane-à-DR-GS, qui par rapport au carraghénane-à-DR, a subi une étape de glycol split (**voir figure 49 et tableau 11**). Dans un premier temps, une population allant de DP-2    DP-10 a pu être détectée (**figure 49 A**) de la même manière que pour le carraghénane-à-DR. Puis l’analyse plus poussée du spectre total a permis d’identifier des pertes de soufre analogues à celles observées pour le carraghénane-à-DR ainsi qu’un gain de deux ou quatre hydrogènes qui indique que la réaction de glycol split a bien eu lieu (**figure 49 B**). En effet, l’ouverture de cycles comportant des diols vicinaux fait passer deux fonctions alcools secondaires en fonctions alcool primaires, induisant ainsi un gain de 2 hydrogènes par ouverture de cycle. L’exemple est pris (**figure 49 B**) pour les DP-4 et DP-6 ou les pertes de soufre sont visibles ainsi que les ouvertures de cycles indiquées par les "split". Le nombre de splits observés est au maximum de deux. Il peuvent être observés tant sur des chaînes ayant perdu des fonctions sulfates que sur des chaînes non altérées comme on peut le voir sur l’analyse du carraghénane-à-DR-GS DP-4 (**figure 49 B**).

L’intérêt du glycol split est d’apporter un gain de flexibilité des chaînes par l’ouverture de cycles pyranosiques. Cependant, dans notre étude, seules les héparines et chondro  itines-4-sulfate possèdent des monosaccharides porteurs de diols vicinaux sensibles au glycol split. Nous avons alors émis l’hypothèse que la perte de fonctions sulfates pourrait créer des diols vicinaux (**illustrée figure 50**) sur la structure native des autres polysaccharides, dont le carraghénane-à. Ces analyses en LC-MS semblent pour le moment infirmer cette hypothèse, du fait que les splits soient observés même sur des structures non désulfatées (illustré par les

pics observés DP4-1split et DP4-2split **figure 49 B**).

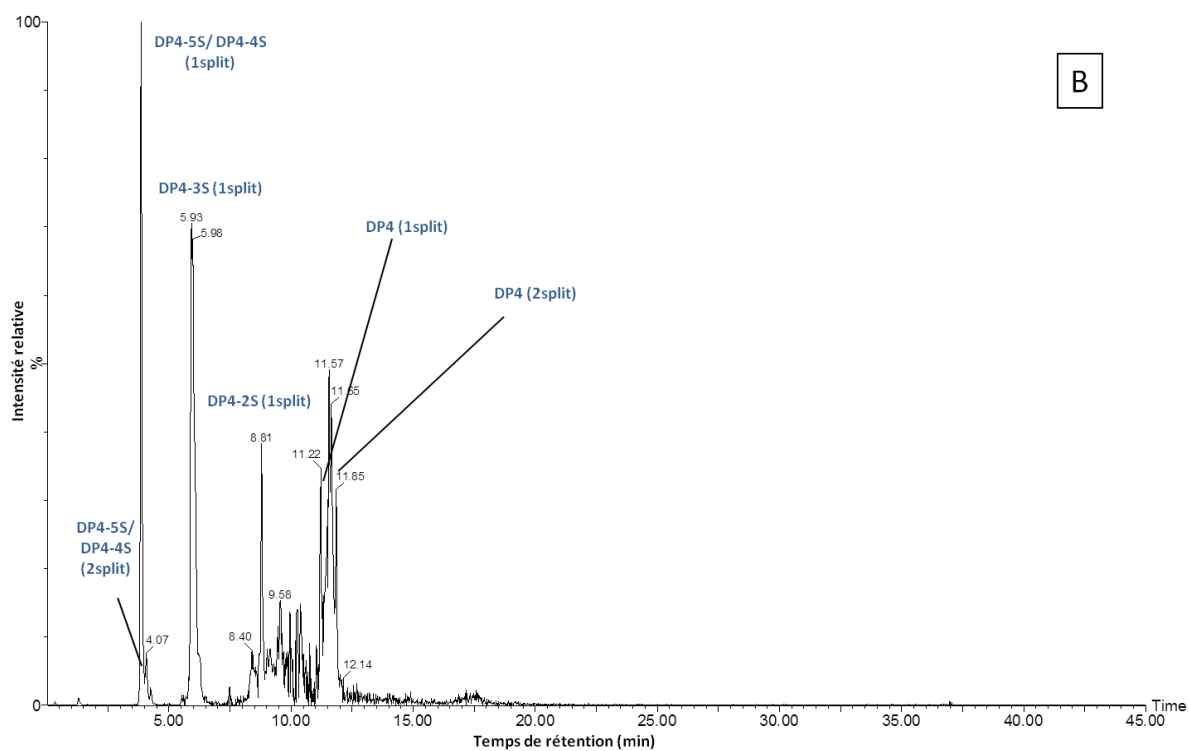
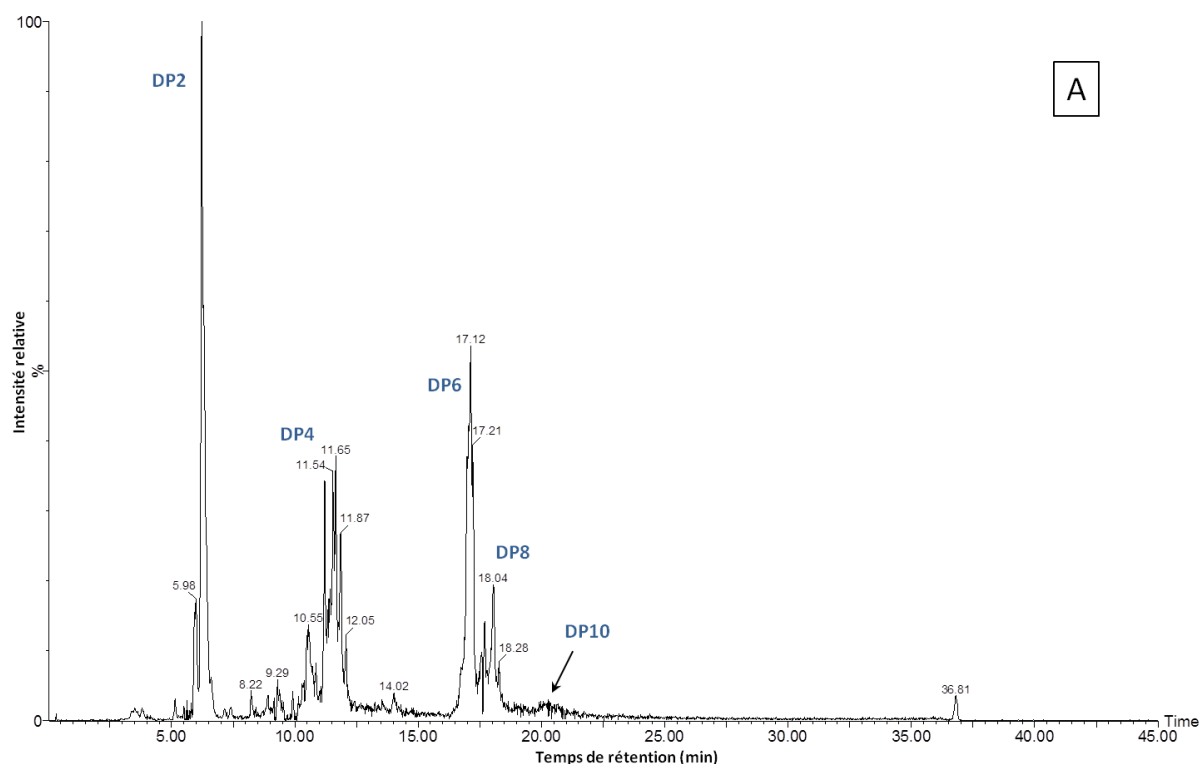


Figure 49 : Spectre LC-MS du carraghénane-λ-DR-GS montrant les DP de 2 à 10 identifiés par les ions (m/z) indiqués tableau 12 (A). Spectre LC-MS du carraghénane-λ-DR-GS montrant les dérivés du DP4 ayant perdu des fonctions sulfates et ou des ouvertures de cycle ont été détectées (1 ouverture = 1 split), les ions identifiés sont renseignés tableau 11.

Tableau 11 : Analyse du Carraghénane- λ -DR-GS par ESI-UHPLC-MS (**figure 48**). Identification de chaînes allant de DP2 à DP10. Observation d'espèces montrant des pertes de sulfatation ainsi que 1 ou 2 ouvertures de cycle (split)

Identification des ions correspondants aux différents DP du Carraghénane- λ -DR-GS (spectre A)					
Temps rétention (min)	(m/z) mesurée	Résolution (ppm)	adduit	formule brute	Degré de polymérisation + split
6,22	698,1301	0,68	$[(D2S6S-G2S) + (C_7H_{15}NH_3^+) + H]^+$	$[C_{19}H_{40}NO_{20}S_3]^+$	DP2 + 1 split
	813,2665	0,22	$[(D2S6S-G2S) + (C_7H_{15}NH_3^+)_2]^+$	$[C_{26}H_{57}N_2O_{20}S_3]^+$	DP2 + 1 split
6,29	700,144	3,25	$[(D2S6S-G2S) + (C_7H_{15}NH_3^+) + H]^+$	$[C_{19}H_{42}NO_{20}S_3]^+$	DP2 + 2 split
	815,2792	3,89	$[(D2S6S-G2S) + (C_7H_{15}NH_3^+)_2]^+$	$[C_{26}H_{59}N_2O_{20}S_3]^+$	DP2 + 2 split
11,21	745,6862	0,91	$[(D2S6S-G2S)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_3 + H]^{2+}$	$[C_{45}H_{93}N_3O_{39}S_6]^{2+}$	DP4 + 1 split
11,21	803,2539	0,40	$[(D2S6S-G2S)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_4]^{2+}$	$[C_{52}H_{110}N_4O_{39}S_6]^{2+}$	DP4 + 1 split
11,51	804,2606	0,96	$[(D2S6S-G2S)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_4]^{2+}$	$[C_{52}H_{112}N_4O_{39}S_6]^{2+}$	DP4 + 2 split
17,12	1200,3771	0,52	$[(D2S6S-G2S)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_6 + H]^{2+}$	$[C_{78}H_{164}N_6O_{58}S_9]^{2+}$	DP6 + 1 split
17,12	1257,9453	0,38	$[(D2S6S-G2S)_3 + (C_7H_{15}NH_3^+)_7]^{2+}$	$[C_{85}H_{181}N_7O_{58}S_9]^{2+}$	DP6 + 1 split
18,04	1103,0396	4,00	$[(D2S6S-G2S)_4 + (C_7H_{15}NH_3^+)_9]^{3+}$	$[C_{111}H_{234}N_9O_{77}S_{12}]^{3+}$	DP8 + 1 split
20,8	1406,1801	5,66	$[(D2S6S-G2S)_5 + (C_7H_{15}NH_3^+)_12]^{3+}$	$[C_{144}H_{305}N_{12}O_{96}S_{15}]^{3+}$	DP10 + 2 split

Identification des espèces désulfatées issues du DP4 du Carraghénane- λ -DR-GS (spectre B)					
Temps rétention (min)	(m/z) mesurée	Résolution (ppm)	adduit	formule brute	Degré de polymérisation + split
11,51	804,2606	0,96	$[(D2S6S-G2S)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_4]^{2+}$	$[C_{52}H_{112}N_4O_{39}S_6]^{2+}$	DP4 + 2 split
11,21	803,2539	0,40	$[(D2S6S-G2S)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_4]^{2+}$	$[C_{52}H_{110}N_4O_{39}S_6]^{2+}$	DP4 + 1 split
11,21	745,6862	0,91	$[(D2S6S-G2S)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_3 + H]^{2+}$	$[C_{45}H_{93}N_3O_{39}S_6]^{2+}$	DP4 + 1 split
8,8	590,151	1,57	$[(D2S,6S-G2S)_2 - (SO_3)_2 - (H_2O)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_2 + 2H]^{2+}$	$[C_{38}H_{72}N_2O_{31}S_4]^{2+}$	DP4 - 2SO ₃ + 1 split
5,95	1101,3531	1,75	$[(D2S,6S-G2S)_2 - (SO_3)_3 - (H_2O)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+)_2 + 3H]^+$	$[C_{38}H_{73}N_2O_{28}S_3]^+$	DP4 - 3SO ₃ + 1 split
4,07	908,2739	0,08	$[(D2S,6S-G2S)_2 - (SO_3)_5 - (H_2O)_2 + 2H]^+$	$[C_{31}H_{58}NO_{25}S_2]^+$	DP4 - 4SO ₃ + 2 split
3,86	906,2597	1,57	$[(D2S,6S-G2S)_2 - (SO_3)_4 - (H_2O)_2 + (C_7H_{15}NH_3^+) + 4H]^+$	$[C_{31}H_{56}NO_{25}S_2]^+$	DP4 - 4SO ₃ + 1 split
4,07	713,1805	0,67	$[(D2S,6S-G2S)_2 - (SO_3)_5 - (H_2O)_2 + 2H]^+$	$[C_{24}H_{41}O_{22}S]^+$	DP4 - 5SO ₃ + 2 split
3,86	711,1662	1,16	$[(D2S,6S-G2S)_2 - (SO_3)_5 - (H_2O)_2 + 2H]^+$	$[C_{24}H_{39}O_{22}S]^+$	DP4 - 5SO ₃ + 1 split

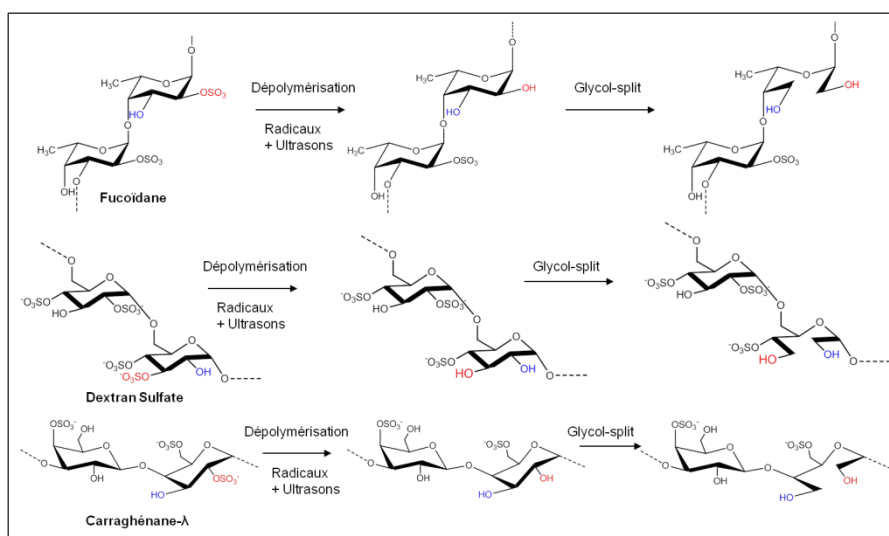


Figure 50 : Hypothèses de glycol-split suite à des désulfatation induites par la DR

Les "splits" observés proviendraient alors de l'ouverture de l'extrémité non réductrice aisément accessible en terme d'environnement stérique (**figure 51 a**) et de la réduction de l'extrémité réductrice (**figure 51 b**), dont la fonction aldehyde présente dans sa forme ouverte peut être réduite lors de l'ajout de NaBH₄ pendant l'étape de glycol split.

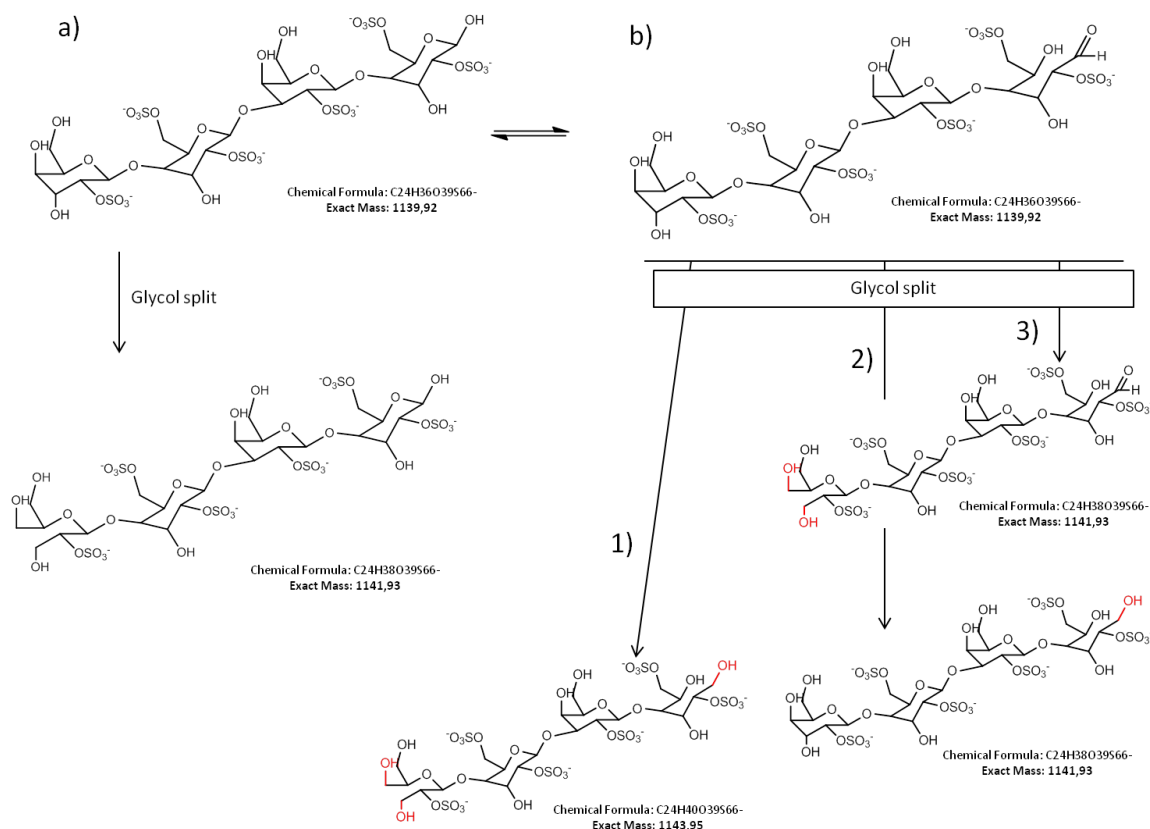


Figure 51 : Hypothèses de réaction par le procédé de glycol split sur un carraghénane-λ de DP4. Ouverture de l'extrémité non réductrice par le procédé de glycol-split a) formes existantes quand l'extrémité réductrice est sous forme ouverte b) ouverture de l'extrémité non réductrice et réduction de l'extrémité réductrice b1) uniquement réduction de l'extrémité réductrice b2) Ouverture de l'extrémité non réductrice et extrémité réductrice sou forme ouverte b3)

Bien que ces analyses ne permettent d'émettre que des hypothèses sur l'impact structural provoqué par l'opération de glycol split, les résultats obtenus avec le carraghénane-λ-DR-GS montrent que l'association DR-GS améliore l'inhibition de l'héparanase et abaisse l'effet sur la coagulation du composé comparé au carraghénane-λ-DR. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'ouverture des extrémités non réductrices et/ou réductrices serait le facteur impactant ces activités. De récentes données en modélisation moléculaire suggèrent que le carraghénane-λ peut entrer dans le site actif de l'héparanase (Rabelink et al., 2017). Le gain de degrés de liberté induits par le glycol split pourraient aider à une meilleure reconnaissance de l'enzyme ou une meilleure fixation au site actif.

Conclusion du Chapitre I:

Dans ce chapitre, nous avons évalué les activités biologiques de plusieurs polysaccharides sulfatés analogues des héparanes sulfates ainsi que leurs dérivés de bas poids moléculaires produits par dépolymérisation physicochimique et/ou modification chimique. Les activités recherchées étaient l'inhibition de l'héparanase ainsi que l'inhibition de la coagulation sanguine. L'objectif de ce chapitre était d'isoler des composés possédant une activité **d'inhibition ciblée de l'héparanase sans effets secondaires sur la coagulation.**

Nous avons travaillé avec 7 polysaccharides différents : Les héparines et chondroïtine-4-sulfate d'origine animale, les carraghénanes- λ , - κ , - ι et les fucoïdanes d'origine algale ainsi que les dextrans sulfates produits par hypersulfatation de dextranes bactériens.

Afin de moduler les activités biologiques de ces 7 composés, quatre méthodes de modifications structurales ont été utilisées : une méthode de **dépolymérisation radicalaire assistée par ultrasons (DR)**, un procédé chimique d'oxydation puis réduction appelé **glycol split (GS)** ainsi que l'association des deux procédés dans les deux ordres différents alors nommés **GS-DR** et **DR-GS**.

Les premiers résultats obtenus montrent que dans l'ensemble, les 7 polysaccharides non fractionnés sont très sulfatés avec des pourcentages de sulfatation massiques situés entre 18,3% et 53,2%. L'évaluation de leurs activités biologiques démontre que leurs taux de sulfatation est corrélé avec leur capacité à inhiber l'héparanase ainsi que la coagulation sanguine. Plus les composés sont sulfatés plus leur pouvoir d'inhibition est grand. Ces résultats mettent également en évidence que la chondroïtine-4-sulfate n'est active ni sur l'héparanase, ni sur la coagulation sanguine. Cela confirme que l'activité des composés, notamment sur des enzymes comme l'héparanase, dépend de leur sulfatation mais également de certains motifs structuraux indispensables (Wu et al., 2015a).

Si l'on s'intéresse maintenant aux différentes méthodes de **dépolymérisations** et **modifications chimiques** (GS, DR, DR-GS et GS-DR) appliquées aux polysaccharides (**tableau 13**), on s'aperçoit que d'un point de vue général, le procédé GS induit peu de modifications structurales et n'impacte pas les activités biologiques. En revanche, la DR est efficace pour dépolymériser nos différents polysaccharides jusqu'à des tailles inférieures à 10 kDa, bien qu'elle induise des pertes de sulfatation. L'association des procédés GS-DR ou DR-

GS donne des résultats structuraux similaires à la DR seule. On note, toutefois, que l'utilisation du GS avant la DR semble atténuer légèrement l'effet de la dépolymérisation ainsi que la perte de sulfatation.

Tableau 12 : Résumé des impacts structuraux des méthodes GS, DR, GS-DR et DR-GS sur les polysaccharides sulfatés

Procédés	Effets sur les polysaccharides sulfatés
GS	Induit de très faibles dépolymérisations (perte de 1 à 4 kDa) Possibles modifications chimiques non détectées
DR	Dépolymérisation efficace Obtention d'espèces inférieures à 10 kDa pour les héparines, fucoïdanes, dextrans sulfates et carraghénane- λ Obtention d'espèces entre 29 kDa et 77 kDa pour les carraghénanes-k et i Perte de sulfatation notables pour les héparines, fucoïdanes et carraghénanes- λ
GS-DR	Atténue légèrement l'effet de la DR Atténue la perte de sulfatation observée avec la DR
DR-GS	Induit des dépolymérisations plus poussées que la DR seule Obtention d'espèces inférieures à 15 kDa pour les carraghénanes-k et i Pertes de sulfatation notables pour la majorité des polysaccharides

Du point de vue des activités biologiques, les modifications structurales induites par l'utilisation des procédés DR, GS-DR et DR-GS ont provoqué des changements d'activités significatifs tant sur l'inhibition de l'héparanase que sur l'inhibition de la coagulation.

L'un des points qui ressort des données obtenues est que les changements d'activités semblent principalement liés à la **diminution de la masse moléculaire** des composés. **Cela s'observe pour chaque composé** et est illustré (**Figure 52**) par le cas des dextrans sulfate et des héparines. La diminution du poids moléculaire entraîne une perte de l'inhibition de l'héparanase ainsi qu'une perte de l'inhibition de la coagulation. Concernant la perte d'activité anticoagulante cette dernière est observée sur les 3 voies de la coagulation ainsi que les facteurs Xa et IIa et semble donc **non spécifique**.

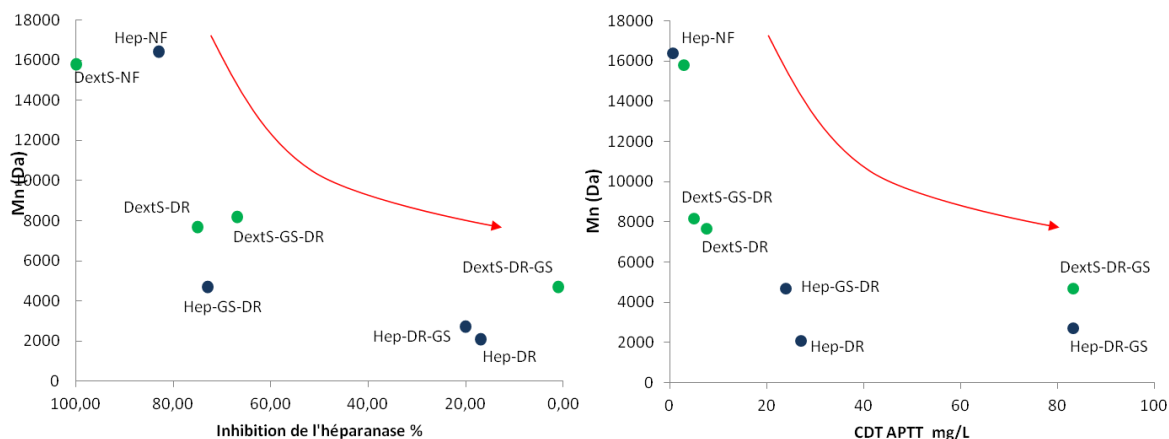


Figure 52 : Effet de la diminution du poids moléculaire moyen des polysaccharides sur leur capacité à inhiber l'héparanase ou la coagulation (via le test aPTT).

Un constat intéressant est que la **perte d'activité en fonction de la diminution du poids moléculaire** moyen est différente en fonction des polysaccharides. Nous avons notamment mis en évidence que les activités anticoagulantes et anti-héparanase des **fucoïdanes** sont sensibles à de faibles variations de poids moléculaire comme le suggère déjà la littérature (Lake et al., 2006; Soeda et al., 2000).

Bien que la diminution du poids moléculaire montre un fort impact sur les activités biologiques des composés, la sulfatation est également importante. Pour autant, les plus grosses pertes de poids moléculaires observées dans notre étude, notamment avec le procédé DR-GS, sont généralement accompagnées d'une **perte de sulfatation** ce qui rend compliquée l'interprétation de ces deux paramètres individuellement.

Dans l'optique d'une production de composés capables d'inhiber sélectivement l'héparanase par rapport à la coagulation, ce criblage aura permis d'identifier plusieurs candidats intéressants issus d'héparines, de fucoïdanes et de carraghénanes-à (tableau 14). Tous montrent des inhibitions intéressantes de l'héparanase et des **activités anticoagulantes inférieures à celles du lovenox**, et leurs masses moléculaires moyennes sont situées entre 2,7 kDa et 16 kDa. Ces candidats semblent donc de bonnes alternatives aux dérivés d'héparines déjà commercialisés comme le lovenox pour l'inhibition de l'héparanase.

Les meilleurs inhibiteurs sélectifs de l'héparanase identifiés sont les héparines-DR-GS et les carraghénanes-à-DR-GS. Leurs activités anticoagulantes sont plus de **dix fois inférieures**   celles du lovenox tandis que leur capacité à inhiber l'héparanase est très intéressante (bien que l'inhibition à 40 g/L ne le suggère pas forcément). En effet, dans l'étude que nous avons

publié, nous montrons que l'IC₅₀ du dérivé carraghénane-λ-DR-GS est de 7,32 ng/ml tandis que celui de l'héparine-NF est de 10,7 ng/mL alors que l'IC₅₀ du dérivé Héparine-DR-GS est de 147 ng/mL et celui du lovenox de 82 ng/mL.

Tableau 13 : Propriétés physicochimiques et activités biologiques des meilleurs inhibiteurs de l'héparanase (*Mn*, la masse moléculaire moyenne en nombre)

Caractérisation physicochimique				Propriétés anticoagulantes					Inhibition 40µg/L
				CDT (mg/L)			IC50 (mg/L)		
	<i>Mn</i> (Da)	I.P	% sulfates (m/m)	TT	apTT	TP	Xa	Ila	Heparanase
Enoxaparin(Lovenox)	2196	1,73	40	9,5	3,5	>83	0,22	70	40,0%
Héparine-GS-DR	4684	1,42	37,9	16	24	833	610	800	72,6%
Fucoïdane-GS-DR	8262	1,64	6,6	80	31	>833	112	300	28,9%
Carraghénane-λ-GS-DR	16639	1,79	23,2	35	>83	>83	10	330	45,0%
Héparine-DR-GS	2716	1,27	28	>125	>83,3	83,3	50	>2500	0,2%
Carraghénane-λ-DR-GS	11396	1.51	19	105	>33.3	>83	400	>250	44,0%

Le candidat le plus prometteur est le **carraghénane-λ-DR-GS** dont l'IC₅₀ est **meilleure que celle de l'héparine-NF** (qui est l'inhibiteur de référence de l'héparanase) alors qu'il **ne présente pas d'activité anticoagulante**. De plus, à une concentration testée de 500 µg/ml le carraghénane-λ-DR-GS diminue la viabilité cellulaire de cellules microvasculaires (HskMEC) de seulement 10% alors qu'à la même concentration l'héparine-NF induit une perte de viabilité cellulaire de 50%.

Concernant l'inhibition de l'héparanase, nos tests ont été réalisés avec une concentration d'héparanase de 100 ng/mL. Si l'on compare ces résultats avec ceux d'une étude récente décrivant la cinétique d'inhibition de l'héparanase par le SST0001 (Roneparstat), la valeur d'IC₅₀ déterminée pour ce composé est de 3 nM pour une concentration d'héparanase de 2,5 nM (Pala et al., 2016). Si l'on considère la masse molaire de l'héparanase mature ; soit 58 kDa et la masse moléculaire moyenne déterminée pour notre carraghénane-λ-DR-GS; soit 11,3 kDa, nos résultats correspondent à un IC₅₀ pour le carraghénane-λ-DR-GS de 3,5 nM pour une concentration d'héparanase de 1,74 nM. Bien que les conditions de réalisation des tests soient légèrement différentes, **les résultats obtenus avec le carraghénane-λ-DR-GS semblent très proches de ceux obtenus avec le Roneparstat**. Cela est d'autant plus prometteurs que le Roneparstat est actuellement en essai clinique pour le traitement du myélome multiple.

Si l'on revient sur la structure de notre composé prometteur carraghénane- λ -DR-GS, des analyses par UHPLC-MS suggèrent que le glycol split ouvre les cycles pyranosiques aux extrémités réductrices et/ou non réductrices. Ce gain de flexibilité pourrait être à l'origine de l'activité biologique particulière du composé. Des analyses complémentaires par RMN devront être effectuée pour confirmer ces hypothèses.

L'identification dans cette partie des travaux du dérivé carraghénane- λ -DR-GS comme étant un fort inhibiteurs de l'héparanase et un très faible anticoagulant répond donc à une partie des objectifs fixés pour ce projet de thèse. **Ce candidat est d'autant plus intéressants que les carraghénanes- λ sont issus d'algues brunes** (Necas and Bartosikova, 2013) et qu'il pourrait présenter une excellente **alternative aux héparines provenant de tissus animaux.**

Conclusion du Chapitre I :

- Les polysaccharides sulfatés : Héparines, dextran sulfate, fucoïdane, Carraghénane- λ - ι et - κ présentent tous des activités d'inhibition de l'héparanase sous leur forme non fractionnée mais semblent également inhiber la coagulation sanguine.
- **La dépolymérisation radicalaire assistée aux ultrasons est efficace pour dépolymériser tous les polysaccharides de cette étude.** Après 8h de dépolymérisation en présence d'un ratio massique H_2O_2 /polysaccharide de 0,15 il est possible d'obtenir des poids moléculaire inférieurs à 10 kDa, sauf pour les carraghénanes- ι et - κ dont les propriétés gellifiantes limitent la dépolymérisation à des fragments entre 20 et 80 kDa.
- Le procédé de glycol split semble peu efficace seul pour impacter les activités biologiques des polysaccharides étudiés. L'appliquer à la suite d'une dépolymérisation permet de moduler plus efficacement ces activités biologiques. Des risques de destructurations complètes du composé sont cependant envisageables avec le procédé DR-GS.
- **La sulfatation des composés semble tout aussi importante que la taille des chaînes pour inhiber l'héparanase.** Le même constat est effectué concernant l'inhibition des 3 voies de la coagulation.
- Le criblage d'activités biologiques a permis l'identification de dérivés de carraghénane- λ (GS-DR ainsi que DR-GS) comme étant de bons inhibiteurs de l'héparanase et de faibles inhibiteurs de la coagulation sanguine.
- La dépolymérisation radicalaire assistée aux ultrasons appliquée aux carraghénane- λ peut être accélérée en augmentant le ratio massique H_2O_2 /polysaccharide . Elle induit un mélange d'espèces de degrés de polymérisation variables et **des profils de sulfatations très hétérogènes.**
- Les IC_{50} de l'inhibition de l'héparanase obtenus avec les héparines NF et les carraghénanes- λ DR-GS sont quasi identiques (10,7 et 7,32 ng/mL). **Ces résultats sont très proches de ceux décrits pour le SST0001** un mélange d'héparines non-anticoagulantes actuellement en essai clinique (Roneparstat) comme **traitement anti-angiogénique dans le myélome multiple via inhibition de l'héparanase.**
- La faible cytotoxicité du **carraghénane- λ DR-GS** sur des cellules endothéliales microvasculaires confirme son **fort potentiel en tant qu'inhibiteur spécifique de l'héparanase** et est encourageante pour de potentiels tests *in-vivo*.
- Le carraghénane- λ -DR-GS comporte potentiellement des alternances de structures type carraghénane- λ et carraghénanes- θ ainsi que **des cycles ouverts aux extrémités de chaînes** qui influent sur ses activités biologiques.

**Chapitre II : Elaboration d'un modèle d'angiogénèse *in-vitro*
pour le criblage de polysaccharides sulfatés inhibiteurs de
l'héparanase et régulateurs de l'angiogénèse tumorale**

Avant propos :

La première partie des travaux a mené à l'identification de plusieurs dérivés de polysaccharides sulfatés montrant, *in vitro*, une bonne inhibition de l'héparanase et une activité anticoagulante fortement réduite. Les candidats les plus intéressants sont des dérivés d'héparines ou de carraghénanes- λ de bas poids moléculaires obtenus par modifications physicochimiques des polysaccharides non fractionnés. Plus précisément, les composés ont été soumis à une dépolymérisation radicalaire (DR) assistée par ultrasons puis ont subi une étape de glycol split (GS). La structure finale des dérivés produits n'a pas encore été élucidée mais l'IC₅₀ du carraghénane- λ DR-GS vis-à-vis de l'héparanase (7,32 ng/mL) est quasi identique à celle obtenue avec l'héparine non fractionnée (10,7 ng/mL) qui est le composé le plus proche structuralement du substrat naturel de l'héparanase : l'héparane sulfate. Le carraghénane- λ DR-GS est donc un candidat prometteur pour une inhibition ciblée de l'héparanase.

L'héparanase exerce un rôle de dégradation de la MEC, favorisant la mobilité cellulaire et le relargage de facteurs de croissance tel que le VEGF dans le microenvironnement tumoral. Cette activité de dégradation a donc un rôle promoteur de l'angiogénèse et de la dissémination métastatique (Ilan et al., 2006).

L'angiogénèse peut être déclenchée en cas de manque d'oxygène des cellules cancéreuses (hypoxie), ou par un manque de nutriments. L'hypoxie notamment, est un facteur déterminant dans la gravité des cancers car elle provoque la production de multiples facteurs afin d'aider la tumeur à pallier le manque d'oxygène (Brahimi-Horn et al., 2007). Ces facteurs peuvent être pro-angiogéniques afin de vasculariser la tumeur et lui apporter l'oxygène nécessaire, ou pro-métastatiques afin que les cellules puissent envahir des zones proches ou plus éloignées où l'oxygénation est meilleure.

L'héparanase semble faire partie des facteurs pro-angiogéniques et pro-métastatiques favorisés par l'hypoxie (Wu et al., 2010). De plus, une hypoxie prolongée tend à acidifier le microenvironnement tumoral, ce qui stimule l'excrétion de l'héparanase dont l'activité enzymatique est optimale pour des pH proches de 5 (He, 2004).

Les traitements anti-angiogéniques actuels ciblent dans leur grande majorité le facteur de croissance VEGF ou ses récepteurs et ont une efficacité limitée et peuvent présenter de nombreux effets secondaires (Ye, 2016). En effet certains patients ne répondent pas aux

traitements ou leurs tumeurs finissent par s'adapter et contourner le traitement à court terme (Bergers and Hanahan, 2008). Du fait que l'activité enzymatique de l'héparanase aide au relargage des facteurs de croissance, son inhibition agirait en amont des traitements anti-angiogéniques actuels ciblant ces facteurs. Cette stratégie représente donc une alternative ou un complément aux traitements antiangiogéniques prescrits à ce jour.

Certains composés anti-héparanase sont actuellement en phase d'essais cliniques pour le traitement de l'angiogénèse tumorale, à l'image du SST0001 (Roneparstat®) (Pala et al., 2016) ou du PI88 (Muparfostat®) (Kudchadkar et al., 2008). Le Roneparstat est un dérivé non anticoagulant d'héparines non fractionnées tandis que le Muparfostat est un oligosaccharide de mannoses polysulfatés. Les essais précliniques ont montré que ces composés inhibaient fortement l'héparanase mais possédaient également des activités antagonistes ou de régulations des facteurs de croissance tels que FGFs, HGF et VEGF (Rivara et al., 2016). Le composé carraghénane- λ DR-GS par son activité anti-héparanase proche de celle des héparines et du SST0001 apparaît donc comme un candidat sérieux à étudier pour l'inhibition de l'angiogénèse tumorale.

Les objectifs des travaux présentés dans le chapitre I ciblaient dans un premier temps l'étude de l'impact des conditions hypoxiques et carencées en nutriments, sur la production d'héparanase par des cellules tumorales mammaires non métastatiques (MCF-7) ou prométastatiques (MDA-MB-231).

Dans un deuxième temps, la mise au point d'un modèle d'angiogénèse *in-vitro* en Matrigel 3D a été effectuée avec l'utilisation de cellules endothéliales microvasculaires dont le comportement a été étudié en hypoxie en présence ou non de surnageants de culture des cellules de cancers mammaires.

Enfin, le potentiel d'inhibition de l'angiogénèse par des composés identifiés dans le chapitre I comme de bons inhibiteurs de l'héparanase a été évalué sur le modèle établi.

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du docteur Catherine Grillon du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans (UPR 4301). Ils font l'objet d'un article scientifique intitulé "Assessment of heparanase mediated angiogenesis using microvascular endothelial cells : identification of λ -Carrageenan derivative as a potent antiangiogenic agent" accepté pour publication dans le journal *Marine Drugs* le 27 avril 2017.

Article

Assessment of heparanase-mediated angiogenesis using microvascular endothelial cells: identification of λ -Carrageenan derivative as a potent anti angiogenic agent

N. Poupard¹, P. Badarou², F. Fasani², H. Groult¹, N. Bridiau¹, F. Sannier¹, S. Bordenave¹, C. Kieda², J-M. Piot¹, C. Grillon², I. Fruitier-Arnaudin^{1*}, T. Maugard^{1§},

¹ Université de la Rochelle, UMR CNRS 7266, LIENSs, Equipe Approches Moléculaires, Environnement-Santé, Avenue Michel Crépeau, La Rochelle, France

² Centre de Biophysique Moléculaire, UPR CNRS 4301, Orléans, France

* Correspondence: Ingrid.fruitier@univ-lr.fr; Fax: +33 546458277

Academic Editor: name

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Heparanase is overexpressed by tumor cells and degrades the extracellular matrix proteoglycans through cleavage of heparan sulfates (HS), allowing pro-angiogenic factor release and thus playing a key role in tumor angiogenesis and metastasis. Here we propose new HS analogs as potent heparanase inhibitors: Heparin as a positive control, Dextran Sulfate, λ -Carrageenan, and modified forms of them obtained by depolymerization associated to glycol splitting (RD-GS). After heparanase activity assessment, 11 kDa RD-GS- λ -Carrageenan emerged as the most effective heparanase inhibitor with an IC₅₀ of 7.32 ng/ml compared to 10.7 ng/ml for the 16 kDa unfractionated heparin. The fractionated polysaccharides were then tested in a heparanase-rich medium-based *in vitro* model, mimicking tumor microenvironment, to determine their effect on microvascular endothelial cells (HSkMEC) angiogenesis. As a preliminary study, we identified that under hypoxic and nutrient poor conditions, MCF-7 cancer cells released much more mature heparanase in their supernatant than in normal conditions. Then a Matrigel™ assay using HSkMEC cultured under hypoxic conditions in the presence (or not) of this heparanase-rich supernatant was realized. Adding heparanase-rich media strongly enhanced angiogenic network formation with a production of twice more pseudo-vessels than with the control. When sulfated polysaccharides were tested in this angiogenesis assay, RD-GS- λ -Carrageenan was identified as a promising anti-angiogenic agent.

Keywords: Heparanase, Angiogenesis, Endothelial cells, λ -Carrageenan, Hypoxia, anti-angiogenic, Sulfated Polysaccharide

1. Introduction

It is now well known that solid tumor growth beyond 1-2 mm³ is dependent on angiogenesis, the sprouting of new blood vessels from preexisting ones to perfuse the tumor (Folkman, 1971b). This process promotes the tumor access to the nutrients and oxygen required for its development, opening in the meantime, the way to metastasis. Tumor angiogenesis is triggered by a range of pro-angiogenic factors released in the tumor microenvironment such as enzymes, chemokines and growth factors (VEGF, FGFs) that interact with surrounding blood vessels and induce neovascularization. It has been shown that hypoxia, the condition where cells suffer from oxygen deprivation, particularly stimulates the expression of these factors (Brahimi-Horn et al., 2007; Taipale and Keski-Oja, 1997).

Considering the poor prognosis associated with tumor neovascularization, anti-angiogenic therapies have become an attractive approach to cancer therapy (Flier et al., 1995). Anti-angiogenic treatments leading to excessive blood vessels pruning or disruption seem to induce the selection of aggressive and resistant cancer phenotypes because they intensify hypoxia and activate the production of even more pro-angiogenic factors (Ebos et al., 2009). Nowadays, clinicians prefer to normalize angiogenesis to create a proper matured blood flow that reduces hypoxia, the occurrence of edema caused by leaky vessels and cell spreading while enhancing drug delivery efficiency (Jain, 2005).

In particular, growth factors determine the development of angiogenesis and thus have become a target of choice for its normalization (Neufeld and Kessler, 2006). Treatments using inhibitors such as anti-VEGF antibodies (Avastin®) are useful tools, when correctly administrated, for VEGF modulation rather than total inactivation. Approaches using VEGF trap have also shown their efficiency for angiogenesis normalization and tumor growth inhibition (Collet et al., 2014). However, these approaches may be faced with other problems, including “tumor evasion”, where the tumor adapts and produces other derived pro-angiogenic factors to compensate the VEGF neutralization (Carmeliet, 2003). Thus, targeting degradative enzymes present in the tumor microenvironment and associated with angiogenesis should be an effective strategy to develop new anti-angiogenic treatments.

Among them, heparanase, an endo- β -D-glucuronidase, plays a crucial role in tumor development, metastasis and angiogenesis (Freeman and Parish, 1998; Vlodavsky et al., 2008). It is involved in extracellular matrix (ECM) and vascular basement membrane degradation, allowing tumor cells to spread and/or endothelial cells to form new blood vessels in order to perfuse the tumor. In the ECM, heparan sulfates (HS) are cleaved by heparanase which induces, as a consequence, the release of numerous pro-angiogenic chemokines and growth factors, including VEGF and FGF-2, in the tumor microenvironment (Vlodavsky et al., 1990). Since the gene encoding heparanase has been cloned (Vlodavsky et al., 1999), the enzyme has been more extensively studied and heparanase is now considered as a potential target for new anti-angiogenic treatments (Pisano et al., 2014).

To date, several heparanase inhibitors from different chemical classes have been developed (Pisano et al., 2014). Among them, heparan sulfate mimics like PI88 (Kudchadkar et al., 2008), PG545 (Dredge et al., 2010), and SST0001 (Ritchie et al., 2011), emerged as good candidates and are currently in different phases of clinical trials. The latter, SST0001 (roneparstat, Sigma-Tau research, Switzerland SA) is a non anticoagulant 100% N-acetylated heparin with a 25% “glycol split” (Naggi et al., 2005). Glycol-splitting, a two-step reaction involving an oxidation then a reduction, is of particular interest for heparins as it opens hexuronic rings and disrupts their anticoagulant activities. More interestingly, this process seems to give more flexibility to the polysaccharide chains and enhances the inhibition of heparanase (Vlodavsky et al., 2007). Recent reports emphasized the difficulty to find safe and reliable sources of heparin (Szajek et al., 2016), underlining the need to study alternative supply sources of sulfated polysaccharides. Interestingly, certain plants or seaweeds can produce polysaccharides structurally close to HS (Jiao et al., 2011; Shanmugam and Mody, 2000). Dextran sulfate are highly sulfated polysaccharides that can easily be produced by hypersulfation of dextran produced by bacteria (ex: *leuconostoc mesenteroides*). λ -Carrageenan can be extracted from red marine algae species. They are widely used in the food-industry as thickening agent (Shah and Huffman, 2003) and already showed interesting results as anti-angiogenics (Niu et al., 2015). Raw unfractionated (UF) products from λ -Carrageenan or dextran sulfate can have high molecular weights up to millions of Daltons. To limit side effects and increase bioavailability of these compounds, a depolymerization process is necessary to obtain species with low molecular weights (LMW), less than 15 kDa. We previously described a radical-assisted ultrasonic (RD) method to depolymerize sulfated polysaccharides (Achour et al., 2013) and decided to associate it with glycol splitting (GS) to give higher flexibility to the chains.

The main objective of this study was then to assess the anti-heparanase activities of these products along with their anti-angiogenic potential.

One of the major outcomes when identifying anti-angiogenic drugs is the relevance of *in vitro* angiogenesis models used for bioassays. The model shall be easy, repeatable, close to the *in vivo* conditions with accessible informations about the metabolic pathways that the drug will affect. To date, plethora of models have been proposed and one of the most popular consists in cultivating endothelial cells in a 3D Matrigel™ composed of mouse tumor-derived ECM. Using this test, endothelial cells are able to develop capillary-like structures with cell extensions resembling chords (Goodwin, 2007). It is particularly adapted for the study of ECM degradation and evaluation of anti-angiogenic agents. However, this test has often been used with macrovascular endothelial cells (HUVECs for instance) that may not be the most representative model of tumor neovascularization, mostly composed of microvasculature (Reitan et al., 2010).

Thus, a second aspect of our work was to develop a Matrigel™-based model to specifically investigate the role of heparanase on microvascular endothelial cell angiogenesis in hypoxic conditions. The HSkMEC cell line was chosen because of its microvascular profile with a stable phenotype in terms of adhesion molecules (Carreau et al., 2011b) and typical endothelial cell characteristics (presence of angiotensin-converting-enzyme and von Willebrand factor (Kieda et al., 2002)). The exposition of HSkMEC cells cultured in Matrigel™ to tumor microenvironment conditions such as hypoxia or nutrient deprivation was studied regarding the angiogenesis behavior and heparanase production. The role of an exogenous source of heparanase was also evaluated via the addition of heparanase-rich supernatants in media of HSkMEC cell cultures. The latter was produced from hypoxic cultures of breast carcinoma cells.

Using this *in vitro* angiogenesis assay that comprises heparanase and tumor microenvironment conditions, it was possible to screen potential anti-angiogenic candidates among the depolymerized and glycol splitted (RD-GS) HS mimics compounds that we generated from UF-heparins, UF-dextran sulfate and UF- λ -Carrageenan.

2 Results and discussion

2.1 Preparation and characterization of sulfated polysaccharides.

To produce a range of modified sulfated polysaccharides, we used UF- λ -Carrageenans, UF-heparins and UF-Dextran sulfate as starting material.

Heparins are certainly the most studied HS mimics and their role in the regulation of the angiogenic process is well known (Folkman and Shing, 1992). Moreover, the inhibition of heparanase by heparins and their derivatives has already been explored. It helped to further understand the mechanism of action of the endo-glycosidase (Bar-Ner et al., 1987; Peterson and Liu, 2010; Vlodavsky et al., 2007) revealing the importance of sulfate groups and the sulfation pattern responsible for its inhibition. Although heparins are interesting heparanase inhibitors, they are currently extracted from porc intestines in low yields. This, added to the drastic and costly purification controls, emphasize the needs for alternative inhibitors (Linhardt and Liu, 2012b).

λ -carrageenans are sulfated polysaccharides naturally occurring in seaweed species like *Gigartina* (Falshaw and Furneaux, 1994) and Dextran sulfate can be easily produced by hypersulfation of dextran extracted from bacteria (ex: *leuconostoc mesenteroides*). We selected these polysaccharides because their structures (**Fig. 1**) have high similarities with HS and because they could provide a reliable source of sulfated polysaccharides from biomass. Still, heparins will be used in this study as a reference.

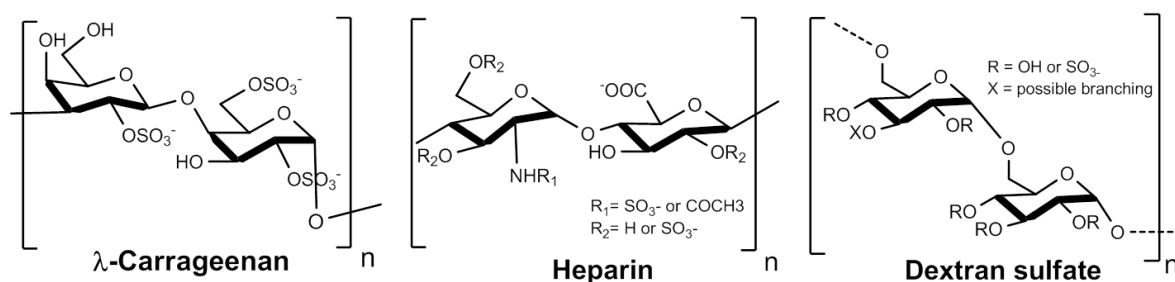


Figure 53. Structure of the three sulfated polysaccharides studied : λ -Carrageenan, Heparin and Dextran sulfate. Concerning the heparin structure, the glucuronic acid may be epimerized as iduronic acid along the chain and bear an O-sulfatation on the C-3 position

One major problem with polysaccharide extracts is the size of the chains that are often long and generate side effects when used as therapeutics. To resolve this, a depolymerization step is necessary. Depolymerization reduces chain length, enhances polysaccharide bioavailability and helps to modulate some biological activities (Linhardt and Gunay, 1999b).

The three polysaccharides studied here were submitted to depolymerization (RD) using a previously described method which associates radicals (from hydrogen peroxide) and ultrasonic waves (Achour et al., 2016). After depolymerization, the compounds were submitted to glycol splitting (GS) (Naggi et al., 2005) (Sodium periodate oxidation followed by sodium borohydride reduction) and then respectively called RD-GS-Heparin, RD-GS-DextranS and RD-GS- λ -Carrageenan.

Glycol splitting is particularly interesting in the case of heparin as it reduces its anticoagulant activity (Casu et al., 2002). It also increases chain flexibility with the opening of C2-C3 unsubstituted uronic acid rings which is thought to increase heparanase inhibition (Vlodavsky et al., 2007). We thus proposed it would be of interest to combine depolymerization and glycol splitting to modulate the biological activities of our three sulfated polysaccharides. The unfractionated structures of Dextran sulfate and λ -carrageenan do not possess vicinal diols susceptible to be oxidized by the glycol-split process. However, radical depolymerization assisted by ultrasounds can induce a loss of sulfate functions (Achour et al., 2013; Poupard et al., 2017a) in addition to the shortening of the polysaccharides chain length. We then hypothesized it may produce derivatives with hexoses possessing C2-C3 diols, rendering them sensitive to glycol-splitting. The opening of the hexose rings would thus offer a subsequent gain in chain plasticity.

Table 1. Physicochemical characterization and biological activities of UF-Heparin and RD-GS polysaccharides. a) Sulfation degree = mol sulfates/ mol disaccharide. b) Heparanase inhibition expressed as IC_{50} values (ng/mL) of inhibitors against heparanase (100 ng/mL). c) Survival of HSkMEC cells exposed to compounds concentration of 250 μ g/mL in complete OPTIMEM medium supplemented with 2% FBS for 48h. * $P \leq 0,05$

	Mn (Da)	Sulfation degree ^a	Heparanase inhibition ^b (IC_{50} values in ng/ml)	HSkMEC cell viability ^c
UF-Heparin	16412	2	10,7	68,9 $\pm$ 13,9% *
RD-GS-Heparin	2716	1,4	147	85 $\pm$ 9% *
RD-GS-DextranS	4710	0,9	61,5	84,2 $\pm$ 5,8% *
RD-GS- λ -Carrageenan	11396	1,1	7,32	89,2 $\pm$ 6,2% *

The extent of sulfation of polysaccharides was analyzed by Azure A colorimetric assay on products solutions and compared to a calibration curve using dextran sulfate with 17% sulfur (w/w). Comparing UF-Heparin and RD-GS Heparin, a clear decrease of 0,6 in the sulfation degree was observed after depolymerization and glycol splitting (see Table 1). RD-GS- λ -Carrageenans have a sulfation degree of 1,1 close to the lowest degree of 0,9 observed for RD-GS-DextranS. The number average molecular weight (M_n) of each compound was measured using size exclusion

chromatography. The size of RD-GS products was inferior to 5000 Da for heparins and dextran sulfate when the size of RD-GS- λ -Carrageenans were around 11000 Da.

Using an enzyme assay kit, the degradation of biotinylated heparin by heparanase in the presence of potent inhibitors was studied (**Table 1**). As expected, a low concentration (10.7 ng/mL) of UF-Heparin was needed to inhibit 50% of the heparanase activity. Comparatively, RD-GS- λ -Carrageenan appeared as a better heparanase inhibitor with an IC_{50} of 7.32 ng/mL while the IC_{50} of RD-GS-DextranS was moderate at 61.5 ng/mL. As observed comparing UF-Heparin IC_{50} (10.7ng/ml) and RD-GS-Heparin IC_{50} (147 ng/ml), the combination of depolymerization and glycol splitting decreased the anti-heparanase activity of the unfractionated polysaccharide. The same observations were made in a recent study comparing UF-species of λ -Carrageenan and their RD-GS counterparts (Poupard et al., 2017b). A new study on heparanase crystal structure revealed that the enzyme binding cleft is lined by basic side chains, explaining the huge importance of sulfation pattern for substrate recognition (Wu et al., 2015b). Moreover, in the case of heparin, it has been shown that around the cleavage site, the 2-N sulfation and 6-O sulfation of motifs in -1 and +1 positions are mandatory for recognition. The RD-GS process may have altered the heparin 2-N or 6-O sulfation pattern more than the λ -carrageenan D2S,6S-G2S one, and could explain the better inhibition observed for RD-GS- λ -Carrageenans. This suggests that beside a useful depolymerization effect, the RD-GS process did not impair the structure of λ -Carrageenans to a point where it is not recognized by heparanase. RD-GS-DextranS have a low sulfation degree of 0,9 that could account for their weaker inhibition of heparanase and RD-GS-Heparin with a sulfation degree of 1,4 displayed an even weaker inhibition of the enzyme. It has been hypothesized that a reasonably long polysaccharide can bind two enzymes at the the same time and create inhibition (Pala et al., 2016). RD-GS-DextranS, RD-GS- λ -Carrageenan and UF-Heparin have longer chains (respectively 4710 Da, 11396 Da and 16412Da) than RD-GS-Heparin (2716 Da) and may bind two enzymes at the same time. These results support the fact that sulfation pattern of a polysaccharide alone can't create an inhibition without a proper chain length.

The HSkMEC viability was then tested by exposing cells for 48h to the compounds at the concentration of 250 μ g/mL in a complete OPTIMEM medium with 2% added FBS. Despite the toxicity of UF-heparins that decreased cell viability to $68,9 \pm 13,9$ %, the RD-GS derivatives showed relatively low impact on cell viability diminishing it by less than 16%. These data indicated that the effects of these compounds on the formation of the angiogenic network (shown later in **Fig. 4**) could not be misinterpreted with a potent cytotoxicity.

The presented cell viability data were part of a dose dependent study realized for UF-Heparins, RD-GS-Heparin and RD-GS- λ -Carrageenan from 0 to 500 μ g/ml (Poupard et al., 2017b). This study showed a correlation between higher compounds concentrations and higher cytotoxicities, UF-heparin being the most hazardous for HskMEC cells and RD-GS- λ -Carrageenan being the least.

2.2 Expression and secretion of heparanase in human skin microvascular endothelial cells and human mammary cancer cells.

In order to assess the possible heparanase-related angiogenesis induced by tumors, we first studied heparanase expression and secretion in the endothelial cell line HSkMEC and in different breast cancer cell lines. Heparanase is known to be overexpressed in the breast carcinoma microenvironment (Ilan et al., 2006), so breast cancer cell lines producing heparanase-rich supernatant were selected. The heparanase expression profiles of non-metastatic MCF-7 breast carcinoma cells and moderate metastatic MDA-MB-231 breast carcinoma cells were assessed and compared. Because we wanted to study the effects of tumor microenvironment drastic conditions on heparanase expression, cells were cultured in hypoxia and in nutrient poor conditions (FBS deprived).

By western blotting, the endogenous level of heparanase in the cell lysate of the three studied cell lines was determined after a 48h incubation in 2% FBS or FBS-free medium under normoxic (95% air, 5% CO₂) and hypoxic (1% O₂) conditions (**Fig. 2a**).

Western blotting revealed the presence of a 65 kDa form of heparanase corresponding to the pro-enzyme and a 50 kDa form corresponding to its mature active form. In fact, heparanase is synthesized as a 543aa / 65kDa proform that is activated after proteolytic cleavage. The enzyme has been reported to be a heterodimer consisting of the 50 kDa subunit (Lys¹⁵⁸-Ile⁵⁴³) non-covalently associated with a 8 kDa peptide (Gln³⁶-Glu¹⁰⁹), with an intervening 6 kDa peptide (Ser¹¹⁰-Gln¹⁵⁷) being excised by proteolysis (Parish et al., 2001b). It has been shown that the proteolytic cleavage is performed by the endopeptidase Cathepsin L in the lysosomal compartment (Abboud-Jarrous et al., 2008).

In HSkMEC lysates, the heparanase proform content was high, both under hypoxia and normoxia and the mature form seemed slightly expressed. The presence of FBS did not impact the enzyme production. Concerning MCF-7 lysate, the production of mature heparanase is clearly favored in normoxia. Still, small amounts of pro-heparanase was produced in normoxia and the addition of FBS tended to increase this production. In a same way hypoxia only showed the production of the mature form of heparanase with an increased amount when FBS is added. Beyond the hypothesis that in hypoxia, all the pro-form was processed into the mature form, it could be assumed that for MCF-7, the pro-heparanase was also redirected to the cell surface. In fact, it has been shown that heparanase does not need to be active to play a role in cancer progression (Liat Fux et al., 2009).

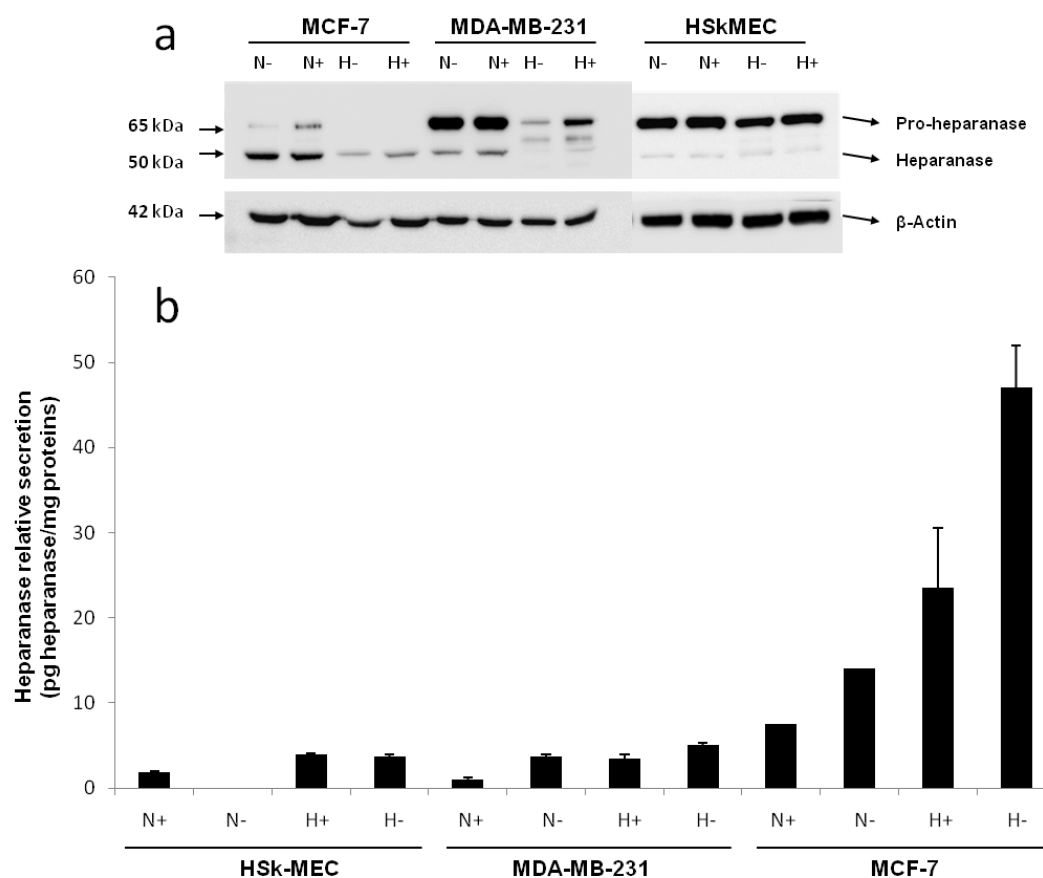


Figure 2. Determination of heparanase expression in both cell lysates and medium of HSkMEC, MDA-MB-231 and MCF-7 cells. (a). Western blot analysis of cell lysates (22.5 µg of total proteins) obtained from cells cultured under hypoxic or normoxic conditions for 48h in 2% FBS or FBS-free medium. Bands were reported relative to the level of β-Actin. (b). ELISA quantification of heparanase in cell supernatant obtained from cells cultured under hypoxic or normoxic conditions for 48h in 2% FBS or FBS-free medium. H indicates Hypoxia; N indicates Normoxia; (+) indicates that 2% FBS was present in the medium; (-) indicates that the medium was FBS-free. Results are expressed as a relative heparanase

release compared to the protein content in the cell lysate. Results are presented as the mean $\pm$ SD for triplicates

MDA-MB-231 lysates contained both form of heparanase. The pro-form appeared to be the most expressed form both under hypoxia and normoxia and the presence of FBS in both conditions stimulated the production of the two forms of the enzyme.

The endogenous heparanase content in cell lysates (western blot) was then compared to the content released in culture supernatant (ELISA, 50 kDa mature form specific) (**Fig. 2b**). The first thing to note is that MCF-7 cells excreted heparanase's mature form in its supernatant. For MCF-7 cells, the most favorable conditions for heparanase excretion appeared to be in hypoxia without added FBS as they showed a secretion 10 times higher compared to the other cell lines. The fact that less mature heparanase was detected in the lysate in hypoxia could be explained by the observed excretion of the enzyme in the same condition of culture.

Concerning HSkMEC and MDA-MB-231 cells, even if the quantity detected was low, the mature heparanase was also excreted by these cells. As for MCF-7 cells, the preferred conditions to excrete the enzyme are in hypoxia and the absence of FBS also seemed to have an impact. These results confirm not only the already known potential of endothelial cells to produce heparanase (Bartlett et al., 1995) but also that invasive breast cancer phenotypes such as MDA-MB-231 favor the excretion of heparanase (Zcharia et al., 2001). Moreover, heparanase protein is released in the supernatant when conditions are harsh, stressful and when low oxygen concentrations are present supporting the fact that heparanase is expressed when angiogenesis is needed.

Regarding MDA-MB-231, hypoxia lowered the mature enzyme level in the lysate but this was not compensated by a high release of the enzyme in the supernatant, as seen for MCF-7. This could be explained by the fact that the mature enzyme remained attached on the cell surface even after lysis. It has been shown that heparanase may be released at the cell surface for degrading neighboring ECM or cell basement membrane (Freeman and Parish, 1998). Furthermore, heparanase may remain on the cell surface to activate some receptors, modifying the cell behavior through the production of more degradative enzymes (Liat Fux et al., 2009).

Overall, these results showed that hypoxia was likely to trigger heparanase trafficking either for its release in the supernatant or potentially to direct it to the cell surface. FBS deprivation also seemed to trigger the excretion of heparanase. This first study revealed that hypoxic conditions in FBS-free medium are the best culture conditions for MCF-7 cells to excrete high amounts of mature heparanase.

2.3 Effect of MCF-7 heparanase-rich supernatant on HSkMEC pseudovessels formation

After determining the heparanase expression profile of the three studied cell lines, we developed an *in vitro* model to better understand the role of heparanase in tumor angiogenesis. For this purpose, we used the HSkMEC microvascular endothelial cell line capacity to form a capillary network in Matrigel™. This kind of *in vitro* angiogenesis tests are often realized in normoxic conditions (75% N₂, 20% O₂, 5% CO₂) whereas intratumoral levels of oxygen are reported to be way below the normoxic level, corresponding to the state of hypoxia (Carreau et al., 2011a). Realizing experiments in normoxic conditions may induce an oxidative stress in cells that is not representative of the tumor microenvironnement. To address this issue, angiogenesis tests were realized in hypoxic conditions.

We studied the effect of the addition of MCF-7 heparanase-rich supernatant produced under hypoxic conditions in FBS-free medium, i.e. under the optimal conditions previously determined to produce the highest heparanase content.

Indeed, adding MCF-7 heparanase-rich supernatant could help us investigate how heparanase affects angiogenesis in association to the heterogenous mix of cytokines/chemokines also produced by MCF-7 breast carcinoma cells (Ben-Baruch, 2003).

Photographs of HSkMEC hypoxic Matrigel™ cultures in FBS-free medium alone and in the presence of MCF-7 heparanase-rich supernatant were taken after 9h30 of incubation (**Fig. 2**). The angiogenesis network was much more developed and structured in the presence of MCF-7

heparanase-rich supernatant (**Fig. 2b**) than with FBS-free medium alone (**Fig. 2a**). These high stress conditions triggered the release of mature heparanase whose degradative activity on Matrigel™ could account for the more developed vascularization network seen in **Fig. 2b**. Though, other chemokines and growth factors expressed in MCF-7 heparanase-rich supernatant under stress conditions may also play a role in the more dense vascularization (Fox et al., 2007). These results support the work of Cohen et al that describe the pro-angiogenic activity of normoxic MCF-7 cells transfected with heparanase cDNA (Cohen et al., 2006)

After these first observations, we evaluated the behavior of vascularization development. The kinetic of angiogenesis formation was studied over 21h by time laps microscopy. Images taken every 2 hours were analyzed and treated with the ImageJ software to determine the number of pseudo-vessels, inter-vessel junctions, meshes and mean mesh size. Results are presented in **Fig. 3c**.

This kinetic study clearly showed that adding MCF-7 heparanase-rich supernatant increased the capillary network formation. The number of pseudo-vessels formed was approximately 2 times higher with MCF-7 heparanase-rich supernatant than with FBS-free medium alone. The number of junctions and that of meshes were multiplied by 1.5 and 2, respectively and the mean mesh size was multiplied by 1.5. We also observed that, regardless of the presence of heparanase-rich supernatant, the number of pseudo-vessels, inter-vessel junctions and meshes formed, first tended to increase between 0 to 7h of incubation, then reached a plateau that lasted 10h and finally slightly decreased until the last measurement at 21h. Regarding the mean mesh size, it continuously increased from 0 to 21h. Based on these observations, we could assume that neovascularization begins by the formation of many vessels that branch to form a network for a certain time, 7h in our case, then only the overall network evolves, with microvascular endothelial cells moving to create a more harmonized net pattern with regular meshes.

For further use of this model and to test our sulfated polysaccharides, we defined 9h30 as the incubation time after which the capillary network was well formed and stable at this time. Pictures taken at $t = 9\text{h}30$ could then be compared to see the potent anti-angiogenic activities of the tested compounds.

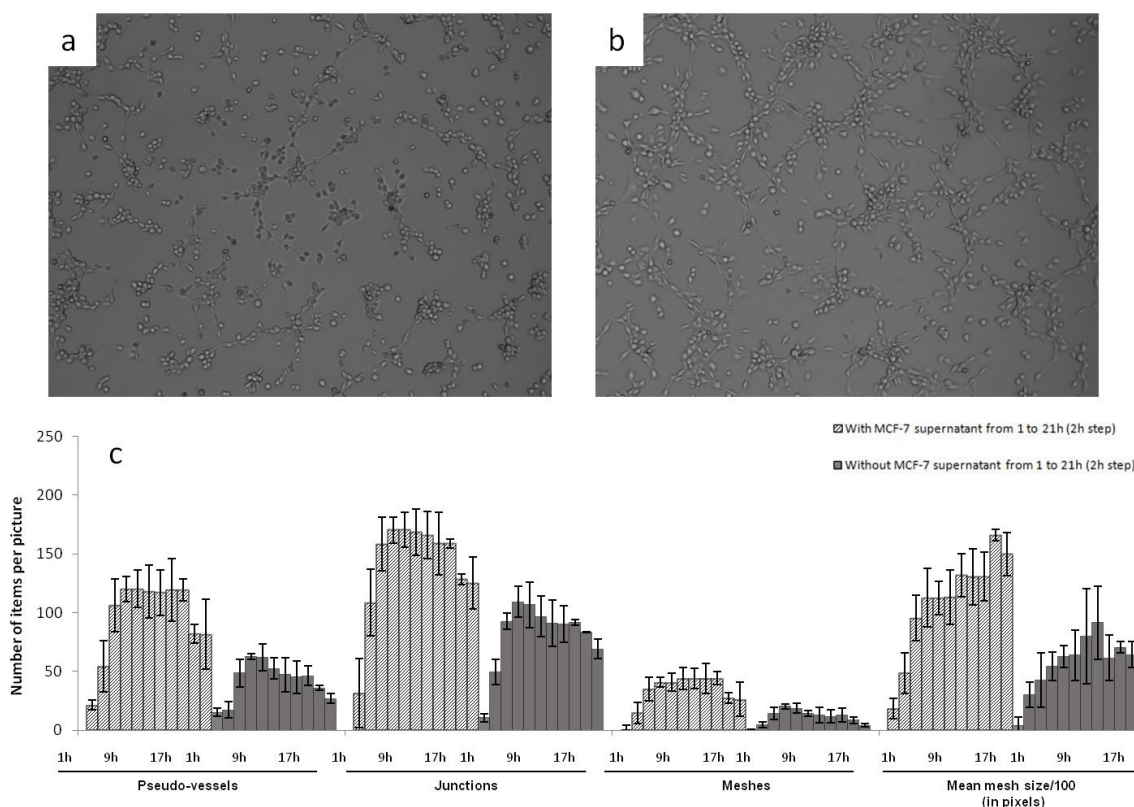


Figure 3. Effect of the addition of MCF-7 heparanase-rich supernatant on HSkMEC pseudo-vessels formation. Cells were plated in Matrigel™ in the presence (or absence) of 10 µl of heparanase-rich supernatant from MCF-7 cultured in FBS-free medium under hypoxia for 48h. Capillary network formation was visualized using a Zeiss Axiovert 200M fluorescent inverted microscope and monitored for 21h. Angiogenesis was observed after 9h30 under hypoxia in FBS-free medium in the absence (a) or in the presence (b) of heparanase-rich MCF-7 supernatant. (c) Angiogenesis formation was followed over time with pictures taken every 2 hours and by studying the number of pseudovessels, junctions, meshes and the size of the meshes (indicated in pixels). Results are presented as the mean +/- SD for triplicates

2.4 *Anti-angiogenic potential of heparanase inhibitors.*

After establishing a Matrigel™ test implicating heparanase in the angiogenesis process, the anti-angiogenic potential of the LMW anti-heparanase polysaccharides we produced was assessed. Compounds were tested at a concentration of 200µg/ml and their impact on pseudo-vessels formation and number of junctions in the angiogenesis network were measured. The previous kinetic study indicated that in the HskMEC Matrigel® model, the angiogenesis tended to develop quickly and then mature, to form a regular net pattern. We then investigated on one hand, the effect of the LMW sulfated polysaccharides on the angiogenesis development during the first seven hours, when the cellular activity is the highest and, on the other hand, the number of pseudo vessels formed at t = 9h30, when angiogenesis reached a plateau. The rate of angiogenesis formation was represented as the slope of the linear regression made on the evolution, over time, of the number of pseudo vessels (from 0 to 7h) and junctions (1h30 to 7h). (Slopes obtained are presented in supplementary data)

Overall, the four compounds slowed down the angiogenesis development, both in the FBS-free or in the MCF-7 induced tube formation (**Figure 4**). As shown in **Figure 5**, it appears that the more the compound inhibits heparanase, the more it slows the angiogenesis development. Thus, the RD-GS-λ-Carrageenan, proposed as a good alternative to heparin for heparanase inhibition, was able to slow the speed of formation of pseudo vessels by 32% in FBS-free medium and 48% in heparanase-rich medium. In comparison, UF-heparin slowed the speed of formation of pseudo vessels by 45% in classic medium and 57% in heparanase-rich medium (**Figure 4a**).

When looking at a precise time: 9h30, where angiogenesis has reached a plateau, the potential of the RD-GS-λ-Carrageenan seems confirmed (**Fig 4c**). Indeed, compared to the blank control, the number of pseudo vessels at 9h30 is reduced by 39% in the presence of RD-GS-λ-Carrageenan in medium supplemented by MCF-7 supernatant when UF-heparin displayed a lower reduction of 28% in the same conditions. In this analysis, all the LMW sulfated polysaccharides present lower inhibition when MCF-7 supernatant was added. The most striking examples concern UF-heparin and RD-GS-DextranS. They display an inhibition of pseudo vessels formation of respectively 44% and 21% when FBS-free medium is used and 28% and 12% when the supernatant is added. This could be explained because in classic medium, even in hypoxic conditions, the HsKMEC microendothelial cells didn't secrete much heparanase (see **Fig 2**). However, when heparanase-rich medium from MCF-7 was added in the medium, the resulting higher level of enzyme made the inhibition less efficient as the same inhibitor concentrations were tested in both cases.

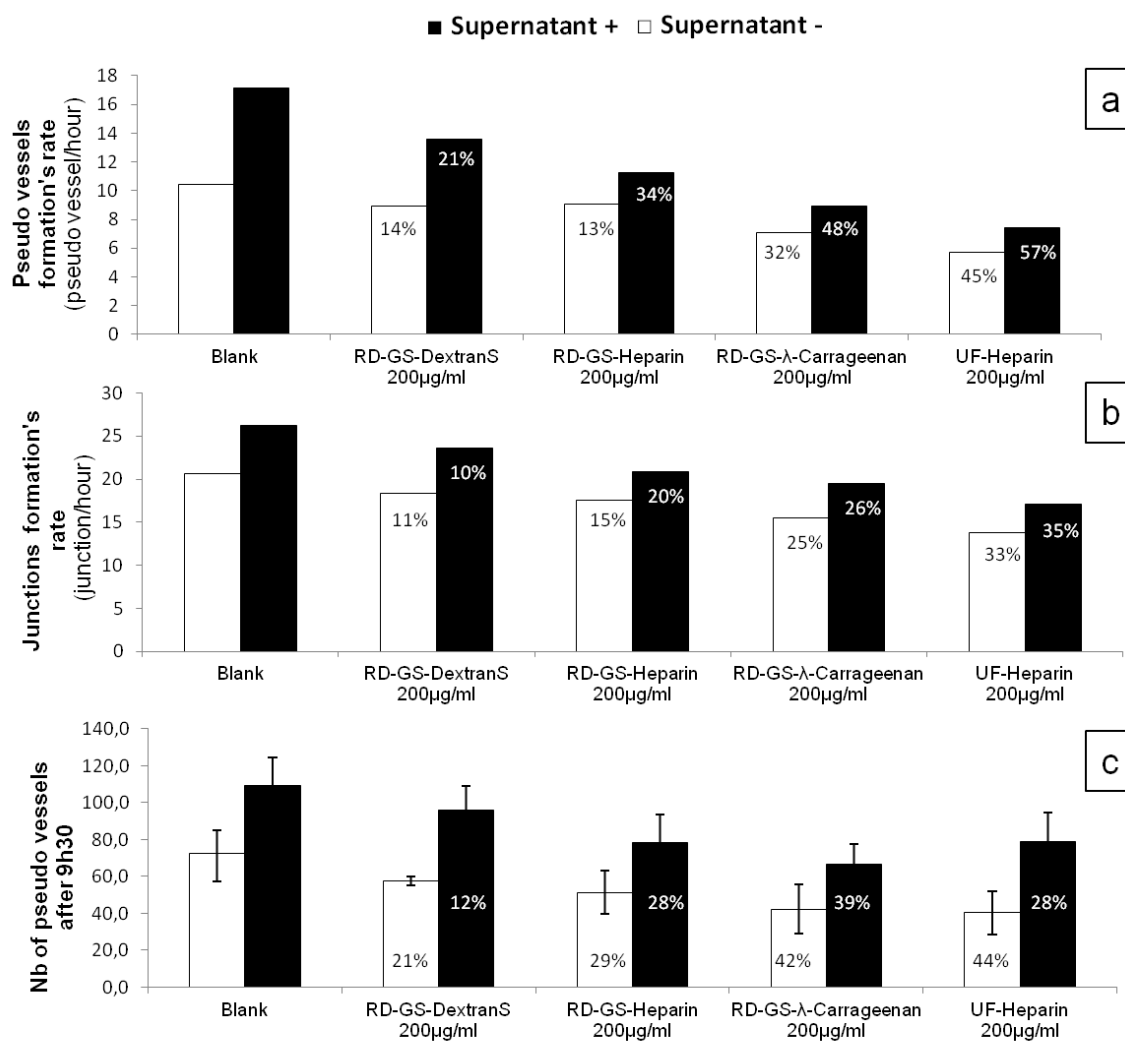


Figure 4. Effects of heparanase inhibitors on the kinetics of HSkMEC pseudovessels formation and junctions between them. Cells were incubated with heparanase inhibitors (200 µg/ml) on Matrigel either in the presence (black columns) or absence (white columns) of MCF-7 heparanase-rich supernatant. Angiogenesis kinetic was assessed by the determination of pseudo-vessels formed (a), between 0 to 7h, and junctions formed between 1h30 to 7h (b) with photos taken every 30 min. Results are presented as the slope of a linear regression realized with number of pseudo vessels and junctions determined at each time with the Image J software (see supplementary data). (c) The number of pseudo vessels ($\pm$ SD) formed at $t = 9h30$. Inhibition of the angiogenesis development is specified for each compound tested and indicated as a percentage missing compared to the blank values. Complete kinetics from 0 to 19h are presented in supplementary data.

Moreover, it is also well described that breast cancer cells can produce a variety of growth factors like VEGF or FGF-2 (Fox et al., 2007; Relf et al., 1997). These additional growth factors can as well stimulate angiogenesis and reduce the efficacy of tested compound, although heparin is known for binding to VEGF (Presta et al., 2003), and λ -carrageenan have the potential for binding to growth factors like FGF-2 (Niu et al., 2015).

Though, a correlation seems to appear between anti-heparanase activity and angiogenesis inhibition of our compounds (**figure 5**). We thus hypothesized that they mainly regulate angiogenesis through interaction with heparanase. The endothelial cells mobility and invasion capacity are key factors for the formation of pseudo vessels and heparanase helps this phenomenon by degrading the HS component of the ECM (here the Matrigel) (Barash et al., 2010). A low mobility of the cells was

observed, along with the reduced capacity to form pseudovessels, when analyzing microscope photos of wells containing heparanase inhibitors like UF-Heparin or RD-GS- λ -Carrageenan, supporting the prevalent role of heparanase in angiogenesis.

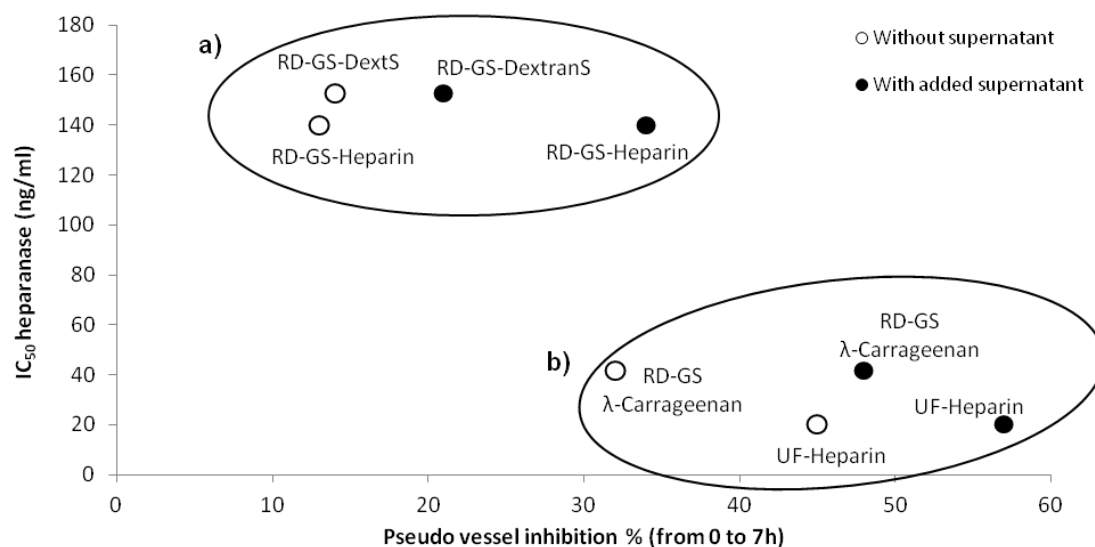


Figure 5. Comparison of the anti-angiogenic and anti-heparanase activities of studied sulfated polysaccharides. (a) The population comprising RD-GS-Heparin and RD-GS-DextranS has low anti-heparanase activity and anti-angiogenic activity. (b) The population comprising UF-Heparin and RD-GS- λ -Carrageenan has high anti-heparanase activity and high anti-angiogenic activity.

Coupled with its low anti-coagulant activity (Poupard et al., 2017a), the RD-GS- λ -Carrageenan appeared as a promising anti-angiogenic candidate. Though, its inhibition potential both in absence or presence of MCF-7 supernatant may suggest that it is not specific to heparanase. In fact, other sulfated polysaccharide-based inhibitors of heparanase actually in clinical trial like SST0001 or PG-545 do not exclusively inhibit heparanase but also interact with VEGFs or FGFs (Rivara et al., 2016). Moreover, our results support the recent study by Niu *et al* (Niu et al., 2015) showing that λ -Carrageenan disaccharide structure bearing an average of three sulfates (D-galactose 2-sulfate + D-galactose 2,6-sulfate) is similar to HS structural features and can bind FGF-2 and inhibit heparanase. Its anti-angiogenic potential through inhibition of heparanase seems even more interesting as a recent modeling study showed its capacity to bind to the active site of heparanase (Rabelink et al., 2017).

3 Material and methods

3.1 Cell culture

The Human Skin Microvascular Endothelial Cell line (HSkMEC) was established in the Centre for Molecular Biophysics of Orléans according to the method previously described (Kieda et al., 2002) and patented (C. Kieda, Centre national de la Recherche Scientifique, patent 99-16169). Their phenotype is stable in terms of adhesion molecules and endothelial cells characteristics (Kieda et al., 2002). Human mammary carcinoma cell line (MCF-7), and metastatic mammary carcinoma cell line MDA-MB-231 were purchased from ATCC.

Cell lines were cultured at 37°C in OptiMEM with Glutamax I (ThermoFischer Europe) supplemented with 2% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma Aldrich), 40 µg/mL gentamycin (ThermoFischer, Europe) and 0.05 µg/mL fungizone (ThermoFischer Europe).

For hypoxia treatment, cells were placed in a humidified atmosphere at 37°C with a stabilized gas mixture input containing 94%N₂/ 5%CO₂/ 1%O₂ (Air Liquide, France) in a Hypoxystation® H35. For

normoxia treatment, cells were incubated in a humidified atmosphere maintained at 37°C in 5% CO₂/95% atmospheric air.

To simulate nutrient poor conditions, cultures were FBS-deprived. The cells were incubated for the first 24h with a complete OPTIMEM medium supplemented with 2% FBS for a good adhesion and multiplication. Then the medium was replaced by complete FBS-free OPTIMEM medium and cells were incubated for 48h before collecting supernatants.

3.2 Western blotting

Cells were grown to 80% confluence and lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1% Triton X-100, 1X complete protease inhibitor cocktail (Roche science)) for 10 min on ice with regular stirring. Cells were finally centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C and supernatants were stored at -80°C.

Protein concentration was determined using the DC protein assay (BioRad), an improved version of the well-documented Lowry assay.

Rabbit anti-human Heparanase was purchased from AbCam, rabbit anti-human actin was purchased from Cell signaling and goat anti-rabbit IgG peroxidase was purchased from Life technology.

Proteins from cell lysate samples (22 µg) were separated by SDS-PAGE on 15% gel, using precision plus protein dual color standard (Bio-Rad) as molecular-weight size markers, and electroblotted on PVDF membranes. These membranes were first incubated with the primary antibody (rabbit anti human actin diluted 1:1000 or rabbit anti-human heparanase diluted 1:500) in 0.05% TBS-Tween with 10% dried milk for 1h at room temperature. Then, the membranes were washed 5 times with 0.05% TBS-Tween before incubation with the secondary antibody (anti-rabbit IgG peroxidase diluted 1:33) in 0.05% TBS-Tween with 10% dried milk for 1h at room temperature. Proteins were detected by chemoluminescence (West Dura supersignal detection system) using Pxi equipped with GeneSys software.

3.3 ELISA assay

The heparanase release profiles in HSkMEC, MCF-7 and MDA-MB-231 cell line supernatants were analyzed using Human HPSE/Heparanase ELISA kit according to the manufacturer's instructions (LSBio).

3.4 In vitro angiogenesis assay

Ninety-six-well plates were coated with growth factor-reduced Matrigel™ (BD Bioscience). Cells were trypsinized, washed and seeded at 15,000 cells per well in FBS-free medium. Inhibitors were added at 200 µg/mL final concentration. The experiment was performed in two conditions, in the presence of 10 µL of MCF-7 heparanase-rich supernatant (10% of final volume) or without (replaced by FBS-free culture medium). Cells were cultured under hypoxic (1% O₂) conditions. Cell rearrangement and pseudo-vessel formation were visualized using a Zeiss Axiovert 200M fluorescence inverted microscope (Zeiss, Le Pecq, France) equipped with an Axiocam high-resolution numeric camera connected to a computer driving the acquisition software Axiovision (Zeiss). The direct real-time visualization of the pseudo-vessel formation was monitored for 24h. Photographs were taken, processed using Axiovision Software and analyzed with ImageJ software with the Angiogenesis analyzer add-on (Carpentier, 2012). Data obtained allowed angiogenesis quantification through determination of pseudo-vessel number, inter-vessel junction number and mesh network number.

3.5 Elaboration of sulfated polysaccharides

Heparins, Dextran sulfate (shortened DextranS in this paper) and λ -Carrageenan were purchased respectively from Alfa Aesar, Sigma Aldrich and FMC Biopolymer. The respective modified molecules were called RD-GS-Heparin, RD-GS-DextranS and RD-GS- λ -Carrageenan.

The RD-GS prefix denotes the radical-assisted depolymerization (RD) of the commercial polysaccharides associated with glycol splitting (GS).

Physicochemical depolymerization of polysaccharides by ultrasonic-assisted radical depolymerization

Polysaccharides were dissolved in water to a final concentration of 25 mg/mL (up to 4 mL) for Heparin and Dextran sulfate and 5 mg/mL for λ -Carrageenan due to its low solubility. The reaction mixture was sonicated using a 3-mm diameter probe-type UP50H ultrasonicator (Hielscher Germany) (micro tip MS3), which provided an amplitude of 180 μ m. The processor generated mechanical longitudinal vibrations with a frequency of 30 kHz that were produced by electrical excitation. With the reaction mixture at room temperature, the sonic pulses maintained a temperature of 60°C in the reactor. Hydrogen peroxide 30% was added to obtain a final hydrogen peroxide/polysaccharide (w/w) ratio of 0.15. After 8h of depolymerization, the reaction mixture was lyophilized prior to Glycol splitting.

Glycol-split polysaccharide preparation

Glycol-split polysaccharides were prepared by exhaustive periodate oxidation followed by borohydride reduction (Naggi et al., 2005). Reaction mixtures (3 mL) containing 40 mg of previously depolymerized polysaccharides and 0.1M NaIO₄ were incubated in the dark at 4°C under stirring at 500 rpm. After a 12h incubation, 120 μ L of ethylene glycol were added to neutralize the excess of periodate. The incubation conditions were the same as above for 1h. Then 26 mg of solid NaBH₄ were added to the reaction mixture at 4°C and the reaction was stirred for 4h to let the temperature return to ambient. The pH was then adjusted to 4 with 1M HCl before neutralization with 1M NaOH. The mixtures were finally desalted by dialysis using a 1kDa porous cellulose ester membrane (spectra/Por Dialysis membrane MWCO: 1000). Dialysis was performed 3 times for 12h at 4°C against 4L of ultrapure water.

3.6 SEC-HPLC Analysis

Structural and quantitative analyzes of reaction products by size exclusion chromatography (SEC) were performed using an Agilent LC/MS-ES system (1100 LC/MSD Trap VL mass spectrometer) with one TSK-GEL G5000PW and one TSK-GEL G4000PW column mounted in series. Columns were maintained at 30°C and the products were eluted with 0.1M Sodium nitrate (NaNO₃) at a flow rate of 0.5 mL/min. Products were detected and quantified by differential refractometry using HP Chemstation software off-line for the processing.

Heparin oligosaccharides of different molecular weights purchased from Iduron (Manchester, UK) were used as calibrants for the standard curve and calculation of the size of heparin derivative products. Dextrans of different molecular weights purchased from Sigma Aldrich were used as calibrants for the standard curve and calculation of the size of Dextran sulfate and Carrageenan derivatives

Number-averaged molar mass (M_n) was calculated as follows (Mulloy and Hogwood, 2015):

$$M_n = (\sum N_i \times M_i) / \sum N_i \quad (1)$$

where N_i was the number of moles of polymer species, M_i was the molecular weight of polymer.

3.7 Cell viability assay

Sulfated polysaccharides were tested on HSkMEC cultures to measure their cytotoxicity using Alamar Blue® assay. This assay was performed over 4 days. On day 1, cells were seeded into a 96-well plate at 500 cells/well in 50 µL of complete OPTIMEM medium supplemented with 2% FBS and incubated for 24h at 37°C. On day 2, 40 µL of complete OPTIMEM medium containing different concentrations of sulfated polysaccharides were added into the wells. Concentrations were tested in 8 replicates. The plate was incubated for another 24h at 37°C. On day 3, 10 µL of commercial solution of Alamar Blue® (Life technology) were added into each well and the plate was incubated for another 24h at 37°C. On day 4, each well supernatant was transferred into a black polystyrene plate (Corning® #3915) adapted for fluorescence and measurements were made using the following parameters: $\lambda_{ex}=544$ nm and $\lambda_{em}=590$ nm with a BMG Labtech Fluostar Omega spectrofluorometer.

3.8 Sulfate determination

The stability of the sulfate groups on the sugar backbone was monitored using (7-aminophenothiazin-3-ylidene)-dimethylazanium chloride (Azure A), which binds the sulfated groups in a polysaccharide chain (Klein et al., 1982b). Briefly, 200 µL of a 10 mg/L solution of aqueous Azure A were added to 20 µL of diluted sulfated polysaccharide samples. Absorbance was then measured at 535 nm. Dextran sulfate with characterized sulfur content was used to build the calibration curve. The sulfur content was then transposed into sulfate content.

3.9 Heparanase inhibition assay

Heparanase inhibition assays were performed using the heparanase assay toolbox (Cisbio Assay, France) with heparanase purchased from R&D systems (human recombinant heparanase HPSE). The hydrolysis of Biotin-H-Eu(K) (heparan sulfate labeled with both biotin and Eu3+ cryptate) was performed in white 96-well half-area plates (Corning® #3693) using a BMG Labtech Fluostar Omega spectrofluorometer with a high time resolved fluorescence (HTRF) module. The reaction was performed in the presence or the absence of polysaccharide products at 37°C in a final volume of 60 µL. First, 15 µL of inhibitor solutions in ultrapure water were added into the wells followed by 15 µL of heparanase solution (400 ng/mL heparanase in Tris-HCl pH 7.5, 0.15M NaCl and 0.1% CHAPS). After 10 min of preincubation at 37°C, an enzyme reaction was initiated by adding 30 µL of Bio-HS-Eu(K) (4.4 ng/µL in 0.2M Sodium acetate buffer, pH 5.5) and the plate was incubated at 37°C for 15 min. Then 20 µL of streptavidin-d2 (10 ng/µL in 0.1M NaPO₄ buffer, pH 7.4, 0.8M KF, 0.1% BSA, 1 mg/mL Heparin) were added and incubated for 2 min at 37°C. The fluorescence was measured at $\lambda_{em1}=620$ nm and $\lambda_{em2}=665$ nm, after 60 µs of excitation at $\lambda_{ex}=337$ nm. The delta F (%) was calculated using the following equation as indicated by the suppliers:

$$\text{Delta F (\%)} = \frac{(F_{665} / F_{620})_{\text{sample}} - (F_{665} / F_{620})_{\text{blank}}}{(F_{665} / F_{620})_{\text{blank}}} \times 100 \quad (2)$$

where F665 and F620 were fluorescence signals measured at 665 nm and 620 nm, respectively.

IC₅₀ were determined based on the curve fitting tool from SigmaPlot software (Systat Software Inc, San Jose, USA) using the equation: Sigmoidal; logistic; 3 parameters.

3.10 Statistical analysis

Data are presented as the mean ± SE of at least one triplicate run. For cell viability and angiogenesis characterization parameters (pseudo-vessels, junctions, meshes), statistical analysis were performed using SigmaPlot software (Systat Software Inc, San Jose, USA). Replicates (n=7 for cell viability; n=3 for angiogenesis parameters) were averaged and the values were tested for normality (Shapiro-Wilk test). Replicates were obtained from individual culture wells (n =7 or n =3) and analyzed using a one-way ANOVA.

4 Conclusion

We herein investigated the heparanase inhibition potential of sulfated polysaccharides submitted to depolymerization and glycol splitting. The 11kDa RD-GS- λ -Carrageenan produced had an interesting heparanase IC₅₀ of 7.32 ng/mL. Then heparanase expression profile of three different cell lines was investigated: one microvascular (HSk-MEC) and two mammary carcinoma cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7). We showed that hypoxia associated with nutrient-poor conditions were the best culture conditions for MCF-7 cells to excrete high amounts of mature heparanase. We used the resultant heparanase-rich supernatant to study its effect on the angiogenesis network formed by HSk-MEC in Matrigel™. Results showed that its addition doubled the number of pseudo-vessels and meshes formed while the junctions were multiplied by 1.5 confirming the pro-angiogenic role of the enzyme. Finally, we assessed the anti-angiogenic properties of produced sulfated polysaccharides in the same Matrigel™ model. An overall anti-angiogenic effect was observed for the 4 compounds and we hypothesized that it was related to their capacity to inhibit heparanase. Though, it remains unclear whether the tested polysaccharides acted solely on heparanase or also by blocking growth factors or their receptors.

Among the 4 sulfated polysaccharides tested, the 11kDa RD-GS- λ -Carrageenan stepped out as a promising anti-angiogenic candidate, as it was able to inhibit pseudo-vessel formation by 42% in the absence of MCF-7 heparanase-rich supernatant and 39% in its presence. It also displayed a capacity to slow the angiogenesis process by reducing the formation of pseudo vessels by 32% for the seven first hours in an *in vitro* Matrigel® test. This λ -carrageenan derivative produced by a simple physico-chemical process offers new options in terms of medical use for this family of sulfated polysaccharide extracted from red algae and mostly exploited today by the food industry.

In a further study, we plan to investigate more exhaustively the composition of the MCF-7 heparanase-rich supernatant used here, especially the growth factors content, and to determine the ability for the 11 kDa RD-GS- λ -Carrageenan to interact with them as well as with heparanase.

Acknowledgments This study was supported by a PhD grant from the Ligue contre le Cancer of Charente-Maritime for N. Poupard (2014-2017). The Ligue contre le Cancer is acknowledged for financial support through the research project “Conception de nanovecteurs intelligents pour la thérapeutique des tumeurs”. Image acquisition was performed on P@CYFIC platform in Center for Molecular Biophysics (Orléans, France).

Supplementary data

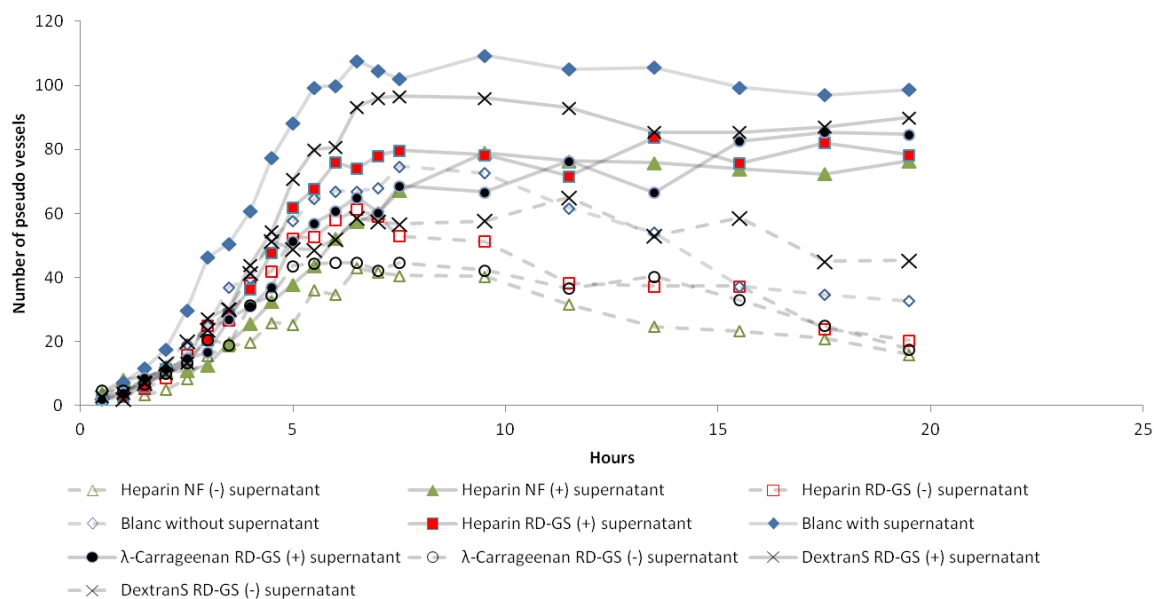


Figure S1 : Complete Kinetic of the number of pseudo vessels formation from 0h to 20h. Each polysaccharide is described in the conditions with FBS-free medium ((-) supernatant) or with medium supplemented with MCF-7 supernatant ((+) supernatant). Each point represent the average value of a triplicate

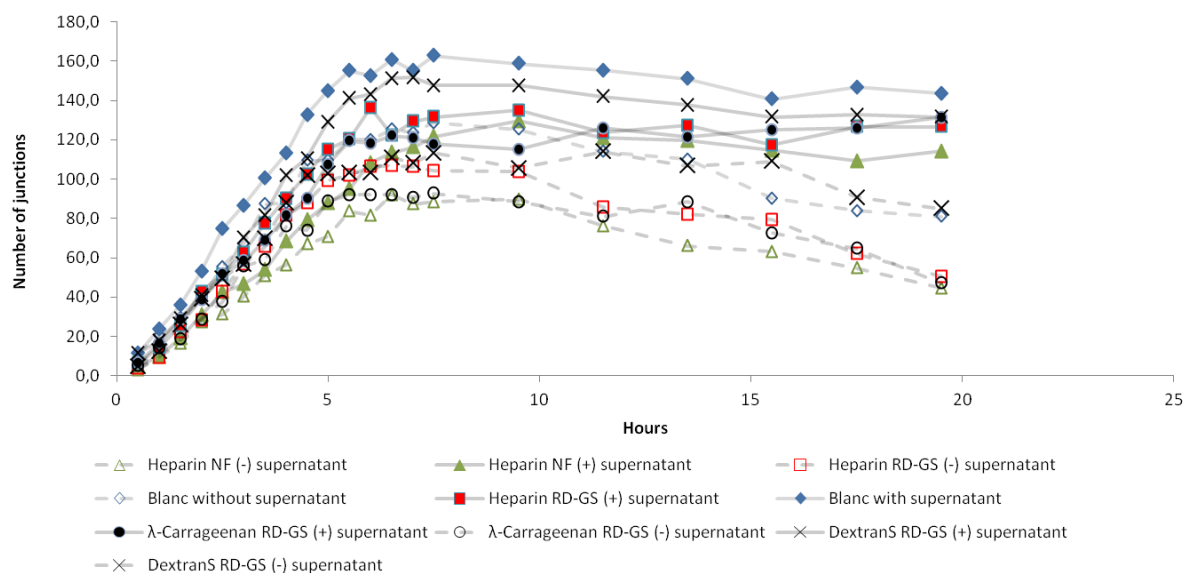


Figure S2 : Complete Kinetic of the junctions formation from 0h to 20h. Each polysaccharide is described in the conditions with FBS-free medium ((-) supernatant) or with medium supplemented with MCF-7 supernatant ((+) supernatant). Each point represent the average value of a triplicate

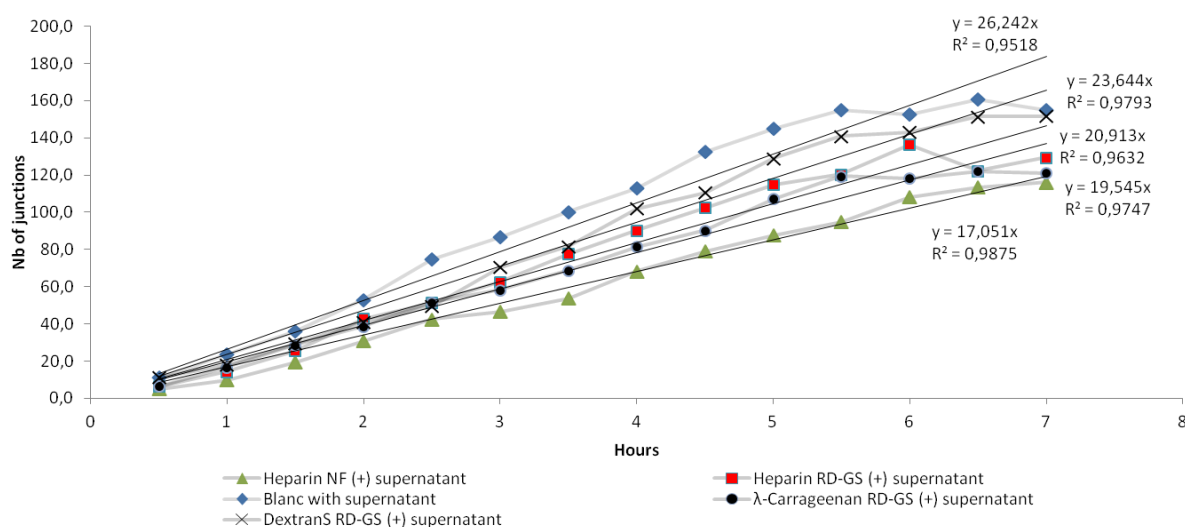


Figure S3 : Slopes determined with linear regression of the number of junctions formed between 0h and 7h with each polysaccharide tested in medium supplemented with MCF7-supernatant. Each point represent the average value of a triplicate

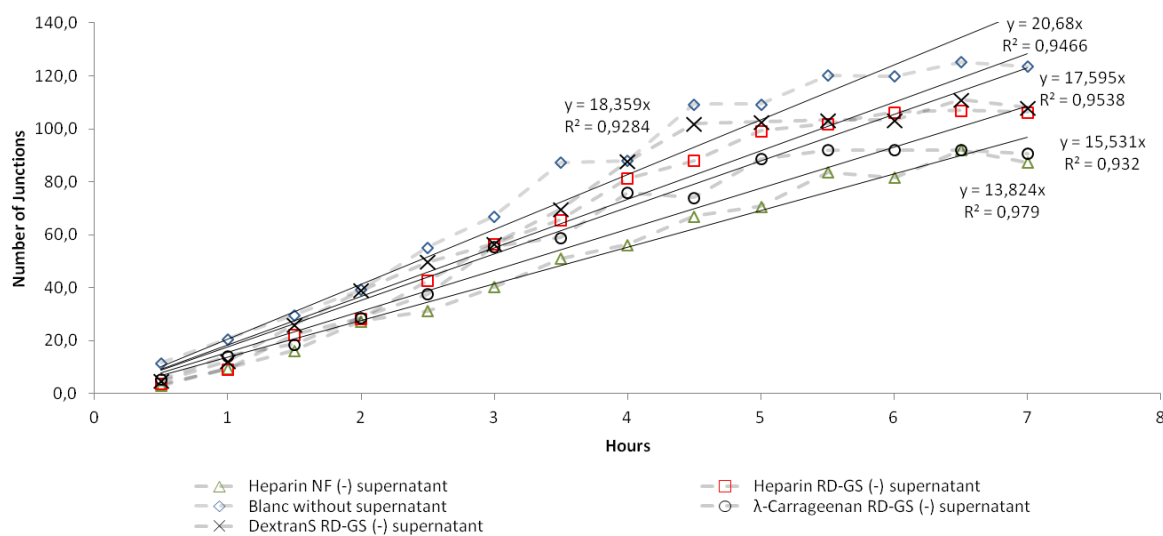


Figure S4 : Slopes determined with linear regression of the number of junctions formed between 0h and 7h with each polysaccharide tested in FBS-free medium. Each point represent the average value of a triplicate

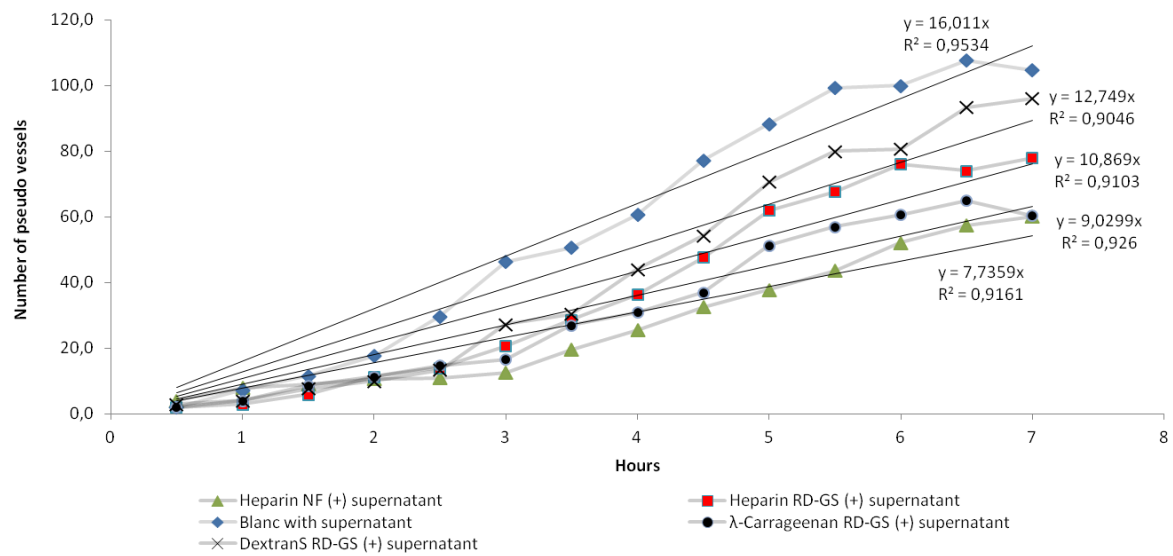


Figure S5 : Slopes determined with linear regression of the number of pseudo vessels formed between 0h and 7h with each polysaccharide tested in medium supplemented with MCF7-supernatant. Each point represent the average value of a triplicate.

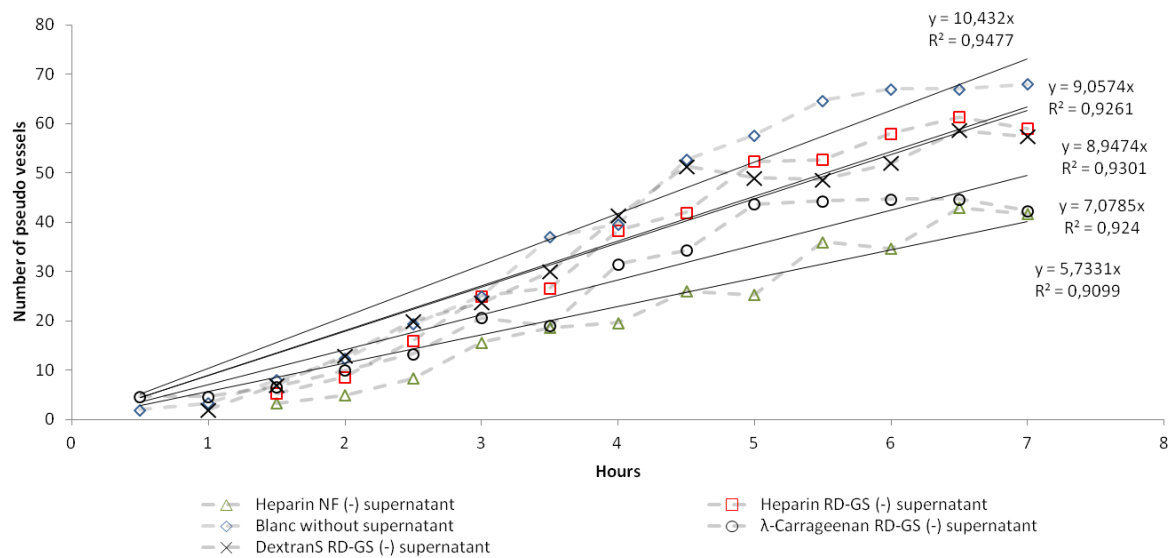


Figure S6 : Slopes determined with linear regression of the number of pseudo vessels formed between 0h and 7h with each polysaccharide tested in in FBS-free medium. Each point represent the average value of a triplicate

Points clés du Chapitre II :

- Les lignées de cancers mammaires non métastatiques (MCF-7) et modérément métastatiques (MDA-MB-231) produisent de l'héparanase sous sa forme pro ou mature.
- Dans des conditions similaires à celles du microenvironnement tumoral telles que **l'hypoxie et le manque de nutriments**, la lignée MCF-7 sécrète de l'héparanase mature dans son surnageant de manière importante.
- Le **surnageant des cellules MCF-7** cultivées en hypoxie et sans sérum, **riche en héparanase**, stimule la formation d'un réseau angiogénique par les cellules microvasculaires HskMEC. Après 9h30 d'incubation en présence du surnageant, les cellules forment 2 fois plus de pseudo vaisseaux que sans ajout de surnageant.
- Le réseau angiogénique formé semble se développer rapidement pendant les **7 premières heures** puis se stabiliser pour devenir plus homogène.
- Les polysaccharides sulfatés testés sont tous plus ou moins inhibiteurs de l'angiogénèse aux concentrations analysées de 200µg/mL. L'inhibition apparaît plus importante en présence du surnageant riche en héparanase.
- Les meilleurs inhibiteurs de l'héparanase tels que les héparine-NF et le carraghénane-λ-DR-GS sont les meilleurs inhibiteurs de l'angiogénèse ce qui confirmerait que l'inhibition observée passe par une inhibition de l'héparanase.
- **Le carraghénane-λ-DR-GS** montre une inhibition de l'angiogénèse proche de celle des héparines-NF. Cela confirme son potentiel en tant qu'**alternative aux héparines** dans une optique de traitement de l'angiogénèse tumorale par inhibition de l'héparanase.
- L'étude nécessite **un approfondissement** axé sur l'analyse des **facteurs de croissance** pro-angiogéniques très probablement présents dans le surnageant hypoxique des cultures de MCF-7. L'inhibition de l'angiogénèse par les polysaccharides sulfatés pouvant provenir de leurs interactions avec ces facteurs de croissance en plus de leur inhibition de l'héparanase, ce paramètre devra être éclairci.

Conclusions générales:

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'intègrent dans un projet dont l'objectif principal est la conception d'inhibiteurs sélectifs de l'héparanase pour des traitements visant la normalisation de l'angiogénèse tumorale.

Dans une approche à la fois fondamentale et méthodologique, ces travaux ont eu pour vocation première, de concevoir des inhibiteurs sélectifs de l'héparanase. Dans un second temps, nous nous sommes attachés à l'étude du comportement de l'héparanase dans les cas de cancers mammaires et au développement d'un modèle d'angiogénèse *in vitro* capable de valider l'intérêt des composés conçus. Ces travaux sont résumés dans la **figure 53**.

L'héparanase est une glycosidase exprimée dans de nombreux cancers et qui participe, par son activité enzymatique de dégradation des héparanes sulfates, au remodelage de la matrice extracellulaire du microenvironnement tumoral (Vlodavsky et al., 2001). Cela a pour effet de favoriser l'angiogénèse tumorale ainsi que la dissémination de métastases au reste du corps. Cette enzyme a suscité un intérêt grandissant depuis sa caractérisation à la fin des années 1990 (Vlodavsky et al., 1999) et la compréhension de son impact dans la progression tumorale n'a cessé d'évoluer dès lors (Vlodavsky et al., 2016). Aujourd'hui, elle représente une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement de l'angiogénèse tumorale.

Pour répondre à l'objectif principal du projet qui est la conception d'inhibiteurs sélectifs de l'héparanase, l'étude a été pensée autour du criblage d'activités d'inhibition enzymatique de l'héparanase par différents polysaccharides sulfatés présentant des analogies structurales avec le substrat naturel de l'héparanase : l'héparane sulfate.

L'un des inhibiteurs les plus décrits de l'héparanase est l'héparine, un composé déjà utilisé comme anticoagulant en médecine et qui est principalement extrait de muqueuses intestinales porcines (Linhardt and Gunay, 1999a). Le fait que ce composé soit **extrait à partir de tissus animaux** pose de nombreuses problématiques en terme de rendement, de purification et de contrôle sanitaire (Szajek et al., 2016). Ces paramètres participent au coût important des traitements des patients (Lévesque et al., 1997) et ont même mené à une crise sanitaire à la fin des années 2000 où des lots d'héparines non conformes avaient entraîné la mort de plusieurs patients (Guerrini et al., 2009).

La recherche d'alternatives aux héparines est un sujet qui a suscité de nombreux

travaux, principalement axés sur la recherche de nouveaux anticoagulants, mais tout aussi importants quant à la recherche d'inhibiteurs de l'héparanase. De nombreux polysaccharides sulfatés, structuralement proches des héparines, peuvent être obtenus à partir de biomasses algales tels que les fucoïdanes ou les carraghénanes. Une autre stratégie consiste en l'hypersulfatation de dextrans extraits de cultures bactériennes qui permet l'obtention de dextrans sulfate. De part leur analogie structurale avec les héparanes sulfate et donc leur intérêt thérapeutique, ces polysaccharides sulfatés représentent un **fort potentiel de valorisation en tant qu'actifs santé**, une thématique de recherche à laquelle s'attache tout particulièrement notre laboratoire.

Dans le **1^{er} chapitre** de ce manuscrit, nous nous sommes donc concentrés sur **la production de polysaccharides sulfatés de bas poids moléculaires inhibiteurs de l'héparanase**.

Les composés qui ont été choisis pour cette étude étaient : les héparines et chondroïtine-4-sulfate d'origine animale, les dextrans sulfate pouvant être produits par l'intermédiaire de dextrans bactériens, ainsi que les fucoïdanes (issus de *fucus vesiculosus*) et les carraghénanes- λ , - ι et - κ d'origines algales.

De part leur analogie de structure avec les héparines, **ces composés d'origines différentes présentent des activités anticoagulantes** qui, dans le cadre d'une inhibition ciblée de l'héparanase, deviennent des effets secondaires indésirables (Campo et al., 2009; Li et al., 2008; Zeerleder et al., 2002).

En 2013, une méthode de dépolymérisation a été développée au laboratoire qui, utilisée sur des héparines, a permis l'obtention d'HBPM dont les activités anti-coagulantes étaient réduites (Achour et al., 2013). Cette méthode associe une dépolymérisation chimique radicalaire utilisant le peroxyde d'hydrogène à une dépolymérisation physique utilisant les ultrasons.

Un autre procédé a également été testé, celui du glycol-split. Il correspond à une étape d'oxydation suivie d'une réduction. Utilisée sur les héparines, ce procédé permet de supprimer leurs activités anticoagulantes (Casu et al., 2002) et il semble augmenter la flexibilité des chaînes moléculaires, améliorant ainsi l'inhibition de l'héparanase (Naggi et al., 2005; Vlodavsky et al., 2007). Ce gain de plasticité nous a paru particulièrement intéressant quant à la modulation des activités biologiques des polysaccharides de notre étude.

Suite à ces observations, nous avons donc soumis nos polysaccharides sulfatés à : la

méthode de dépolymérisation radicalaire assistée par ultrasons (DR) seule, la méthode de glycol-split (GS) seule, ainsi que l'association des deux méthodes dans les deux ordres possibles : Dépolymérisation puis glycol-split (DR-GS), ou glycol split puis dépolymérisation (GS-DR).

L'activité recherchée **en priorité** dans notre travail est **une inhibition ciblée de l'héparanase**. Les activités anticoagulantes ont également été évaluées. L'inhibition de l'héparanase a été mesurée par un test enzymatique *in vitro* tandis que l'inhibition de la coagulation a été évaluée par des tests en coagulométrie sur les trois voies de la coagulations (intrinsèque, extrinsèque et commune) ainsi que sur des facteurs spécifiques tels que le Xa et le IIa (thrombine) en présence d'antithrombine.

Les résultats préliminaires de cette étude ont montré dans un premier temps que **tous les composés NF, exceptés les chondroïtines-4-sulfate exerçaient une inhibition de l'héparanase**. Les plus fortes inhibitions relatives ont été observées pour les dextrans sulfate, fucoïdanes, héparines et carrageenan- λ (respectivement 102%, 86%, 83% et 69% à 40 μ g/mL) et semblaient indiquer **une corrélation directe entre le taux de sulfatation des composés et leur potentiel d'inhibition de l'héparanase**. Cependant, tous présentaient également de fortes inhibitions des différentes composantes de la coagulation. Leurs activités se devaient donc d'être modulées afin d'essayer de gagner en spécificité sur l'inhibition de l'héparanase.

La dépolymérisation radicalaire assistée par ultrasons s'est avérée efficace sur tous les polysaccharides testés. Après 8h de dépolymérisation sous ultrasons en présence d'un ratio massique H₂O₂/polysaccharide de 0,15, des poids moléculaires inférieurs à 10 kDa ont pu être obtenus pour tous les polysaccharides excepté les carraghénanes- ι et - κ dont les poids moléculaires respectifs n'ont pu être réduits au delà de 77 kDa et 29 kDa. Nous avons observé que les dépolymérisations s'accompagnaient en général d'une perte d'activité, tant sur la coagulation que sur l'héparanase ainsi que d'une diminution du taux de sulfate.

Excepté pour les héparines, **le procédé de glycol split seul, s'est avéré inefficace pour moduler les activités biologiques des polysaccharides**. Nos expériences ont cependant confirmé une perte de l'activité anticoagulante des héparines-GS, notamment envers les facteurs spécifiques Xa et IIa comme le décrit la littérature (Casu et al., 2002). Pour autant, nos données ne montrent pas d'améliorations apportées par le GS quant à l'inhibition de

l'héparanase par les héparines comme l'indique la littérature (Naggi et al., 2005).

L'association DR-GS a permis l'obtention de composés de poids moléculaires inférieurs à ceux obtenus avec la DR. De plus, avec cette association, **le GS semble avoir un impact plus important sur les activités biologiques**. Par exemple, le carraghénane- λ -DR n'a montré aucune inhibition de l'héparanase et une activité anticoagulante modérée alors que le carraghénane- λ -DR-GS présentait une inhibition relative de l'héparanase de 44% et une activité anticoagulante quasi nulle.

Pour certains polysaccharides, **l'association DR-GS a entraîné une déstructuration trop importante menant à une perte totale d'activité**. Cela a notamment été observé pour les dextrans sulfate tandis qu'une fragmentation quasi-totale du composé s'est produite pour les fucoïdanes ou aucun poids moléculaire supérieur à 1000 Da n'a été obtenu. Cela serait associé au fait que les réactions radicalaires pendant la DR génèrent des dérivés sensibles à l'oxydation induite par le GS et ainsi une déstructuration totale (Horton, 2011).

Toutes ces données nous ont permis de conclure que **la sulfatation des composés était tout aussi importante que la taille des chaînes pour inhiber l'héparanase. Cela semble également valable pour l'inhibition des facteurs des 3 voies de la coagulation**.

La conception de polysaccharides sulfatés de bas poids moléculaire et l'analyse de leurs activités anti-héparanase et anticoagulante a permis d'identifier **des dérivés d'héparines et de carraghénane- λ** (notamment GS-DR et DR-GS) comme étant de **bons inhibiteurs de l'héparanase et de faibles inhibiteurs de la coagulation sanguine**. Cette spécificité d'inhibition de l'héparanase observée nous a mené à effectuer une étude plus approfondie des dérivés produits qui a fait l'objet d'une **publication dans le journal carbohydre polymer en février 2017** (Poupard et al, 2017).

Cette étude a repris une partie des données obtenues lors de la phase de criblage des polysaccharides sulfatés, puis s'est intéressée aux paramètres de la DR vis-à-vis de la réduction du poids moléculaire des carraghénanes- λ . Les résultats ont mis en avant que **l'augmentation du ratio H_2O_2 /carraghénane- λ permettait une dépolymérisation plus importante et plus rapide**, alors que des tentatives analogues effectuées sur un polysaccharide complexe extrait d'une bactérie n'avaient pas mené à ce constat (Petit et al., 2007). Ces résultats suggèrent qu'en ajustant les paramètres de ratio H_2O_2 /polysaccharide et

du temps de dépolymérisation il serait possible de contrôler la masse moléculaire moyenne que l'on souhaite obtenir. Ils confirment, par la même occasion, l'utilité de **la DR dont la réalisation se fait en une étape, est peu coûteuse et n'utilise pas de solvants organiques.**

L'étude a également permis d'aller plus en amont dans le comportement d'inhibition de l'héparanase par nos dérivés en obtenant leurs IC_{50} . Ces résultats sont particulièrement intéressants car **les IC_{50} calculés de l'héparine-NF et du carraghénane- λ -DR-GS (respectivement de 10,7 et 7,32 ng/mL) sont quasi identiques.** L'héparine étant l'inhibiteur de prédilection pour l'héparanase, ces résultats sont prometteurs pour le composé carraghénane- λ DR-GS. Ce composé est d'autant plus prometteur que **sa capacité d'inhibition de l'héparanase est très proche de celle de l'héparine non anticoagulante SST0001** actuellement en essai clinique pour le traitement anti-angiogénique de myélomes multiples par inhibition de l'héparanase. En effet, l' IC_{50} du SST0001 envers l'héparanase a été évalué à 3 nM pour une concentration d'héparanase de 2,5 nM (Pala et al., 2016), tandis que celle évaluée pour notre carraghénane- λ DR-GS correspond à 3,5 nM pour une concentration d'héparanase de 1,74 nM. Toutefois une caractérisation plus précise de la masse moléculaire du carraghénane- λ DR-GS devra être effectuée avant de pouvoir réellement affirmer ces résultats.

L'un des autres points positifs du carraghénane- λ -DR-GS est sa **faible cytotoxicité** (sur des cellules endothéliales) de 10% à la concentration de 500 μ g/mL alors qu'un mélange d'héparines non fractionnées à la même concentration induisait la mort de 50% des cellules.

De part l'intérêt présenté par le carraghénane- λ -DR-GS, **une étude plus approfondie sur sa structure a été réalisée par UHPLC-MS.** Cette étude a permis d'identifier des espèces allant de DP-2 à DP-10 et correspondant bien à la **structure D2S,6S** caractéristique des carraghénanes- λ . Des chaînes plus longues sont également présentes en solution mais de par la difficulté d'ionisation, ne sont pas observables en analyse en ESI en mode négatif. Les résultats obtenus ont également montré que **pour chaque DP différent, des espèces désulfatés partiellement ou en totalité existaient dans le mélange du carraghénane- λ -DR-GS.** La possibilité de cyclisations intramoléculaires détectées par la perte d' H_2O consécutive à une perte de fonction sulfate est également envisagée sur la moitié D2S,6S pour former un 3,6 anhydrogalactose (DA). Cette cyclisation induirait des **alternances entre structures de type carraghénane- λ (G2S - D2S,6S) et carraghénane- θ (G2S - DA2S).** Le changement de conformation de chaise ${}^4C_1$ à ${}^1C_4$ entre le motif D2S,6S et DA2S pourrait grandement

impacter les activités biologiques du composé.

Ces analyses en UHPLC-MS ont également permis d'élucider les modifications structurales provoquées par le procédé de GS. Les données obtenues ne semblent pas valider l'hypothèse qu'en dépolymérisant le carraghénane- λ , la perte de sulfate engendrée pourrait produire des motifs D2OH,6S dont les diols vicinaux pourraient permettre des ouvertures de cycles pyranosiques par le procédé de GS. En réalité, le GS ne semble pas ouvrir de cycles en milieu de chaînes. En effet, **les cycles pyranosiques ouverts par ce procédé seraient plus probablement ceux des extrémités réductrices et non réductrices**. A ce stade de l'étude, il est donc encore difficile de distinguer structuralement ce qui permet une faible inhibition de la coagulation et une forte inhibition de l'héparanase pour le carraghénane- λ -DR-GS.

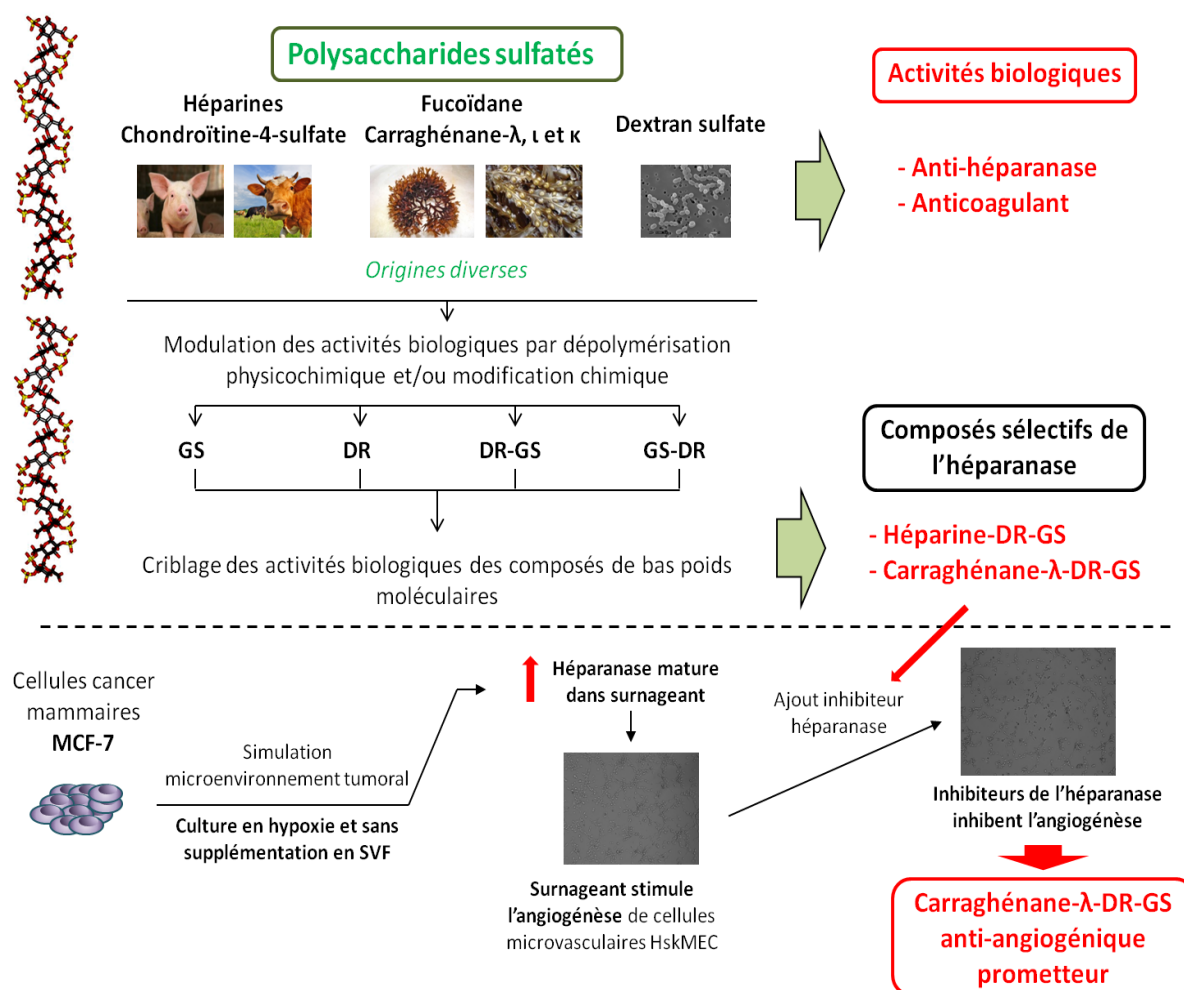


Figure 53 : Résumé schématique des travaux réalisés dans le manuscrit, : de la production de polysaccharides de bas poids moléculaires pour l'inhibition ciblée de l'héparanase à l'évaluation de leur activité anti-angiogénique.

Quoi qu'il en soit, **le profil d'inhibition de l'héparanase qu'offre le carraghénane- λ -DR-GS est prometteur quant à l'inhibition de l'angiogénèse médiée par cette enzyme.**

Les travaux réalisés dans le **chapitre 2** étaient destinés à concevoir un modèle dans lequel nous pourrions étudier **le rôle de l'héparanase dans l'angiogénèse des tumeurs mammaires ainsi que le rôle de ses inhibiteurs**.

L'étude a porté sur **deux lignées de cancers mammaires** aux phénotypes différents, l'une non métastatique (**MCF-7**) et la seconde modérément métastatique (**MDA-MB-231**). Nous souhaitions, dans un premier temps, analyser l'impact que pouvait avoir les conditions particulières du microenvironnement tumoral comme **l'hypoxie et le manque de nutriments** sur la production et la sécrétion d'héparanase (forme pro ou forme mature) par ces lignées cellulaires. Pour simuler l'hypoxie, ces cellules ont été cultivées dans une atmosphère contenant 1% d'oxygène tandis que pour simuler le manque de nutriments, elles ont été cultivées sans sérum de veau fœtal (SVF). Ces analyses ont également été effectuées sur la lignée de cellules endothéliales microvasculaires (HskMEC) que nous souhaitions utiliser pour l'évaluation de l'angiogénèse.

Les premiers résultats ont été obtenus par des mesures en western blot des lysats cellulaires. Pour les deux lignées de cancer mammaire, de l'héparanase sous sa forme pro et mature était présente dans les lysats cellulaires cultivés en normoxie. La lignée MCF-7 semblait cependant favoriser la production d'héparanase mature. Les résultats obtenus en hypoxie montraient une forte diminution de la forme pro-héparanase dans les lysats cellulaires et toujours une présence résiduelle d'héparanase mature. Nous avons donc émis **l'hypothèse qu'en hypoxie, la production d'héparanase mature était favorisée**, ce qui expliquait la baisse du taux de pro-héparanase. Nous avons également avancé que si aucun surplus d'héparanase mature ne semblait visible dans les lysats cellulaires obtenus en hypoxie, la raison pouvait être que l'héparanase mature était bien produite en plus grande quantité mais qu'elle était **excrétée dans le microenvironnement**. L'ajout ou non de SVF dans les cultures n'a pas montré d'impact sur la quantité d'héparanase pro ou mature produite.

Pour vérifier ces hypothèses nous avons réalisé un dosage ELISA de l'héparanase dans les surnageants cellulaires. Une très faible différence en faveur de l'excrétion de l'héparanase mature en conditions hypoxiques a été observée pour la lignée MDA-MB-231. En revanche, pour la lignée MCF-7, **l'hypoxie semble clairement favoriser une sécrétion de l'héparanase mature dans le milieu extracellulaire**. La sécrétion observée était encore plus importante dans les cultures sans sérum. Ces résultats montrent que pour la lignée MCF-7, les conditions de stress du microenvironnement tumoral tel que l'hypoxie ou le manque de

nutriments favorisent clairement la sécrétion d'héparanase, probablement dans le but de déclencher l'angiogénèse qui viendrait pallier à ce manque d'oxygène et de nutriments. Nous avons été plus étonné de ne pas observer une sécrétion d'héparanase par la lignée MDA-MB-231 étant donné son phénotype pro-métastatique. Une hypothèse probable est que sur ce type de cellules invasives, l'héparanase est sécrétée, mais peut rester accrochée sur la paroi externe des cellules afin de dégrader la MEC et gagner en mobilité, ou pour dégrader la membrane basale des vaisseaux sanguins et entamer une extravasation dans le système circulatoire.

Ces premiers résultats nous ont mené à évaluer l'impact de ce surnageant riche en héparanase produit par les cellules MCF-7 en conditions hypoxiques et sans sérum sur l'angiogénèse des cellules endothéliales. Pour cela, des cellules endothéliales ont été cultivées **en hypoxie** puis déposées sur **un Matrigel 3D** en présence de **surnageant tumoral riche en héparanase**, ou de milieu de culture pour le contrôle. Les résultats obtenus par traitement d'images des photos prises en microscopie ont clairement montré une augmentation de l'angiogénèse d'un facteur 2 du à la présence de surnageant de MCF-7 riche en héparanase. L'étude cinétique de l'angiogénèse en fonction des paramètres du réseau angiogénique formé (nombre de **pseudo vaisseaux** de **jonctions** et de maille) a également permis de montrer que **l'angiogénèse se développait rapidement dans les 6 premières heures** avec ou sans surnageant puis tendait à former un réseau plus aboutit avec des mailles plus resserrées jusqu'à 24h.

La dernière partie de cette étude consistait à utiliser ce modèle d'angiogénèse sous hypoxie afin de tester le potentiel anti-angiogénique de nos meilleurs candidats anti-héparanase identifiés lors de la phase de criblage. Ces tests ont montré que notre meilleur candidat, le carraghénane- λ -DR-GS présentait une inhibition de la formation de pseudo vaisseaux (de 0 à 7h de culture) proche de celle observée pour l'héparine NF (respectivement 32% et 47%). Ces données corrôlaient totalement avec l'inhibition de l'héparanase que présentait ces composés, sans pour autant nous permettre d'affirmer que cette inhibition de l'angiogénèse héparanase dépendante. De plus, lors de cette étude, nous avons souhaité tester le Dextran sulfate DR-GS en tant que témoin négatif car il n'avait pas montré d'inhibition conséquente de l'héparanase. Sur le modèle d'angiogénèse, ce composé a en effet montré une inhibition très réduite de la formation de pseudo vaisseaux.

Un deuxième paramètre a alors été analysé : l'inhibition de l'angiogénèse par nos candidats inhibiteurs de l'héparanase en situation ou du surnageant riche en héparanase

provenant de MCF-7 était rajouté. Les inhibitions de l'angiogénèse relevées dans cette phase de test étaient toutes plus importantes que dans les conditions n'impliquant pas d'ajout de surnageant. Dans ces conditions, le carraghénane- λ -DR-GS inhibait la vitesse de formation des pseudo vaisseaux, de 0 à 7h, à hauteur de 48% tandis que l'héparine-NF inhibait cette même vitesse à hauteur de 57%. Ces résultats ont donc confirmé l'intérêt du carraghénane- λ -DR-GS comme anti-angiogénique alternatif aux héparines.

L'inhibition plus forte en présence de surnageant riche en héparanase semble supporter le fait que l'activité anti-angiogénique observée est liée à l'héparanase, cependant elle pourrait également être attribuée à une interaction des composés testés avec des facteurs de croissance pro-angiogéniques. En effet, il est décrit dans la littérature que les tumeurs mammaires surexpriment des facteurs pro-angiogéniques tel que le VEGF ou le FGF-2 (Relf et al., 1997). Or, si l'on observe les inhibiteurs de l'héparanase actuellement en essai clinique, comme le SST0001 ou le PG-545, ils sont tous décrits comme inhibant l'angiogénèse par inhibition de l'héparanase mais également par capture de certains facteurs de croissance (Rivara et al., 2016). De plus des dérivés de carraghénane- λ ont déjà été décrits pour interagir avec le FGF-2 (Niu et al., 2015). Il ne serait donc pas étonnant que notre carraghénane- λ -DR-GS exerce une activité anti-angiogénique en interagissant avec des facteurs de croissance.

Déterminer la structure exacte de ce composé et les cibles biologiques sur lesquelles il influe représente, par ailleurs, les principales perspectives pour la suite de ces travaux.

Perspectives

Différentes perspectives sont envisagées pour compléter ces travaux de thèse, tant sur l'aspect de la conception d'inhibiteurs de l'héparanase que sur le test d'angiogénèse impliquant les lignées cellulaires MCF-7 et Hsk-MEC. Ces perspectives sont énumérées ci-dessous et sont rassemblées au sein d'un schéma récapitulatif présenté (**Figure 55**)

Les travaux de criblage ont permis l'obtention **d'un composé inhibiteur de l'héparanase prometteur : le carraghénane- λ -DR-GS**. Ce dernier est dépourvu **d'activité anticoagulante** et les paramètres d'inhibition de l'héparanase identifiés sont **proches de ceux du SST0001** (Roneparstat), actuellement en phase I d'essai clinique pour le traitement du myélome multiple. Afin de compléter la caractérisation de ce composé, des analyses complémentaires sur la structure sont envisagées. Les premiers indices obtenus en UHPLC-MS pourront être complétés par l'analyse de fragments plus petits pour faciliter l'élucidation de la structure.

Afin d'obtenir ces fragments, plus facilement caractérisables en LC-MS et plus adaptés pour des analyses par RMN, la dégradation du dérivé carraghénane- λ -DR-GS par la **λ -carraghénase** issue de la bactérie marine *pseudoalteromonas carrageenovora* pourrait être une option intéressante. Cette enzyme permet l'obtention **d'oligosaccharides de carraghénane- λ allant jusqu'à DP2** (Guibet et al., 2007), dont le profil de sulfatation n'est pas altéré, comme c'est le cas pour des dépolymérisations en conditions acides ou radicalaires. Elle paraît donc particulièrement adaptée pour aider à la détermination de la structure du carraghénane- λ -DR-GS.

Comme nous l'avons proposé dans notre étude soumise au journal Marine Drugs, il est fort probable que le carraghénane- λ -DR-GS interagisse avec des facteurs de croissance en plus de l'héparanase. Des mesures évaluant les **constantes d'affinité** avec ces facteurs de croissance, à l'aide de la **technologie Biacore**, pourraient apporter des informations cruciales sur les interactions biologiques qu'exerce ce composé.

Très récemment au laboratoire, la synthèse de nanoparticules de fer recouvertes de manière non covalente par des héparines a été réalisée. Ces nanoparticules ont la particularité d'induire un **contraste T2 en IRM, d'allonger le temps de demie-vie** des héparines et peuvent être utilisées pour de la vectorisation grâce à leur capacité de magnétoguidage. Ces travaux qui font actuellement l'objet d'une publication soumise au journal *Biomaterials* pourraient être **adaptés aux carraghénanes- λ -DR-GS pour des tests *in vivo*** sur le petit animal en condition de xenogreffe qui permettrait de valider l'accumulation du nano-objet dans la tumeur. Un

autre protocole permettant d'évaluer la biodistribution du composé sur petit animal est également envisagé.

Concernant le modèle d'angiogénèse, une **caractérisation fine du surnageant** riche en héparanase produit par la lignée **MCF-7, en condition d'hypoxie et sans sérum**, est indispensable. Plusieurs axes de caractérisations sont envisagés pour la poursuite de ces travaux.

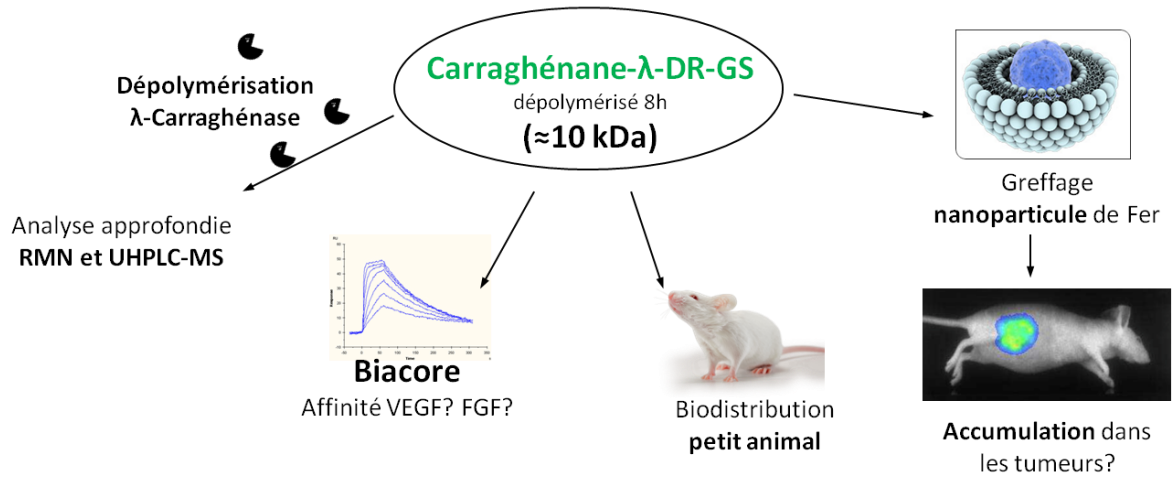
Dans un premier temps, le **dosage par méthode ELISA des facteurs de croissance tels que le VEGF et le FGF** dans les surnageants de culture pourrait être effectué.

Dans un second temps, il serait intéressant de déterminer si la hausse de la concentration en héparanase mesurée dans le surnageant est corrélée à une hausse de l'activité catalytique. Pour cela, nous envisageons d'ajouter l'héparane sulfate portant un système FRET (Biotin-HS-K), utilisé dans le test d'activité héparanase de nos travaux, au sein du milieu de culture hypoxique sans sérum de cellules MCF-7. Le **suivi de la dégradation du substrat par fluorimétrie** devrait permettre de déterminer si une activité catalytique de type héparanase est présente dans le milieu de culture.

Pour finir, il est envisagé d'effectuer des **co-cultures MCF-7/Hsk-MEC à l'aide de transwells**. Cette technologie permet de cultiver les deux lignées dans deux puits superposés baignant dans le même milieu de culture. Le puit supérieur possède un fond poreux qui permet **l'échange de signaux moléculaires** sans un contact direct entre les lignées. De cette manière, il sera possible d'étudier plus précisément le rôle des potentiels facteurs de croissance produits par MCF-7 ainsi que de l'héparanase sur les cellules Hsk-MEC au sein d'un Matrigel. Ces cultures utilisant les transwells sont également envisagées en utilisant des cellules MCF-7 dont l'expression de l'héparanase aurait été **abolie au préalable à l'aide de Si-RNA** dirigés contre le gène de l'enzyme (MCF-7 HPSE négatives). Cela nous permettra d'évaluer si les effets observés sur l'angiogénèse formée par les cellules Hsk-MEC sont bien médiés par l'héparanase.

Des analyses à l'aide d'un kit d'extraction des protéines membranaires sont actuellement en cours afin de déterminer si l'héparanase est ancrée à la surface des cellules MCF-7. Ces analyses nous permettront de mieux appréhender les résultats obtenus par western blot des lysats cellulaires et des dosages ELISA appliqués sur les surnageants.

Perspectives pour le candidat Carraghénane- λ -DR-GS



Perspectives pour le modèle d'angiogénèse dépendante de l'héparanase

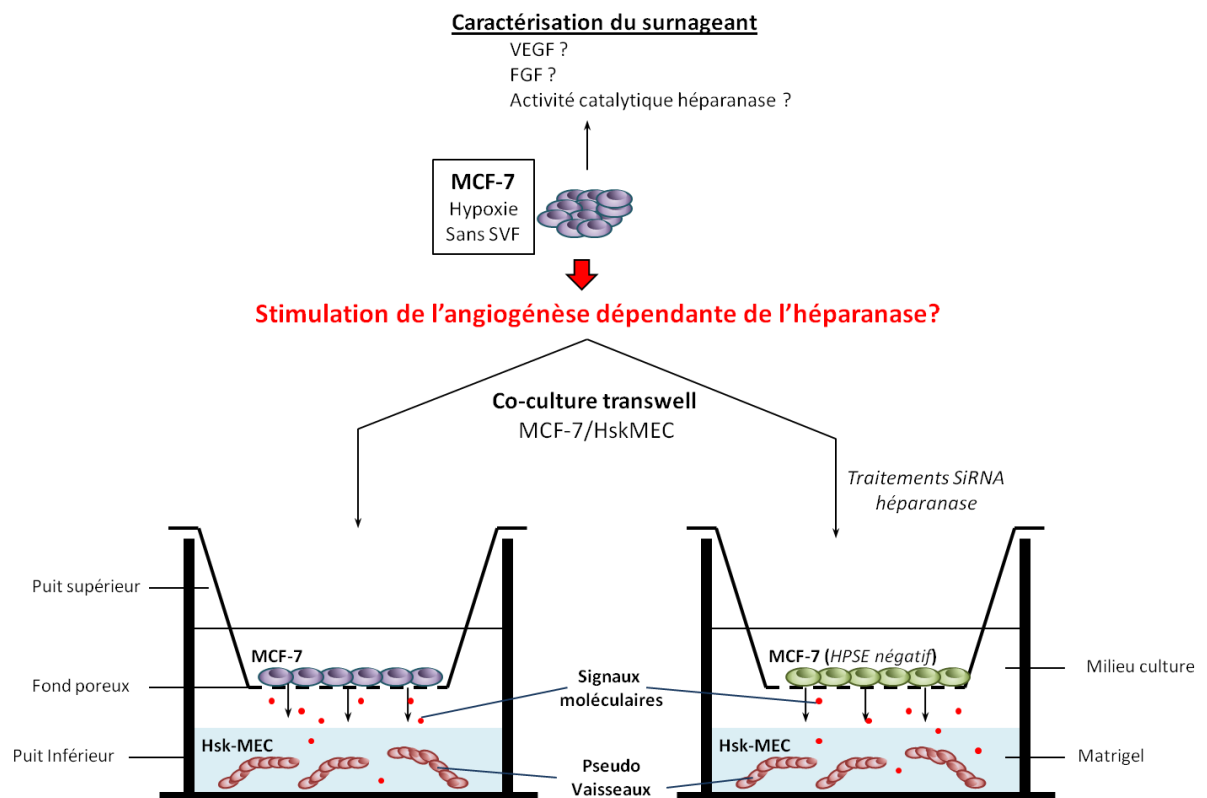


Figure 54 : Travaux envisagés pour compléter les données obtenues concernant les deux thématiques traitées dans la thèse.

Références Bibliographiques

-A-

- Abboud-Jarrous, G., Atzmon, R., Peretz, T., Palermo, C., Gadea, B.B., Joyce, J.A., Vlodavsky, I., 2008. Cathepsin L Is Responsible for Processing and Activation of Proheparanase through Multiple Cleavages of a Linker Segment. *J. Biol. Chem.* 283, 18167–18176. doi:10.1074/jbc.M801327200
- Abdollahi, A., Hahnfeldt, P., Maercker, C., Gröne, H.-J., Debus, J., Ansorge, W., Folkman, J., Hlatky, L., Huber, P.E., 2004. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Mol. Cell* 13, 649–663.
- Achour, O., 2014. Aide au criblage du microenvironnement tumoral par le développement d'un nano-système de détection et de traitement des tumeurs avec inhibition ciblée de l'héparanase. La Rochelle.
- Achour, O., Bridiau, N., Godhbani, A., Le Joubioux, F., Bordenave Juchereau, S., Sannier, F., Piot, J.-M., Fruitier Arnaudin, I., Maugard, T., 2013. Ultrasonic-assisted preparation of a low molecular weight heparin (LMWH) with anticoagulant activity. *Carbohydr. Polym.* 97, 684–689. doi:10.1016/j.carbpol.2013.05.046
- Achour, O., Poupard, N., Bridiau, N., Bordenave Juchereau, S., Sannier, F., Piot, J.-M., Fruitier Arnaudin, I., Maugard, T., 2016. Anti-heparanase activity of ultra-low-molecular-weight heparin produced by physicochemical depolymerization. *Carbohydr. Polym.* 135, 316–323. doi:10.1016/j.carbpol.2015.08.041
- Agarwal, N., Sonpavde, G., Sternberg, C.N., 2012. Novel Molecular Targets for the Therapy of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur. Urol.* 61, 950–960. doi:10.1016/j.eururo.2011.12.028
- Agnelli, Turpi, 2012. Thromboprophylaxis in Patients Receiving Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 366, 1839–1840. doi:10.1056/NEJMc1203094
- Aird, W.C., 2005. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J. Thromb. Haemost.* JTH 3, 1392–1406. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01328.x
- Albregues, J., Bertero, T., Grasset, E., Bonan, S., Maiel, M., Bourget, I., Philippe, C., Herraiz Serrano, C., Benamar, S., Croce, O., Sanz-Moreno, V., Meneguzzi, G., Feral, C.C., Cristofari, G., Gaggioli, C., 2015. Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat. Commun.* 6, 10204. doi:10.1038/ncomms10204
- Ale, M.T., Mikkelsen, J.D., Meyer, A.S., 2011. Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Mar. Drugs* 9, 2106–2130. doi:10.3390/md9102106
- Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A., 2008. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol. Rev.* 222, 155–161. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00607.x
- Allen, E., Walters, I.B., Hanahan, D., 2011. Brivanib, a Dual FGF/VEGF Inhibitor, Is Active Both First and Second Line against Mouse Pancreatic Neuroendocrine Tumors Developing Adaptive/Evasive Resistance to VEGF Inhibition. *Clin. Cancer Res.* 17, 5299–5310. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2847
- ANSM, 2014. Etat des lieux sur les héparines.
- Antonopoulos, A., Favetta, P., Helbert, W., Lafosse, M., 2005. On-Line Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Characterization of κ - and ι -Carrageenans. Application to the Hybrid ι - ν -Carrageenans. *Anal. Chem.* 77, 4125–4136. doi:10.1021/ac050091o

- Antonopoulos, A., Favetta, P., Lafosse, M., Helbert, W., 2004. Characterisation of iota-carrageenans oligosaccharides with high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A* 1059, 83–87.
- Arenillas, J.F., Sobrino, T., Castillo, J., Dávalos, A., 2007. The role of angiogenesis in damage and recovery from ischemic stroke. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* 9, 205–212.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., Isner, J.M., 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964–967.
- ASKCI Consulting Co. Ltd, 2015. Production and market of chondroitin sulfate industry in China (No. 3246980).
- Astrof, S., Hynes, R.O., 2009. Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 12, 165–175. doi:10.1007/s10456-009-9136-6
- Augustin, H.G., Koh, G.Y., Thurston, G., Alitalo, K., 2009. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 165–177. doi:10.1038/nrm2639

-B-

- Baeurle, S.A., Kiselev, M.G., Makarova, E.S., Nogovitsin, E.A., 2009. Effect of the counterion behavior on the frictional–compressive properties of chondroitin sulfate solutions. *Polymer* 50, 1805–1813. doi:10.1016/j.polymer.2009.01.066
- Barash, U., Cohen-Kaplan, V., Dowek, I., Sanderson, R.D., Ilan, N., Vlodavsky, I., 2010. Proteoglycans in health and disease: new concepts for heparanase function in tumor progression and metastasis: New concepts for heparanase function. *FEBS J.* 277, 3890–3903. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07799.x
- Bar-Ner, M., Eldor, A., Wasserman, L., Matzner, Y., Cohen, I.R., Fuks, Z., Vlodavsky, I., 1987. Inhibition of heparanase-mediated degradation of extracellular matrix heparan sulfate by non-anticoagulant heparin species. *Blood* 70, 551–557.
- Bartlett, M.R., Underwood, P.A., Parish, C.R., 1995. Comparative analysis of the ability of leucocytes, endothelial cells and platelets to degrade the subendothelial basement membrane: Evidence for cytokine dependence and detection of a novel sulfatase. *Immunol. Cell Biol.* 73, 113–124. doi:10.1038/icb.1995.19
- Ben-Baruch, A., 2003. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Res. BCR* 5, 31–36.
- Benjamin, L.E., Hemo, I., Keshet, E., 1998. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Dev. Camb. Engl.* 125, 1591–1598.
- Berger, W., Setinek, U., Mohr, T., Kindas-Mügge, I., Vetterlein, M., Dekan, G., Eckersberger, F., Caldas, C., Micksche, M., 1999. Evidence for a role of FGF-2 and FGF receptors in the proliferation of non-small cell lung cancer cells. *Int. J. Cancer* 83, 415–423.
- Bergers, G., Benjamin, L.E., 2003. Angiogenesis: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401–410. doi:10.1038/nrc1093
- Bergers, G., Hanahan, D., 2008. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8, 592–603. doi:10.1038/nrc2442
- Bhaumik, P., Dhepe, P.L., 2015. Chapter 1. Conversion of Biomass into Sugars, in: Murzin, D., Simakova, O. (Eds.), *Biomass Sugars for Non-Fuel Applications*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 1–53. doi:10.1039/9781782622079-00001
- Bigler, S.A., Deering, R.E., Brawer, M.K., 1993. Comparison of microscopic vascularity in

- benign and malignant prostate tissue. *Hum. Pathol.* 24, 220–226.
- Bikfalvi, A., 2004. Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis. *Semin. Thromb. Hemost.* 30, 379–385. doi:10.1055/s-2004-831051
- Bindert-Foucart, F., Belot, A., Delafosse, P., Remontet, L., Wordonoff, A.-S., Bossard, N., 2013. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Partie 1 – Tumeurs solides.
- Birner, P., Gatterbauer, B., Oberhuber, G., Schindl, M., Rössler, K., Proding, A., Budka, H., Hainfellner, J.A., 2001. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer* 92, 165–171.
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P., Lodish, H.F., 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* 342, 1350–1358. doi:10.1056/NEJM200005043421807
- Böhlen, P., Baird, A., Esch, F., Ling, N., Gospodarowicz, D., 1984. Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 5364–5368.
- Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J., Pouyssegur, J., 2007. Hypoxia and cancer. *J. Mol. Med.* 85, 1301–1307. doi:10.1007/s00109-007-0281-3
- Briozzo, P., Morisset, M., Capony, F., Rougeot, C., Rochefort, H., 1988. In vitro degradation of extracellular matrix with Mr 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells. *Cancer Res.* 48, 3688–3692.
- Bruemmer, D., 2012. Targeting Angiogenesis as Treatment for Obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 161–162. doi:10.1161/ATVBAHA.111.241992

-C-

- Campo, V.L., Kawano, D.F., Silva, D.B. da, Carvalho, I., 2009. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. *Carbohydr. Polym.* 77, 167–180. doi:10.1016/j.carbpol.2009.01.020
- Cao, Y., Cao, R., Hedlund, E.-M., 2008. Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 86, 785–789. doi:10.1007/s00109-008-0337-z
- Cao, Y., Xue, L., 2004. Angiostatin. *Semin. Thromb. Hemost.* 30, 83–93. doi:10.1055/s-2004-822973
- Capila, I., Linhardt, R.J., 2002. Heparin-protein interactions. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 41, 391–412.
- Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653–660. doi:10.1038/nm0603-653
- Carmeliet, P., Jain, R.K., 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307. doi:10.1038/nature10144
- Carpentier, G., 2012. Angiogenesis Analyzer for ImageJ.
- Carreau, A., Hafny-Rahbi, B.E., Matejuk, A., Grillon, C., Kieda, C., 2011a. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1239–1253. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x
- Carreau, A., Kieda, C., Grillon, C., 2011b. Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. *Exp. Cell Res.* 317, 29–41. doi:10.1016/j.yexcr.2010.08.011
- Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G., Hanahan, D., 2005. Drug resistance by evasion of

- antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8, 299–309. doi:10.1016/j.ccr.2005.09.005
- Cascone, T., Herynk, M.H., Xu, L., Du, Z., Kadara, H., Nilsson, M.B., Oborn, C.J., Park, Y.-Y., Erez, B., Jacoby, J.J., Lee, J.-S., Lin, H.Y., Ciardiello, F., Herbst, R.S., Langley, R.R., Heymach, J.V., 2011. Upregulated stromal EGFR and vascular remodeling in mouse xenograft models of angiogenesis inhibitor-resistant human lung adenocarcinoma. *J. Clin. Invest.* 121, 1313–1328. doi:10.1172/JCI42405
- Casu, B., Guerrini, M., Naggi, A., Perez, M., Torri, G., Ribatti, D., Carminati, P., Giannini, G., Penco, S., Pisano, C., Belleri, M., Rusnati, M., Presta, M., 2002. Short heparin sequences spaced by glycol-split uronate residues are antagonists of fibroblast growth factor 2 and angiogenesis inhibitors. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 10519–10528.
- Cathcart, J., Pulkoski-Gross, A., Cao, J., 2015. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. *Genes Dis.* 2, 26–34. doi:10.1016/j.gendis.2014.12.002
- Cesarman-Maus, G., Hajjar, K.A., 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* 129, 307–321. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x
- Chen, H., Yan, X., Lin, J., Wang, F., Xu, W., 2007. Depolymerized products of lambda-carrageenan as a potent angiogenesis inhibitor. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6910–6917. doi:10.1021/jf070183+
- Chen, Y., Williams, V., Filippova, M., Filippov, V., Duerksen-Hughes, P., 2014. Viral Carcinogenesis: Factors Inducing DNA Damage and Virus Integration. *Cancers* 6, 2155–2186. doi:10.3390/cancers6042155
- Chevolot, L., Foucault, A., Chaubet, F., Kervarec, N., Siquin, C., Fisher, A.-M., Boisson-Vidal, C., 1999. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr. Res.* 319, 154–165. doi:10.1016/S0008-6215(99)00127-5
- Choueiri, T.K., Schutz, F.A.B., Je, Y., Rosenberg, J.E., Bellmunt, J., 2010. Risk of Arterial Thromboembolic Events With Sunitinib and Sorafenib: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *J. Clin. Oncol.* 28, 2280–2285. doi:10.1200/JCO.2009.27.2757
- Chow, L.Q.M., Eckhardt, S.G., 2007. Sunitinib: From Rational Design to Clinical Efficacy. *J. Clin. Oncol.* 25, 884–896. doi:10.1200/JCO.2006.06.3602
- Ciancia, M., Nosedà, M.D., Matulewicz, M.C., Cerezo, A.S., 1993. Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu- and lambda-series. *Carbohydr. Polym.* 20, 95–98. doi:10.1016/0144-8617(93)90083-G
- Clegg, D.O., Reda, D.J., Harris, C.L., Klein, M.A., O'Dell, J.R., Hooper, M.M., Bradley, J.D., Bingham, C.O., Weisman, M.H., Jackson, C.G., Lane, N.E., Cush, J.J., Moreland, L.W., Schumacher, H.R., Oddis, C.V., Wolfe, F., Molitor, J.A., Yocum, D.E., Schnitzer, T.J., Furst, D.E., Sawitzke, A.D., Shi, H., Brandt, K.D., Moskowitz, R.W., Williams, H.J., 2006. Glucosamine, Chondroitin Sulfate, and the Two in Combination for Painful Knee Osteoarthritis. *N. Engl. J. Med.* 354, 795–808. doi:10.1056/NEJMoa052771
- Cohen, I., Pappo, O., Elkin, M., San, T., Bar-Shavit, R., Hazan, R., Peretz, T., Vlodavsky, I., Abramovitch, R., 2006. Heparanase promotes growth, angiogenesis and survival of primary breast tumors. *Int. J. Cancer* 118, 1609–1617. doi:10.1002/ijc.21552
- Collet, G., Lamerant-Fayel, N., Tertilt, M., El Hafny-Rahbi, B., Stepniewski, J., Guichard, A., Foucault-Collet, A., Klimkiewicz, K., Petoud, S., Matejuk, A., Grillon, C., Jozkowicz, A., Dulak, J., Kieda, C., 2014. Hypoxia-Regulated Overexpression of Soluble VEGFR2 Controls Angiogenesis and Inhibits Tumor Growth. *Mol. Cancer Ther.* 13, 165–178. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0637
- Cook, K.M., Figg, W.D., 2010. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA. Cancer J. Clin.* 60, 222–243. doi:10.3322/caac.20075

- Cooke, V.G., LeBleu, V.S., Keskin, D., Khan, Z., O'Connell, J.T., Teng, Y., Duncan, M.B., Xie, L., Maeda, G., Vong, S., Sugimoto, H., Rocha, R.M., Damascena, A., Brentani, R.R., Kalluri, R., 2012. Pericyte Depletion Results in Hypoxia-Associated Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis Mediated by Met Signaling Pathway. *Cancer Cell* 21, 66–81. doi:10.1016/j.ccr.2011.11.024
- Cooper, H.S., Murthy, S., Kido, K., Yoshitake, H., Flanigan, A., 2000. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis* 21, 757–768.
- Coussens, L.M., 2002. Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer--Trials and Tribulations. *Science* 295, 2387–2392. doi:10.1126/science.1067100

-D-

- Dabrow, M.B., Francesco, M.R., McBrearty, F.X., Caradonna, S., 1998. The effects of platelet-derived growth factor and receptor on normal and neoplastic human ovarian surface epithelium. *Gynecol. Oncol.* 71, 29–37. doi:10.1006/gyno.1998.5121
- David, S., 1995. Chimie molculaire et supramolculaire des sucres. EDP Sciences, Les Ulis.
- De Bont, R., 2004. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19, 169–185. doi:10.1093/mutage/geh025
- Delage, S., 2015. Antiangiogéniques : Une révolution.
- Dhanabal, M., Sethuraman, N., 2006. Endogenous angiogenesis inhibitors as therapeutic agents: historical perspective and future direction. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* 1, 223–236.
- Dong, J., Kukula, A.K., Toyoshima, M., Nakajima, M., 2000. Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene. *Gene* 253, 171–178.
- Douaiher, J., Succar, J., Lancerotto, L., Gurish, M.F., Orgill, D.P., Hamilton, M.J., Krilis, S.A., Stevens, R.L., 2014. Development of Mast Cells and Importance of Their Tryptase and Chymase Serine Proteases in Inflammation and Wound Healing, in: *Advances in Immunology*. Elsevier, pp. 211–252.
- Doyle, J.P., Giannouli, P., Rudolph, B., Morris, E.R., 2010. Preparation, authentication, rheology and conformation of theta carrageenan. *Carbohydr. Polym.* 80, 648–654. doi:10.1016/j.carbpol.2009.10.029
- Dredge, K., Hammond, E., Davis, K., Li, C.P., Liu, L., Johnstone, K., Handley, P., Wimmer, N., Gonda, T.J., Gautam, A., Ferro, V., Bytheway, I., 2010. The PG500 series: novel heparan sulfate mimetics as potent angiogenesis and heparanase inhibitors for cancer therapy. *Invest. New Drugs* 28, 276–283. doi:10.1007/s10637-009-9245-5
- Du, R., Lu, K.V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passequé, E., Song, H., VandenBerg, S., Johnson, R.S., Werb, Z., Bergers, G., 2008. HIF1 α Induces the Recruitment of Bone Marrow-Derived Vascular Modulatory Cells to Regulate Tumor Angiogenesis and Invasion. *Cancer Cell* 13, 206–220. doi:10.1016/j.ccr.2008.01.034
- Durbeej, M., 2010. Laminins. *Cell Tissue Res.* 339, 259–268. doi:10.1007/s00441-009-0838-2
- Dvorak, H.F., 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 315, 1650–1659. doi:10.1056/NEJM198612253152606

-E-

- Ebos, J.M.L., Lee, C.R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G.A., Christensen, J.G., Kerbel, R.S., 2009. Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis. *Cancer Cell* 15, 232–239. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.021
- Elalamy, I., 2010. Héparines : structure, propriétés pharmacologiques et activités. *EMC - Hématologie* 5, 1–12. doi:10.1016/S1155-1984(10)39844-X
- El-Emir, E., Boxer, G.M., Petrie, I.A., Boden, R.W., Dearling, J.L.J., Begent, R.H.J., Pedley, R.B., 2005. Tumour parameters affected by combretastatin A-4 phosphate therapy in a human colorectal xenograft model in nude mice. *Eur. J. Cancer* 41, 799–806. doi:10.1016/j.ejca.2005.01.001
- El-Kenawi, A.E., El-Remessy, A.B., 2013. Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales: Angiogenesis inhibitors in cancer therapy. *Br. J. Pharmacol.* 170, 712–729. doi:10.1111/bph.12344
- Elkin, M., 2001. Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action. *FASEB J.* doi:10.1096/fj.00-0895fje
- El-Safory, N.S., Fazary, A.E., Lee, C.-K., 2010. Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydr. Polym.* 81, 165–181. doi:10.1016/j.carbpol.2010.02.047
- Engblom, C., Pfirschke, C., Pittet, M.J., 2016. The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* 16, 447–462. doi:10.1038/nrc.2016.54
- Enomoto, K., Okamoto, H., Numata, Y., Takemoto, H., 2006. A simple and rapid assay for heparanase activity using homogeneous time-resolved fluorescence. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 912–917. doi:10.1016/j.jpba.2006.01.032
- Ernst, S., Langer, R., Cooney, C.L., Sasisekharan, R., 1995. Enzymatic Degradation of Glycosaminoglycans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 387–444. doi:10.3109/10409239509083490
- Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W.M., Szczylik, C., Oudard, S., Staehler, M., Negrier, S., Chevreau, C., Desai, A.A., Rolland, F., Demkow, T., Hutson, T.E., Gore, M., Anderson, S., Hofilena, G., Shan, M., Pena, C., Lathia, C., Bukowski, R.M., 2009. Sorafenib for Treatment of Renal Cell Carcinoma: Final Efficacy and Safety Results of the Phase III Treatment Approaches in Renal Cancer Global Evaluation Trial. *J. Clin. Oncol.* 27, 3312–3318. doi:10.1200/JCO.2008.19.5511
- Escudier, B., Pluzanska, A., Koralewski, P., Ravaud, A., Bracarda, S., Szczylik, C., Chevreau, C., Filipek, M., Melichar, B., Bajetta, E., Gorbunova, V., Bay, J.-O., Bodrogi, I., Jagiello-Gruszfeld, A., Moore, N., 2007. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *The Lancet* 370, 2103–2111. doi:10.1016/S0140-6736(07)61904-7
- Esko, J.D., Kimata, K., Lindahl, U., 2009. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

-F-

- Falshaw, R., Furneaux, R.H., 1994. Carrageenan from the tetrasporic stage of *Gigartina decipiens* (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydr. Res.* 252, 171–182. doi:10.1016/0008-6215(94)90014-0
- Ferrara, N., Henzel, W.J., 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding

- growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851–858.
- Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.-P., Novotny, W., 2004. Case history: Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 391–400. doi:10.1038/nrd1381
- Ferro, V., Liu, L., Johnstone, K.D., Wimmer, N., Karoli, T., Handley, P., Rowley, J., Dredge, K., Li, C.P., Hammond, E., Davis, K., Sarimaa, L., Harenberg, J., Bytheway, I., 2012. Discovery of PG545: A Highly Potent and Simultaneous Inhibitor of Angiogenesis, Tumor Growth, and Metastasis. *J. Med. Chem.* 55, 3804–3813. doi:10.1021/jm201708h
- Figg, W.D., Folkman, J. (Eds.), 2008. *Angiogenesis*. Springer US, Boston, MA.
- Flier, J.S., Underhill, L.H., Folkman, J., 1995. Clinical Applications of Research on Angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* 333, 1757–1763. doi:10.1056/NEJM199512283332608
- Folkman, J., 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 273–286. doi:10.1038/nrd2115
- Folkman, J., 2002. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.* 29, 15–18. doi:10.1053/sonc.2002.37263
- Folkman, J., 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1, 27–31.
- Folkman, J., 1989. Successful Treatment of an Angiogenic Disease. *N. Engl. J. Med.* 320, 1211–1212. doi:10.1056/NEJM198905043201811
- Folkman, J., 1971a. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182–1186. doi:10.1056/NEJM197111182852108
- Folkman, J., 1971b. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182–1186. doi:10.1056/NEJM197111182852108
- Folkman, J., Long, D.M., Becker, F.F., 1963. Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* 16, 453–467. doi:10.1002/1097-0142(196304)16:4<453::AID-CNCR2820160407>3.0.CO;2-Y
- Folkman, J., Shing, Y., 1992. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. *Adv. Exp. Med. Biol.* 313, 355–364.
- Folkman, J., Watson, K., Ingber, D., Hanahan, D., 1989. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339, 58–61. doi:10.1038/339058a0
- Fox, S.B., Generali, D.G., Harris, A.L., 2007. Breast tumour angiogenesis. *Breast Cancer Res.* 9, 216. doi:10.1186/bcr1796
- Frantz, C., Stewart, K.M., Weaver, V.M., 2010. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 4195–4200. doi:10.1242/jcs.023820
- Freeman, C., Parish, C.R., 1998. Human platelet heparanase: purification, characterization and catalytic activity. *Biochem. J.* 330 (Pt 3), 1341–1350.
- Friedman, H.S., Prados, M.D., Wen, P.Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L.E., Yung, W.K.A., Paleologos, N., Nicholas, M.K., Jensen, R., Vredenburgh, J., Huang, J., Zheng, M., Cloughesy, T., 2009. Bevacizumab Alone and in Combination With Irinotecan in Recurrent Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* 27, 4733–4740. doi:10.1200/JCO.2008.19.8721
- Funderburgh, J.L., 2000. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* 10, 951–958.
- Fux, L., Feibish, N., Cohen-Kaplan, V., Gingis-Velitski, S., Feld, S., Geffen, C., Vlodavsky, I., Ilan, N., 2009. Structure-Function Approach Identifies a COOH-Terminal Domain That Mediates Heparanase Signaling. *Cancer Res.* 69, 1758–1767. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1837

Fux, Liat, Ilan, N., Sanderson, R.D., Vlodavsky, I., 2009. Heparanase: busy at the cell surface. *Trends Biochem. Sci.* 34, 511–519. doi:10.1016/j.tibs.2009.06.005

-G-

- Gandhi, N.S., Freeman, C., Parish, C.R., Mancera, R.L., 2012. Computational analyses of the catalytic and heparin-binding sites and their interactions with glycosaminoglycans in glycoside hydrolase family 79 endo- α -D-glucuronidase (heparanase). *Glycobiology* 22, 35–55. doi:10.1093/glycob/cwr095
- Garber, M.E., Troyanskaya, O.G., Schluens, K., Petersen, S., Thaessler, Z., Pacyna-Gengelbach, M., van de Rijn, M., Rosen, G.D., Perou, C.M., Whyte, R.I., Altman, R.B., Brown, P.O., Botstein, D., Petersen, I., 2001. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13784–13789. doi:10.1073/pnas.241500798
- Gazzaniga, P., Gandini, O., Gradilone, A., Silvestri, I., Giuliani, L., Magnanti, M., Gallucci, M., Saccani, G., Frati, L., Agliano, A.M., 1999. Detection of basic fibroblast growth factor mRNA in urinary bladder cancer: correlation with local relapses. *Int. J. Oncol.* 14, 1123–1127.
- Gerhardt, H., Betsholtz, C., 2005. How do endothelial cells orientate? *EXS* 3–15.
- Godin, D.A., Fitzpatrick, P.C., Scandurro, A.B., Belafsky, P.C., Woodworth, B.A., Amedee, R.G., Beech, D.J., Beckman, B.S., 2000. PH20: a novel tumor marker for laryngeal cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 126, 402–404.
- Goel, S., Duda, D.G., Xu, L., Munn, L.L., Boucher, Y., Fukumura, D., Jain, R.K., 2011. Normalization of the Vasculature for Treatment of Cancer and Other Diseases. *Physiol. Rev.* 91, 1071–1121. doi:10.1152/physrev.00038.2010
- Gondi, C.S., Rao, J.S., 2013. Cathepsin B as a cancer target. *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 281–291. doi:10.1517/14728222.2013.740461
- Gonzalezgronow, M., Grenett, H., Gawdi, G., Pizzo, S., 2005. Angiostatin directly inhibits human prostate tumor cell invasion by blocking plasminogen binding to its cellular receptor, CD26. *Exp. Cell Res.* 303, 22–31. doi:10.1016/j.yexcr.2004.09.008
- Good, D.J., Polverini, P.J., Rastinejad, F., Le Beau, M.M., Lemons, R.S., Frazier, W.A., Bouck, N.P., 1990. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6624–6628.
- Goodall, K.J., Poon, I.K.H., Phipps, S., Hulett, M.D., 2014. Soluble Heparan Sulfate Fragments Generated by Heparanase Trigger the Release of Pro-Inflammatory Cytokines through TLR-4. *PLoS ONE* 9, e109596. doi:10.1371/journal.pone.0109596
- Goodwin, A.M., 2007. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc. Res.* 74, 172–183. doi:10.1016/j.mvr.2007.05.006
- Greenaway, J., Lawler, J., Moorehead, R., Bornstein, P., LaMarre, J., Petrik, J., 2007. Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *J. Cell. Physiol.* 210, 807–818. doi:10.1002/jcp.20904
- Gressett, S.M., Shah, S.R., 2009. Intricacies of Bevacizumab-Induced Toxicities and Their Management. *Ann. Pharmacother.* 43, 490–501. doi:10.1345/aph.1L426
- Gruber, B.L., Marchese, M.J., Kew, R., 1995. Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood* 86, 2488–2493.
- Guerrini, M., Shriver, Z., Bisio, A., Naggi, A., Casu, B., Sasisekharan, R., Torri, G., 2009. The Tainted Heparin Story: An Update. *Thromb. Haemost.* doi:10.1160/TH09-02-0079

Guibet, M., Colin, S., Barbeyron, T., Genicot, S., Kloareg, B., Michel, G., Helbert, W., 2007. Degradation of λ -carrageenan by *Pseudoalteromonas carrageenovora* λ -carrageenase: a new family of glycoside hydrolases unrelated to κ - and ι -carrageenases. *Biochem. J.* 404, 105. doi:10.1042/BJ20061359

-H-

- Haddad, O., Guyot, E., Marival, N., Chevalier, F., Maillard, L., Gadi, L., Laguillier-Morizot, C., Oudar, O., Sutton, A., Charnaux, N., Hlawaty, H., 2015. Heparanase and Syndecan-4 Are Involved in Low Molecular Weight Fucoidan-Induced Angiogenesis. *Mar. Drugs* 13, 6588–6608. doi:10.3390/md13116588
- Hammond, E., Handley, P., Dredge, K., Bytheway, I., 2013. Mechanisms of heparanase inhibition by the heparan sulfate mimetic PG545 and three structural analogues. *FEBS Open Bio* 3, 346–351. doi:10.1016/j.fob.2013.07.007
- Hanahan, D., Folkman, J., 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353–364.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanford, H.A., Wong, C.A., Kassan, H., Cundiff, D.L., Chandel, N., Underwood, S., Mitchell, C.A., Soff, G.A., 2003. Angiostatin(4.5)-mediated apoptosis of vascular endothelial cells. *Cancer Res.* 63, 4275–4280.
- Hascall, V., Esko, J.D., 2009. Hyaluronan, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- Haute Autorité de Santé, 2015. Rapport HAS Cyramza. France.
- He, X., 2004. Hypoxia Increases Heparanase-Dependent Tumor Cell Invasion, Which Can Be Inhibited by Antiheparanase Antibodies. *Cancer Res.* 64, 3928–3933. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2718
- Heinen, C.D., Schmutte, C., Fishel, R., 2002. DNA repair and tumorigenesis: lessons from hereditary cancer syndromes. *Cancer Biol. Ther.* 1, 477–485.
- Heinrich, M.C., Maki, R.G., Corless, C.L., Antonescu, C.R., Harlow, A., Griffith, D., Town, A., McKinley, A., Ou, W.-B., Fletcher, J.A., Fletcher, C.D.M., Huang, X., Cohen, D.P., Baum, C.M., Demetri, G.D., 2008. Primary and Secondary Kinase Genotypes Correlate With the Biological and Clinical Activity of Sunitinib in Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor. *J. Clin. Oncol.* 26, 5352–5359. doi:10.1200/JCO.2007.15.7461
- Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M., Jain, R.K., 1997. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat. Med.* 3, 177–182. doi:10.1038/nm0297-177
- Hendrix, M.J.C., Seftor, E.A., Hess, A.R., Seftor, R.E.B., 2003. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat. Rev. Cancer* 3, 411–421. doi:10.1038/nrc1092
- Hermanson, M., Funa, K., Hartman, M., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H., Westermark, B., Nistér, M., 1992. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res.* 52, 3213–3219.
- Heyman, B., Yang, Y., 2016. Mechanisms of heparanase inhibitors in cancer therapy. *Exp. Hematol.* 44, 1002–1012. doi:10.1016/j.exphem.2016.08.006

- Heyns, A.D., Eldor, A., Vlodavsky, I., Kaiser, N., Fridman, R., Panet, A., 1985. The antiproliferative effect of interferon and the mitogenic activity of growth factors are independent cell cycle events. Studies with vascular smooth muscle cells and endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 161, 297–306.
- Hickey, M.M., Simon, M.C., 2006. Regulation of Angiogenesis by Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors, in: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 217–257.
- Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J., 1999. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284, 1994–1998.
- Hollebecque, A., Massard, C., Soria, J.-C., 2012. Vascular disrupting agents: a delicate balance between efficacy and side effects. *Curr. Opin. Oncol.* 24, 305–315. doi:10.1097/CCO.0b013e32835249de
- Horton, D., 2011. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. Volume 65 Volume 65. Academic Press, Amsterdam, NL.
- Huang, D., Ding, Y., Zhou, M., Rini, B.I., Petillo, D., Qian, C.-N., Kahnoski, R., Futreal, P.A., Furge, K.A., Teh, B.T., 2010. Interleukin-8 Mediates Resistance to Antiangiogenic Agent Sunitinib in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 70, 1063–1071. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3965
- Huang, S.H., Waldron, J.N., Milosevic, M., Shen, X., Ringash, J., Su, J., Tong, L., Perez-Ordóñez, B., Weinreb, I., Bayley, A.J., Kim, J., Hope, A., Cho, B.C.J., Giuliani, M., Razak, A., Goldstein, D., Shi, W., Liu, F.-F., Xu, W., O’Sullivan, B., 2015. Prognostic value of pretreatment circulating neutrophils, monocytes, and lymphocytes in oropharyngeal cancer stratified by human papillomavirus status: Leukocyte and Oropharyngeal Cancer Outcomes. *Cancer* 121, 545–555. doi:10.1002/cncr.29100
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., Kabbinavar, F., 2004. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 2335–2342. doi:10.1056/NEJMoa032691

-I-

- Ilan, N., Elkin, M., Vlodavsky, I., 2006. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 2018–2039. doi:10.1016/j.biocel.2006.06.004
- INCa, 2014. *Plan Cancer 2014-2019*.
- Indraccolo, S., 2010. Interferon- α as angiogenesis inhibitor: Learning from tumor models. *Autoimmunity* 43, 244–247. doi:10.3109/08916930903510963
- Insight strategy and marketing, 2002. WO02060373.
- Iozzo, R.V., Schaefer, L., 2015. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* 42, 11–55. doi:10.1016/j.matbio.2015.02.003
- Italiano, J.E., Richardson, J.L., Patel-Hett, S., Battinelli, E., Zaslavsky, A., Short, S., Ryeom, S., Folkman, J., Klement, G.L., 2008. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood* 111, 1227–1233. doi:10.1182/blood-2007-09-113837
- Itano, N., Kimata, K., 2008. Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression. *Semin.*

-J-

- Jain, R.K., 2014. Antiangiogenesis Strategies Revisited: From Starving Tumors to Alleviating Hypoxia. *Cancer Cell* 26, 605–622. doi:10.1016/j.ccell.2014.10.006
- Jain, R.K., 2005. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science* 307, 58–62. doi:10.1126/science.1104819
- Javle, M., Smyth, E.C., Chau, I., 2014. Ramucirumab: Successfully Targeting Angiogenesis in Gastric Cancer. *Clin. Cancer Res.* 20, 5875–5881. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1071
- Je, Y., Schutz, F.A., Choueiri, T.K., 2009. Risk of bleeding with vascular endothelial growth factor receptor tyrosine-kinase inhibitors sunitinib and sorafenib: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Lancet Oncol.* 10, 967–974. doi:10.1016/S1470-2045(09)70222-0
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., Ewart, H., 2011. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Mar. Drugs* 9, 196–223. doi:10.3390/md9020196
- Jin, L., Abrahams, J.P., Skinner, R., Petitou, M., Pike, R.N., Carrell, R.W., 1997. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 14683–14688.
- Jo, J.-H., Do, J.-R., Kim, Y.-M., kim, dong-soo, Lee, T., kim, seong-bong, 2005. Optimization of shark (*squatina oculata*) cartilage hydrolysis for the preparation of Chondroitin sulfate. *Food Sci. Biotechnol.* 14, 654–655.

-K-

- Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J., Boot-Handford, R.P., 2007. Collagens at a glance. *J. Cell Sci.* 120, 1955–1958. doi:10.1242/jcs.03453
- Kallunki, T., Olsen, O.D., Jäättelä, M., 2013. Cancer-associated lysosomal changes: friends or foes? *Oncogene* 32, 1995–2004. doi:10.1038/onc.2012.292
- Kalluri, R., 2016. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 16, 582–598. doi:10.1038/nrc.2016.73
- Kamba, T., McDonald, D.M., 2007. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br. J. Cancer* 96, 1788–1795. doi:10.1038/sj.bjc.6603813
- Keating, G.M., 2014. Bevacizumab: A Review of Its Use in Advanced Cancer. *Drugs* 74, 1891–1925. doi:10.1007/s40265-014-0302-9
- Kerkela, R., Woulfe, K.C., Durand, J.-B., Vagnozzi, R., Kramer, D., Chu, T.F., Beahm, C., Chen, M.H., Force, T., 2009. Sunitinib-Induced Cardiotoxicity Is Mediated by Off-Target Inhibition of AMP-Activated Protein Kinase. *Clin. Transl. Sci.* 2, 15–25. doi:10.1111/j.1752-8062.2008.00090.x
- Khoshnoodi, J., Cartailier, J.-P., Alvares, K., Veis, A., Hudson, B.G., 2006. Molecular Recognition in the Assembly of Collagens: Terminal Noncollagenous Domains Are Key Recognition Modules in the Formation of Triple Helical Protomers. *J. Biol. Chem.* 281, 38117–38121. doi:10.1074/jbc.R600025200
- Kieda, C., Paprocka, M., Krawczyński, A., Załęcki, P., Dupuis, P., Monsigny, M., Radzikowski, C., Duś, D., 2002. New Human Microvascular Endothelial Cell Lines with Specific Adhesion Molecules Phenotypes. *Endothelium* 9, 247–261. doi:10.1080/10623320214736

- Kim, I.-G., Lee, Y.-S., 2003. Radiation-induced Tumorigenesis. *BMB Rep.* 36, 144–148. doi:10.5483/BMBRep.2003.36.1.144
- Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., Ferrara, N., 1993. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362, 841–844. doi:10.1038/362841a0
- Kindler, H.L., Niedzwiecki, D., Hollis, D., Sutherland, S., Schrag, D., Hurwitz, H., Innocenti, F., Mulcahy, M.F., O'Reilly, E., Wozniak, T.F., Picus, J., Bhargava, P., Mayer, R.J., Schilsky, R.L., Goldberg, R.M., 2010. Gemcitabine Plus Bevacizumab Compared With Gemcitabine Plus Placebo in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: Phase III Trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J. Clin. Oncol.* 28, 3617–3622. doi:10.1200/JCO.2010.28.1386
- Klein, M.D., Drongowski, R.A., Linhardt, R.J., Langer, R.S., 1982a. A colorimetric assay for chemical heparin in plasma. *Anal. Biochem.* 124, 59–64. doi:10.1016/0003-2697(82)90219-6
- Klein, M.D., Drongowski, R.A., Linhardt, R.J., Langer, R.S., 1982b. A colorimetric assay for chemical heparin in plasma. *Anal. Biochem.* 124, 59–64. doi:10.1016/0003-2697(82)90219-6
- Koblinski, J.E., Ahram, M., Sloane, B.F., 2000. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 291, 113–135.
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., Claesson-Welsh, L., 2011. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. J.* 437, 169–183. doi:10.1042/BJ20110301
- Korc, M., Friesel, R.E., 2009. The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Curr. Cancer Drug Targets* 9, 639–651.
- Kreisl, T.N., Kim, L., Moore, K., Duic, P., Royce, C., Stroud, I., Garren, N., Mackey, M., Butman, J.A., Camphausen, K., Park, J., Albert, P.S., Fine, H.A., 2009. Phase II Trial of Single-Agent Bevacizumab Followed by Bevacizumab Plus Irinotecan at Tumor Progression in Recurrent Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* 27, 740–745. doi:10.1200/JCO.2008.16.3055
- Kuczynski, E.A., Yin, M., Bar-Zion, A., Lee, C.R., Butz, H., Man, S., Daley, F., Vermeulen, P.B., Yousef, G.M., Foster, F.S., Reynolds, A.R., Kerbel, R.S., 2016. Co-option of Liver Vessels and Not Sprouting Angiogenesis Drives Acquired Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 108, djw030. doi:10.1093/jnci/djw030
- Kudchadkar, R., Gonzalez, R., Lewis, K.D., 2008. PI-88: a novel inhibitor of angiogenesis. *Expert Opin. Investig. Drugs* 17, 1769–1776. doi:10.1517/13543784.17.11.1769

-L-

- Lahaye, 2001. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *J. Appl. Phycol.* 13, 173–184.
- Lake, A.C., Vassy, R., Di Benedetto, M., Lavigne, D., Le Visage, C., Perret, G.Y., Letourneur, D., 2006. Low Molecular Weight Fucoidan Increases VEGF165-induced Endothelial Cell Migration by Enhancing VEGF165 Binding to VEGFR-2 and NRP1. *J. Biol. Chem.* 281, 37844–37852. doi:10.1074/jbc.M600686200
- Larsen, M., 2006. Cell and fibronectin dynamics during branching morphogenesis. *J. Cell Sci.* 119, 3376–3384. doi:10.1242/jcs.03079
- Lasagni, L., Francalanci, M., Annunziato, F., Lazzeri, E., Giannini, S., Cosmi, L., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Orlando, C., Maggi, E., Marra, F., Romagnani, S., Serio, M.,

- Romagnani, P., 2003. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J. Exp. Med.* 197, 1537–1549. doi:10.1084/jem.20021897
- Lawler, P.R., Lawler, J., 2012. Molecular Basis for the Regulation of Angiogenesis by Thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006627–a006627. doi:10.1101/cshperspect.a006627
- Lemmon, M.A., Schlessinger, J., 2010. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 141, 1117–1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011
- Leone, Voirin N, Roche L, Binder-Foucart F, Woronoff AS, Delafosse P, Remontet L, Bossard N, Uhry Z, 2015. Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2015 - (Technique).
- Lévesque, H., Marie, I., Cailleux, N., Hantute, N., Courtois, H., 1997. Coût des héparines de bas poids moléculaire utilisées en prophylaxie ou en traitement curatif de la maladie thromboembolique. *Rev. Médecine Interne* 18, 651s–656s. doi:10.1016/S0248-8663(97)80712-6
- Levy-Adam, F., Abboud-Jarrous, G., Guerrini, M., Beccati, D., Vlodavsky, I., Ilan, N., 2005. Identification and Characterization of Heparin/Heparan Sulfate Binding Domains of the Endoglycosidase Heparanase. *J. Biol. Chem.* 280, 20457–20466. doi:10.1074/jbc.M414546200
- Levy-Adam, F., Ilan, N., Vlodavsky, I., 2010. Tumorigenic and adhesive properties of heparanase. *Semin. Cancer Biol.* 20, 153–160. doi:10.1016/j.semcancer.2010.06.005
- Levy-Adam, F., Miao, H.-Q., Heinrikson, R.L., Vlodavsky, I., Ilan, N., 2003. Heterodimer formation is essential for heparanase enzymatic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 885–891.
- Li, B., Lu, F., Wei, X., Zhao, R., 2008. Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules* 13, 1671–1695. doi:10.3390/molecules13081671
- Lindahl, P., Johansson, B.R., Leveen, P., Betsholtz, C., 1997. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277, 242–245.
- Linhardt, R.J., Gunay, N.S., 1999a. Production and chemical processing of low molecular weight heparins. *Semin. Thromb. Hemost.* 25 Suppl 3, 5–16.
- Linhardt, R.J., Gunay, N.S., 1999b. Production and chemical processing of low molecular weight heparins. *Semin. Thromb. Hemost.* 25 Suppl 3, 5–16.
- Linhardt, R.J., Liu, J., 2012a. Synthetic heparin. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 217–219. doi:10.1016/j.coph.2011.12.002
- Linhardt, R.J., Liu, J., 2012b. Synthetic heparin. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 217–219. doi:10.1016/j.coph.2011.12.002
- Lionel Prin, Gilbert Faure, Guislaine Garcelain, 2011. Structure et organisation générale du système immunitaire.
- Liu, J., Zhan, X., Wan, J., Wang, Y., Wang, C., 2015. Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features versus adverse biological effects. *Carbohydr. Polym.* 121, 27–36. doi:10.1016/j.carbpol.2014.11.063
- Liu, W., Litwack, E.D., Stanley, M.J., Langford, J.K., Lander, A.D., Sanderson, R.D., 1998. Heparan sulfate proteoglycans as adhesive and anti-invasive molecules. Syndecans and glypican have distinct functions. *J. Biol. Chem.* 273, 22825–22832.
- Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., de Oliveira, A.C., Santoro, A., Raoul, J.-L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T.F., Galle, P.R., Seitz, J.-F., Borbath, I., Häussinger, D., Giannaris, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D., Bruix, J., 2008. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 359, 378–390. doi:10.1056/NEJMoa0708857

- Lloyd, J.B., Mason, R.W. (Eds.), 1996. *Biology of the Lysosome, Subcellular Biochemistry*. Springer US, Boston, MA.
- Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z., Bissell, M.J., 1997. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.* 139, 1861–1872.
- Lodish, H.F. (Ed.), 2000. *Molecular cell biology*, 4th ed. ed. W.H. Freeman, New York.
- Lu, T., Ramakrishnan, R., Altioek, S., Youn, J.-I., Cheng, P., Celis, E., Pisarev, V., Sherman, S., Sporn, M.B., Gabrilovich, D., 2011. Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 4015–4029. doi:10.1172/JCI45862
- Luch, A., 2005. Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 5, 113–125. doi:10.1038/nrc1546

-M-

- Mabjeesh, N.J., Amir, S., 2007. Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. *Histol. Histopathol.* 22, 559–572.
- Madan, A.K., Pang, Y., Wilkiemeyer, M.B., Yu, D., Beech, D.J., 1999a. Increased hyaluronidase expression in more aggressive prostate adenocarcinoma. *Oncol. Rep.* 6, 1431–1433.
- Madan, A.K., Yu, K., Dhurandhar, N., Cullinane, C., Pang, Y., Beech, D.J., 1999b. Association of hyaluronidase and breast adenocarcinoma invasiveness. *Oncol. Rep.* 6, 607–609.
- Maher, S., Romero-Weaver, A., Scarzello, A., Gamero, A., 2007. Interferon: Cellular Executioner or White Knight? *Curr. Med. Chem.* 14, 1279–1289. doi:10.2174/092986707780597907
- Maione, T.E., Gray, G.S., Petro, J., Hunt, A.J., Donner, A.L., Bauer, S.I., Carson, H.F., Sharpe, R.J., 1990. Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* 247, 77–79.
- Marieb, E.N., Hoehn, K., 2013. *Human anatomy & physiology*, 9th ed. ed. Pearson, Boston.
- Marinval, N., Saboural, P., Haddad, O., Maire, M., Bassand, K., Geinguenaud, F., Djaker, N., Ben Akrou, K., Lamy de la Chapelle, M., Robert, R., Oudar, O., Guyot, E., Laguillier-Morizot, C., Sutton, A., Chauvierre, C., Chaubet, F., Charnaux, N., Hlawaty, H., 2016. Identification of a Pro-Angiogenic Potential and Cellular Uptake Mechanism of a LMW Highly Sulfated Fraction of Fucoidan from *Ascophyllum nodosum*. *Mar. Drugs* 14, 185. doi:10.3390/md14100185
- Maruotti, N., Cantatore, F.P., Crivellato, E., Vacca, A., Ribatti, D., 2006. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Histol. Histopathol.* 21, 557–566.
- Mason, T.J., Peters, D., 2011. *Practical sonochemistry: uses and applications of ultrasound*, 2. ed., repr. ed. Woodhead, Cambridge.
- Maynard, S.E., Min, J.-Y., Merchan, J., Lim, K.-H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T.A., Morgan, J.P., Sellke, F.W., Stillman, I.E., Epstein, F.H., Sukhatme, V.P., Karumanchi, S.A., 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest.* 111, 649–658. doi:10.1172/JCI200317189
- McDonald, D.M., Choyke, P.L., 2003. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat. Med.* 9, 713–725. doi:10.1038/nm0603-713
- Micallef, L., Vedrenne, N., Billet, F., Coulomb, B., Darby, I.A., Desmoulière, A., 2012. The

- myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5, S5. doi:10.1186/1755-1536-5-S1-S5
- Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E.A., Shenkier, T., Cella, D., Davidson, N.E., 2007. Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 357, 2666–2676. doi:10.1056/NEJMoa072113
- Mordor Intelligence, 2017. Global carrageenan market, trends and forecasts (2017-2022).
- Motzer, R.J., Hutson, T.E., Tomczak, P., Michaelson, M.D., Bukowski, R.M., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Pili, R., Bjarnason, G.A., Garcia-del-Muro, X., Sosman, J.A., Solska, E., Wilding, G., Thompson, J.A., Kim, S.T., Chen, I., Huang, X., Figlin, R.A., 2009. Overall Survival and Updated Results for Sunitinib Compared With Interferon Alfa in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 27, 3584–3590. doi:10.1200/JCO.2008.20.1293
- Moutray, T., Chakravarthy, U., 2011. Age-related macular degeneration: current treatment and future options. *Ther. Adv. Chronic Dis.* 2, 325–331. doi:10.1177/2040622311415895
- Mulloy, B., Hogwood, J., 2015. Chromatographic Molecular Weight Measurements for Heparin, Its Fragments and Fractions, and Other Glycosaminoglycans, in: Balagurunathan, K., Nakato, H., Desai, U.R. (Eds.), *Glycosaminoglycans*. Springer New York, New York, NY, pp. 105–118.

-N-

- Nadav, L., Eldor, A., Yacoby-Zeevi, O., Zamir, E., Pecker, I., Ilan, N., Geiger, B., Vlodavsky, I., Katz, B.-Z., 2002. Activation, processing and trafficking of extracellular heparanase by primary human fibroblasts. *J. Cell Sci.* 115, 2179–2187.
- Naggi, A., Casu, B., Perez, M., Torri, G., Cassinelli, G., Penco, S., Pisano, C., Giannini, G., Ishai-Michaeli, R., Vlodavsky, I., 2005. Modulation of the Heparanase-inhibiting Activity of Heparin through Selective Desulfation, Graded N-Acetylation, and Glycol Splitting. *J. Biol. Chem.* 280, 12103–12113. doi:10.1074/jbc.M414217200
- Nagy, R., Sweet, K., Eng, C., 2004. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* 23, 6445–6470. doi:10.1038/sj.onc.1207714
- Nakajima, M., DeChavigny, A., Johnson, C.E., Hamada, J., Stein, C.A., Nicolson, G.L., 1991. Suramin. A potent inhibitor of melanoma heparanase and invasion. *J. Biol. Chem.* 266, 9661–9666.
- Nakajima, M., Irimura, T., Di Ferrante, N., Nicolson, G.L., 1984. Metastatic melanoma cell heparanase. Characterization of heparan sulfate degradation fragments produced by B16 melanoma endoglucuronidase. *J. Biol. Chem.* 259, 2283–2290.
- Nakajima, M., Irimura, T., Nicolson, G.L., 1988. Heparanases and tumor metastasis. *J. Cell. Biochem.* 36, 157–167. doi:10.1002/jcb.240360207
- Necas, Bartosikova, 2013. Carrageenan: a review. *Vet. Med. (Praha)* 58, 187–205.
- Neufeld, G., Kessler, O., 2006. Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 373–385. doi:10.1007/s10555-006-9011-5
- Nico, B., Crivellato, E., Guidolin, D., Annese, T., Longo, V., Finato, N., Vacca, A., Ribatti, D., 2010. Intussusceptive microvascular growth in human glioma. *Clin. Exp. Med.* 10, 93–98. doi:10.1007/s10238-009-0076-7
- Niu, T.-T., Zhang, D.-S., Chen, H.-M., Yan, X.-J., 2015. Modulation of the binding of basic fibroblast growth factor and heparanase activity by purified λ -carrageenan oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 125, 76–84. doi:10.1016/j.carbpol.2015.02.069
- Norden, A.D., Drappatz, J., Wen, P.Y., 2009. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma.

-O-

- Oikawa, T., Onozawa, C., Sakaguchi, M., Morita, I., Murota, S., 1994. Three isoforms of platelet-derived growth factors all have the capability to induce angiogenesis in vivo. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1686–1688.
- Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., Claesson-Welsh, L., 2006. VEGF receptor signalling — in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 359–371. doi:10.1038/nrm1911
- Oosthuysen, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., Nuyens, D., Brusselmans, K., Van Dorpe, J., Hellings, P., Gorselink, M., Heymans, S., Theilmeier, G., Dewerchin, M., Laudenbach, V., Vermynen, P., Raat, H., Acker, T., Vleminckx, V., Van Den Bosch, L., Cushman, N., Fujisawa, H., Drost, M.R., Sciot, R., Bruyninckx, F., Hicklin, D.J., Ince, C., Gressens, P., Lupu, F., Plate, K.H., Robberecht, W., Herbert, J.M., Collen, D., Carmeliet, P., 2001. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* 28, 131–138. doi:10.1038/88842
- O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., Folkman, J., 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277–285.
- O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H., Folkman, J., 1994. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315–328.
- Oreste, P., Zoppetti, G., 2012. Semi-synthetic Heparinoids, in: Lever, R., Mulloy, B., Page, C.P. (Eds.), *Heparin - A Century of Progress*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 403–422. doi:10.1007/978-3-642-23056-1_18

-P-

- Padera, T.P., Stoll, B.R., Tooredman, J.B., Capen, D., Tomaso, E. di, Jain, R.K., 2004. Pathology: Cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* 427, 695–695. doi:10.1038/427695a
- Paget, S., 1889. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet* 133, 571–573. doi:10.1016/S0140-6736(00)49915-0
- Pala, D., Rivara, S., Mor, M., Milazzo, F.M., Roscilli, G., Pavoni, E., Giannini, G., 2016. Kinetic analysis and molecular modeling of the inhibition mechanism of roneparstat (SST0001) on human heparanase. *Glycobiology* 26, 640–654. doi:10.1093/glycob/cww003
- Parish, C.R., Coombe, D.R., Jakobsen, K.B., Bennett, F.A., Underwood, P.A., 1987. Evidence that sulphated polysaccharides inhibit tumour metastasis by blocking tumour-cell-derived heparanases. *Int. J. Cancer* 40, 511–518.
- Parish, C.R., Freeman, C., Brown, K.J., Francis, D.J., Cowden, W.B., 1999. Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity. *Cancer Res.* 59, 3433–3441.
- Parish, C.R., Freeman, C., Hulett, M.D., 2001a. Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. *Biochim. Biophys. Acta* 1471, M99-108.

- Parish, C.R., Freeman, C., Hulett, M.D., 2001b. Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. *Biochim. Biophys. Acta* 1471, M99-108.
- Parish, Snowden, 1996. Sulphated polysaccharides having anti-metastatic and/or anti-inflammatory activity. 5,541,166.
- Pestman, J.M., Engberts, J.B.F.N., de Jong, F., 2010. Sonochemistry: Theory and applications. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 113, 533–542. doi:10.1002/recl.19941131202
- Peterson, S.B., Liu, J., 2013. Multi-faceted substrate specificity of heparanase. *Matrix Biol.* 32, 223–227. doi:10.1016/j.matbio.2013.02.006
- Peterson, S.B., Liu, J., 2010. Unraveling the Specificity of Heparanase Utilizing Synthetic Substrates. *J. Biol. Chem.* 285, 14504–14513. doi:10.1074/jbc.M110.104166
- Petit, A.-C., Noiret, N., Guezennec, J., Gondrexon, N., Collic-Jouault, S., 2007. Ultrasonic depolymerization of an exopolysaccharide produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. *Ultrason. Sonochem.* 14, 107–112. doi:10.1016/j.ultsonch.2006.03.010
- Petrelli, F., Barni, S., 2012. Bevacizumab in advanced breast cancer: an opportunity as second-line therapy? *Med. Oncol.* 29, 1–4. doi:10.1007/s12032-010-9773-z
- Pisano, C., Vlodavsky, I., Ilan, N., Zunino, F., 2014. The potential of heparanase as a therapeutic target in cancer. *Biochem. Pharmacol.* 89, 12–19. doi:10.1016/j.bcp.2014.02.010
- Portenlänger, G., Heusinger, H., 1997. The influence of frequency on the mechanical and radical effects for the ultrasonic degradation of dextrans. *Ultrason. Sonochem.* 4, 127–130.
- Poupard, N., Groult, H., Bodin, J., Bridiau, N., Bordenave-Juchereau, S., Sannier, F., Piot, J.-M., Fruitier-Arnaudin, I., Maugard, T., 2017a. Production of heparin and λ -carrageenan anti-heparanase derivatives using a combination of physicochemical depolymerization and glycol splitting. *Carbohydr. Polym.* doi:10.1016/j.carbpol.2017.02.040
- Poupard, N., Groult, H., Bodin, J., Bridiau, N., Bordenave-Juchereau, S., Sannier, F., Piot, J.-M., Fruitier-Arnaudin, I., Maugard, T., 2017b. Production of heparin and λ -carrageenan anti-heparanase derivatives using a combination of physicochemical depolymerization and glycol splitting. *Carbohydr. Polym.* 166, 156–165. doi:10.1016/j.carbpol.2017.02.040
- Presta, M., Leali, D., Stabile, H., Ronca, R., Camozzi, M., Coco, L., Moroni, E., Liekens, S., Rusnati, M., 2003. Heparin Derivatives as Angiogenesis Inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 9, 553–566. doi:10.2174/1381612033391379

-R-

- Rabelink, T.J., van den Berg, B.M., Garsen, M., Wang, G., Elkin, M., van der Vlag, J., 2017. Heparanase: roles in cell survival, extracellular matrix remodelling and the development of kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* doi:10.1038/nrneph.2017.6
- Rafii, S., 2000. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J. Clin. Invest.* 105, 17–19. doi:10.1172/JCI8774
- Ramani, V.C., Purushothaman, A., Stewart, M.D., Thompson, C.A., Vlodavsky, I., Au, J.L.-S., Sanderson, R.D., 2013. The heparanase/syndecan-1 axis in cancer: mechanisms and therapies. *FEBS J.* 280, 2294–2306. doi:10.1111/febs.12168
- Ramlau, R., Gorbunova, V., Ciuleanu, T.E., Novello, S., Ozguroglu, M., Goksel, T., Baldotto, C., Bennouna, J., Shepherd, F.A., Le-Guennec, S., Rey, A., Miller, V., Thatcher, N., Scagliotti, G., 2012. Aflibercept and Docetaxel Versus Docetaxel Alone After

- Platinum Failure in Patients With Advanced or Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Controlled Phase III Trial. *J. Clin. Oncol.* 30, 3640–3647. doi:10.1200/JCO.2012.42.6932
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Bateman, A., 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 38, D227–D233. doi:10.1093/nar/gkp971
- Raymond, E., Dahan, L., Raoul, J.-L., Bang, Y.-J., Borbath, I., Lombard-Bohas, C., Valle, J., Metrakos, P., Smith, D., Vinik, A., Chen, J.-S., Hörsch, D., Hammel, P., Wiedenmann, B., Van Cutsem, E., Patyna, S., Lu, D.R., Blanckmeister, C., Chao, R., Ruzsniowski, P., 2011. Sunitinib Malate for the Treatment of Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *N. Engl. J. Med.* 364, 501–513. doi:10.1056/NEJMoa1003825
- Reitan, N.K., Thuen, M., Goa, P.E., de Lange Davies, C., 2010. Characterization of tumor microvascular structure and permeability: comparison between magnetic resonance imaging and intravital confocal imaging. *J. Biomed. Opt.* 15, 036004. doi:10.1117/1.3431095
- Relf, M., LeJeune, S., Scott, P.A., Fox, S., Smith, K., Leek, R., Moghaddam, A., Whitehouse, R., Bicknell, R., Harris, A.L., 1997. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res.* 57, 963–969.
- Renault, B., 2003. Comixture of dextran sulfate/escin for treating skin redness/edema and/or sensitive skin. US6562355 B1.
- Ribatti, D., Nico, B., Floris, C., Mangieri, D., Piras, F., Ennas, M.G., Vacca, A., Sirigu, P., 2005. Microvascular density, vascular endothelial growth factor immunoreactivity in tumor cells, vessel diameter and intussusceptive microvascular growth in primary melanoma. *Oncol. Rep.* 14, 81–84.
- Ricard-Blum, S., Ruggiero, F., 2005. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol. Biol.* 53, 430–442. doi:10.1016/j.patbio.2004.12.024
- Rini, B.I., Escudier, B., Tomczak, P., Kaprin, A., Szczylik, C., Hutson, T.E., Michaelson, M.D., Gorbunova, V.A., Gore, M.E., Rusakov, I.G., Negrier, S., Ou, Y.-C., Castellano, D., Lim, H.Y., Uemura, H., Tarazi, J., Cella, D., Chen, C., Rosbrook, B., Kim, S., Motzer, R.J., 2011. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *The Lancet* 378, 1931–1939. doi:10.1016/S0140-6736(11)61613-9
- Risau, W., 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671–674. doi:10.1038/386671a0
- Ritchie, J.P., Ramani, V.C., Ren, Y., Naggi, A., Torri, G., Casu, B., Penco, S., Pisano, C., Carminati, P., Tortoreto, M., Zunino, F., Vlodavsky, I., Sanderson, R.D., Yang, Y., 2011. SST0001, a Chemically Modified Heparin, Inhibits Myeloma Growth and Angiogenesis via Disruption of the Heparanase/Syndecan-1 Axis. *Clin. Cancer Res.* 17, 1382–1393. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2476
- Rivara, S., Milazzo, F.M., Giannini, G., 2016. Heparanase: a rainbow pharmacological target associated to multiple pathologies including rare diseases. *Future Med. Chem.* 8, 647–680. doi:10.4155/fmc-2016-0012
- Rivera, L.B., Bergers, G., 2015. Tumor angiogenesis, from foe to friend. *Science* 349, 694–695. doi:10.1126/science.aad0862
- Ruffell, B., Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Ho, C.M.T., Pryer, N., Daniel, D., Hwang, E.S., Rugo, H.S., Coussens, L.M., 2014. Macrophage IL-10 Blocks CD8⁺ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. *Cancer Cell* 26, 623–637. doi:10.1016/j.ccell.2014.09.006

- Saleem, S.J., Martin, R.K., Morales, J.K., Sturgill, J.L., Gibb, D.R., Graham, L., Bear, H.D., Manjili, M.H., Ryan, J.J., Conrad, D.H., 2012. Cutting edge: mast cells critically augment myeloid-derived suppressor cell activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189, 511–515. doi:10.4049/jimmunol.1200647
- Saltz, L.B., Lenz, H.-J., Kindler, H.L., Hochster, H.S., Wadler, S., Hoff, P.M., Kemeny, N.E., Hollywood, E.M., Gonen, M., Quinones, M., Morse, M., Chen, H.X., 2007. Randomized Phase II Trial of Cetuximab, Bevacizumab, and Irinotecan Compared With Cetuximab and Bevacizumab Alone in Irinotecan-Refractory Colorectal Cancer: The BOND-2 Study. *J. Clin. Oncol.* 25, 4557–4561. doi:10.1200/JCO.2007.12.0949
- Sanderson, R.D., 2001. Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 89–98. doi:10.1006/scdb.2000.0241
- Sanderson, R.D., Yang, Y., Purushothaman, A., Khotskaya, Y.B., Ritchie, J.P., Ramani, V.C., 2010. Proteoglycans and Cancer, in: Zent, R., Pozzi, A. (Eds.), *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*. Springer New York, New York, NY, pp. 191–215.
- Sandler, A., Gray, R., Perry, M.C., Brahmer, J., Schiller, J.H., Dowlati, A., Lilienbaum, R., Johnson, D.H., 2006. Paclitaxel–Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 355, 2542–2550. doi:10.1056/NEJMoa061884
- Sasisekharan, R., Venkataraman, G., 2000. Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 626–631.
- Schiraldi, C., Cimini, D., De Rosa, M., 2010. Production of chondroitin sulfate and chondroitin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1209–1220. doi:10.1007/s00253-010-2677-1
- Schved, 2007. *Physiologie de l'hémostase*.
- Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F., 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983–985.
- Sevenich, L., Joyce, J.A., 2014. Pericellular proteolysis in cancer. *Genes Dev.* 28, 2331–2347. doi:10.1101/gad.250647.114
- Shafat, I., Vlodavsky, I., Ilan, N., 2006. Characterization of Mechanisms Involved in Secretion of Active Heparanase. *J. Biol. Chem.* 281, 23804–23811. doi:10.1074/jbc.M602762200
- Shah, Z.C., Huffman, F.G., 2003. Current Availability and Consumption of Carrageenan-Containing Foods. *Ecol. Food Nutr.* 42, 357–371. doi:10.1080/03670240390265175
- Shanmugam, M., Mody, K., 2000. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Curr. Sci.* 79, 1672–1683.
- Shaya, D., Zhao, W., Garron, M.-L., Xiao, Z., Cui, Q., Zhang, Z., Sulea, T., Linhardt, R.J., Cygler, M., 2010. Catalytic Mechanism of Heparinase II Investigated by Site-directed Mutagenesis and the Crystal Structure with Its Substrate. *J. Biol. Chem.* 285, 20051–20061. doi:10.1074/jbc.M110.101071
- Shibuya, M., Claesson-Welsh, L., 2006. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* 312, 549–560. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.012
- Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., Klagsbrun, M., 1984. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 223, 1296–1299.
- Shiozawa, H., Takahashi, M., Takatsu, T., Kinoshita, T., Tanzawa, K., Hosoya, T., Furuya, K., Takahashi, S., Furihata, K., Seto, H., 1995. Trachyspic acid, a new metabolite

- produced by *Talaromyces trachyspermus*, that inhibits tumor cell heparanase: taxonomy of the producing strain, fermentation, isolation, structural elucidation, and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* 48, 357–362.
- Shojaei, F., Lee, J.H., Simmons, B.H., Wong, A., Esparza, C.O., Plumlee, P.A., Feng, J., Stewart, A.E., Hu-Lowe, D.D., Christensen, J.G., 2010. HGF/c-Met Acts as an Alternative Angiogenic Pathway in Sunitinib-Resistant Tumors. *Cancer Res.* 70, 10090–10100. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0489
- Shteingauz, A., Ilan, N., Vlodavsky, I., 2014. Processing of heparanase is mediated by syndecan-1 cytoplasmic domain and involves syntenin and α -actinin. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 4457–4470. doi:10.1007/s00018-014-1629-9
- Silva, F.R.F., Dore, C.M.P.G., Marques, C.T., Nascimento, M.S., Benevides, N.M.B., Rocha, H.A.O., Chavante, S.F., Leite, E.L., 2010. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. *Carbohydr. Polym.* 79, 26–33. doi:10.1016/j.carbpol.2009.07.010
- Slevin, M., Kumar, S., Gaffney, J., 2002. Angiogenic Oligosaccharides of Hyaluronan Induce Multiple Signaling Pathways Affecting Vascular Endothelial Cell Mitogenic and Wound Healing Responses. *J. Biol. Chem.* 277, 41046–41059. doi:10.1074/jbc.M109443200
- Soeda, S., Kozako, T., Iwata, K., Shimeno, H., 2000. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1497, 127–134.
- Staton, C., Kumar, I., Reed, M., Brown, N., 2007. Neuropilins in physiological and pathological angiogenesis. *J. Pathol.* 212, 237–248. doi:10.1002/path.2182
- Stern, R., Asari, A., Sugahara, K., 2006. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 699–715. doi:10.1016/j.ejcb.2006.05.009
- Stern, R., Kogan, G., Jedrzejewski, M.J., Šoltés, L., 2007. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnol. Adv.* 25, 537–557. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.07.001
- Stoletov, K., Kato, H., Zardoujian, E., Kelber, J., Yang, J., Shattil, S., Klemke, R., 2010. Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J. Cell Sci.* 123, 2332–2341. doi:10.1242/jcs.069443
- Sugahara, K., 2003. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 612–620. doi:10.1016/j.sbi.2003.09.011
- Szajek, A.Y., Chess, E., Johansen, K., Gratzl, G., Gray, E., Keire, D., Linhardt, R.J., Liu, J., Morris, T., Mulloy, B., Nasr, M., Shriver, Z., Torralba, P., Viskov, C., Williams, R., Woodcock, J., Workman, W., Al-Hakim, A., 2016. The US regulatory and pharmacopeia response to the global heparin contamination crisis. *Nat. Biotechnol.* 34, 625–630. doi:10.1038/nbt.3606

-T-

- Taipale, J., Keski-Oja, J., 1997. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 11, 51–59.
- Takahashi, H., Shibuya, M., 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci.* 109, 227–241. doi:10.1042/CS20040370
- Takaoka, M., Naomoto, Y., Ohkawa, T., Uetsuka, H., Shirakawa, Y., Uno, F., Fujiwara, T., Gunduz, M., Nagatsuka, H., Nakajima, M., Tanaka, N., Haisa, M., 2003. Heparanase expression correlates with invasion and poor prognosis in gastric cancers. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 83, 613–622.

- Tarallo, V., De Falco, S., 2015. The vascular endothelial growth factors and receptors family: Up to now the only target for anti-angiogenesis therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 64, 185–189. doi:10.1016/j.biocel.2015.04.008
- Tarin, D., Croft, C.B., 1969. Ultrastructural features of wound healing in mouse skin. *J. Anat.* 105, 189–190.
- Tarui, T., Miles, L.A., Takada, Y., 2001. Specific Interaction of Angiostatin with Integrin α_3 in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 39562–39568. doi:10.1074/jbc.M101815200
- Taylor, S., Folkman, J., 1982. Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 297, 307–312. doi:10.1038/297307a0
- Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Gialeli, C., Karamanos, N.K., 2016. Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97, 4–27. doi:10.1016/j.addr.2015.11.001
- Theocharis, A.D., Tsolakis, I., Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K., 2006. Chondroitin Sulfate as a Key Molecule in the Development of Atherosclerosis and Cancer Progression, in: *Advances in Pharmacology*. Elsevier, pp. 281–295.
- Toole, B.P., 2004. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat. Rev. Cancer* 4, 528–539. doi:10.1038/nrc1391
- Trojanovsky, B., Levchenko, T., Månsson, G., Matvijenko, O., Holmgren, L., 2001. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J. Cell Biol.* 152, 1247–1254.
- Tugues, S., Koch, S., Gualandi, L., Li, X., Claesson-Welsh, L., 2011. Vascular endothelial growth factors and receptors: Anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Mol. Aspects Med.* 32, 88–111. doi:10.1016/j.mam.2011.04.004

-V-

- Van Cutsem, E., Tabernero, J., Lakomy, R., Prenen, H., Prausova, J., Macarulla, T., Ruff, P., van Hazel, G.A., Moiseyenko, V., Ferry, D., McKendrick, J., Polikoff, J., Tellier, A., Castan, R., Allegra, C., 2012. Addition of Aflibercept to Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Improves Survival in a Phase III Randomized Trial in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated With an Oxaliplatin-Based Regimen. *J. Clin. Oncol.* 30, 3499–3506. doi:10.1200/JCO.2012.42.8201
- Vann, W.F., Schmidt, M.A., Jann, B., Jann, K., 1981. The structure of the capsular polysaccharide (K5 antigen) of urinary-tract-infective *Escherichia coli* 010:K5:H4. A polymer similar to desulfo-heparin. *Eur. J. Biochem.* 116, 359–364.
- Vasudev, N.S., Reynolds, A.R., 2014. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* 17, 471–494. doi:10.1007/s10456-014-9420-y
- Vlodavsky, I., Elkin, M., Abboud-Jarrous, G., Levi-Adam, F., Fuks, L., Shafat, I., Ilan, N., 2008. Heparanase: One Molecule with Multiple Functions in Cancer Progression. *Connect. Tissue Res.* 49, 207–210. doi:10.1080/03008200802143281
- Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Bitan, M., Pappo, O., Peretz, T., Michal, I., Spector, L., Pecker, I., 1999. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 5, 793–802. doi:10.1038/10518
- Vlodavsky, I., Goldshmidt, O., Zcharia, E., Metzger, S., Chajek-Shaul, T., Atzmon, R., Guatta-Rangini, Z., Friedmann, Y., 2001. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer progression and normal development. *Biochimie* 83, 831–839.
- Vlodavsky, I., Ilan, N., Nadir, Y., Brenner, B., Katz, B.-Z., Naggi, A., Torri, G., Casu, B., Sasisekharan, R., 2007. Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer

- progression. *Thromb. Res.* 120 Suppl 2, S112-120. doi:10.1016/S0049-3848(07)70139-1
- Vlodavsky, I., Korner, G., Ishai-Michaeli, R., Bashkin, P., Bar-Shavit, R., Fuks, Z., 1990. Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 9, 203–226.
- Vlodavsky, I., Singh, P., Boyango, I., Gutter-Kapon, L., Elkin, M., Sanderson, R.D., Ilan, N., 2016. Heparanase: From basic research to therapeutic applications in cancer and inflammation. *Drug Resist. Updat.* 29, 54–75. doi:10.1016/j.drug.2016.10.001
- von Sonntag, C., 1980. Free-Radical Reactions of Carbohydrates as Studied by Radiation Techniques, in: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Elsevier, pp. 7–77. doi:10.1016/S0065-2318(08)60019-0

-W-

- Wang, Y.-Q., Miao, Z.-H., 2013. Marine-Derived Angiogenesis Inhibitors for Cancer Therapy. *Mar. Drugs* 11, 903–933. doi:10.3390/md11030903
- Wegrowski, Y., Maquart, F., 2006. Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Tumor Progression, in: *Advances in Pharmacology*. Elsevier, pp. 297–321.
- Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R., Folkman, J., 1991. Tumor Angiogenesis and Metastasis — Correlation in Invasive Breast Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 324, 1–8. doi:10.1056/NEJM199101033240101
- Welsh, J.B., Sapinoso, L.M., Su, A.I., Kern, S.G., Wang-Rodriguez, J., Moskaluk, C.A., Frierson, H.F., Hampton, G.M., 2001. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res.* 61, 5974–5978.
- West, D.C., Hampson, I.N., Arnold, F., Kumar, S., 1985. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 228, 1324–1326.
- White, C.W., Sondheimer, H.M., Crouch, E.C., Wilson, H., Fan, L.L., 1989. Treatment of Pulmonary Hemangiomatosis with Recombinant Interferon Alfa-2a. *N. Engl. J. Med.* 320, 1197–1200. doi:10.1056/NEJM198905043201807
- Wickström, S.A., Alitalo, K., Keski-Oja, J., 2002. Endostatin associates with integrin $\alpha 5 \beta 1$ and caveolin-1, and activates Src via a tyrosyl phosphatase-dependent pathway in human endothelial cells. *Cancer Res.* 62, 5580–5589.
- Wilson, J.C., Laloo, A.E., Singh, S., Ferro, V., 2014. ^1H NMR spectroscopic studies establish that heparanase is a retaining glycosidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 185–188. doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.079
- Wise, S.G., Weiss, A.S., 2009. Tropoelastin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 494–497. doi:10.1016/j.biocel.2008.03.017
- Witz, I.P., Levy-Nissenbaum, O., 2006. The tumor microenvironment in the post-PAGET era. *Cancer Lett.* 242, 1–10. doi:10.1016/j.canlet.2005.12.005
- Wu, L., Viola, C.M., Brzozowski, A.M., Davies, G.J., 2015a. Structural characterization of human heparanase reveals insights into substrate recognition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 1016–1022. doi:10.1038/nsmb.3136
- Wu, L., Viola, C.M., Brzozowski, A.M., Davies, G.J., 2015b. Structural characterization of human heparanase reveals insights into substrate recognition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 1016–1022. doi:10.1038/nsmb.3136
- Wu, S., Chen, J.J., Kudelka, A., Lu, J., Zhu, X., 2008. Incidence and risk of hypertension with sorafenib in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 9, 117–123. doi:10.1016/S1470-2045(08)70003-2

Wu, W., Pan, C., 'en, Meng, K., Zhao, L., Du, L., Liu, Q., Lin, R., 2010. Hypoxia activates heparanase expression in an NF-kappaB dependent manner. *Oncol. Rep.* 23, 255–261.

-XYZ-

- Xu, D., Fuster, M.M., Lawrence, R., Esko, J.D., 2011. Heparan sulfate regulates VEGF165- and VEGF121-mediated vascular hyperpermeability. *J. Biol. Chem.* 286, 737–745. doi:10.1074/jbc.M110.177006
- Yamada, T., Ogamo, A., Saito, T., Watanabe, J., Uchiyama, H., Nakagawa, Y., 1997. Preparation and anti-HIV activity of low-molecular-weight carrageenans and their sulfated derivatives. *Carbohydr. Polym.* 32, 51–55. doi:10.1016/S0144-8617(96)00128-2
- Ye, W., 2016. The Complexity of Translating Anti-angiogenesis Therapy from Basic Science to the Clinic. *Dev. Cell* 37, 114–125. doi:10.1016/j.devcel.2016.03.015
- Yokoyama, Y., Ramakrishnan, S., 2007. Binding of endostatin to human ovarian cancer cells inhibits cell attachment. *Int. J. Cancer* 121, 2402–2409. doi:10.1002/ijc.22935
- Yousoufian, H., Hicklin, D.J., Rowinsky, E.K., 2007. Review: Monoclonal Antibodies to the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 in Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* 13, 5544s–5548s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1107
- Zaidi, N., Maurer, A., Nieke, S., Kalbacher, H., 2008. Cathepsin D: A cellular roadmap. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 5–9. doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.099
- Zcharia, E., Metzger, S., Chajek-Shaul, T., Friedmann, Y., Pappo, O., Aviv, A., Elkin, M., Pecker, I., Peretz, T., Vlodavsky, I., 2001. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer progression and mammary gland morphogenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 6, 311–322.
- Zeerleder, S., Mauron, T., Lämmle, B., Wuillemin, W.A., 2002. Effect of low-molecular weight dextran sulfate on coagulation and platelet function tests. *Thromb. Res.* 105, 441–446.
- Zeh, H.J., Lotze, M.T., 2005. Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 28, 1–9.
- Zetter, B.R., 1998. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu. Rev. Med.* 49, 407–424. doi:10.1146/annurev.med.49.1.407
- Zhao, L., Liu, M., Wang, J., Zhai, G., 2015. Chondroitin sulfate-based nanocarriers for drug/gene delivery. *Carbohydr. Polym.* 133, 391–399. doi:10.1016/j.carbpol.2015.07.063
- Zhou, H., Roy, S., Cochran, E., Zouaoui, R., Chu, C.L., Duffner, J., Zhao, G., Smith, S., Galcheva-Gargova, Z., Karlgren, J., Dussault, N., Kwan, R.Y.Q., Moy, E., Barnes, M., Long, A., Honan, C., Qi, Y.W., Shriver, Z., Ganguly, T., Schultes, B., Venkataraman, G., Kishimoto, T.K., 2011. M402, a Novel Heparan Sulfate Mimetic, Targets Multiple Pathways Implicated in Tumor Progression and Metastasis. *PLoS ONE* 6, e21106. doi:10.1371/journal.pone.0021106

Conception de polysaccharides sulfatés inhibiteurs de l'héparanase pour le traitement de l'angiogénèse tumorale

Résumé :

L'angiogénèse tumorale correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin d'alimenter la tumeur et d'amplifier son développement. Cette étape constitue un facteur pronostique défavorable pour les patients et son inhibition représente un fort intérêt thérapeutique. Parmi les acteurs participant à l'angiogénèse tumorale, on retrouve l'enzyme de dégradation héparanase au sein du microenvironnement tumoral de nombreux cancers. Ces travaux de thèse ont pour objectif de développer des inhibiteurs spécifiques de l'héparanase à partir de polysaccharides sulfatés pour le traitement de l'angiogénèse tumorale. La première partie de ces travaux a été consacrée à l'élaboration de polysaccharides sulfatés de bas poids moléculaires issus de sources animales (Héparine, Chondroïtine sulfate), algales (Fucoïdanes, Carraghénane- λ - ι - κ) ou bactérienne (Dextran sulfate). Nous avons utilisé pour cela un procédé de dépolymérisation radicalaire assisté par ultrasons, développé en 2013 au laboratoire, que nous avons associé à un procédé de modification chimique appelé glycol-split. Les composés produits ont été évalués pour leurs activités d'inhibition de l'héparanase et de la coagulation sanguine. Ce criblage a notamment permis l'identification d'un dérivé de bas poids moléculaire issu de Carraghénane- λ possédant une forte inhibition de l'héparanase pour une faible inhibition de la coagulation. La deuxième partie de ces travaux s'est ensuite concentrée sur l'évaluation du potentiel anti-angiogénique des inhibiteurs de l'héparanase. Dans ce but, nous avons dans un premier temps évalué le rôle de l'hypoxie et/ou le manque de nutriments sur la production d'héparanase par des cellules de cancers mammaires. Dans ces conditions de stress, nous avons observé que la lignée MCF-7 excrétaient une forte quantité d'héparanase. L'analyse en Matrigel 3D du réseau angiogénique formé par des cellules microvasculaires HskMEC, en présence du surnageant de MCF-7 riche en héparanase, a montré une forte stimulation de l'angiogénèse. Les mêmes tests réalisés en présence des inhibiteurs de l'héparanase ont montré une inhibition de l'angiogénèse qui semblait corrélée avec l'inhibition de l'héparanase.

Mots clé: Angiogénèse, Héparanase, Coagulation sanguine, Microenvironnement tumoral, Polysaccharides sulfatés, Dépolymérisation radicalaire assistée par ultrasons, Glycol-split, Hypoxie, Ciblage thérapeutique

Design of sulfated polysaccharide-based heparanase inhibitors for the treatment of tumor angiogenesis.

Abstract :

Tumor angiogenesis is defined by the spouting of new blood vessels from preexisting ones in order to sustain and amplify the tumor development. This crucial step is associated with poor prognosis for patients and its inhibition is therefore considered as a promising way to treat cancer. Among several factors participating in the angiogenesis process, the degradative enzyme heparanase is active in the tumor microenvironment of many cancers. The work presented in this thesis aims to develop specific heparanase inhibitors using sulfated polysaccharides for the treatment of tumor angiogenesis. The first part of this work is dedicated to the conception of low molecular weight sulfated polysaccharides obtainable from animal source (Heparin, Chondroitin sulfate), algal source (Fucoidan, Carrageenan- λ - ι - κ) and bacterial source (dextran sulfate). To do so, we used a depolymerization process based on free radicals associated to ultrasonic waves developed in 2013 in the laboratory. This depolymerization method was then coupled with a chemical process called glycol-split. The produced compounds were evaluated for their capacity to inhibit heparanase and blood coagulation. This screening phase led to the identification of a low molecular weight compound produced from λ -carrageenan endowed with a strong heparanase inhibition power and a low impact on the blood coagulation. The second part of this work was then focused on the evaluation of the anti-angiogenic properties of our best heparanase inhibitors. To do so, we first evaluated the role of hypoxia and lack of nutrients on the heparanase production from breast cancer cell lines. In these highly stressful conditions, we observed that the MCF-7 cell line secreted a huge amount of heparanase. 3D Matrigel angiogenesis network formation using Hsk-MEC microvascular cells in the presence of MCF-7 heparanase rich supernatant showed a strong angiogenesis stimulation. Same tests realized in the presence of heparanase inhibitors showed an angiogenesis inhibition power that seemed correlated with heparanase inhibition.

Key words: Angiogenesis, Heparanase, blood coagulation, tumor microenvironment, sulfated polysaccharides, free radicals depolymerization associated to ultrasounds, Glycol-split, Hypoxia, therapeutic targeting.

