



HAL
open science

Fucoïdanes extraits de l'algue brune *ascophyllum nodosum* : effets pro-angiogéniques in vitro et régénération de valves pulmonaires acellularisées

Nicolas Marinval

► To cite this version:

Nicolas Marinval. Fucoïdanes extraits de l'algue brune *ascophyllum nodosum* : effets pro-angiogéniques in vitro et régénération de valves pulmonaires acellularisées. Ingénierie biomédicale. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCD014 . tel-02426177

HAL Id: tel-02426177

<https://theses.hal.science/tel-02426177>

Submitted on 2 Jan 2020

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.

Université Paris XIII – Léonard De Vinci
U.F.R. Santé Médecine et Biologie Humaine

THESE

Pour obtenir le grade de :
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13
Discipline : Biologie moléculaire et cellulaire

Fucoïdanes extraits de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* : Effets pro- angiogéniques *in vitro* et régénération de valves pulmonaires acellularisées

Présentée et soutenue publiquement le 07/12/2016 à l'Université Paris 13 par:

Nicolas MARINVAL

Ecole doctorale: Institut Galilée

Unité de Recherche: INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science

Equipe: Bioingénierie Cardiovasculaire

Groupe: Biothérapies et Glycoconjugués

Directrice de thèse: **Pr Nathalie CHARNAUX**

Co-encadrante de thèse: **Dr Hanna HLAWATY**

Jury de thèse

Dr Sylvia COLLIEC-JOUAULT, IFREMER

Rapportrice

Dr Agnès DENYS, Université de Lille 1

Rapportrice

Dr Catherine LE VISAGE, INSERM U791

Examinatrice

Pr Didier LUTOMSKI, Université Paris 13

Examineur

Pr Nathalie CHARNAUX, Université Paris 13

Directrice de thèse

Dr Hanna HLAWATY, Université Paris 13

Co-encadrante de thèse

Sommaire

Remerciements.....	6
Liste des illustrations.....	9
Liste des abréviations.....	12
Déroulement de la thèse.....	14

PARTIE 1

INTRODUCTION.....	18
Chapitre I : Les glycosaminoglycanes et leurs mimétiques.....	19
1. Les liens entre les glycosaminoglycanes endogènes et la matrice extracellulaire.....	19
1.1. Composition et biosynthèse des macromolécules de la matrice extracellulaire.....	19
a) Le collagène.....	20
b) L'élastine.....	21
c) Les glycoprotéines.....	22
d) Les protéoglycanes.....	22
1.2. Rôles biologiques et signalisation des syndécanes.....	24
a) Les fonctions des syndécanes.....	24
b) La signalisation des syndécanes.....	25
c) Les voies endocytiques dans les fonctions intracellulaires des syndécanes.....	27
1.3. Les glycosaminoglycanes : un large spectre de fonctions biologiques.....	28

a) Biosynthèse et sulfatation des GAGs	31
b) Interaction des GAGs avec les cytokines	32
c) Rôles des GAGs sulfatés dans l'angiogenèse : héparane sulfate et chondroïtine sulfate	33
2. Les mimétiques de GAGs : une nouvelle approche thérapeutique	34
2.1. Les Regenerating agents (RGTA) comme agents potentialisateurs	35
2.2 Un mimétique de GAG naturel : Le fucoïdane et ses applications	36
a) Historique: structure et découverte des effets biologiques	36
b) Le fucoïdane mimétique de l'héparine : effets anticoagulants et anti- thrombotiques.....	40
c) Le fucoïdane dans l'angiogenèse : effets hétérogènes et hypothèses structurales sur son potentiel angiogénique	41
d) Fonctionnalisation et greffage du fucoïdane: développement et applications.....	46
2.3 D'autres polysaccharides naturels mimétiques de GAGs	53
Chapitre II : Problématique du traitement de l'ischémie	54
1. Le système cardiovasculaire	54
1.1 La physiopathologie vasculaire	54
a) Histologie et physiologie des vaisseaux sanguins.....	54
b) Biologie des cellules endothéliales.....	57
c) Mécanismes de l'angiogenèse: acteurs cellulaires et moléculaires.....	58
d) Rôle de la MEC dans l'angiogenèse	61

e) Remodelage matriciel de la MEC vasculaire	64
2. Les effets physiopathologiques de l'ischémie	66
a) L'ischémie	67
b) Les rôles des GAGs dans l'ischémie.....	68
3. Les thérapies vasculaires en réponse à l'ischémie : Application et développement d'angiogenèse thérapeutique.....	69
Chapitre III : Problématique de la régénération de prothèses de valve cardiaque par l'ingénierie tissulaire	72
1. La bioingénierie tissulaire pour une application cardiovasculaire	72
a) Les enjeux et promesses de la médecine régénérative	72
b) Développement de biomatériaux à partir de polysaccharides sulfatés pour l'ingénierie tissulaire	75
c) Les films de polyélectrolytes en multicouches à base de fucoïdane.....	78
2. La bioingénierie de prothèses de valves cardiaques	79
a) Les valvulopathies : sténose et dégénérescence	80
b) Les prothèses de valve cardiaque.....	81
c) La bioingénierie de prothèses de valves biologiques	82
d) Modifications apportées aux valves et procédés d'ingénierie : limites et perspectives dans le potentiel de régénération/repopulation.....	83
BUT DE LA THESE	85

PARTIE 2

RESULTATS	87
Chapitre I : Fractionnement du fucoïdane, analyse physico-chimique et étude de ses effets biologiques sur les cellules endothéliales HUVECs	88
Hypothèses et objectifs	89
Matériels et méthodes	91
Article 1. Marinval et al., 2016	103
Discussion et perspectives du chapitre 1	126
Conclusion	139
Article 2. Haddad et al., 2016	141
Chapitre II : Bio-ingénierie tissulaire : Régénérescence de prothèses biologiques de valves cardiaques acellularisées	164
Hypothèses et objectifs	165
Matériels et méthodes	168
Article 3. Marinval et al., 2017- en cours	179
Discussion et perspectives du chapitre II	214
Conclusion	222

PARTIE 3

Conclusion générale, bibliographie et travaux annexes	224
Conclusion et perspectives générales	225
Bibliographies	227
Communications	260
Travaux annexes	262
Résumé	290

Remerciements

En premier lieu, je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté de juger mes travaux de recherche, et particulièrement mes rapporteurs le Dr. Sylvia Collic-Jouault et le Dr. Agnès Denys, pour avoir accordé votre temps pour la lecture de mon manuscrit. Je remercie également mes examinateurs que sont le Dr. Catherine Le Visage et le Pr. Didier Lutomski.

J'éprouve une profonde gratitude pour mes responsables scientifiques que sont mon encadrante de thèse Hanna Hlawaty et ma directrice de thèse Nathalie Charnaux. Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre groupe de recherche et pour votre engagement dans cette thèse, de m'avoir accordé votre confiance et d'avoir su me donner les moyens et la motivation nécessaire pour la réaliser.

Je remercie également le Dr. Didier Letourneur pour son accueil chaleureux au sein de l'unité INSERM U1148 et de m'avoir permis de réaliser mes travaux de recherche dans le laboratoire (Laboratory for Vascular Translational Science) au sein de l'équipée bioingénierie cardiovasculaire dès mon arrivée. De la même façon, j'exprime une extrême reconnaissance au Dr. Piotr Wilczek de m'avoir reçu pour deux missions dans son laboratoire (Laboratoire de bioingénierie, Fondation FRK, Zabrze, Pologne) et de m'avoir formé à des techniques d'ingénierie tissulaire.

Je remercie chaudement l'équipe scientifique appartenant au site de Bobigny que ce soit, Oualid Haddad, Angela Sutton, Olivier Oudar, Benjamin Richard, Erwan Guyot et Christelle Laguillier-Morizot pour leur aide, leur écoute et l'accompagnement dans ma thèse.

Je remercie également les personnes ayant collaborées à mes projets de recherche, telles que Rima Belibel, Eric Assier, Frédéric Chaubet, Cédric Chauvierre, Murielle Maire, Romain Robert, Marie-Paule Jacob et Véronique Ollivier pour la France, mais aussi Malgorzata Morenc, Aneta Samotus, Ola Niemiec-Cyganec et Kasia Jesse pour la Pologne.

J'adresse un immense merci, particulièrement à Pierre, Loic, Sophie, et Latifa pour l'aide conséquente qu'ils ont pu m'apporter lorsque j'avais une petite curiosité ou une foule de questions, mais aussi Dorian, Laetitia, Batia et Laure, Maya, Marisol, Louis, Rachida, Adrian, Devi, Kamel, Richard, Marie-Anne et pour leur soutien moral et l'accompagnement quotidien que ce soit dans l'enceinte ou à l'extérieur du laboratoire. Je n'oublie pas Karen et Angèle qui m'ont gracieusement et gentiment offert leur sang pour réaliser des analyses.

Je remercie également chaudement Amena, Hadjer, Kevin et Abdallah, les actuels et nouveaux arrivants en doctorat qui commencent, et les encourage en leur souhaitant une bonne réussite dans leurs démarches professionnelles et personnelles.

J'adresse un remerciement particulièrement affectueux à Dristy qui m'a accompagné et soutenu dans les méandres émotionnels qui ont ponctués cette thèse et à qui je souhaite la meilleure réussite.

Je tiens enfin à remercier Samira Benadda, Francesco Andreatta et Florence Poirier pour leur grande aide technique et leur écoute.

Enfin, Je remercie encore toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, permis l'accomplissement de mes travaux de recherche et de cette thèse.

Nombreux sont les essais littéraires et vidéo-ludiques qui ont essayé de théoriser et concrétiser des formes de réparation tissulaires. On pense à « Frankenstein » de Mary Shelley (1818) et son adaptation au cinéma en 1931 par James Whale où un savant redonne vie à un être humain en le reconstituant de plusieurs membres et organes cadavériques. Une adaptation plus moderne, le film de Luc Besson « Le Cinquième Élément » (1997), qui se joue dans un futur utopiste, illustre parfaitement l'aboutissement absolu de la médecine régénérative, dont la scène de la reconstruction d'un être entier en quelques minutes par une machinerie sophistiquée et ce, à partir d'un reste de membre supérieur, a fasciné toute une génération dont je fais partie.

Liste des illustrations

Tableaux

Tableau 1. Structure des différentes familles de glycosaminoglycanes.

Tableau 2. Bibliographie des études structurales et fonctionnelles des fucoïdanes dans l'angiogenèse in vitro et in vivo.

Figures

Figure 1. A) Lames élastiques observées dans l'aorte humaine en microscopie électronique. B) Capacité élastique de la fibre d'élastine.

Figure 2. Les protéoglycanes transmembranaires.

Figure 3. Les rôles du syndécan-4 à la membrane cellulaire.

Figure 4. Trafic intracellulaire des syndécanes.

Figure 5. A) Composition de la paroi cellulosique des algues brunes et localisation du fucoïdane. B) Illustration de l'algue *Ascophyllum nodosum* dans son état naturel à sec.

Figure 6. Structure disaccharidique du fucoïdane extrait d'*Ascophyllum nodosum*/*Fucus vesiculosus*/*Fucus evanescens*.

Figure 7. Méthode d'extraction et purification du fucoïdane à partir des algues brunes.

Figure 8. Microbilles poreuses fonctionnalisables par réticulation avec des mimétiques de GAGs pour favoriser l'adhérence cellulaire visualisées en microscopie électronique à balayage.

Figure 9. Fonctionnalisation d'une matrice poreuse avec du fucoïdane et VEGF pour développer une angiogenèse thérapeutique

Figure 10. Application du fucoïdane pour l'ingénierie tissulaire osseuse.

Figure 11. Libération du FGF-2 complexé à un hydrogel de chitosane/fucoïdane et fonctionnalisation sur l'angiogenèse in vivo.

Figure 12. Organisation cellulaire des tuniques des vaisseaux sanguins.

Figure 13. Néoangiogenèse par le recrutement et l'incorporation des cellules progénitrices dans un contexte ischémique.

Figure 14. Facteurs déclenchant l'angiogenèse chez l'adulte par les cellules progénitrices endothéliales.

Figure 15. Influence de la MEC vasculaire (collagène I et laminine-1) sur l'activité morphogénique des cellules endothéliales dans l'angiogenèse.

Figure 16. Régulation du comportement et des mécanismes cellulaires par la MEC vasculaire.

Figure 17. Modulation et shedding du glycocalyx endothélial en réponse à l'ischémie.

Figure 18. Illustration de l'ingénierie tissulaire.

Figure 19. Différents modèles mécaniques et biologiques de prothèses de valves cardiaques.

Figure 20. Localisation du LMWF dans les cellules HUVECs.

Figure 21. Chromatographie de phase liquide à haute performance (HPLC)-détecteur multiangulaire à diffusion de la lumière– Réfractomètre différentiel.

Figure 22. Evaporateur rotatif.

Figure 23. Effet de l'inhibiteur β DX sur l'expression des GAGs endogènes.

Figure 24. Méthodologie de la migration en chambre de Boyden.

Figure 25. Différents types de paramètres quantifiés pour les réseaux vasculaires en 2-dimensions.

Figure 26. Réaction simplifiée de l'amination du fucoïdane et du couplage avec le fluorochrome.

Figure 27. Profil d'élution du fucoïdane fluorescent après chromatographie et lecture de l'absorbance.

Figure 28. Les principales voies d'internalisation cellulaire et leurs inhibiteurs.

Figure 29. Dissection des valves pulmonaires porcines acellulaires.

Figure 30. Support acellulaire de valve porcine installée dans un bioréacteur.

Figure 31. Revêtement des supports de valves acellulaires par le PEM fucoïdane/VEGF.

Figure 32. Méthode d'ensemencement cellulaire à la surface des supports de valves acellulaires recouvert du PEM fucoïdane/VEGF.

Figure 33. Plaques de culture 12 puits pour les valvules et fragments de conduits acellulaires cultivés en condition statique.

Figure 34. Circuits de deux bioréacteurs pour l'analyse de la thrombogénicité des valves en flux.

Figure 35. Schéma de la direction de l'orientation des fragments de valves pulmonaire et appareil de mesure de réponse au stress biomécanique.

Liste des abréviations

ADP: Adénosine diphosphate

ASPHY: Ascophyscient

β DX: 4-Nitrophenyl β -D-xylopyranoside

BrdU: BromodesoxyUridine

CK: Chimiokines

CML: Cellules musculaires lisses

DAB: 3, 3 –diaminobenzidine

ECFC: Endothelial colony forming cells

EGF: Epidermal growth factor – Facteur de croissance épidermal

EXT: Exostosine

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

FGF: Fibroblast growth factor – Facteur de croissance fibroblastique

FITC: 4-Fluorenyl-isothiocyanate

HPLC: Chromatographie de phase liquide à haute performance.

HPSEC-MALS-dRI: High performance size exclusion chromatography - Multi-angle laser light scattering - differential refractometer.

HRP: Horseradish peroxydase

HS: Héparane sulfate

HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell – Cellule endothéliale de veine ombilicale humaine

Ig: Immunoglobuline

IGF: Insulin growth factor – Facteur de croissance ressemblant à l'insuline

IL: Interleukine

GAG: Glycosaminoglycane

LMWF : Low molecular weight fucoidan – Fucoïdane de petit poids moléculaire

LMWH: Low molecular weight heparin – Héparine de petit poids moléculaire

LPS : Lipopolysaccharide

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

MEC: Matrice extracellulaire

MMP: Matrix Metallo-protease – Metalloprotéase matricielle

MMWF: Medium molecular weight fucoidan

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

NDST: N-Déacétylase/N-Sulfotransférase

OMS: Organisation mondiale de la santé

PDGF: Platelet derived growth factor

PEM: Polyelectrolyte Multilayer – Multicouches de polyelectrolytes

PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase

RANTES: Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted

SDF-1: Stromal cell-derived factor-1

SPR : Surface plasmon resonance – Résonance plasmonique de surface

VEGF: Vascular endothelial growth factor - Facteur de croissance endothélial vasculaire

VWF: Facteur de von Willebrand

Déroulement de la thèse

Ces études ont été menées sous la direction conjointe du Pr Nathalie Charnaux, et du Dr Hanna Hlawaty. Les recherches ont été réalisées au sein du laboratoire LVTS (Laboratory for Translational Vascular Science) Unité INSERM 1148, dirigé par le Dr Didier Letourneur, développé sur trois sites, les campus de l'Université Paris 13 (Bobigny et Villetaneuse) et l'Université Paris 7 dans l'hôpital Bichat à Paris. Une partie des recherches a été effectuée dans le laboratoire de Bio-ingénierie de la Fondation de Cardiochirurgie dirigé par le Dr Piotr Wilczek, à Zabrze en Pologne. Au sein du laboratoire LVTS, j'ai intégré le groupe de *Biothérapies et Glycoconjugués* dirigé par le Pr Nathalie Charnaux situé à l'UFR Santé Médecine Biologie Humaine (SMBH) de l'Université Paris 13 à Bobigny, rattaché à l'équipe 3 de *Bioingénierie Cardiovasculaire* dirigée par le Dr Didier Letourneur. Le laboratoire propose des thématiques de recherche pluridisciplinaires et translationnelles associant des biologistes, des chimistes, des physico-chimistes, et des cliniciens (chirurgiens, cardiologues et radiologues) s'intégrant dans cinq équipes thématiques avec des projets communs transversaux comme ceux d'expérimentation animale, de biologie cellulaire, d'ingénierie tissulaire et de biomatériaux.

Le travail de recherche que j'ai effectué a eu pour but d'étudier les effets d'un mimétique de glycosaminoglycanes (GAGs), le fucoïdane, dans les processus angiogéniques et son potentiel dans la régénération tissulaire de modèle de prothèse biologique de valve pulmonaire. Ces travaux se déclinent selon deux modalités, en recherche fondamentale et en recherche appliquée, séparées en deux chapitres distincts. Le travail présenté dans le premier chapitre comporte trois aspects incluant une étude structure/fonction de fucoïdanes extraits de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* dans les mécanismes d'angiogenèse *in vitro* (migration cellulaire, formation de réseau vasculaire en 2-dimensions); le rôle des GAGs endogènes associés aux effets pro-angiogéniques des fucoïdanes; et les voies d'internalisation d'un fucoïdane de bas poids moléculaire dans les cellules endothéliales (article 1).

Ces travaux sont en relation avec une étude à laquelle j'ai participé, portant sur les rôles des syndécanes-1 et -4 et des chaînes GAGs exprimés par les cellules endothéliales dans les effets pro-angiogéniques induits par un fucoïdane extrait de *Fucus vesiculosus*, également incluse dans ce chapitre (article 2).

Le second travail repose sur l'étude du potentiel régénératif de prothèses de valves cardiaques porcines acellularisées recouvertes d'un film en multicouches de fucoïdane/VEGF. Ce deuxième chapitre traite de la conception des prothèses de valves biologiques leur interaction avec le film et leurs propriétés biomécaniques, antithrombotiques, ainsi que leur capacité de ré-endothélialisation *ex vivo* (article 3).

La réalisation de ces travaux de recherche a été rendue possible grâce à l'attribution d'une allocation doctorale de l'école doctorale Galilée (Université Paris 13, Villetaneuse) pendant trois ans. J'ai également bénéficié d'une bourse de mobilité de l'Université Paris 13 par le Service des Relations Européennes et Internationales (SREI) et d'une bourse de mobilité internationale de la communauté « Université Sorbonne-Paris-Cité » (USPC) qui m'ont permis de réaliser deux missions de recherche totalisant 3 mois dans le laboratoire de Bioingénierie du Dr Piotr Wilczek en Pologne.

En complément de mes activités de recherches, j'ai également assuré une mission d'enseignement sous le titre de monitorat qui a eu lieu au sein de l'Université Paris 13 (sur les sites de Bobigny et Saint-Denis) dans le domaine de la biologie (végétale, animale, cellulaire et moléculaire) durant trois ans. J'ai assuré l'exercice de travaux pratiques et de travaux dirigés dans les trois premières années de la Licence de biologie, du DUT de Génie Biologique et en première année commune de médecine.

Le manuscrit est organisé en trois parties.

Dans la première partie, une introduction contextualisant l'état des connaissances et les concepts de biologie cardiovasculaire actuels, de la biochimie des polysaccharides et de leur utilisation dans des biothérapies, se décline en trois sous-sections. Les aspects de biosynthèse et de fonctionnalisation des mimétiques de glycosaminoglycanes, comme le fucoïdane, sont abordés dans la première sous-section. La physiopathologie du système cardiovasculaire dans un contexte ischémique et les traitements actuels sont développés dans la seconde sous-section, tandis que les stratégies de médecine régénérative pour l'amélioration des prothèses de valves cardiaques sont décrites dans la dernière sous-section.

La deuxième partie décrit les résultats de l'étude et se décline en deux chapitres. Les travaux présentés dans le premier chapitre visent à enrichir les connaissances structurales et fonctionnelles du fucoïdane sur ses activités pro-angiogénique au niveau cellulaire *in vitro*. C'est ainsi, qu'en amont d'une utilisation biologique, la caractérisation chimique et physique du fucoïdane y est décrite. Les principales étapes cellulaires impliquées dans l'angiogenèse, à savoir la migration endothéliale induite par chimiotactisme et l'établissement d'interactions cellulaires et réorganisations morphologiques, sont étudiées dans des modèles *in vitro*. Ces essais sont réalisés sur un modèle de cellules endothéliales en culture, exprimant ou non leurs GAGs endogènes afin d'y étudier leurs rôles. L'analyse des voies d'internalisation cellulaire d'un fucoïdane de bas poids moléculaire (LMWF) est présentée conjointement à ces travaux. Enfin, les effets d'un LMWF sur les modifications de l'expression des chaînes GAGs et des syndécans-1 et -4 sont abordés en fin d'étude. Les travaux présentés dans cette partie ont conduit à la publication de deux articles, dont je suis premier et co-auteur respectivement.

Dans le deuxième chapitre, le fucoïdane décrit précédemment est utilisé dans une étude appliquée portant sur la régénération tissulaire pour le développement d'une prothèse valvulaire cardiaque.

L'étude porte sur les capacités d'un film de fucoïdane/VEGF, à améliorer les propriétés régénératives (adhérence, viabilité et prolifération de cellules endothéliales humaines, résistance biomécanique et anti-thrombotique) d'une matrice de valve pulmonaire acellularisée d'origine porcine. Le fucoïdane, est utilisé comme un agent polyanionique associé avec le facteur de croissance endothélial (VEGF), afin de générer un film de polyélectrolytes en multicouche. Ces études de régénération de valves pulmonaires ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire du Dr Piotr Wilczek en Pologne et font l'objet d'une publication en cours d'écriture présentée dans la thèse.

J'ai eu l'occasion de présenter mes travaux de recherche au cours de congrès et journées organisées sur les différents thèmes que j'ai traités. Les communications (orales et affichées) que j'ai effectuées et sont présentés dans le troisième chapitre des résultats.

Enfin, la dernière partie du manuscrit est consacrée à une conclusion générale des travaux de recherche et ouvre sur des perspectives de travaux complémentaires. Les recherches que j'ai effectuées en France ayant donné lieu à deux publications sur des thèmes différents sont présentées dans cette dernière partie. La première traite du développement d'une stratégie de vaccination contre le VEGF dans la polyarthrite rhumatoïde. J'ai participé dans cette étude aux effets cytotoxiques et métaboliques de la vaccination à partir sérum murins sur des cellules endothéliales humaines. Le deuxième projet s'intéresse à l'analyse de la cytotoxicité de produits de dégradation d'un polymère applicable pour le revêtement de stent métallique.

PARTIE 1

-

INTRODUCTION

Chapitre I. Les glycosaminoglycanes et leurs mimétiques

Chapitre II. Problématique du traitement de l'ischémie

Chapitre III. Problématique de régénération de prothèses de valve cardiaque par l'ingénierie tissulaire

Chapitre I. Les glycosaminoglycanes et leurs mimétiques

1. Les liens entre les glycosaminoglycanes endogènes et la matrice extracellulaire

1.1. Composition et biosynthèse des macromolécules de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un composant interstitiel multiprotéique et jointif des tissus animaux et possède la propriété d'être insoluble et réticulée. La MEC englobe les cellules interstitielles (par exemple les fibroblastes) qui la synthétisent, et modulent en retour leur phénotype en fonction des protéines contenues dans le matrisome. Le matrisome humain comprend un ensemble d'environ 300 protéines tout type confondu. La MEC est entièrement synthétisée lors du développement du corps humain, mais sa structure reste modulable à un certain degré chez l'adulte, fonction qui peut être assurée par ces mêmes cellules interstitielles. Ce phénomène est décrit sous le nom de remodelage matriciel.

La fonction principale de la MEC est de constituer un support d'adhérence cellulaire stable et permettant de faciliter la prolifération et la migration cellulaire. La composition de la MEC permet notamment d'interagir et de retenir des facteurs et des enzymes capables de moduler et d'affiner sa structure en réponse à un signal cellulaire [Hynes, 2012; Sternlicht, 2001; Marastoni, 2008]. La MEC est ainsi dotée d'un rôle de signalisation et de régulation envers les cellules environnantes. Elle constitue un réservoir important de facteurs de croissance et d'enzymes impliqués dans le fonctionnement cellulaire. Lors de la dégradation des composants matriciels, ces facteurs sont libérés et permettent d'induire un remodelage tissulaire en modulant le comportement des cellules à proximité. La dégradation de la MEC génère également des fragments protéiques et polysaccharidiques pouvant présenter un effet direct ou indirect sur le fonctionnement cellulaire [Sternlicht, 2001].

La MEC est constituée de 4 grandes familles de protéines structurelles comprenant les collagènes, l'élastine, les glycoprotéines de soutien et les protéoglycanes. Ces quatre macromolécules s'entrelacent et s'organisent selon un schéma préétabli propre à chaque tissu. Les fibres de collagène et d'élastine configurent la matrice principale tandis que les protéoglycanes vont combler les lacunes. Chacune de ces catégories de protéines structurelles peut être divisée en plusieurs classes et sous-classes et leur association et assemblage peut varier selon le type de MEC avec lesquelles elles sont associées dans un tissu donné [Frantz, 2010].

a) Le collagène

Le collagène est le type de protéine le plus répandu dans le corps humain et confère une résistance mécanique aux tissus grâce à sa structure solide et inextensible. La durée de vie du collagène est longue et dans certains tissus comme le cartilage, sa synthèse n'est pas renouvelée après l'âge adulte car la fibre matricielle est capable d'assurer ses fonctions tout au long de la vie [Verziji, 2000].

Chez les vertébrés, le collagène comprend une grande famille de 27 membres de protéines (I à XXVII), divisées en deux sections de protéines fibrillaires et non-fibrillaires. Les collagènes I et III sont majoritairement retrouvés dans la MEC vasculaire, tandis que le collagène IV intervient dans la structure de la lame basale endothéliale.

Chaque membre de collagène est assemblé en homotrimère ou hétérotrimère de chaînes alpha ayant un ou plusieurs domaines en triple hélice [Myllyharju, 2004]. Avant d'être assemblées, les fibres de collagène sont synthétisées sous forme de molécules de pro-collagène, puis maturées en collagène par une série de modifications post-traductionnelles orchestrées par une série d'enzymes dont deux protéinases qui vont cliver les pro-peptides aux extrémités N- et C-terminales [Prockop, 1998]. Une lysyl oxydase est mobilisée pour réaliser les liaisons de pontage entre les fibres de collagène dessinant une ébauche de la structure du réseau matriciel [Kagan, 2003].

b) L'élastine

L'élastine est une protéine synthétisée sous forme de monomère de tropoélastine. La riche teneur en résidus lysine de l'élastine permet aux monomères de tropoélastine de s'agréger entre eux afin de constituer une fibre sur laquelle va s'assembler un maillage de microfibrilles de la famille des fibrillines (**Figure 1**). La combinaison des fibrillines et de l'élastine permet de générer la fibre élastique [Chothia, 1997; Mithieux, 2005; Rosenbloom, 1993]. La fibre élastique peut constituer jusqu'à 70% des protéines tissulaires de artères majeures [Moore, 2011].

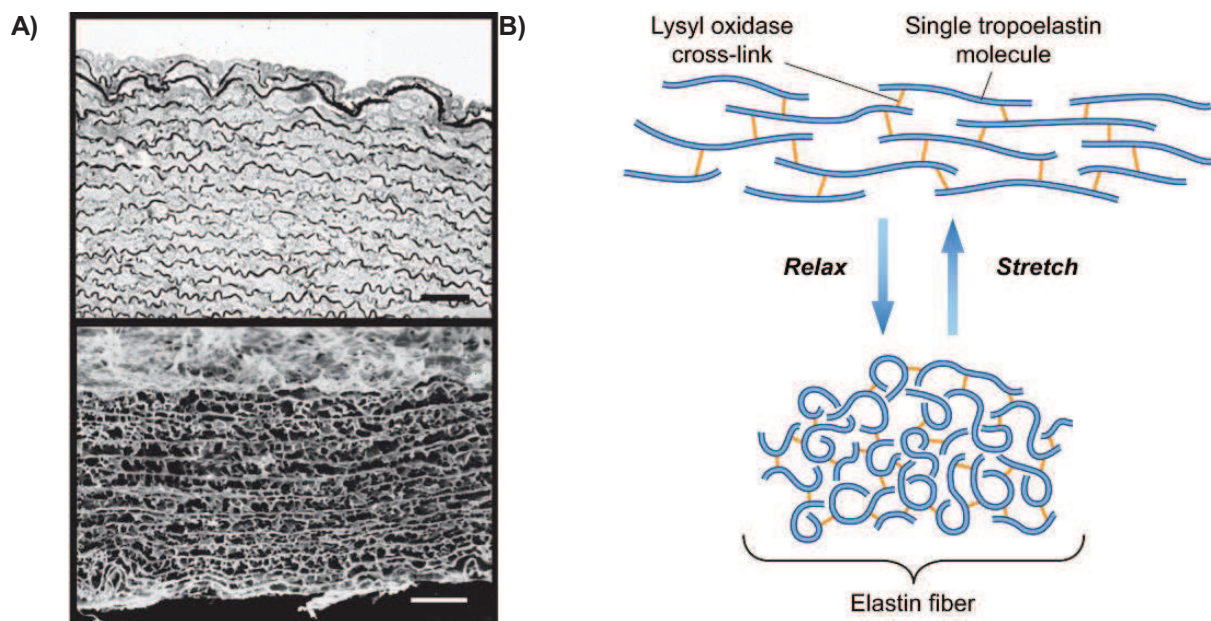


Figure 1. A) Lames élastiques observées dans l'aorte humaine en microscopie électronique. Haut : Réarrangement des couches de cellules musculaires lisses séparées par des lames élastiques foncées. Bas : Réseau d'élastine après enlèvements des cellules et protéines de la MEC. Les lames élastiques sont jointes par des connexions intralamellaires en clair. Barre = 20 μm . **B) Capacité élastique de la fibre d'élastine.** Les molécules jonctions entre les molécules de tropoélastine sont générées par la lysyl oxidase. Chaque molécule peut s'étendre et se contracter aléatoirement, ainsi l'ensemble des molécules peut s'étirer et se détendre comme une entité unique.

A) D'après : Wagenseil et al., 2010 ; B) D'après : Moore et al., 2011.

c) Les glycoprotéines

Les glycoprotéines (GP) sont des protéines de soutien sur lesquelles sont greffées des chaînes glucidiques de courte longueur [Myllyharju, 2004]. Toutes les glycoprotéines possèdent des sites d'interaction avec des intégrines et autre molécules membranaires exprimées par les cellules ou retrouvées dans la MEC, notamment par leurs séquences Arg-Gly-Asp (RGD).

Les glycoprotéines comprennent la fibronectine, exprimée ubiquitairement dans tout l'organisme et impliquée dans l'attachement des cellules à la MEC et l'organisation du cytosquelette. Les autres glycoprotéines sont dépendantes du type de matrice et distribuées selon leur appartenance tissulaire, par exemple, l'assemblage de laminines est essentiel à la constitution de la lame basale.

d) Les protéoglycanes

Les protéoglycanes (PGs) sont constitués d'un corps protéique portant des chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs) greffées de façon covalente [Iozzo, 1998]. Les protéoglycanes peuvent être exprimés à la surface des cellules (PGs membranaires), dans des granules (PGs intracellulaires), ou bien sécrétés sous forme totale ou clivés (PGs extracellulaires). Le clivage des protéoglycanes est appelé shedding, phénomène intervenant lors du remodelage matriciel ou de la surface cellulaire.

Les chaînes de GAGs portent une part importante de charges négatives, permettant des interactions électrostatiques avec les molécules d'eau afin d'hydrater les tissus conférant une résistance aux pressions (cartilage et vaisseau), mais aussi avec des enzymes du remodelage matriciel (métalloprotéases) et des cytokines (facteurs de croissance, chimiokines) [Couchman, 2010]. Cette dernière propriété permet aux protéoglycanes d'assurer un rôle de corécepteurs par le contrôle de la distribution et de la disponibilité de ces facteurs pouvant moduler l'intensité d'un signal cellulaire induit par la liaison d'un ligand à son récepteur.

Plusieurs types de protéoglycanes sont exprimés dans les vaisseaux sanguins:

PGs extracellulaires : le perlécane, la décorine, l'aggrécane, le versicane, le neurocane, le biglycane, le brevicane, la fibromoduline et le lumicane.

Les PG de la MEC vasculaires peuvent interagir avec les fibres matricielles et avec de nombreux facteurs de croissance (Vascular Endothelial Growth Factor ou VEGF, Fibroblast Growth Factor-2 ou FGF-2, Platelet Derived Growth Factor ou PDGF pour le perlécane et Transforming Growth Factor-Beta TGF- β et Epithelial Growth Factor EGF pour la décorine), leur conférant une activité sur l'angiogenèse selon le type de signal engagé [Iozzo and Sanderson, 2011].

PGs membranaires : les glypicanes, les syndécanes, le CD44, le béta-glycane, le cérébroglycane et les neuropilines (**Figure 2**).

Les PG cellulaires sont exprimés à la surface des cellules et expriment pour la plupart des chaînes de GAGs de type héparane sulfate (HS) et certains de type chondroïtine sulfate (CS).

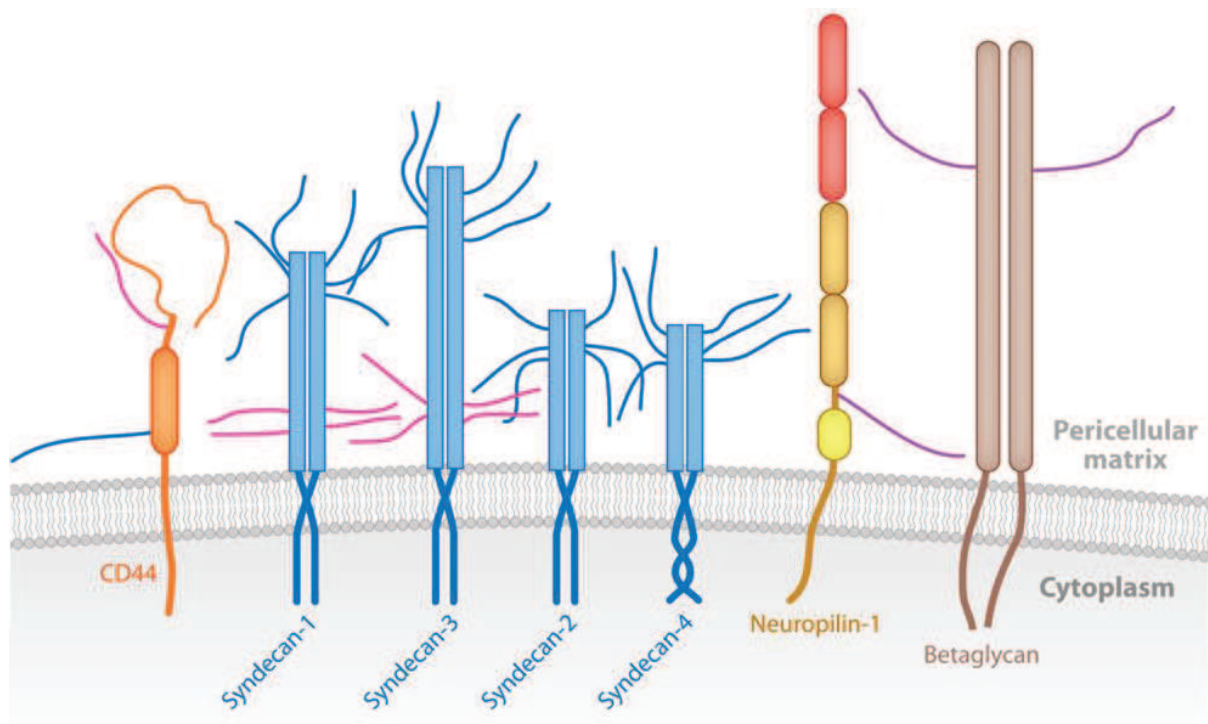


Figure 2. Les protéoglycanes transmembranaires. Substitution des chaînes GAGs : HS en bleu, CS en rose, HS/CS/DS en violet.

D'après : Couchman et al., 2010.

PGs intracellulaires : le serglycine.

Le serglycine est exprimé principalement dans les cellules hématopoïétiques et endothéliales et permet de stocker l'héparine dans des granules intracellulaires.

Les glypicanes sont répartis chez l'Homme en une famille de six formes exprimées et sont les seuls PG reliés à la membrane cellulaire par un ancrage au Glycosylphosphatidylinositol (GPI). Chez l'Homme, les syndécanes (SDCs) sont les PGs les plus étudiés et composent une famille de quatre types de différents corps protéiques transmembranaires (SDC-1 à -4) dont seulement la partie extracellulaire varie.

1.2. Rôles biologiques et signalisation des syndécanes

a) Les fonctions des syndécanes

Les rôles biologiques variés de ces molécules sont dus à leurs interactions multiples avec le cytosquelette d'une part, les protéines du matrisome et leurs récepteurs RCPG d'autre part. Par conséquent les SDCs sont souvent impliqués dans la migration, l'adhérence, la morphologie et la prolifération cellulaire, mais aussi la cicatrisation des plaies, le contrôle de la pression sanguine, l'inflammation et l'athérosclérose [Tkachenko, 2005; Lambaerts, 2009; Elfenbein, 2012].

Le SDC-1 est constitué d'un corps protéique de 310 acides aminés pour un poids moléculaire de 33 kDa. Il porte des chaînes HS et CS. Son expression est principalement située au niveau de la membrane basolatérale des épithéliums où il interagit avec la matrice extracellulaire pour établir et consolider les liaisons d'adhérence. Il régule également la morphologie cellulaire par interaction avec le cytosquelette d'actine.

Les SDC-2 et -3 sont retrouvés dans les tissus neuronaux, cependant le SDC-2 est également exprimé dans les cellules mésenchymateuses et peut intervenir dans les processus angiogéniques grâce aux interactions avec des facteurs de croissance. Le SDC-2 ne porte que des chaînes HS tandis que le SDC-3 porte des chaînes HS et CS.

Le SDC-4 est le plus petit des SDC comprenant 198 acides aminés pour 22 kDa et le seul exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme humain. Il intervient dans la formation et la stabilisation des points de contacts focaux, la migration cellulaire et la réorganisation du cytosquelette d'actine [Alexopoulou, 2007; Iozzo et Sanderson, 2011]. Le SDC-4 porte uniquement des chaînes HS.

b) La signalisation des syndécanes

Les mécanismes moléculaires sous-jacents aux fonctions biologiques des syndécanes sont également variés et restent mal compris. Leur élucidation est susceptible de donner un éclairage supplémentaire sur la polyvalence de la signalisation induite par les SDCs. Les capacités de corécepteur et de signalisation propre des SDCs ont modifié les modèles et les notions conventionnelles de la transduction du signal directement médié par un récepteur comprenant l'initiation, la modulation et la transduction des voies de signalisation. En outre d'un rôle de corécepteur qui facilite la liaison d'un ligand à son récepteur protéique, les syndécanes peuvent aussi médier une signalisation qui leur est propre, par la fixation d'un ligand sur leurs chaînes GAGs, (**Figure 3**). L'oligomérisation du SDC-4 dans des radeaux lipidiques riches en cholestérol et sphingolipides peuvent initier de nombreuses signalisations intracellulaires [Fuki, 2000; Tkachenko and Simons, 2002; Tkachenko, 2004].

Le syndécane-4 fait partie des PGs les plus largement étudiés. Ce protéoglycane a été décrit comme corécepteur pour la signalisation de récepteurs transmembranaires (Récepteur à protéine G, RCPG ; récepteur à tyrosine kinase, RTK) mais peut aussi déclencher des cascades de signalisation indépendantes lors de son oligomérisation et son auto-activation [Elfenbein et Simons, 2013].

L'endocytose du complexe corécepteur-récepteur-ligand module par ailleurs ces réactions de signalisation à travers un dialogue complexe avec d'autres processus cellulaires.

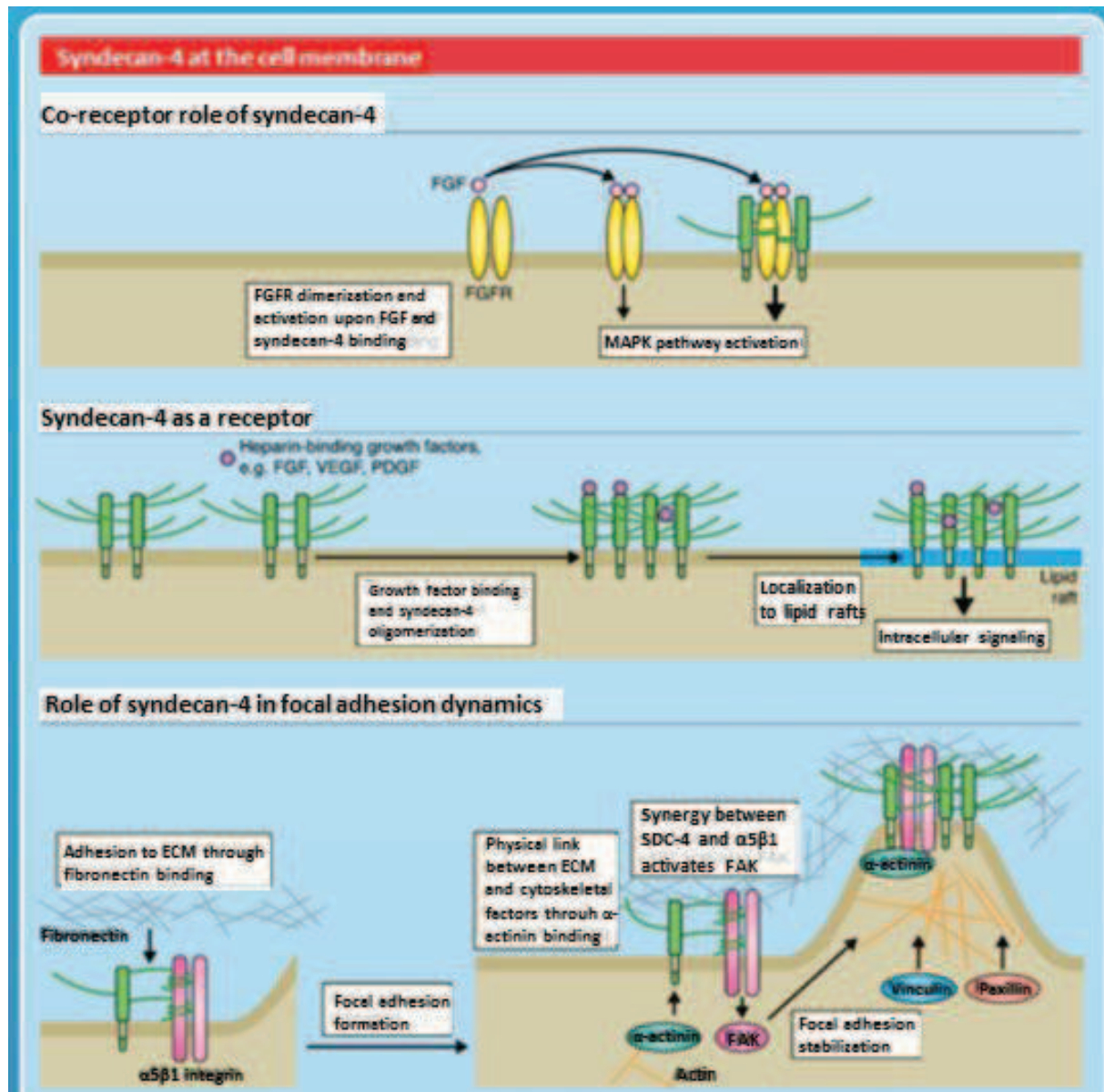


Figure 3. Les rôles du syndécane-4 à la membrane cellulaire. Haut : Rôle de corécepteur du SDC-4 avec le récepteur au FGF. Milieu : Rôle de récepteur du SDC-4 par oligomérisation dans un radeau lipidique. Bas : Rôle du SDC-4 dans la formation de contacts focaux.

D'après : Effenbein et Simons, 2013.

c) Les voies endocytiques dans les fonctions intracellulaires des syndécanes

Selon une revue écrite par Lambaerts *et al.* regroupant de nombreuses études sur le sujet, la voie d'endocytose utilisée par les SDCs apparaît comme étant non conventionnelle et caractéristique de chaque signal [Fuki, 2000; Tkachenko et Simons, 2002; Tkachenko, 2005; Nakase, 2007; Nishi, 2007; Payne, 2007]. Les syndécanes peuvent être co-intériorisés avec le complexe ligand-récepteur-corécepteur, et également indépendamment avec des polypeptides polycationiques. [Belting, 2003; Fan, 2007]. (Figure 4).

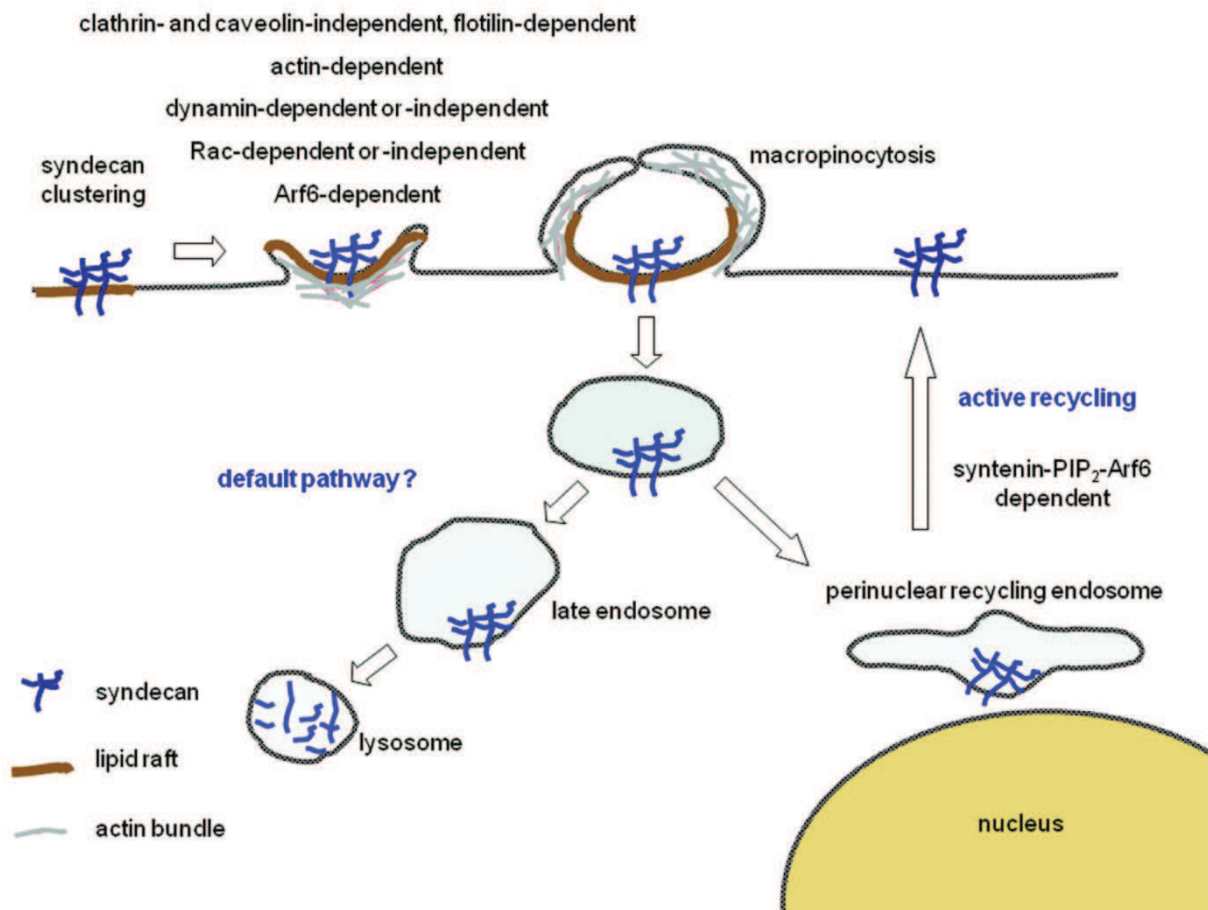


Figure 4. Trafic intracellulaire des syndécanes. Après leur clustering, les SDCs, sont internalisés avec le ligand par une voie d'endocytose indépendante de clathrine et de cavéoline. Le devenir de la vésicule contenant les SDCs peut s'orienter vers la fusion avec un lysosome ou avec un endosome de recyclage.

D'après : Lambaerts, Wilcox-Adelman et Zimmermann, 2009.

Après leur regroupement ou « clustering », les SDCs sont internalisés par une voie indépendante de la clathrine et de la cavéoline. Plusieurs observations montrent que les SDCs sont impliqués dans la formation de radeaux membranaires et dans la macropinocytose [Elfenbein, 2012]. Le recrutement de dynamine, flotiline-1 ou l'activation de Rac-1 peut être dépendant du contexte cellulaire, la nature du ligand, la présence de corécepteurs et de machinerie cellulaire spécifique. Il a été observé que la dynamine interagit spécifiquement avec la région C1 du SDC-4 suggérant que les SDCs pourraient être mécaniquement liés à la formation des endosomes [Yoo, 2005].

Les connaissances sur le devenir des SDCs après leur internalisation sont limitées. Des études ont mis en évidence leur présence dans les endosomes tardifs, puis dans les lysosomes où ils seraient dégradés ensemble avec leur chargement protéique (ligand). Cette donnée suppose une dégradation conjointe du ligand et des SDCs avec l'extinction du signal.

De façon intéressante, le domaine C2, bien qu'il ne soit pas important pour l'internalisation des SDC, supporte des voies endocytiques alternatives [Zimmermann, 2005]. C'est ce qui a été par ailleurs démontré, d'autres études mettant en évidence l'engagement des syndécanes dans d'autres voies d'internalisation. Il a été démontré que le syndécane-4 peut engager l'endocytose de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ par une voie médiée par la dynamine et la cavéoline [Bass, 2011]. L'emprunt de la voie d'endocytose médiée par la clathrine par le SDC-4 a également été démontré lors de la gastrulation [Ohkawara, 2011].

1.3. Les glycosaminoglycanes : un large spectre de fonctions biologiques

Les glycosaminoglycanes sont des chaînes linéaires polysaccharidiques non ramifiées ayant un poids moléculaire allant de 10 à 100 kDa et portant des charges négatives, dues notamment à la présence de groupements sulfates et/ou carboxylate dans leur structure. Ces charges confèrent aux GAGs une propriété hydrophile.

On les retrouve majoritairement exprimés dans le glycocalyx constitué d'un réseau de PGs et de glycoprotéines localisés à la surface cellulaire, les matrices extracellulaires et tissus conjonctifs, notamment dans le cartilage et les tendons où ils sont importants pour l'hydratation et la lubrification des tissus.

Les polysaccharides contenus dans les GAGs sont constitués d'enchaînement d'unités disaccharidiques répétitives. Cette unité osidique est principalement composée d'un ose aminé (glucosamine GlcN ou galactosamine GalN) associé à un acide uronique (acide D-glucuronique GlcA ou acide L-iduronique IdoA) par une liaison glycosidique. On distingue deux types de glycosaminoglycanes, les GAGs sulfatés comme, l'héparane/héparine sulfate (HS), le chondroïtine sulfate (CS), le dermatane sulfate (DS) et le kératane sulfate (KS) ; et un type de GAGs non sulfatés, l'acide hyaluronique(AH).

La nature des résidus glucidiques formant l'unité disaccharidique et le type de liaison entre eux permet de discerner les quatre familles de GAGs (**Tableau 1**).

Les héparanes/Héparine sulfate sont des chaînes d'acide glucuronique (GlcA) ou iduronique (IdoA) associé par une liaison de type β 1-4 (si GlcA) ou α 1-4 (si IdoA) à une N-acétyl-glucosamine. Les polysaccharides d'héparane sulfate peuvent atteindre 100 à 200 unités disaccharidiques. (GlcNAc)

Les chondroïtines sulfate et dermatanes sulfates sont les GAGs les plus abondants dans le corps humain. Ils sont composés d'une N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc), liée à un acide D-glucuronique (GlcA) pour les CS et IdoA pour les DS. La chaîne des CS peut atteindre 40 à 100 unités disaccharidiques.

L'acide hyaluronique est le premier GAG découvert dans l'humeur vitrée de l'œil par Karl Meyer [**Meyer, 1940;Wight, 2011**] qui a inspiré son nom issu du grec hyalos (vitreux). On le retrouve principalement dans les tissus conjonctifs épithéliaux et neuronaux. Il est composé d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamine relié par des liaisons β -1,4 et β -1,3. Sa synthèse intervient dans le cytoplasme et il est sécrété sous une forme indépendante d'un corps protéique. Le polymère d'acide hyaluronique peut atteindre une taille de 10000 kDa.

Le kératane sulfate est composé d'un enchaînement de galactose (Gal) avec une *N*-acétyl-glucosamine (GlcNAc) par une liaison β 1-4.

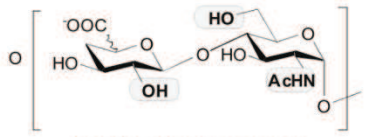
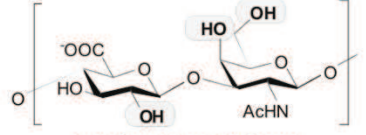
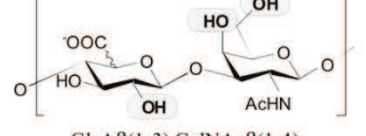
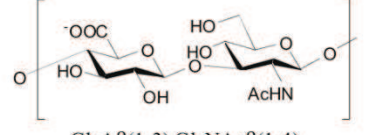
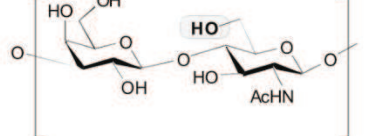
GAG	Uronic acid/ Galactose	Hexosamine	Disaccharide
Heparin (HP) Heparan sulfate (HS)	D-Glucuronic acid L-Iduronic acid	D-Glucosamine	 GlcA β (1-4) GlcNAc α (1-4) IdoA α (1-4) GlcNAc α (1-4)
Chondroitin sulfate (CS)	D-Glucuronic acid	D-Galactosamine	 GlcA β (1-3) GalNAc β (1-4)
Dermatan sulfate (DS)	D-Glucuronic acid L-Iduronic acid	D-Galactosamine	 GlcA β (1-3) GalNAc β (1-4) IdoA α (1-3) GalNAc β (1-4)
Hyaluronic acid (HA)	D-Glucuronic acid	D-Glucosamine	 GlcA β (1-3) GlcNAc β (1-4)
Keratan sulfate (KS)	D-Galactose	D-Glucosamine	 Gal β (1-4) GlcNAc β (1-3)

Tableau 1. Structure des différentes familles de glycosaminoglycane. Représentation des formules et classification des Héparine/héparane sulfate, chondroïtine sulfate, dermatane sulfate, acide hyaluronique et kératane sulfate en fonction de leur composition en sucre.

D'après : Papy-Garcia et al., 2011.

À l'exception de l'AH, les GAGs sulfatés peuvent être liés à un core protéique formant la structure du protéoglycane. Les chaînes de GAGs sont associées à une sérine au niveau d'un motif sérine-glycine du core protéique par une liaison O-glycosidique impliquant une séquence glycanique xylose-galactose-galactose-acide glucuronique.

L'étude structurelle des PG s'est d'abord focalisée sur la caractérisation du core protéique avant de s'intéresser aux chaînes de glycosaminoglycanes, qui restent relativement mal connues due à leur complexité structurelle et aux techniques d'étude plus tardives.

Le core protéique des PGs détermine le type d'expression et la localisation cellulaire des GAGs. L'induction de la signalisation cellulaire est essentiellement déterminée et assurée par la liaison d'un ligand avec la composante glycanique et rarement par le corps protéique. Les GAGs peuvent être impliqués dans de nombreux mécanismes, tels l'adhérence, la migration et la prolifération cellulaire, mais aussi dans des processus développementaux, l'angiogenèse, la cicatrisation, l'inflammation et la progression du stade tumoral vers un stade métastatique [Tkachenko, 2005; Couchman, 2010; Bass, 2011; Elfenbein et Simons, 2013].

a) Biosynthèse et sulfatation des GAGs

La synthèse des GAGs intervient essentiellement au niveau de l'appareil de Golgi où les enzymes de biosynthèses vont assembler et modifier les chaînes polysaccharidiques par des modifications post-traductionnelles d'épimérisation et de sulfatation. On distingue les polymérases exososines (EXT) responsables de l'élongation de la chaîne, parmi lesquelles EXT1 assure la fonction de transférase et EXT2 maintient la structure. Une fois la chaîne constituée, les N-Déacétylases/N-Sulfotransférases (NDST) agissent au niveau des groupements N-acétylés de certaines glucosamines pour les substituer par des groupements N-sulfatés. Les sulfatations des GAGs interviennent aux positions, 2-O pour l'acide iduronique, 4-O et 6-O pour le galactosamine ou 3-O et 6-O pour le glucosamine [Couchman, 2010]. Les sulfatations en 2-O interviennent en même temps que la N-déacétylation, la N-sulfatation et l'épimérisation. (6-O et 3-O, liaison $\beta(1\rightarrow4)$).

Les GAGs peuvent être fixés sur un core protéique par O-glycosylation d'un motif tétrasaccharidique xylose-galactose-galactose-acide glucuronique. Le xylose est lié de façon covalente au groupement hydroxyle d'un résidu sérine ou thréonine de la protéine. Le premier sucre du GAG est toujours un acide glucuronique faisant partie du tétrasaccharide. La composition des GAGs varie selon les réponses cellulaires, ce qui en fait des molécules subtiles et versatiles possédant une immense variabilité.

b) Interaction des GAGs avec les cytokines

Les groupements sulfate portés par les glycosaminoglycanes génèrent une charge négative à pH physiologique et permettent d'interagir avec des protéines chargées positivement (facteur de croissance, chimiokines) par interaction électrostatique. Des études structurales ont essayé de définir les conformations et les motifs possibles qui permettent cette interaction. La conservation des domaines protéiques des cytokines du type des chimiokines ont permis d'identifier des épitopes linéaires requis pour l'interaction avec les GAGs. La conservation des motifs XBBXB et XBBBXXBX, où B représente un acide aminé basique et X un acide aminé non spécifique, a pu être mise en évidence suggérant un motif commun pour la liaison de ces protéines avec les GAGs [**Handel, 2005**]. Cependant, les chimiokines sont connues pour s'oligomériser lorsqu'elles se fixent sur les chaînes GAGs, permettant ainsi de diversifier la nature des épitopes de liaison [**Hamel, 2009**].

D'autre part, la structure des GAGs, notamment le degré et le positionnement des sulfates, joue également un rôle important quant à la nature de liaison qu'elle peut offrir aux protéines liant l'héparine (Heparin Binding Protein, HBP) tels les facteurs de croissance. Les sulfates positionnés sur une N-glucosamine et en 2-O des unités iduronate génèrent un site de fixation permettant l'interaction des GAGs avec le FGF-2 tandis que les résidus glucosamine sulfatés en position 6-O sont nécessaires pour l'activité mitogène du complexe FGF-2/GAGs [**Pye, 1998, Goodger, 2008**].

Il a par ailleurs été montré que le VEGF interagit préférentiellement avec les chaînes héparane sulfate (HS) contenant deux résidus saccharidiques hautement sulfatés et espacés de fragments partiellement sulfatés [**Robinson, 2006**].

c) Rôles des GAGs sulfatés dans l'angiogenèse : héparane sulfate et chondroïtine sulfate

Les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG), ont un rôle important dans les processus angiogéniques. Le remodelage contrôlé de la matrice extracellulaire, et des GAGs matriciels et cellulaires par leur dégradation enzymatique ou leur recyclage et permet de répondre rapidement et de façon adaptée à un stimulus angiogénique [**Stringer, 2006; Casu, 2010; van Wijk, 2013; Knelson, 2014**].

Différents fragments de la chaîne de polysaccharides des HSPGs sont responsables des interactions entre un grand nombre de cytokines tels les facteurs de croissance et les chimiokines, pouvant promouvoir la formation de complexes ternaires avec leurs récepteurs respectifs [**Mulloy, 2006; Brown, 2013**].

Les GAGs sont des modulateurs importants lors des processus de cicatrisation et réparation tissulaire suite à une angiogenèse développée dans un contexte ischémique. Grâce à leur interaction avec les cytokines, ils peuvent soit favoriser leur délivrance en jouant le rôle de corécepteur [**Suffee, 2012**], soit les retenir pour les concentrer et empêcher leur dégradation [**Ziarek, 2013**].

Les études menées dans notre laboratoire ont montré l'importance de la modulation de l'expression des GAGs dans les processus angiogéniques et les modifications dans l'expression des chaînes GAGs, notamment dans leur niveau de sulfatation [**Chevalier, 2015; Haddad, 2015**].

2. Les mimétiques de GAGs : une nouvelle approche thérapeutique

La recherche sur les biomatériaux se base sur le développement de matériaux ou de dispositifs capables d'améliorer ou de remplacer les fonctions biologiques défaillantes. L'utilisation de molécules biologiques et de polymères d'origine naturelle comme dispositif médical pour l'ingénierie tissulaire est actuellement l'une des approches majeures pour favoriser la régénération tissulaire [Malafaya, 2007; Von der Mark, 2009; Ikeda, 2011]. D'autres utilisations des GAGs ont également été suggérées afin d'inhiber des activités biologiques comme compétiteur des GAGs endogènes afin de séquestrer des facteurs de croissance et empêcher leur fixation à leur récepteur. C'est le cas de mimétiques de GAGs anti-angiogéniques développés pour des activités inhibant le développement tumoral [Brennan, 2016].

Il a été démontré que la plupart des facteurs de croissance et chimiokines impliqués dans la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire, peuvent interagir avec les GAGs matriciels et le glycocalyx. Ces interactions les protègent de la glycolyse et permettent une délivrance contrôlée et continue de ces facteurs dans le milieu extracellulaire. Depuis lors, les stratégies thérapeutiques visant la concentration et la délivrance de molécules bioactives se sont focalisées sur l'emploi de l'association des GAGs et leurs mimétiques chargés en facteurs de croissance (par exemple VEGF ou FGF-2) [Tillman, 2006 ; Ikeda, 2011; Favretto, 2014]. Ces travaux ont permis l'introduction de dérivés de GAG de diverses origines et plus facile d'accès que les GAGs de mammifères, et le développement d'études sur leurs activités biologiques. La facilité d'extraction et la grande disponibilité des analogues de GAGs comme le fucoïdane, le pentosane polysulfaté ou le dextrane sulfaté en font des molécules d'intérêt pour l'ingénierie tissulaire.

Ces GAGs exogènes ont sont considérés comme mimétiques de GAGs endogènes (structure composée de sulfate et de groupement carboxylate). D'un point de vue mécanistique lors d'une lésion tissulaire, ces mimétiques de GAGs pourraient se substituer aux GAGs endogènes endommagés par les endoglycosidases matricielles activées par la lésion tissulaire.

Dans ce cas de figure, les GAGs exogènes permettraient de restaurer la fonction des GAGs endogènes dégradés en restaurant un échafaud concentrant les facteurs de croissance et chimiokines.

2.1. Les Regenerating agents (RGTA) comme agents potentialisateurs

Le potentiel régénératif des GAGs et leurs dérivés ont attiré les recherches focalisées sur de nouvelles approches thérapeutiques. Au milieu des années 90, des mimétiques de glycosaminoglycanes sulfatés artificiels et appelés ReGeneraTing Agents (RGTA) ont été développés à des fins thérapeutiques [Meddahi, 1996; Desgranges, 1997; Barritault et Caruelle, 2006]. Les RGTAs sont des polymères synthétiques basés sur une structure de dextrane sulfaté comprenant une teneur plus ou moins importante en groupement carboxylique.

L'un des mécanismes d'action serait de substituer les fonctions des GAGs endogènes, dont l'expression est modifiée après une lésion tissulaire.

Il a été démontré que les RGTAs peuvent améliorer la vitesse et la qualité de la réparation tissulaire dans des modèles animaux, incluant la peau [Meddahi, 1996], les os [Blanquaert, 1999], le colon [Meddahi, 2002] et autres [Barbosa, 2005; Barritault et Caruelle, 2006]. C'est le cas pour les pathologies vasculaires telles que l'ischémie où les RGTAs favorisent la réparation et la régénération tissulaire de façon plus importante [Desgranges, 1999].

Les RGTAs sont également utilisés dans le développement de matrices poreuses cellularisées comme agents de fonctionnalisation. L'intégration des RGTAs par réticulation confère à la matrice des capacités d'interaction avec des facteurs de croissance permettant de les retenir afin d'améliorer la cellularisation [Desgranges, 1997, 2001].

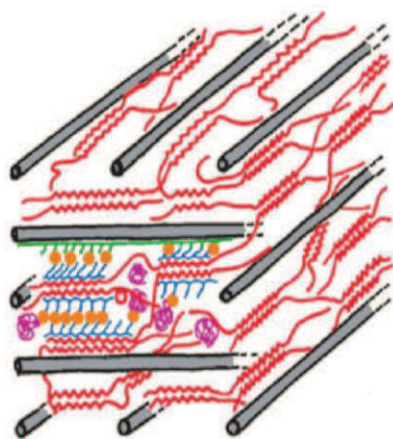
2.2 Un mimétique de GAG naturel : Le fucoïdane et ses applications

a) Historique: structure et découverte des effets biologiques

L'histoire du fucoïdane commence en 1913 lorsque Kylin décrit une molécule polysaccharidique pariétale isolée de la paroi des algues marines, « le fucoidin » [Kylin, 1913] (Figure 5). Le nom de fucoïdane ne lui sera attribué qu'à partir de 1959 par McNeely qui le décrit [McNeely, 1959]. L'intérêt pour ses activités biologiques ne s'est véritablement développé qu'à partir des années 70-80.

Plusieurs études se sont portées sur la caractérisation de la structure des fucoïdanes en fonction de l'origine de l'espèce.

A)



B)



Figure 5. A) Composition de la paroi cellulosique des algues brunes et localisation du fucoïdane. Modèle hypothétique de l'organisation biochimique de la paroi cellulaire des algues brunes (adapté de Kloareg, 1986). **B) Illustration de l'algue *Ascophyllum nodosum* dans son état naturel émergé.**

D'après : Gurvan, 2010. Images sous licence Creative Commons.

La première structure du fucoïdane fut décrite par Ross et Percival en 1950 sur un extrait de *Fucus vesiculosus*. La structure décrite par les auteurs se base sur un squelette linéaire de L-Fucose liés entre eux par des liaisons glycosidiques en $\alpha(1\rightarrow2)$ et plus rarement en $\alpha(1\rightarrow4)$ avec une substitution de groupes hydroxyles par des esters de sulfates (R-O-SO₃⁻) en O-4 [**Percival et Ross, 1950**].

En 1993, Patankar *et al.* révisent la structure d'un fucoïdane extrait de l'algue *Fucus vesiculosus* comme étant un polymère de L-Fucose liés en $\alpha(1\rightarrow3)$ contenant des groupes sulfates substitués en O-4 de certains résidus fucose. Ils ajoutent que le corps de ce fucane contiendrait des branchements en position O-4 ou O-2 tous les 2 à 3 résidus fucose, correspondant à l'époque à la formule faisant consensus pour expliquer son interaction avec les sélectines [**Patankar, 1993**].

Les fucoïdanes sont généralement décrits comme étant composés de 50 à 90% de L-fucose, 35 à 45% de sulfate et moins de 8% d'acide uronique [**Chaubet, 2000**]. On relève aussi la présence d'autres monosaccharides (galactose, mannose, xylose, glucose...) en proportions variables.

Par la suite, des études ont mis en évidence certains motifs de répétition sur des fractions de fucoïdane hautement purifiées provenant de différentes espèces [**Chizhov, 1999; Bilan, 2010; Nishino, 1994; Usov, 1998**]. Ces structures sont toutes basées sur un squelette d'unités L-fucosyl liées en $\alpha(1\rightarrow3)$ avec quelques liaisons glycosidiques en $\alpha(1\rightarrow4)$. Les positions de substitution par les groupes sulfate sont variables mais principalement en O-2 et O-4.

Nardella *et al.* réalisent une étude structure-fonction en 1996 sur les capacités anticoagulantes de fucoïdanes dégradés à partir d'extraits bruts d'*Ascophyllum nodosum* obtenus par dépolymérisation radicalaire [**Nardella, 1996**]. Les auteurs de cette étude ont montré qu'un extrait de fucane est constitué d'un mélange de plusieurs populations de polysaccharides ayant une composition similaire à la structure du fucoïdane et qu'une de ces fractions de bas poids moléculaire présente une activité anticoagulante plus élevée. Ils concluaient que la taille du polysaccharide est importante dans leur étude.

Au début des années 2000, de nouvelles perspectives sont mises en lumière avec la mise en place et la multiplication d'analyses plus fines par des techniques plus performantes (particulièrement en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire ou RMN). Chevolot *et al.* décrivent pour la première fois en 2001, une structure plus détaillée de fucoïdanes de petits poids moléculaires extraits d'*Ascophyllum nosodum* et de *Fucus vesiculosus*. Une analyse plus fine de la structure du fucoïdane y est introduite, avec une chaîne linéaire organisée sur une base de disaccharides sulfatés [Chevolot, 1999 et 2001].

En 2002, Bilan *et al.* s'accordent sur cette nouvelle définition en décrivant la structure d'un fucoïdane provenant de l'espèce d'algue *Fucus evanescens* en utilisant une analyse fine du fucoïdane brut et fractionné par chromatographie échangeuse d'ions, par des techniques de spectroscopies RMN et infrarouge [Bilan, 2002]. Leurs résultats montrent une structure proche de ce qui avait été décrit précédemment avec une chaîne de L-fucopyranose alternant des liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\alpha(1\rightarrow4)$, sulfatés en position -2 du cycle carboné et en position -4 uniquement pour les résidus fucose liés par le carbone -3. Dans leur structure, une part du groupement hydroxyl restant est aléatoirement acétylé.

Puis, l'année suivante, Berteau O. et Mulloy B. résument dans une étude comparative de différentes sources de fucoïdanes, l'analyse de leurs récentes études structurales et fonctionnelles [Berteau et Mulloy ,2003]. La structure formulée dans cette revue fera consensus et référence jusqu'à maintenant (Figure 6). Quelques revues ont compilé les structures précédemment identifiées [Morya, 2012; Li, 2008; Usov, 2009; Bilan, 2008; Ale, 2011; Ale, 2013; Ustyuzhanina, 2014; Pomin, 2012].

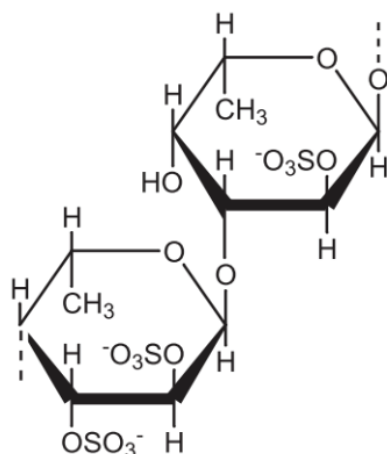


Figure 6. Structure disaccharidique du fucoïdane extrait d'*Ascophyllum nodosum*/*Fucus vesiculosus*/*Fucus evanescens*. [4)- α -L-Fucp-2,3di-OSO₃)-(1→3)- α -L-Fucp(2OSO₃)-(1).

D'après Berteau et Mulloy, 2003.

Le fucoïdane compose 15 à 20% du poids sec de la paroi des algues brunes, ce qui en fait un biomatériau accessible et productible en quantité importante [Vera, 2011]. Son extraction est réalisée en eau chaude et basée sur la précipitation de sels ou de solvants organiques [Silva, 2012]. La production industrielle du fucoïdane s'appuie sur le développement de systèmes reproductibles capable d'extraire et produire des fucoïdanes identiques et élagués d'impuretés (dont les alginates). Le procédé d'extraction comprend trois étapes dont le broyage des algues, l'extraction/purification (comprenant plusieurs étapes dont la précipitation du fucoïdane avec les alginates par du calcium) et le séchage et stockage du produit (Figure 7).

Il existe une grande variété de fucoïdane, dû au fait qu'il existe une variété d'algues qui le synthétisent. La composition du fucoïdane en fucose, sulfate, et acide uronique varie au sein de ces espèces, mais peut être également influencée par d'autres facteurs. Les caractéristiques physico-chimiques des fucoïdanes dépendent de la sévérité des traitements et conditions dans l'extraction, telles que la température, la concentration des composés chimiques, le temps de réaction, mais aussi l'espèce et le type d'algues, le climat et des facteurs environnementaux [Holtkamp, 2009; Li, 2008].

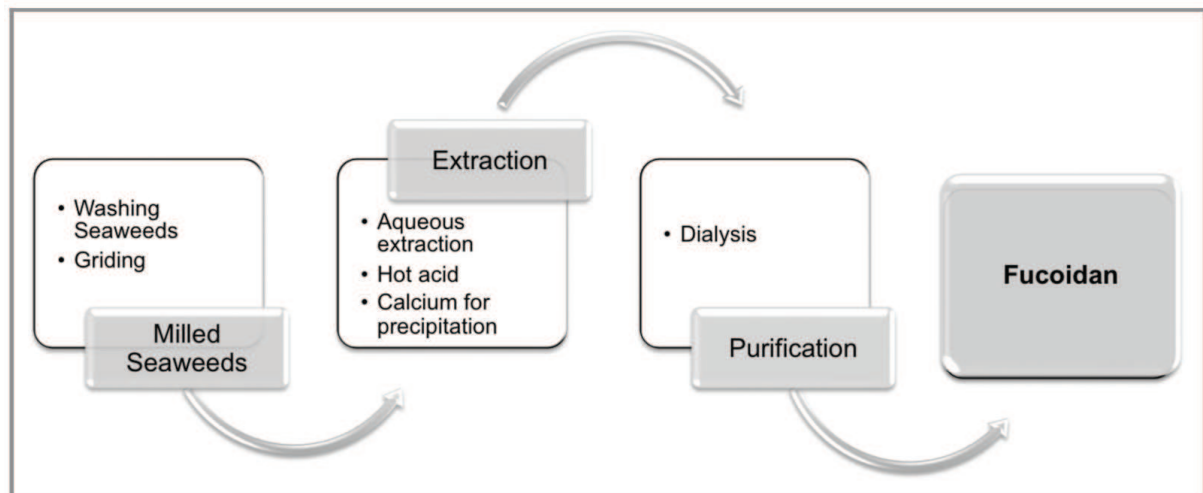


Figure 7. Méthode d'extraction et purification du fucoïdane à partir des algues brunes. Le procédé est divisé en trois étapes : le broyage des algues (lavage et broyage), l'extraction et la purification (impliquant de multiples extractions aqueuses, de solutions acides et peuvent inclure l'utilisation du calcium pour précipiter les alginates afin de récupérer du fucoïdane). Le produit final est obtenu après séchage.

D'après Silva et al., 2012.

b) Le fucoïdane mimétique de l'héparine : effets anticoagulants et anti-thrombotiques

La première fois que des activités anticoagulantes sont associées au fucoïdane date de 1957 grâce aux travaux de Springer. Les propriétés inhibitrices du fucoïdane sur l'activation de la thrombine et l'activation plaquettaire ont été maintes fois démontrées par la suite [Mauray, 1998; Nishino, 1999; Mourão, 2004]. Le fucoïdane inhibe l'activité de la thrombine soit en agissant directement sur cette enzyme, soit en activant l'antithrombine III ou le cofacteur II de l'héparine [Cumashi, 2007]. Le type de mécanisme biochimique précis induisant une activité anticoagulante varie en fonction du type de fucoïdane.

Dans certains cas, l'effet anti-thrombotique d'un fucoïdane est aussi efficace que celui de l'héparine qui est largement utilisée en clinique comme anti-thrombotique.

Durand et al. ont également mis en évidence qu'un LMWF avait des propriétés anti-thrombotiques plus intéressantes qu'une LMWH avec un risque hémorragique plus faible [Durand, 2008]. L'origine végétale du fucoïdane envisagé comme alternative à l'héparine d'origine animale, serait ici un avantage quant à la disponibilité et la facilité de production.

c) Le fucoïdane dans l'angiogenèse : effets hétérogènes et hypothèses structurales sur son potentiel angiogénique

Effets pro-angiogéniques : De nombreux travaux ont étudié les effets thérapeutiques de fucoïdanes sur des maladies cardiovasculaires dans des modèles animaux. Il a ainsi été démontré que le fucoïdane pouvait promouvoir la revascularisation après une ischémie critique d'un membre inférieur chez le rat [Luyt, 2003] et la ré-endothélialisation dans l'hyperplasie intimale développée chez le lapin [Deux, 2002]. Sa structure de polysaccharide sulfaté lui confère des similarités dans les propriétés biochimiques qu'il partage avec les GAGs. Il a par ailleurs été montré que le fucoïdane pouvait interagir de manière électrostatique avec les cytokines retrouvées normalement associées au matrisome, tels que les facteurs de croissance FGF-2 et VEGF [Matou, 2002 ; Lake, 2006], mais aussi les chimiokines comme SDF-1 [Berteau et Mulloy, 2003 ; Fermas, 2008].

Cependant, selon l'origine et la taille du fragment de polysaccharide le constituant, le fucoïdane peut avoir une activité pro-angiogénique par la modulation de la biodisponibilité des cytokines angiogéniques sous forme soluble ou associées à la matrice. [Matou, 2002; Boisson-Vidal, 2007]. Des études sur des modèles *in vitro* se sont intéressées aux mécanismes d'action du fucoïdane sur l'induction de l'angiogenèse. Le fucoïdane peut favoriser le phénotype pro-angiogénique de progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) en présence de FGF-2, par une forte augmentation de l'expression de l'intégrine- $\alpha 6$ permettant l'adhésion de ces cellules à la laminine de la lame basale de l'endothélium [Zemani, 2005].

Le fucoïdane agit également sur l'expression des glycosaminoglycanes endothéliaux. Récemment, il a été démontré qu'un fucoïdane de bas poids

moléculaire (LMWF) pouvait modifier l'expression des HS endothéliaux en modulant l'expression et l'activité de l'héparanase et des syndécanes [Haddad, 2015].

Peu de travaux ont étudié les voies de signalisations qui pouvaient être activées par le fucoïdane pour induire des effets pro-angiogéniques. Un fucoïdane extrait de l'algue *Laminaria japonica* emprunterait les voies de signalisation JNK et p-38 médiées par une activation conjointe de AKT et MMP-2 en présence de FGF-2 [Kim, 2014]. De même, un LMWF provenant d'*Ascophyllum nodosum*, pourrait, seul, activer la voie PI3K/AKT jouant un rôle crucial dans l'angiogenèse. Dans la même étude, les auteurs démontrent que l'induction de la migration de cellules endothéliales par le fucoïdane et le VEGF est dépendante de la voie PI3K/AKT et que le LMWF peut moduler l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués à différents niveaux dans l'angiogenèse [Bouvard, 2015].

Effets anti-angiogéniques : Un certain nombre de publications démontrent un effet négatif du fucoïdane sur l'angiogenèse.

Une étude menée sur un fucoïdane de haut poids moléculaire (HMWF) de 100-130 000 g/mol démontre par exemple qu'une sursulfatation du fucoïdane inhibe l'action du FGF-2 dans la formation de réseaux vasculaire en 2 dimensions par des cellules endothéliales, contrairement au même fucoïdane natif [Soeda, 2000]. D'autre part, un fucoïdane de très petit poids moléculaire (760 g/mol) isolé de *Sargassum hemiphyllum* et très riche en sulfate (40,8% p/p) présente des capacités anti-angiogénique dans l'hypoxie tumorale en régulant négativement l'activité du facteur induit par l'hypoxie (HIF-1 α) et la signalisation PI3K/AKT [Chen, 2015]. Ou encore, un fucane extrait d'*Ascophyllum nodosum* présente des activités anti-tumorales et antiprolifératives sur une lignée de cellules cancéreuses provenant d'un carcinome broncho-pulmonaire [Riou D, 1996].

L'ensemble de ces différentes études mettent en lumière l'importance de la composition et la structure du fucoïdane notamment sur la nature de ses composés osidiques, le taux de sulfatation et la taille de la chaîne, sur ses capacités et son potentiel thérapeutique pour favoriser ou inhiber l'angiogenèse. Phrase à revoir

La compilation de ces données permet d'identifier des homologues structurales liées aux effets similaires, comme le souligne Ustyuzhanina en exposant l'hypothèse que les fucoïdanes de petit poids moléculaire sont plus aptes à induire un angiogénèse tandis que les hauts poids moléculaire auraient tendance à l'inhiber [Ustyuzhanina, 2014].

Les données bibliographiques des activités des fucoïdanes en fonction de l'espèce d'algue sont classées dans le tableau suivant (**Tableau 2**).

Espèces	Classification	Méthode d'extraction	Structure	Activités biologiques	Références
Laminaria saccharina	Laminariales	Extraction suivie par une précipitation avec Cetavlon et déacétylation avec alkali	Homo-(1→3) avec branchement 2-O- α -fucosyl comme principal composant, SO ₃ Na – 29.6%	Inhibition potentielle de la tubulogénèse d'HUVECs <i>in vitro</i> (100 μ g/mL), diminue le niveau d'expression de PAI-1 dans le surgangeant d'HUVEC.	Cumashi, 2007;
		Extraction suivie par une chromatographie échangeuse d'anion	Homo-(1→3)- avec branchement 2-O- α -fucosyl comme principal composant, SO ₃ Na – 36.8%	Inhibition potentielle de la tubulogénèse d'HUVECs <i>in vitro</i> (100 μ g/mL), diminue le niveau d'expression de PAI-1 dans le surgangeant d'HUVEC. Inhibition de l'angiogénèse dans des expériences <i>in vivo</i> avec des souris portant des plugs de Matrigel contenant des cellules de Melanome.	Croci, 2011; Kylin, 1913; Black, 1954; de Reviere, 1983; Maruyama, 1987; Rozkin, 1989; Kitamura, 1991; Pereira, 1999
Laminaria digita		Extraction suivie par une précipitation avec Cetavlon et déacétylation avec alkali.	Homo-(1→3) avec branchement 2-O- α -fucosyl comme principal composant, SO ₃ Na – 27.5%	Inhibition potentielle de la tubulogénèse d'HUVECs <i>in vitro</i> (100 μ g/mL), diminue le niveau d'expression de PAI-1 dans le surgangeant d'HUVEC.	Cumashi, 2007
Laminaria japonica		Extraction suivie par une hydrolyse acide douce et une chromatographie échangeuse d'anion.	No structural data, SO ₃ Na – 33.2%	Inhibition potentielle de la tubulogénèse d'HUVECs <i>in vitro</i> (100 μ g/mL), diminue le niveau d'expression de PAI-1 dans le surgangeant d'HUVEC.	Matsubara, 2005
Undaria pinnatifida	Laminariales	Hydrolyse enzymatique, précipitation dans l'alcool, chromatographie échangeuse d'ion et de gel-perméation	Fuc + Gal (59,2%), acide uronique (9,13%), SO ₃ Na – 21.0%	Réduction significative de l'expression de VEGF-A, inhibition de la prolifération, migration, tubulogénèse des HUVECs, et formation d'un réseau vasculaire à haute concentration (400 μ g/mL).	Liu, 2012; Mori, 1982
Fucus serratus	Fucales	Extraction suivie par une chromatographie échangeuse d'anion	(1→3)(1→4), avec branchement, SO ₃ Na – 29.2%	Inhibition potentielle de la tubulogénèse d'HUVECs <i>in vitro</i> (100 μ g/mL), diminue le niveau d'expression de PAI-1 dans le surgangeant d'HUVEC.	Cumashi, 2007
Fucus disticus	Fucales	Extraction suivie par une chromatographie échangeuse d'anion.	(1→3),(1→4), SO ₃ Na – 34.8%	Inhibition potentielle de la tubulogénèse d'HUVECs <i>in vitro</i> (100 μ g/mL), diminue le niveau d'expression de PAI-1 dans le surgangeant d'HUVEC.	Cumashi, 2007
Fucus vesiculosus	Fucales	Produit de Sigma Aldrich Corp.	(1→3),(1→4), SO ₃ Na – no data	Inhibition de l'angiogénèse dans des expériences avec des cellules de gliome T98G et des monocytes THP1. Diminution de l'expression <i>in vitro</i> de VEGF dans des cellules cancéreuses murines 4T1, réduction <i>in vivo</i> du nombre de microvaisseaux, l'expression et la sécrétion de VEGF dans les tumeurs de souris traitées avec le fucoïdane. Diminution de la sécrétion de VEGF dans des explants RPE/choroïde et cellules RPE, réduisant l'expression de VEGF par les cellules RPE dans le surgangeant et l'angiogénèse induite par VEGF par les cellules endothéliales périphériques.	Lv, 2012; Xue, 2012;
		Produit de Sigma Aldrich Corp. Purifié par chromatographie de gel-perméation.	(1→3),(1→4), SO ₃ Na – 31.2%	Inhibition modérée de la migration des HUVECs et la tubulogénèse par FGF-2 (100 μ g/mL). Suppression de l'action mitogénique et chimiotactique du VEGF sur les HUVECs par la prévention de la fixation de VEGF à son récepteur membranaire.	Soeda, 2000; Koyanagi, 2003;
		Produit de Sigma Aldrich Corp. Purifié par chromatographie de gel-perméation et chimiquement sulfaté.	(1→3),(1→4), SO ₃ Na – 52.4%	Inhibition potentielle de la tubulogénèse d'HUVECs <i>in vitro</i> (100 μ g/mL), diminue le niveau d'expression de PAI-1 dans le surgangeant d'HUVEC. Inhibition potentielle de la tubulogénèse d'HUVECs <i>in vitro</i> (100 μ g/mL), diminue le niveau d'expression de PAI-1 dans le surgangeant d'HUVEC. Suppression de l'action mitogénique et chimiotactique du VEGF sur les HUVECs par la prévention de la fixation de VEGF à son récepteur membranaire, inhibition de l'angiogénèse <i>in vitro</i> avec des cellules murines de sarcome 180, de carcinome pulmonaire Lewis et mélanome B16.	Soeda, 1997; Soeda, 2000; Koyanagi, 2003
		Produit de Sigma Aldrich Corp. Purifié par chromatographie de gel-perméation et chimiquement désulfaté.	(1→3),(1→4), SO ₃ Na – 0%	Pas d'inhibition de la tubulogénèse d'HUVEC <i>in vitro</i> (100 μ g/mL).	Soeda, 2000;
		Extraction suivie par une précipitation avec Cetavlon et déacétylation avec alkali.	(1→3),(1→4), SO ₃ Na – 23.6%	Pas d'inhibition de la tubulogénèse d'HUVEC <i>in vitro</i> (100 μ g/mL).	Cumashi, 2007; Kylin, 1913; Black, 1954; Usov, 2001
Fucus evanescent	Fucales	Extraction suivie par une chromatographie échangeuse d'anion	(1→3),(1→4), SO ₃ Na – 36.3%	Inhibition potentielle de la tubulogénèse d'HUVECs <i>in vitro</i> (100 μ g/mL), diminue le niveau d'expression de PAI-1 dans le surgangeant d'HUVEC.	Cumashi, 2007
Cladosiphon novae caledoniae	Chordariales	Fucoïdane extrait par digestion par Abalone glycosidase - Produit de Daichi Sangyo Corp. (Japan)	Pas de données structurales, SO ₃ Na – 14.5%	Diminution de l'expression et la sécrétion de VEGF par des cellules de carcinome humain HeLa et inhibition de la formation de tubules vasculaires par les cellules tumorales.	Ye, 2005

Tableau 2.1 Bibliographie des études structurales et fonctionnelles des fucoïdanes dans l'angiogénèse *in vitro* et *in vivo*. Effets anti-angiogéniques

D'après Ustyuzhanina et al., 2014 ; Silva et al., 2012.

Espèces	Classification	Méthode d'extraction	Structure	Activités biologiques	Références
Cladosiphon okamuranus	Chordariales	Produit de South Product Corp., Japan.	Homo-(1→3) avec branchement 2-O- α -glucuronyl, SO ₃ Na – 15.1%	Pas d'inhibition de la tubulogénèse d'HUVEC <i>in vitro</i> (100 μ g/mL).	Nagaoka, 1999; Cumashi, 2007
Fucus spiralis		Extraction suivie par une précipitation avec Cetavlon et déacétylation avec alkali	(1→3),(1→4), SO ₃ Na – 25.9%	Faible inhibition de la tubulogénèse d'HUVEC <i>in vitro</i> (100 μ g/mL)	Cumashi, 2007
Ascophyllum nodosum	Fucales	Extraction suivie par une précipitation avec Cetavlon et déacétylation avec alkali	(1→3),(1→4), Xyl, Gal, Man, SO ₃ Na – 24.4%	Faible inhibition de la tubulogénèse d'HUVEC <i>in vitro</i> (100 μ g/mL)	Cumashi, 2007
Ascophyllum nodosum	Fucales	Extraction suivie par une dépolymérisation radicalaire.	(1→3),(1→4), Xyl, GlcA, Man, SO ₃ Na – 34%, Mw \leq 16 kDa	<p>Stimulation de la prolifération des HUVECs induite par FBS- et FGF-1-, renforçant la migration des HUVECs en présence de FGF-1 (10 μg/mL).</p> <p>Augmentation de la densité de structures tubulaires induites par FGF-2 <i>in vivo</i> (10 μg/mL).</p> <p>Renforcement de la formation de tubules endothéliaux induite par FGF-2 à travers la surexpression de l'intégrine α6 dépendante des héparanes sulfate (10 μg/mL).</p> <p>Renforcement de l'angiogénèse <i>in vivo</i> induite par FGF-2 dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez la souris (10 μg/mL).</p> <p>Renforcement de la tubulogénèse des cellules endothéliales dans un Matrigel (10 μg/mL).</p> <p>Augmentation de la prolifération et la tubulogénèse induite par FGF-2 de PECs cultivées sur Matrigel (10 μg/mL).</p> <p>Augmentation de l'angiogénèse médiée par les Endothelial-Colony-Forming-Cells (ECFC) <i>in vivo</i> dans un modèle murin d'ischémie des membres inférieurs (10 μg/mL).</p> <p>Augmentation de la migration des HUVECs induite par LMWF <i>in vitro</i> et activation de voies de signalisation dépendantes (PI3K/AKT) de VEGF et FGF-2 dans ECFCs et HUVECs (10 μg/mL).</p>	Giraud, 1998; Matou, 2002; Chabut, 2003; Luyt, 2003; Lake, 2006; Zemani, 2005 Sarlon, 2012 Bouvard, 2015
Fucus vesiculosus	Fucales	Produit de Kraeber GmbH & Co.	Pas de données structurales, SO ₃ Na – 34.0%	Augmentation de la migration et de la formation de tubes vasculaires des cellules endothéliales cultivées sur Matrigel (10 μ g/mL).	Hlawaty, 2011 Haddad, 2015
Laminaria japonica	Laminariales	Produit de Haewon Biotech.	Pas de données structurales, SO ₃ Na – 23.5%	Augmentation de la prolifération et de la formation de tubes vasculaires des cellules endothéliales cultivées sur Matrigel (1 μ g/mL).	Kim, 2014

Tableau 2.2 Bibliographie des études structurales et fonctionnelles des fucoïdanes dans l'angiogénèse *in vitro* et *in vivo*. Effets pro-angiogéniques

D'après Ustyuzhanina et al., 2014 ; Silva et al., 2012.

d) *Fonctionnalisation et greffage du fucoïdane: développement et applications*

La découverte de métabolites actifs produits dans les parois des algues marines démontrant des activités biologiques (carraghénane dans les algues rouges, ulvane dans les algues vertes et fucoïdane dans les algues brunes), a augmenté leur intérêt dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'importante diversité des activités biologiques des fucoïdanes et leur facilité d'obtention, permet d'envisager leur utilisation dans de nombreuses applications, par exemple pour la conception de biomatériaux ou dans l'imagerie [Cunha et Grenha, 2016; Chollet, 2016].

Détection du fucoïdane et localisation

Dans le domaine de l'imagerie, des fucoïdanes modifiés ont été développés en laboratoire, afin d'obtenir des outils permettant sa visualisation et sa quantification. Mizuno *et al.* ont généré des anticorps reconnaissant spécifiquement les fucoses sulfatés développés sur un fucoïdane extrait de *Laminaria japonica*. [Mizuno, 2009].

Le couplage de fucoïdane avec un composé détectable est également largement répandu. La fixation d'un fluorophore est réalisée en général en position terminale sur une extrémité réductrice [Roger, 2002], ou par l'ajout d'un composé radiomarqué dans sa composition [Rouzet, 2011]. Les études fonctionnelles, notamment sur les activités anticoagulantes, qui ont suivi le couplage ont démontré que ces méthodes de fonctionnalisation n'altèrent pas les activités du fucoïdane.

Une étude complémentaire a décrit un système optimisé de préparation et de purification du fucoïdane pour une injection sous forme soluble *in vivo* adossée à une mesure de la distribution et de l'élimination dans un modèle animal [Saboural, 2014].

Ces fucoïdanes détectables sont façonnés pour à terme être utilisés en application clinique comme des outils de diagnostic.

Dans cette optique, *Rouzet et al.* ont développé une méthodologie pour évaluer la présence et l'importance de thrombus vasculaire en utilisant la capacité du fucoïdane à se lier à la P-sélectine exprimée par les plaquettes activées [**Rouzet, 2011**]. Dans une étude similaire, ils ont développé des nanoparticules préparées avec une base d'oxyde de fer supramagnétique (Ultrasmall Supermagnetic Iron Oxyde, USPIO) et de fucoïdane (USPIO-FUCO).

La propriété du fucoïdane ici mise en œuvre a été comparée avec des USPIOs recouverts avec du dextrane anionique pour la reconnaissance de thrombi vasculaires générés chez le rat et visualisés en imagerie par résonance magnétique. Dans cette étude, le fucoïdane reconnaît et identifie spécifiquement le thrombus vasculaire [**Suzuki, 2014**].

Le fucoïdane dans la bio-ingénierie : micro/nanoparticules, matrices 3D, hydrogel et microfilm

De nombreuses utilisations de fucoïdanes ont été développées dans une optique de générer des biomatériaux à potentiel thérapeutique.

Notre laboratoire est spécialisé dans le développement de biomatériaux à partir de composés polysaccharidiques. Nous avons développé plusieurs types de matrices (micro et nano-billes, pastilles tridimensionnelles) qui sont étudiées dans des modèles de pathologies vasculaires *in vitro* et *in vivo*.

A titre d'exemple, le greffage de fucoïdane par co-polymérisation sur des microbilles poreuses cellularisées dans le but de générer une stratégie de thérapie cellulaire est proposé [**Meddahi-Pellé, 2004**] (**Figure 8**).

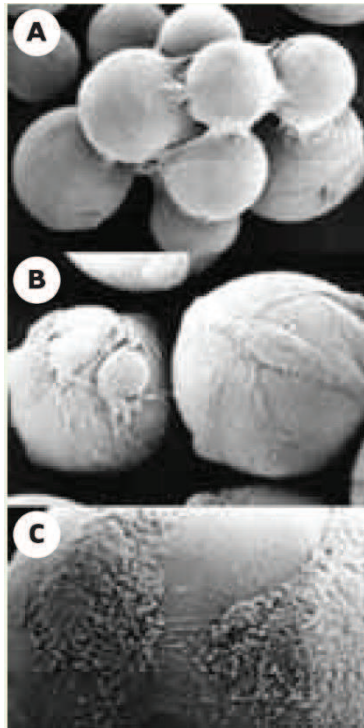


Figure 8. Microbilles poreuses fonctionnalisables par réticulation avec des mimétiques de GAGs pour favoriser l'adhérence cellulaire visualisée en microscopie électronique à balayage. Les supports fonctionnalisés chimiquement permettent de favoriser l'adhérence et la croissance *in vitro* de cellules endothéliales. A) Grossissement x500. B) Grossissement X900. C) Grossissement X3000.

D'après : Meddahi-Pellé, 2004.

Une étude a également montré qu'un fucoïdane de poids moléculaire moyen (MMWF, 39000 g/mol) issu de *Fucus vesiculosus*, peut être utilisé pour fonctionnaliser une matrice poreuse en 3-dimensions avec des molécules bioactives (**Figure 9**). Ces travaux ont mis en évidence l'intérêt de l'utilisation du MMWF afin de contrôler la délivrance du facteur de croissance VEGF et ainsi d'augmenter la revascularisation par induction d'angiogenèse après implantation sous-cutané de la matrice dans un modèle de souris [Purnama, 2013].

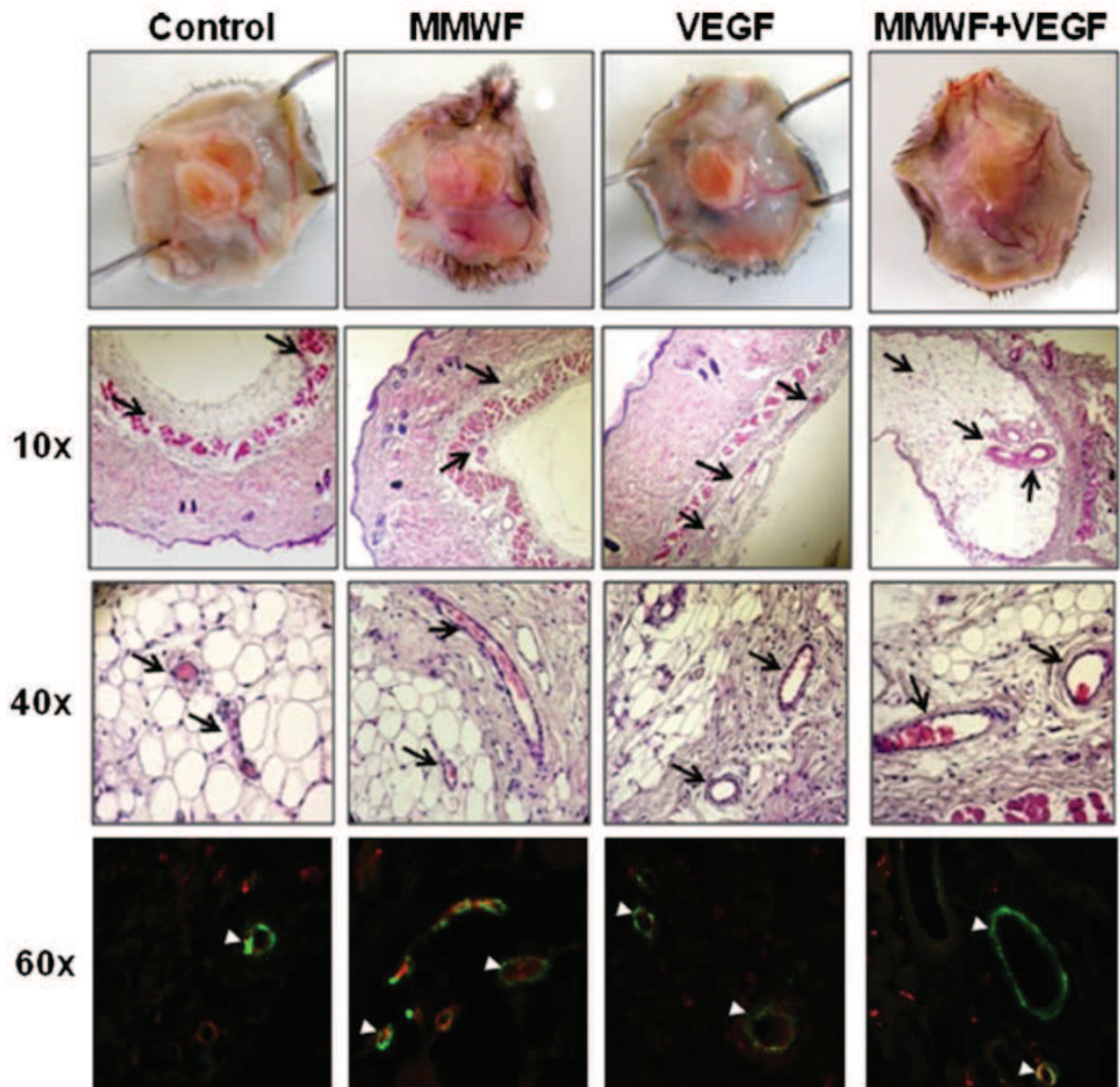


Figure 9. Fonctionnalisation d'une matrice poreuse avec du fucoidane et VEGF pour développer une angiogenèse thérapeutique. Deux semaines après implantation sous-cutanée, les matrices (contrôle, MMWF, VEGF et MMWF+VEGF) ont été récoltées et fixées pour analyses en coupes histologiques. Haut : illustrations des matrices après récolte montrant le développement de réseaux de microvaisseaux. Les microvaisseaux sont observés en microscopie à contraste de phase après marquage de coupe avec une coloration hématoxyline/éosine (les flèches montrent les vaisseaux). Bas : Les vaisseaux sont observés en microscopie à fluorescence après marquage de l'isolectine-B4 (rouge) et α -smooth muscle actin (vert) et identifiés avec les flèches blanches.

D'après : Purnama, 2013.

La fabrication d'un biomatériau basé sur l'association de fucoïdane et de chitosane (TCP-Ch-Fu) pour une application dans l'ingénierie de tissus osseux a été étudiée récemment [Puvaneswary, 2015]. Les auteurs démontrent que l'ajout du fucoïdane dans leur matériau biocomposite améliore les forces de compressions nécessaires pour le développement d'un tel produit, mais aussi la minéralisation par la formation de couche d'apatite, la viabilité et la différenciation de cellules souches mésenchymateuses ensemencées (**Figure 10**). Par leur étude, ils confirment que leur biomatériau à base de fucoïdane peut supporter la culture de cellules humaines et pourrait être utilisé en application pour réparer les tissus osseux endommagés.

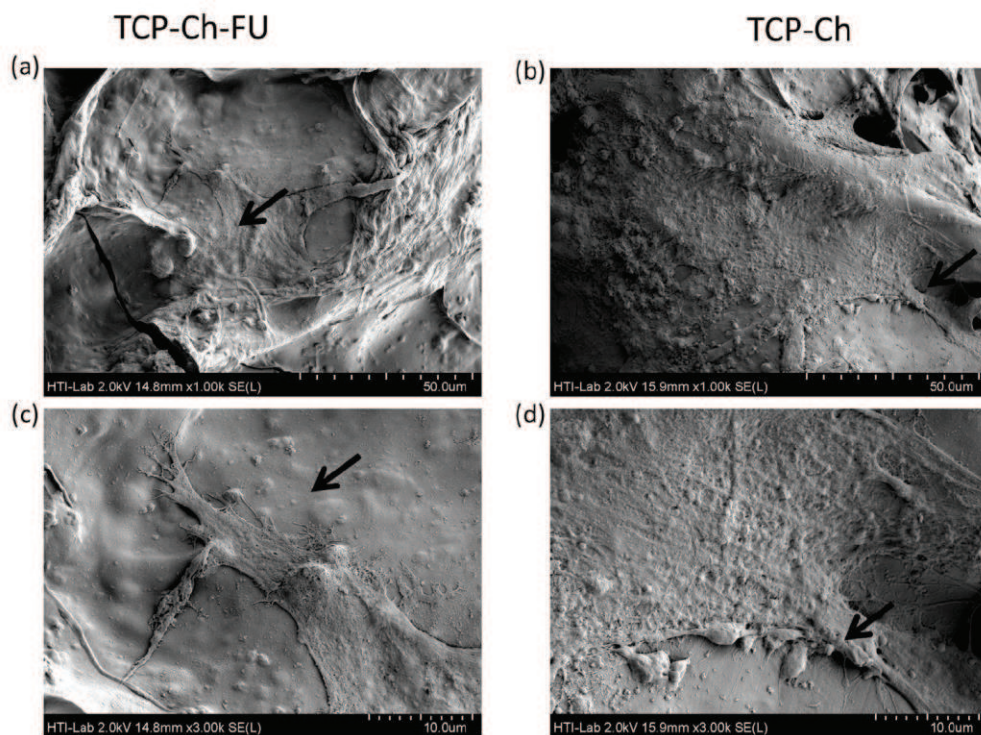


Figure 10. Application du fucoïdane pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Analyse de surface des matrices contenant le chitosane/fucoïdane TCP-Ch-Fu (a et c) et sans TCP-Ch (b et d) par l'observation de champs d'émission en microscopie électronique balayage. Les flèches indiquent l'attachement cellulaire (cellules souches mésenchymateuses humaines) à la surface de la matrice.

D'après : Puvaneswary, 2015.

Une autre étude réalisée par Nakamura *et al.* s'est focalisée sur l'élaboration d'une structure de chitosane/fucoïdane complexée en hydrogel permettant de retenir le FGF-2 (**Figure 11**). Les capacités biologiques du fucoïdane ont été utilisées ici afin de développer un composé capable de délivrer un principe actif (le FGF-2) de manière contrôlée et continue. Les expériences *in vitro* et *in vivo* (injection dans le dos de souris) ont pu mettre en évidence une neovascularisation importante une semaine après injection. La dégradation de l'hydrogel a été observée après 4 semaines [Nakamura, 2008].

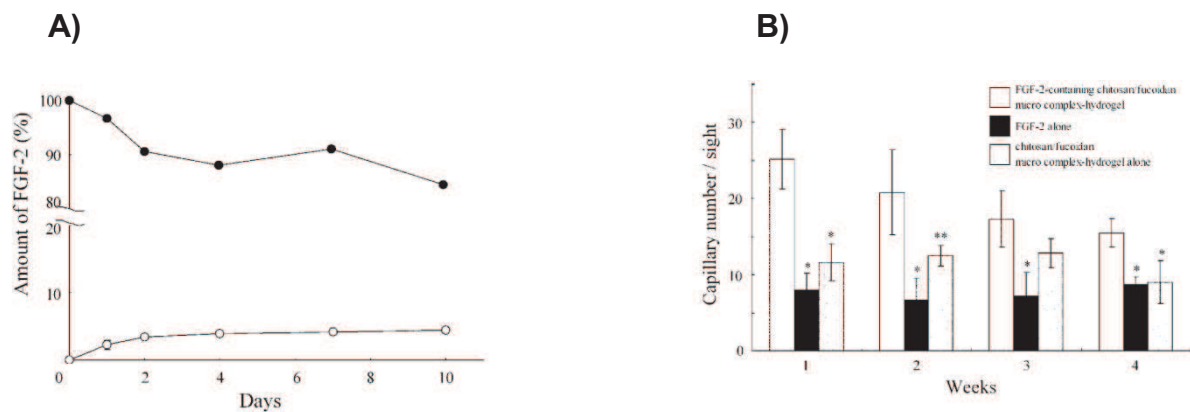


Figure 11. Libération du FGF-2 complexé à un hydrogel de chitosane/fucoïdane et fonctionnalisation sur l'angiogenèse in vivo. A) Profil de la libération de FGF-2 contenu dans l'hydrogel et mesuré dans du milieu de culture à 37°C. B) Effet de l'injection de l'hydrogel de chitosane/ fucoïdane contenant FGF-2 sur la vascularisation in vivo (souris). * $p < 0.001$ ** $p < 0.01$

D'après : Nakamura *et al.*, 2008.

2.3. D'autres polysaccharides naturels mimétiques de GAGs

Les polysaccharides extraits d'algues ne sont pas les seules cibles potentielles pour la recherche de mimétiques naturels des GAGs. Des recherches ont également portées sur les exopolysaccharides bactériens, comme par exemple le HE800 exprimé dans l'espèce bactérienne *Vibrio diabolicus* retrouvée dans les écosystèmes océaniques hydrothermaux. L'exopolysaccharide présente des activités biologiques, notamment dans l'induction de l'angiogenèse et constitue une approche alternative à la recherche de molécules actives pour développer des thérapies cellulaires et des procédés d'ingénierie tissulaire [Senni K, 2011; Zykwincka A, 2016].

Un autre polysaccharide hautement sulfaté de bas poids moléculaire et extrait de la bactérie GY785 présente des propriétés anti-métastatiques sur les processus tumoraux de culture cellulaire d'ostéosarcome [Heymann D, 2016].

Des études *in vitro* de ces deux exopolysaccharides HE800 et GY785 ont également montré leur potentiel applicatif pour la conception d'hydrogels injectables permettant la culture en deux et trois dimensions d'ostéoblastes (MC3T3-E1) et chondrocytes (C28/I2). Les auteurs attestent dans ces travaux des résultats comparables avec des hydrogels constitués d'acide hyaluronique dans l'amélioration de l'attachement des cellules et des propriétés mécaniques des matrices [Rederstorff, 2011].

D'autres polysaccharides naturels d'origine bactérienne sont couramment utilisés pour leur propriétés biologiques tels que les pseudos sucres PI88 et PG45 mimétiques des HS: [Hammond, 2013], le xylane sulfaté [Schone, 1998], le polysulfate de pentosane ou hemicelluloses K4 [Mestaino 2009-2014] CS précurseur et le K5 mimétique héparine provenant d'*Heparosum linahrtd* [Casa, 1994].

Chapitre II : Problématique du traitement de l'ischémie

1. Le système cardiovasculaire

1.1. La physiopathologie vasculaire

a) Histologie et physiologie des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins constituent la principale porte d'entrée des molécules et agents exogènes vers les tissus. Ils sont par conséquent impliqués dans de nombreux processus pathologiques, notamment lorsqu'ils ne permettent plus d'assurer leur fonction principale d'irriguer les organes en nutriments. La sténose du conduit vasculaire, ou rétrécissement de l'ouverture luminale du vaisseau sanguin, est principalement causée par l'athérosclérose (accumulation de lipides et débris cellulaire sur la paroi des vaisseaux), et en fait une cause majeure de santé publique tant elle conduit à des événements plus graves comme l'ischémie des membres.

On distingue trois types de vaisseaux sanguins dans le corps humain, les artères, les veines et les capillaires, organisés en deux circulations (systémique et pulmonaire). Dans la circulation systémique, les artères transportent le sang riche en nutriments et dioxygène et les veines transportent le sang pauvre en nutriments et riche en dioxyde de carbone. Cette situation est inversée dans la circulation pulmonaire. Cette différence majeure influence la physiologie des artères de la circulation systémique et pulmonaire.

Les vaisseaux sont constitués de trois tuniques de tissu (**Figure 12**).

L'intima en contact avec la lumière du vaisseau est composée d'une monocouche étanche de cellules endothéliales (endothélium) couverte de glycocalyx au niveau luminal, permettant les échanges métaboliques et ayant un rôle de protection contre la thrombose et l'inflammation.

La media est la tunique intermédiaire ayant un rôle vasoconstricteur puisque composée d'une large couverture de cellules musculaires lisses (CML) contractiles entourées de matrice extracellulaire comprenant les lames élastiques (collagène et élastine) et une base riche en GAGs [Kentish, 2008]. Les unités lamellaires d'élastine sont agencées parallèlement et rejoignent les cellules musculaires lisses, les polysaccharides et le collagène. Environ 50 unités de lames élastiques constituent la media artérielle chez l'adulte, chacune mesurant 11µm d'épaisseur. Les interconnexions entre le collagène et les lames élastiques sont responsables de la force de résistance du vaisseau, alors que les lames permettent l'élasticité de la paroi accompagnant les cycles de contraction cardiaque [Laurent, 2005].

L'adventice est la dernière tunique constituée pour la plupart de cellules interstitielles fibroblastiques et adipocytaires et de micro-vascularisation pour les plus grandes artères, le vasa-vasorum, irrigant l'adventice elle-même. L'adventice soutient et connecte l'artère aux parois des autres tissus et joue un rôle vasoconstricteur en recevant une innervation vasomotrice du nerf adrénergique formant des boutons synaptiques avec les fibres musculaires de la media [Klemm, 1993].

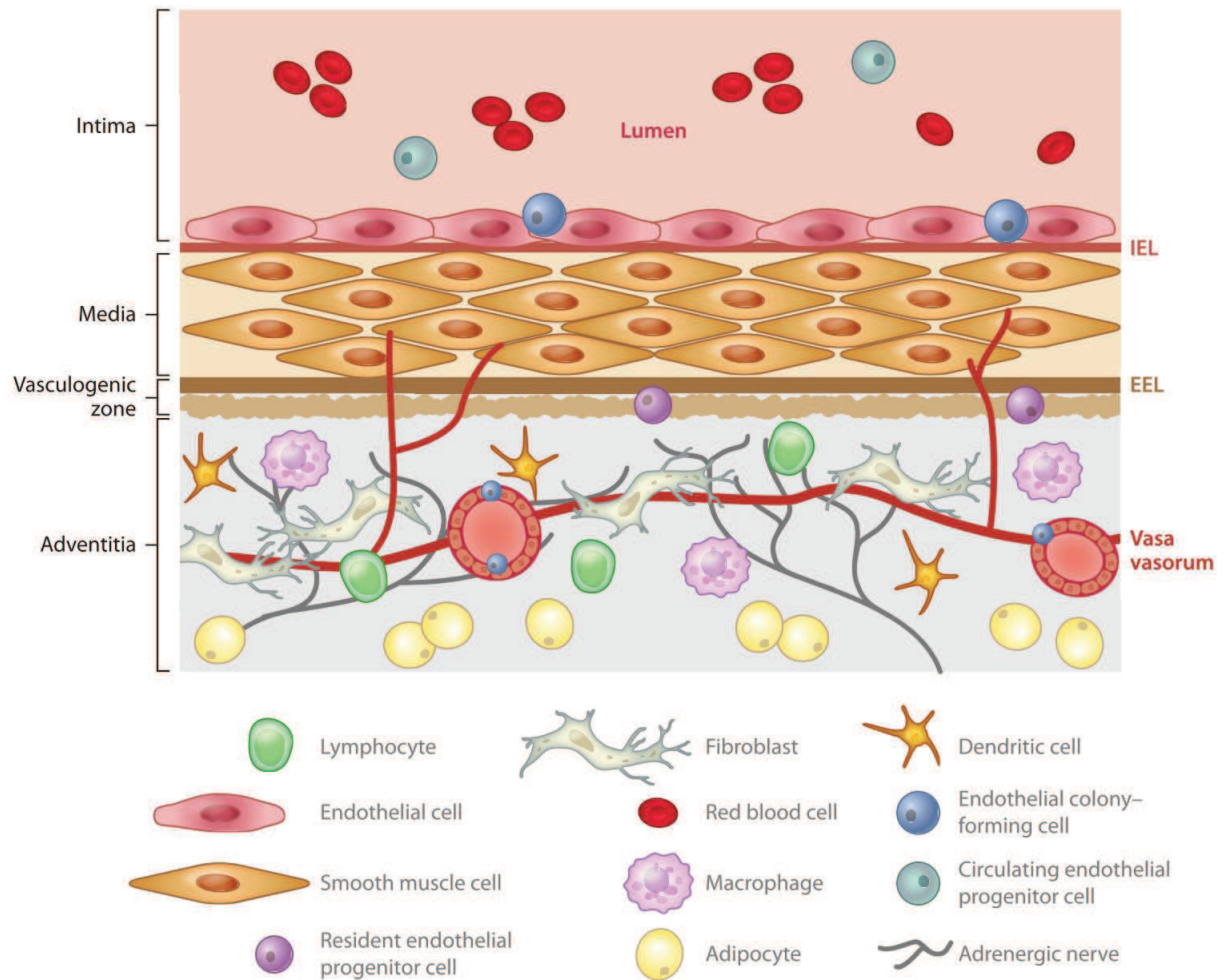


Figure 12. Organisation cellulaire des tuniques des vaisseaux sanguins. L'intima et la média sont composées de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisse respectivement. L'adventice est composée d'une large variété de cellules incluant les fibroblastes, les progéniteurs résidants, des cellules immunomodulatrices (cellules dendritiques, macrophage et lymphocytes T), de cellules composant le vasa vasorum et une innervation adrénergiques par des cellules nerveuses. Abréviations: EEL, external elastic lamina; IEL, internal elastic lamina.

D'après : Stenmark, 2013.

b) Biologie des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales forment un épithélium pavimenteux simple en monocouche appelé endothélium, propice aux échanges (gaz, liquide et métabolites) où les cellules sont organisées en fonction du flux sanguin et jointes par des interactions fortes. L'endothélium tapisse la lumière de tous les vaisseaux sanguins et repose sur une lame basale sécrétée par les cellules endothéliales. Celles-ci sont polarisées et expriment différents profils de molécules au niveau basal responsables de leur adhérence à la lame basale (intégrines, cadhérines, protéoglycanes).

Au niveau de la lame basale, les cellules endothéliales expriment une variété de protéines matricielles telles que le collagène IV, des glycoprotéines (laminine et le nidogène principalement) et des protéoglycanes comme les perlécane [Yurchenco, 2011]. La fibronectine est retrouvée de façon importante dans les vaisseaux en phase angiogénique, mais pas ou très peu dans les vaisseaux quiescents. Les principales protéines matricielles composant la paroi endothéliale sont les collagènes (I et III), l'élastine et la fibrine. On retrouve également les GAGs [Wagenseil and Mecham, 2009].

À l'opposé de la lame basale, l'endothélium présente dans sa polarité apicale, un glycocalyx dense participant au rôle de protection contre l'inflammation et la thrombose. A leur pôle apical elles expriment une autre grande variété de protéines (récepteurs de signaux cellulaires, intégrines, protéoglycanes, sélectines etc.).

L'organisation en échafaud de la MEC vasculaire permet l'adhérence, la survie, la prolifération, la morphogenèse et la migration des cellules des différentes tuniques vasculaires afin d'aboutir à la stabilisation du vaisseau sanguin [Marastoni, 2008].

Les cellules endothéliales sont jointives grâce aux desmosomes, liaisons formées par les desmines qu'elles expriment à leur surface. De même, elles expriment une grande quantité de Vascular Endothelial Cadherin (VE-cadhérine), protéine membranaire impliquée dans les interactions cellulaires structurant l'endothélium.

L'endothélium exprime de nombreux facteurs circulants comme le monoxyde d'azote (NO), basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2) ou le Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) modulant le tonus vasculaire lorsqu'il est nécessaire de réguler le débit sanguin [Martinez-Lemus, 2012].

c) Mécanismes de l'angiogenèse: acteurs cellulaires et moléculaires

Lors de l'établissement du réseau vasculaire pendant la vasculogenèse, intervient un autre phénomène vasculaire qui perdure jusqu'à l'âge adulte, l'angiogenèse. Le terme angiogenèse provient du grec « *angeion* » (vaisseau) et « *genesis* » (production) et a été utilisé pour la première fois par Hertig en 1935 pour décrire la formation d'un réseau vasculaire dans le placenta [Hertig 1935].

La définition de l'angiogenèse prend en compte la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de l'extension (par bourgeonnement ou invagination) d'un vaisseau sanguin préexistant. Ce processus agit dans un environnement bien défini qui oriente les cellules mobilisées. Chez l'adulte, bien que définitif, le réseau vasculaire demeure un système dynamique animé par des modifications liées à l'état d'irrigation des organes et entraînant parfois des phénomènes de néovascularisation. Par exemple, lors d'une sténose artérielle, ou phénomène d'obstruction du vaisseau, de nombreux facteurs cellulaires et moléculaires entrent en jeu pour modifier l'état quiescent des cellules et permettre de générer un nouveau vaisseau [Levy et Sylvestre, 2009].

L'angiogenèse chez l'adulte est contrôlée par le phénomène de « switch angiogénique » qui comprend une balance entre les effecteurs activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse maintenant un état quiescent des cellules endothéliales.

L'angiogenèse est stimulée par les principaux facteurs tels le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et le FGF, l'interleukine-8 (IL-8), les angiopoïétines, l'angiogénine, mais aussi le Tumoral Growth Factor beta (TGF- β) et le Platelet Derived Growth Factor (PDGF) [Ribatti et Djonov, 2012].

A l'inverse, des facteurs permettent d'inhiber l'angiogenèse comme l'angiostatine, l'endostatine et certaines chimiokines au domaine C-X-C comme l'interleukine 10 (IL-10) [Ribatti et Djonov, 2012]. Ces facteurs angiogéniques sont présents à des concentrations nano ou picomolaires (pM) dans l'environnement endothélial. Une variation de la concentration de l'un de ces facteurs peut induire l'entrée des cellules endothéliales dans une phase d'activation ou d'inhibition.

Les étapes de l'angiogenèse comprennent une phase d'activation de l'endothélium et une phase de résolution. La première phase est caractérisée par l'augmentation de la perméabilité vasculaire et le dépôt de fibrine extravasculaire accompagné par la dégradation de la membrane basale. Puis, interviennent la migration de cellules endothéliales et l'invasion de la matrice extracellulaire suivi de la prolifération des cellules endothéliales mobilisées. La phase de résolution comprend l'arrêt de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales, suivie de la reconstitution de la membrane basale et la maturation des jonctions endothéliales [Urbich, 2004; Levy et Sylvestre, 2009].

Le concept de néo-angiogenèse est formulé lorsqu'une blessure apparaît au niveau d'un vaisseau sanguin. Le phénomène de réparation tissulaire est possible et nécessite de recruter des progéniteurs endothéliaux (PEC) par l'intermédiaire de la sécrétion de chimiokines, dont RANTES/CCL5 [Ishida, 2012]. On parle également de néo-angiogenèse lorsqu'une pathologie induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans l'organisme [Urbich, 2004] (Figure 13).

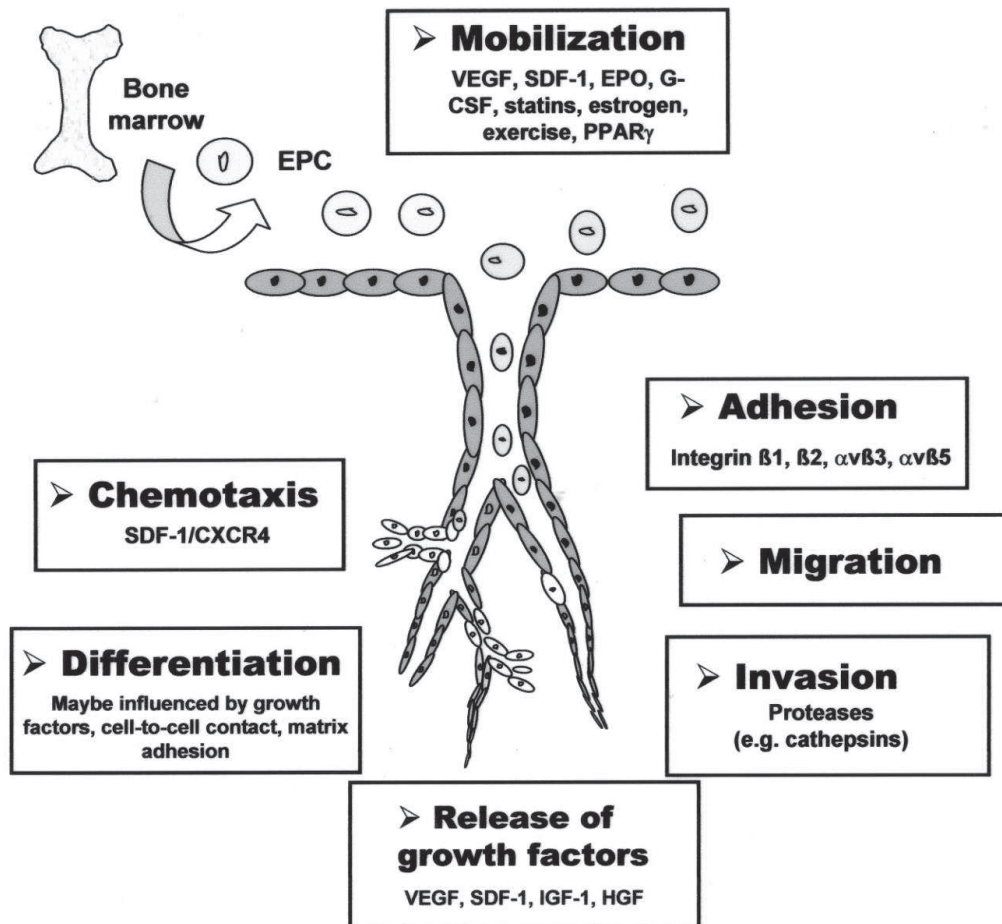


Figure 13. Néoangiogenèse par le recrutement et l'incorporation des cellules progénitrices dans un contexte ischémique. Le schéma décrit l'origine potentielle des cellules endothéliales progénitrices depuis les cellules souches hématopoïétique et non hématopoïétique, et les étapes de néoangiogenèse : émission d'un signal chémo-attractant, mobilisation, adhésion, migration, invasion, expression de facteurs de croissance et différenciation des cellules progénitrices.

D'après : Urbich, 2004.

Après leur adhésion à l'endothélium activé, les cellules progénitrices vasculaires pourraient déclencher la néoangiogenèse vasculaire par deux mécanismes principaux qui comprennent la capacité à se différencier en cellules endothéliales et leur potentiel paracrine de libération de facteurs pro-angiogéniques et pro-artériogéniques [Levy et Sylvestre, 2009] (Figure 14).

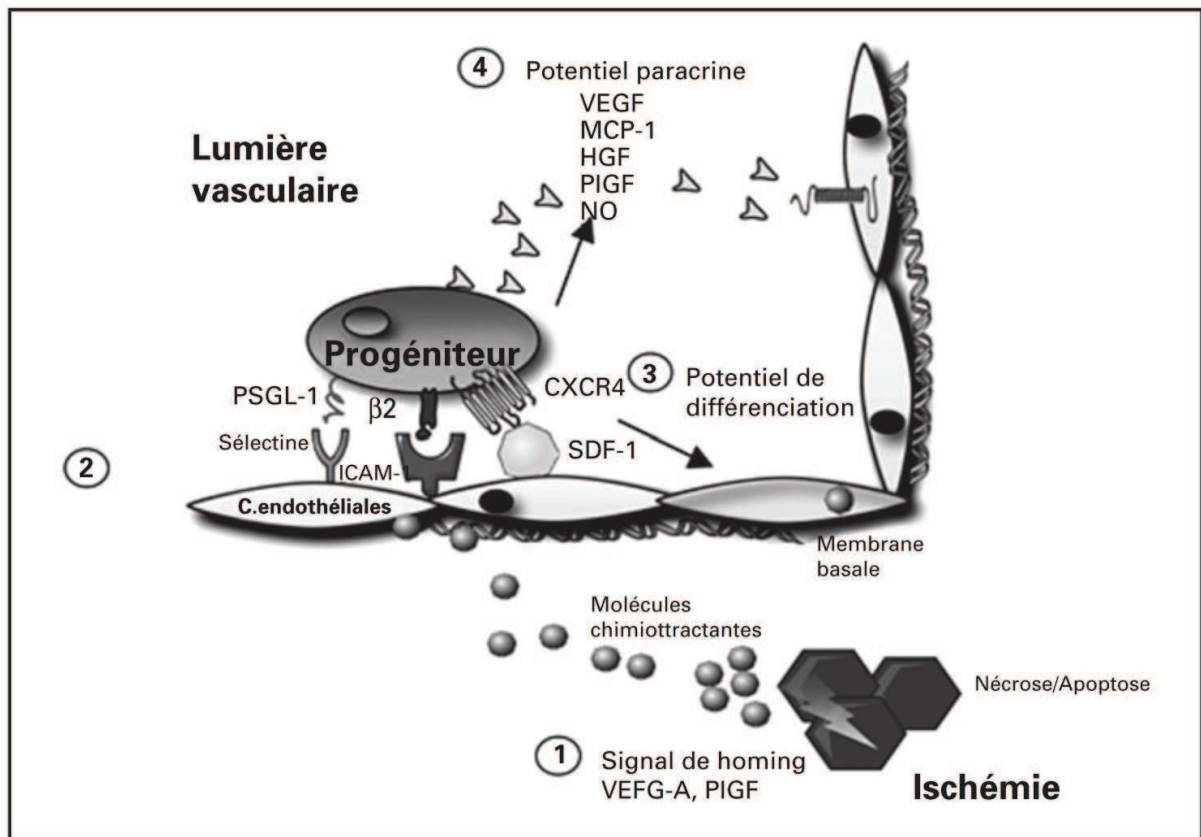


Figure 14. Facteurs déclenchant l'angiogenèse chez l'adulte par les cellules progénitrices endothéliales. Après leur adhésion à l'endothélium activé, les cellules progénitrices vasculaires pourraient déclencher la néogenèse vasculaire par deux mécanismes principaux : leur capacité à se différencier en cellules endothéliales et leur potentiel paracrine de libération de facteurs pro-angiogéniques et pro- artériogéniques.

D'après : Lévy et Silvestre, 2009.

d) Rôle de la MEC dans l'angiogenèse

La fonction principale de la MEC vasculaire est de permettre l'adhérence des cellules vasculaires afin de favoriser leur survie et leur prolifération. L'ancrage des cellules endothéliales à la matrice par les intégrines est essentiel pour induire une signalisation efficace via les cytokines, notamment celles produisant un signal de prolifération cellulaire. Il a été démontré que la MEC joue un rôle important dans le guidage des cellules endothéliales

L'interaction des protéines matricielles avec les couples d'intégrines membranaires $\alpha1\beta1$ and $\alpha2\beta1$ exprimées par les cellules endothéliales [Meredith, 1997; Giancotti, 1999; Wary, 1996, Short, 1998; Aplin, 1999] conduit à l'activation de la signalisation médiée par les Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) p44p42 (Erk1/2) [Vinals, 1999; Seger, 1995; Assoian, 2001] et induit l'expression et l'activation de la cyclin-dépendent kinase indispensable pour la progression du cycle mitotique des cellules endothéliales [Fang, 1996; Assoian, 1997; Zhu, 1996].

En plus d'un signal régulé par un gradient de chimiokines et par les facteurs de croissance (VEGF et FGF-2), la MEC vasculaire contrôle l'adhérence et la motilité dirigée des cellules endothéliales afin de faciliter leur migration lors du phénomène de bourgeonnement d'un vaisseau sanguin observé au cours de l'angiogenèse [Ausprunk, 1977]. Plusieurs composants de la MEC interstitielle entrent en jeu lors de ce processus angiogénique, dont la fibrine et le collagène I, et permettent la migration cellulaire par l'intermédiaire des chimiokines [Dejana, 1985; Senger, 2002]. Par ailleurs, ces protéines matricielles favorisent également la migration haptotactique indépendamment des facteurs solubles [Senger, 1996].

Lors de l'angiogenèse, les cellules endothéliales prolifératives et en migration s'organisent pour former un nouveau réseau de capillaires dans un espace en 3-dimensions. Ce processus a été étudié intensivement dans l'embryon aviaire, démontrant qu'au stade précoce, la morphogenèse capillaire implique une transition de précurseurs endothéliaux abordant une morphologie en broche ou "spindle-shape" [Drake, 1999]. Dans le même temps, les précurseurs endothéliaux s'alignent et se connectent en une structure solide et multicellulaire appelée cordon pré-capillaire dessinant un réseau en forme de polygone [Drake, 1997; Vernon, 1995; Aloisi, 1971]. Lors de la maturation, ces cordons vasculaires deviennent fonctionnels en creusant un lumen pour le transport du liquide sanguin. Les cellules endothéliales sont séquestrées dans la matrice interstitielle sur une lame basale continue constituée de laminine. La MEC offre un système de repère en forme de structure malléable qui permet de supporter la morphogenèse de capillaires.

Les cellules endothéliales peuvent migrer et former des clusters qui peuvent se connecter et transduire des forces mécaniques et contractiles par l'intermédiaire de la MEC à distance.

Ces propriétés confèrent la capacité de générer un réseau de voies de guidance interconnectées permettant d'organiser à distance de larges structures multicellulaires sans la nécessité d'établir un contact cellule-cellule [Davis, 1996, Davis, 2005] (Figure 15).

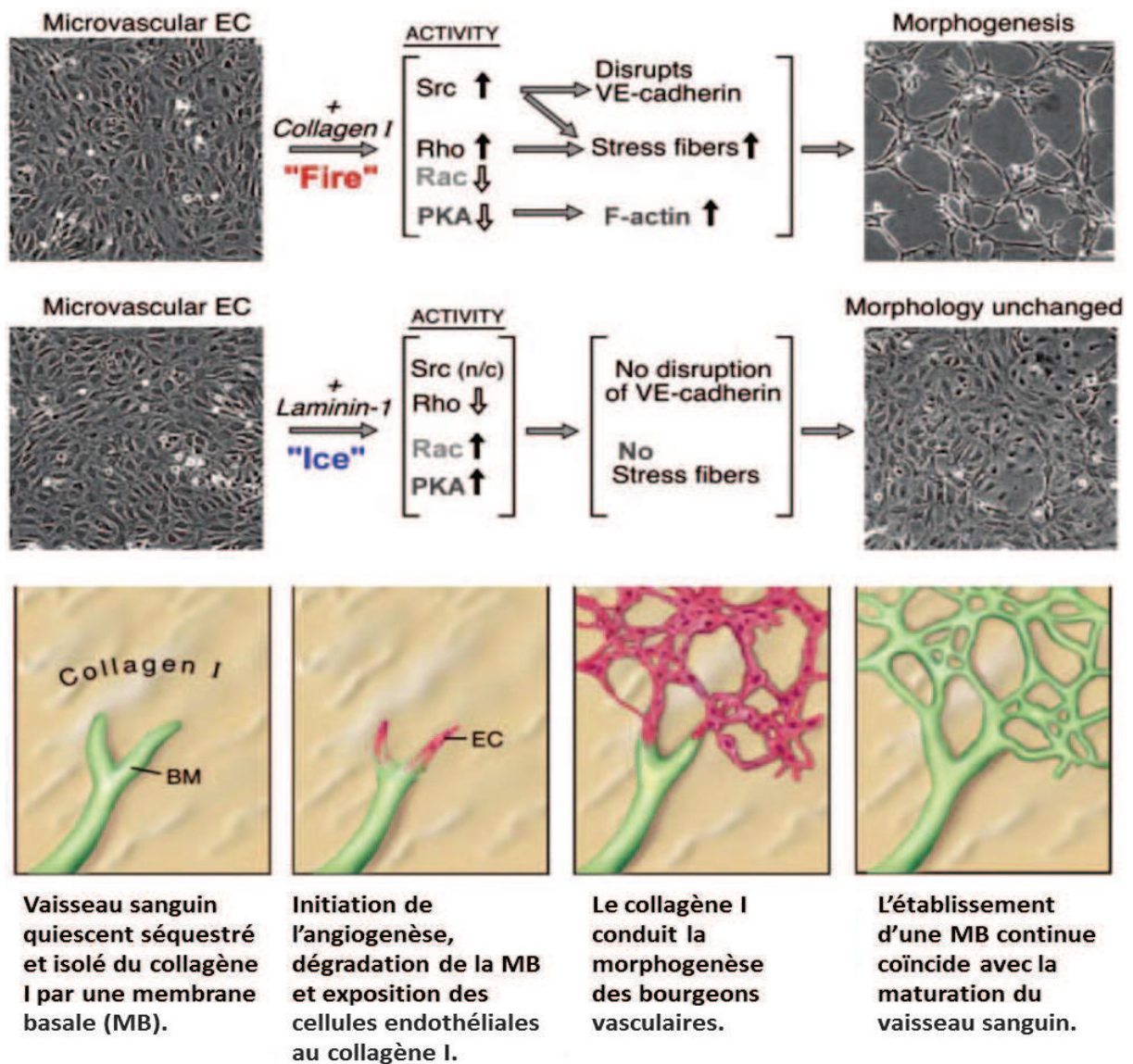


Figure 15. Influence de la MEC vasculaire (collagène I et laminine-1) sur l'activité morphogénique des cellules endothéliales dans l'angiogenèse. Le collagène I et pas la laminine active les voies Src et Rho et inhibe les voies Rac et PKA par l'intégrine $\beta 1$ conduisant à l'induction de fibres de stress (actine), la rupture des interactions VE-cadhérine et la formation d'un cordon primaire.

D'après : Davis et Senger, 2005.

e) Remodelage matriciel de la MEC vasculaire

Le renouvellement de la MEC est un processus lent, mais, lors d'une agression conduisant à une lésion tissulaire, des enzymes protéolytiques de la famille des metalloprotéases (Matrix Metalloproteinase, MMP) peuvent réactiver le métabolisme de ces macromolécules matricielles. Les MMPs ont une activité catalytique endopeptidase des protéines matricielles dépendante de la présence d'ion zinc au sein de leur site actif. Collectivement, ces enzymes sont capables de dégrader toutes les molécules matricielles, mais les MMPs peuvent aussi cliver les protéines membranaires (récepteurs, protéoglycanes) [Sternlicht, 2001].

Au cours de l'angiogenèse, le remodelage de la MEC fait intervenir la protéolyse des composés matriciels et apparaît être une étape critique lors de la morphogenèse vasculaire (**Figure 16**). Ces étapes incluent l'initiation de l'angiogenèse qui provoque la rupture et la dégradation de la membrane basale endothéliale (assurée par les Membrane-Type MMP ou MT-MMP), l'invasion de ces cellules à travers les fibres matricielles et la formation du lumen où les MMPs interviennent également [Davis, 2002; Davis, 2003]. Des données considérables suggèrent que les MT-MMPs sont des régulateurs critiques de l'invasion des cellules endothéliales à travers les matrices tridimensionnelles de collagène ou fibrine [Davis, 2005]. Plusieurs études indiquent que les cellules endothéliales sont fortement protéolytiques lors de la formation ou la régression du réseau vasculaire [Davis, 2002; Heissig, 2003; Pepper, 2001].

Chez l'adulte, les MMPs et leurs régulateurs les TIMPs sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, notamment la migration, l'angiogenèse et la cicatrisation. Les activités de TIMP-1, MMP-9 et MMP-3 augmentent dans les pathologies de sténose de valve, tandis que l'activité de MMP-2 est inchangée [Fondard, 2005].

Dans l'angiogenèse, l'expression de MMP-9 et de MMP-2 peut être activées, notamment dans les fibroblastes par le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) et le TGF- β pour MMP-9 et par le VEGF pour MMP-2 afin de dégrader la membrane basale des cellules endothéliales et leurs attaches à la MEC [Han, 2001; Kim, 2000; Davis, 1996; Rundhaug, 2005; Lee, 2013].

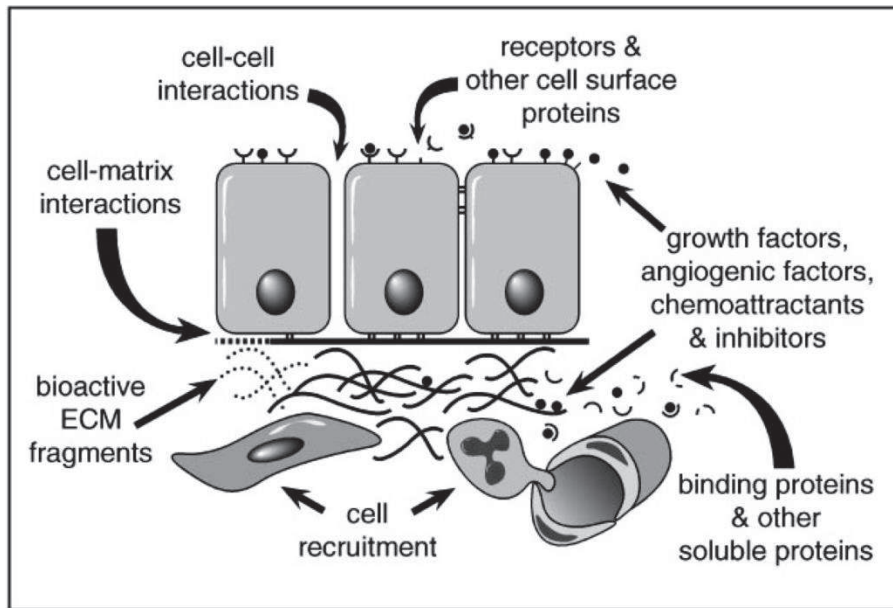


Figure 16. Régulation du comportement et des mécanismes cellulaires par la MEC vasculaire.
 Les mécanismes potentiels induits par les MMPs incluent le relargage de fragments de la MEC, une modulation des interactions cellule-matrice et cellule-cellule, mais aussi du shedding des récepteurs de surface, de la biodisponibilité des facteurs angiogéniques (facteurs de croissance et chimiokines) et de la fixation d'autres protéines solubles.

D'après: Sternlicht, 2001.

2. Les effets physiopathologiques de l'ischémie

a) L'ischémie

L'ischémie se caractérise par la sténose ou rétrécissement du conduit vasculaire induisant une diminution la perfusion sanguine dans les organes localement touchés entraînant une hypoxie. Cette occlusion peut être causée par la formation d'une plaque d'athérome générée par le dépôt et l'accumulation de différents facteurs au niveau de la paroi interne vasculaire. La plaque d'athérome est caractérisée par l'accumulation de lipides et de débris cellulaires le long de l'endothélium artériel du côté luminal constituant à terme l'athérosclérose qui va progressivement réduire le diamètre vasculaire. L'athérosclérose est la principale cause de thrombose artérielle, et d'anévrisme découlant sur des accidents ischémiques.

L'ischémie peut toucher les membres inférieurs, on parle alors de maladie artérielle périphérique. Cette pathologie vasculaire est en expansion dans les pays développés dont les causes principales sont environnementales (tabagisme, hypertension artérielle, diabète et hyperlipidémie) et atteint près de 14% de la population mondiale [**Shammas, 2007; Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia, 1991**].

L'évolution de la maladie est progressive et la plupart du temps asymptomatique. La phase critique de cette pathologie se caractérise par une ischémie chronique des membres inférieurs qui accentue dramatiquement les risques d'accident cardiovasculaire (infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral) [**Norgren, 2007; Novo, 2004**]. L'ischémie évolue en plusieurs phases en commençant par la formation progressive d'un œdème suite à l'augmentation de la perméabilité vasculaire en réponse à l'hypoxie [**Hammersen, 1989 ; Lu, 1997**], puis d'une phase inflammatoire avec l'infiltration leucocytaire dans l'intima et la media [**Bodine-Fowler, 1994; Ruscher, 1998**].

b) Les rôles des GAGs dans l'ischémie

Des anomalies au niveau de l'expression des GAGs interviennent également en réponse à des pathologies vasculaire où les GAGs jouent un rôle central.

Les lésions endothéliales après ischémie/reperfusion [Rehm, 2007] et les inflammations induites par le TNF- α [Chappell, 2009] ou par des endotoxines bactériennes comme le lipopolysaccharide (LPS) [Marechal, 2008] ont montré une perturbation du glycocalyx (**Figure 17**).

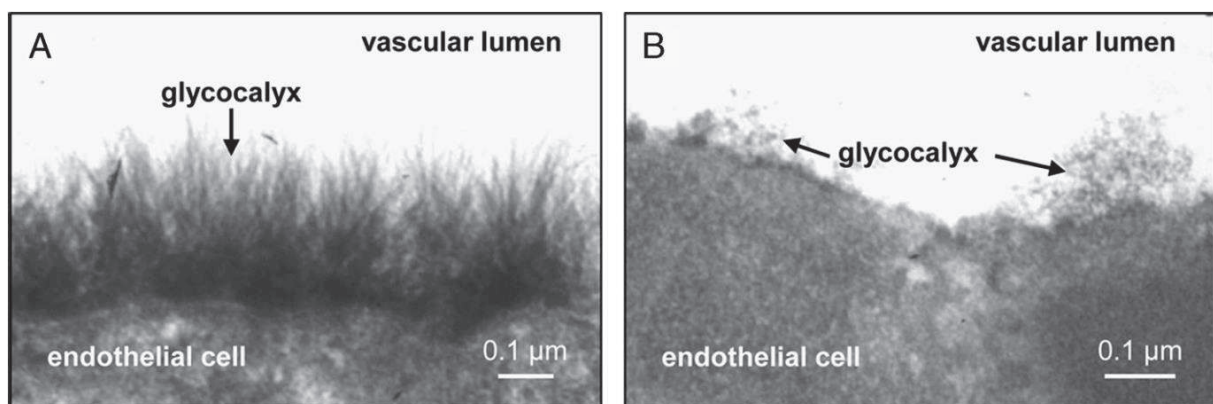


Figure 17. Modulation et shedding du glycocalyx endothélial en réponse à l'ischémie. A) Glycocalyx intact après 25 minutes de perfusion non ischémique. B) Dégradation du glycocalyx après 20 minutes d'ischémie et 10 minutes de reperfusion.

D'après : Chappell, 2010.

La diminution de l'expression du glycocalyx augmente la perméabilité capillaire, conduisant à un œdème tissulaire, suggérant que le glycocalyx pourrait agir comme une barrière perméable [Chappell, 2007]. Les molécules d'adhésion normalement hébergées et protégées par le glycocalyx, sont exposées au clivage (shedding) de leur partie extracellulaire [Nieuwdrop, 2005]. L'observation par microscopie intravitale suggère que la réduction du diamètre fonctionnel de cette structure peut favoriser une adhésion leucocytaire [Henry, 2000]. De précédentes études ont révélé que l'hydrocortisone et l'anti-thrombine pouvait préserver le

glycocalyx dans le cas d'une ischémie/reperfusion [Chappell, 2007; Chappell, 2010] et d'une inflammation médiée par TNF- α [Chappell, 2009]

Chappell *et al.* ont démontré que l'ischémie induit une modification de l'expression d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des GAGs entraînant les changements significatifs dans les motifs structurels des HS et CS tels que la taille et le taux de sulfatation [Chappell, 2010].

Ces changements majeurs ont été associés avec les modifications des capacités des GAGs à interagir avec les facteurs de croissance et moduler leur activité. D'autre part, les chaînes de CS conservent des motifs exprimés à la suite de l'accident ischémique, malgré les processus de régénération des chaînes GAGs [Chappell, 2010].

Récemment des études menées dans notre laboratoire ont démontré les effets que pouvaient avoir l'utilisation de mimétiques de GAGs sur l'expression de ces GAGs endogènes. Nous avons mis en évidence que le traitement par un mimétique de GAG accélère la réparation du tissu musculaire après une ischémie, et montré le rôle du remodelage de la matrice glycanique dans le processus de réparation [Chevalier, 2015]. Dans une autre étude, nous avons démontré le rôle des modifications enzymatiques reçues par les GAGs endothéliaux dans un processus d'angiogenèse induite par un LMWF [Haddad, 2015]. Dans ces travaux, les auteurs concluent que le fucoïdane mobiliserait les enzymes de biosynthèse des GAGs (EXT-2), l'héparanase et modulerait l'expression différentielles des SDC-1 et SDC-4 afin de générer une activité pro-angiogénique. Cette étude à laquelle j'ai participé est présentée sous forme de publication dans la partie 1 des résultats.

3. Les thérapies vasculaires en réponse à l'ischémie : Application et développement d'angiogenèse thérapeutique

Lors d'un accident ischémique, les pratiques thérapeutiques courantes visent à rétablir un flux sanguin par la thrombolyse du thrombus obstruant le conduit. Cependant, d'autres stratégies thérapeutiques actuelles visent à favoriser l'angiogenèse. On parle dans ce cas d'angiogenèse thérapeutique. L'objectif est de rétablir un apport en oxygène des tissus en hypoxie causée par l'ischémie par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

Il existe plusieurs méthodes afin de stimuler ou reconstruire une vascularisation fonctionnelle.

Le VEGF est un acteur central des thérapies pro-angiogéniques. Cependant, son injection intraveineuse (protéine recombinante humaine) chez des patients présentant une coronopathie aigüe n'a pas montré de résultats probants [**Henry, 2003**]. Les conclusions de cette étude clinique s'orientent vers l'hypothèse d'une dégradation du VEGF dans la circulation sanguine et proposent de développer des méthodes de délivrances plus efficaces.

Des techniques de thérapies géniques ont été étudiées avec l'administration de gènes codants pour des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGF ou HGF) à des patients souffrant d'ischémie, par une injection intramusculaire sous forme de plasmides [**Sanada, 2014**]. Malgré la tolérance immunitaire, cet essai n'a pas engendré de résultats satisfaisants, probablement causé par une faible efficacité de transfection. Pour remédier à cela, d'autres études ont utilisé des vecteurs viraux pour augmenter le rendement de transfection des plasmides aux cellules humaines, malgré les potentiels risques d'induire une réponse immunitaire [**Shimamura, 2014 ; Muona, 2012**]. Malgré une bonne tolérance des facteurs viraux par l'organisme, cette approche n'a pas démontré d'amélioration de la vascularisation chez les patients traités.

D'autre part, des stratégies de thérapie cellulaire basées sur l'utilisation de cellules progénitrices endothéliales autologues semblent plus prometteuses.

La technique consiste à prélever des cellules de la moelle osseuse ou du sang du patient contenant ces progéniteurs, les cultiver et les faire proliférer *in vitro* avec des facteurs stimulants et les réimplanter dans les zones ischémisées. [Balaji, 2013]. Les essais sur des modèles animaux, notamment chez des lapins ayant subi un infarctus du myocarde, ont montré une amélioration de la perfusion et la fonction cardiaque [Rahbarghazi, 2014]. Des cellules souches mésenchymateuses ont été implantées et l'analyse tissulaire a montré une différenciation de ces cellules en cellules vasculaires et leur incorporation dans les processus d'angiogenèse, ainsi qu'une réparation du muscle cardiaque avec une diminution de la fibrose.

Les facteurs de croissance et chimiokines sont rapidement dégradés dans la circulation sanguine (la demi-vie du VEGF est de 30 minutes et 2h pour les chimiokines) [Keeley, 2011 ; Lee, 2011]. Des essais avec les mimétiques de GAGs utilisés dans des matrices pour augmenter leur durée et délivrer des facteurs angiogéniques ont été réalisés. Les capacités d'interaction des GAGs sulfatés ont permis de protéger les facteurs de croissance de la protéolyse et moduler leur activité pour une présentation prolongée vers leurs récepteurs [Simon et Parish, 2013].

Les mimétiques de GAGs, RGTAs, fucoïdane et autres polysaccharides sulfatés, sont particulièrement étudiés pour améliorer la rétention, la protection et la présentation des facteurs de croissances et chimiokines à leurs récepteurs. Leur utilisation peut intervenir de façon soluble comme le RGTA OTR4120 (carboxyméthyl-dextrane de sulfate de 77000 g/mol) qui a favorisé l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* en retenant le VEGF et permettant sa présentation aux récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 [Rouet, 2005], et nos études sur le fucoïdane de bas poids moléculaires dans la ré-endothélialisation après hyperplasie intimale et ischémie [Hlawaty, 2011; Luyt, 2003]. Les mimétiques de GAGs peuvent également être utilisés pour la fonctionnalisation de matrices, sous forme d'hydrogel (billes, pastilles, tubes) de composition variées (collagène, fibrine, gélatine, acide hyaluronique, polyethylene glycol, dextrane seul ou associé à d'autres sucres) permettant l'ensemencement de cellulaire et la rétention de facteurs pro-angiogéniques [Martino, 2011; Prokoph, 2012; Song, 2014].

Ces biomatériaux sont pensés pour être biocompatible et dégradés par les voies naturelles du remodelage matriciel, notamment avec l'ajout de zones sensibles au MMPs, afin de pouvoir délivrer cellules et facteurs tout en se dissolvant dans l'organisme [**Park et Gerecht, 2014**].

Chapitre III : Problématique de la régénération de bioprothèses de valve cardiaque par l'ingénierie tissulaire

1. La bioingénierie tissulaire pour une application cardiovasculaire

a) Les enjeux et promesses de la médecine régénérative

La médecine régénérative d'aujourd'hui est un concept né en 1992 sous les mots du praticien Leland Kaiser, qui sous-entend la réparation ou la modification d'un tissu lésé dans une optique thérapeutique. La médecine régénératrice vise à reproduire artificiellement les processus biologiques permettant au corps de se reconstituer aux niveaux tissulaire, cellulaire et moléculaire. Il ne s'agit plus, comme dans le cas de la médecine clinique, de conserver l'intégrité du corps mais plutôt de combattre la dégénérescence en elle-même. Ainsi, l'objectif n'est plus la guérison, mais bien la régénération, ce qui en soit ne suppose aucune limite.

De nos jours, la médecine évolue avec les nouvelles approches thérapeutiques que permet l'essor des nouvelles technologies cellulaires et moléculaires. Les champs d'application que permettent les technologies moléculaires et cellulaires sont encore en développement et leur ampleur est toujours loin d'être soupçonnée.

Les grandes stratégies peuvent être classifiées en trois domaines : la thérapie génique, la thérapie cellulaire, l'ingénierie tissulaire par l'utilisation de biomatériaux.

La thérapie génique utilise les technologies d'organisme génétiquement modifié (OGM), qui vont modifier la fonction ou l'expression d'une ou plusieurs protéines pour cibler un organe précis et modifier son fonctionnement.

Les méthodes employées actuellement permettent l'ajout, le retrait ou l'édition d'un ou plusieurs gènes dans le matériel génétique ou les messagers (gene addition, gene correction, transplicing, exon skipping, siRNA). Ces méthodes sont particulièrement étudiées dans le cas de maladies génétiques difficilement curables ou dans le traitement de cancers. Différentes formulations et stratégies d'application sont envisagées comme l'application directe chez l'individu par injection intraveineuse ou intramusculaire, électro-transfert (Gene-gun) ou application topique par diffusion (gel).

Une autre stratégie *ex vivo* consiste à prélever des cellules autologues chez le patient, les cultiver *in vitro* où la reprogrammation génétique est plus aisée, puis de les réimplanter chez le patient en espérant qu'elles s'intègrent aux tissus et remplacent ou substituent les cellules malades.

La thérapie cellulaire consiste à réimplanter des cellules souches ou déjà différenciées afin de régénérer ou redonner sa fonction à un organe dysfonctionnel. Les cellules souches sont des cellules indifférenciées ayant la capacité d'auto-renouvellement. Chaque organe contient une niche de cellules déterminées multipotentes qui peuvent sous l'influence de certains facteurs spécifiques, proliférer ou se différencier en un type cellulaire spécialisé. Ces cellules constituent un outil qui ouvre des perspectives de régénération tissulaire que l'on pensait jusqu'alors uniquement atteignable par le prélèvement de cellules indifférenciées chez un individu, contraignant leur accès et leur disponibilité. Aujourd'hui la thérapie cellulaire se limite à des allogreffes ou autogreffes de moelle osseuse, îlots de Langerhans (pancréas) et des études sont en cours pour régénérer la rétine [Takahashi, 2016] ou le myocarde après un infarctus [Makkar, 2012].

Or, en 2006, l'équipe de Shinya Yamanaka a prouvé qu'il était possible de redonner un état indifférencié à des cellules spécialisées en modifiant l'expression de seulement quatre facteurs impliqués dans le développement [Takahashi, 2006]. La découverte de ces Cellules Souches Pluripotentes induites (CSPi) amorce un avantage éthique considérable dans la recherche en médecine régénérative.

L'ingénierie tissulaire ou bio-ingénierie formule l'idée interdisciplinaire du développement de substituts viables permettant de restaurer et maintenir la fonction de tissus en mêlant les stratégies de thérapies cellulaires et de l'ingénierie [**Langer, 1993**]. Le défi est de réaliser des cultures dynamiques de cellules autologues en laboratoire en reproduisant leur environnement en trois dimensions par l'utilisation de biomatériaux afin de générer des tissus fonctionnels réimplantables (**Figure 19**).

C'est le domaine dans lequel la technologie actuelle est en pleine effervescence (bioréacteur, imprimante 3D) car elle permettrait à terme de pouvoir construire des tissus à façon et sophistiqués et personnalisés. Cette discipline émergente du domaine biomédical se concentre sur l'élaboration de matériaux biocompatibles pour la conception d'une matrice tissulaire implantable, mais aussi sur les interactions physiologiques et cellulaires avec la matrice, et enfin la manipulation et le contrôle de la matrice tissulaire avec l'environnement de cicatrisation.

Les travaux d'ingénierie tissulaire actuels ont permis de générer des fibres musculaires *in vitro* susceptibles d'être utilisées pour les traitements de muscles endommagés, des maladies cardiaques, des dystrophies musculaires [**Bach, 2004; Levenberg, 2005**] mais aussi pour la conception de vaisseaux sanguins artificiels [**Zakheim, 2012; He, 2005**].

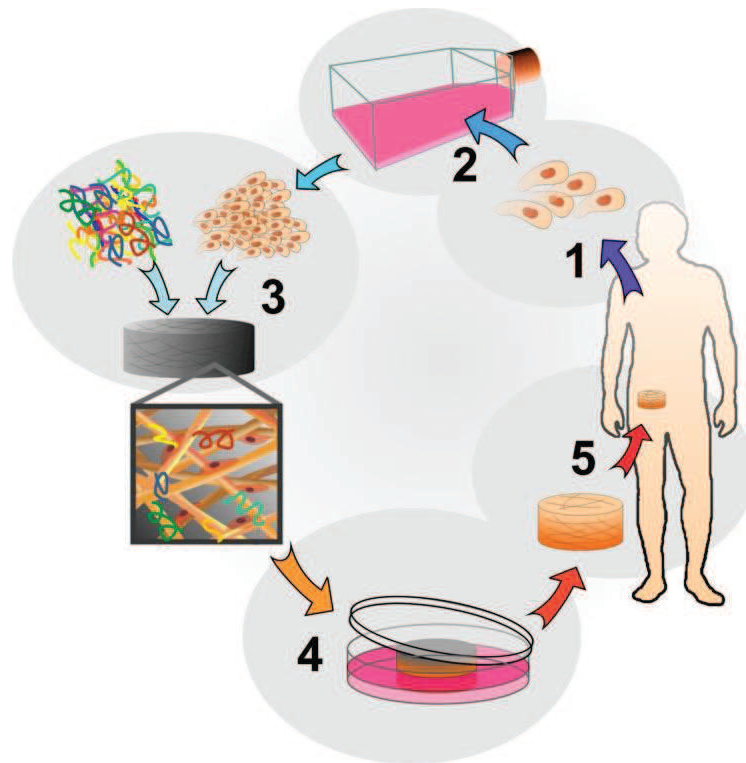


Figure 18. Illustration de l'ingénierie tissulaire. 1. Prélèvement de cellules à potentiel régénératif. 2. Culture et expansion/différenciation cellulaire *in vitro*. 3. Cellularisation et fonctionnalisation de matrice tissulaire biocompatible. 4. Culture et développement *in vitro* dans un bioréacteur. 5. Réimplantation de la matrice tissulaire cellularisée.

D'après la thèse de Julien Ramier, Université Paris Est 2012.

b) Développement de biomatériaux à partir de polysaccharides sulfatés pour l'ingénierie tissulaire

Les recherches actuelles en bioingénierie ont porté une grande attention aux stratégies permettant de développer des solutions thérapeutiques alternatives pour contrer les effets négatifs secondaires des pratiques cliniques courantes (prothèses et greffes aux propriétés fonctionnelles insuffisantes avec une morbidité élevée, rareté de donneurs, et rejet immunitaire). À cet égard, la notion de médecine régénérative dans l'ingénierie tissulaire intervient comme un concept prometteur ayant des applications multidisciplinaires par le mélange des principes d'ingénierie et de science de la vie pour créer de nouveaux tissus fonctionnels [Langer et Vacanti, 1993].

L'une des stratégies de bioingénierie tissulaire suit le développement de structures poreuses ou « scaffold » capables de permettre un ensemencement et la culture de cellules sous certaines conditions. Ces conditions comprennent des contraintes chimiques et mécaniques définies, dans le but d'obtenir un substitut tissulaire fonctionnel à potentiel régénératif et implantable chez des patients présentant une lésion tissulaire irréversible.

Ces structures poreuses doivent respecter une biocompatibilité dans leur forme implantable et dans leur forme dégradée. L'interaction du support poreux avec le tissu environnant doit être optimale en adoptant une configuration permettant des propriétés de surfaces nécessaires (porosité, taille et inter connectivité) conduisant à une régénération tissulaire souhaitée.

Plusieurs techniques sont capables de générer de telles structures contrôlées qui peuvent prendre différents aspects : moussage [**Gomes, 2001 ; Mooney, 1996**], lyophilisation [**Oliveira, 2006; Yan, 2012; Reys, 2011**], extrusion-filage de fibres [**Gomes, 2006; Mikos, 1993**], impression en 3 dimensions [**Hutmacher, 2000; Salgado, 2007**], lixiviation de porogène [**Correlo, 2009; Mikos, 1993; Mikos, 1994**], formation de pores in situ [**Martins, 2008**], agrégation de particules [**Borden, 2002; Malafaya, 2005; Miranda, 2011**], électrospinning [**Martins, 2009; Puppi, 2011**], technologie de fluides supercritiques [**Duarte, 2009; Duarte, 2009**] et utilisation de liquides ioniques [**Silva, 2012**] comme les hydrogels de polyélectrolytes.

Un large nombre de matériaux sont proposés pour leur utilisation en bioingénierie, incluant les polymères naturels et synthétiques ou une conjugaison des deux. Plus récemment, une attention particulière a été donnée au GAGs (principalement CS et AH) et à leurs mimétiques (fucoïdanes), en considérant leur prédominance dans la matrice extracellulaire, mais aussi parce qu'ils possèdent une gamme variée de propriétés biologiques et une faible immunogénicité.

Bien que la compréhension de leurs interactions avec les cellules et la matrice extracellulaire soit incomplète, principalement au niveau moléculaire, il est connu que les GAGs modulent l'adhésion des progéniteurs cellulaires et leurs différenciations subséquentes ainsi que leur expression génique.

En particulier, leur degré de sulfatation, leur masse et leur composition structurale influencent le comportement cellulaire avec des changements observés dans les processus physio-pathologiques [Salbach, 2012]. En dehors de l'influence des GAGs sur l'adhérence des cellules, les groupements sulfates des chaînes GAGs peuvent influencer la différenciation cellulaire. Une étude a dans ce sens évalué l'interaction d'une matrice de collagène II et d'AH sur la différenciation ostéogéniques de cellules souches mésenchymateuses (CSM) en ostéocyte et montré la validité de leur modèle pour induire la différenciation cellulaire [Hintze, 2012]. Une autre étude s'est concentrée sur l'effet de ces groupements déconnecté d'un environnement glycanique. Des surfaces enrichies en sulfates ont été préparées avec un auto-assemblage de ω -sulfatealkanethiols en monocouche et ont montré avoir une influence sur la mobilité des CSMs en favorisant la formation de filipodes [da Costa, 2012].

Connaissant le potentiel des groupements sulfates portés par les GAGs exprimés chez l'Homme, les recherches se sont également focalisées sur la découverte d'autres moyens pour obtenir des GAGs et polysaccharides sulfatés naturels exogènes, en dehors de toutes modifications chimiques. En l'état, les fucoïdanes, et les autres polysaccharides sulfatés retrouvés dans les organismes marins, en particulier les macro-algues, sont des candidats potentiels [Senni, 2011].

Le cas particulier des polysaccharides sulfatés marins portant des propriétés biologiques similaires aux GAGs endogènes constituent une ressource naturelle de biomatériaux sous-exploitée [Silva, 2012]. La récolte de composés glycaniques d'origine marine est potentiellement une alternative plus accessible que l'extraction de GAGs d'origine animale [Senni, 2011].

c) Les films de polyélectrolytes en multicouches à base de fucoïdane

Les films de polyélectrolytes en multicouches (PEM) représentent une stratégie majeure pour l'élaboration d'un revêtement de matrice « molles » pouvant être utilisé dans l'ingénierie tissulaire. La génération d'un PEM consiste en l'application sur une matrice de couches successives et superposées d'une paire de composés avec des charges opposées. Les films de PEMs construits sur une base de polysaccharides sont un sous-groupe de l'ensemble des PEMs et offrent des avantages spécifiques pour l'application dans des biomatériaux [Crouzier, 2010], comprenant la libération contrôlée de molécules bioactives [Costa et Mano, 2014], la lubrification de la surface recouverte [Bongaerts, 2009; Beattie, 2012; Thierry, 2003], et l'amélioration de l'attachement de protéines [Wu, 2014] et de cellules [Almodovar, 2013; Saha, 2013]. La constitution des PEMs se base sur un couple de molécules polyanioniques qui peuvent être de nature multiple. Les polysaccharides les plus employés pour former ce couple sont l'acide hyaluronique constituant la composante anionique, et le chitosane sa paire cationique [Pavinatto, 2010].

Cependant, le fucoïdane possède des caractéristiques spécifiques (anticoagulant, pro-angiogénique, anti-viral et faiblement immunogène) qui sont recherchées dans l'élaboration de matrice tissulaire cardiovasculaire [Fitton, 2011; Cooper, 2002; Indest, 2010; Ho, 2015]. C'est également une molécule fortement polyanionique considérant son degré de substitution de sulfate avec un pKa compris entre 1,0 et 2,5 [Sheng, 2004].

2. La bioingénierie de prothèses de valves cardiaques

a) Les valvulopathies : sténose et dégénérescence

Les valves cardiaques sont sujettes à des pathologies résultant principalement en une sténose ou une dégénérescence à l'origine de valvulopathies symptomatiques. La plupart des valvulopathies se développent au cours de la vie et une proportion moins importante est d'origine congénitale. Avec l'âge, la prévalence de développer une valvulopathie est de 15% de la population [Nkomo, 2006]. Une infection comme l'endocardite peut également être responsable d'un trouble valvulaire. Les valves cardiaques sont très sensibles aux phénomènes d'athérosclérose et de calcification.

Le rétrécissement aortique est la première cause de pathologie valvulaire dans les pays développés [lung, 2003], elle atteint environ 3% de la population mondiale et constitue la principale cause de remplacement de la valve aortique [Lindroos, 1993 ; Chan, 2003]. La sténose peut apparaître au niveau de la valve cardiaque, on parle de sténose valvulaire ou de rétrécissement de l'ouverture des valves.

Lorsque les feuillets valvulaires dégèrent et ne se ferment pas correctement, on parle d'insuffisance aortique souvent détectée par le souffle. Cette pathologie entraîne le phénomène de régurgitation en refluant le sang vers le cœur et réduisant l'efficacité cardiaque pouvant à terme déclencher des troubles pulmonaires.

Ces dérèglements valvulaires sont à l'origine de dysfonctionnements du cœur (angor, trouble du rythme, et insuffisance cardiaque).

b) Les prothèses de valve cardiaque

Les maladies cardiovasculaires, dont les valvulopathies cardiaques, sont aujourd'hui la première cause de mortalité dans les pays développés.

Chaque jour, environ 280 000 remplacements de valves cardiaques sont effectués dans le monde [Zilla, 2008]. En cas de rétrécissement aortique, la seule thérapie disponible est le remplacement chirurgical par une prothèse mécanique ou biologique.

Les prothèses mécaniques

Des prothèses mécaniques fabriquées à partir de matériaux résistants aux forces de cisaillement induites par la pression sanguine depuis le cœur, ont pu être développées (**Figure 18 A-C**). Ces prothèses sont souvent utilisées en médecine réparatrice grâce à leur grande durée de vie qui ne nécessite pas de nouvelles interventions chirurgicales chez le patient adulte. Néanmoins, la pose de ces valves mécaniques est à l'origine de problèmes de thrombose et de calcification à plus ou moins long terme. Le taux de mortalité postopératoire enregistré est approximativement de 4% par patient par an [Jamieson, 1998 ; Hammermeister, 1993].

Les prothèses biologiques

Les prothèses biologiques utilisées en clinique aujourd'hui sont d'origine porcine ou bovine (**Figure 18 C-H**). Une étude clinique réalisée entre 2006 et 2011 sur une cohorte de 66 453 patients ayant reçu des prothèses de valves mécaniques (28,9%) ou biologiques (71,1%) a montré l'avantage de l'utilisation des prothèses biologiques sur la mortalité dans les 30 jours suivant l'opération [Du, 2014]. Cependant, les valves biologiques sont souvent sujettes à des rejets liés à leur degré d'histocompatibilité, à une calcification, puis à une dégénérescence. Leur durée de vie théorique peut approcher 20 ans, toutefois la mortalité postopératoire est pour l'instant très élevée. Trois types de valves sont en général commercialement développés comprenant les xénovalves de valves porcines, les valves bovine péricardiales et les allogreffes ou homogreffes de valves humaines.

Les xénovalves de valves porcines sont préparées et manufacturées selon des configurations variées incluant la couture des valvules à un support soit pour optimiser la facilité d'implantation ou pour améliorer l'efficacité de la surface de l'orifice.

Occasionnellement, les valves peuvent être assemblées à partir de plusieurs segments d'aorte où la configuration et la symétrie naturelle de la matrice tissulaire associée aux valvules, pourrait apporter des éléments bénéfiques jouant sur les performances de la prothèse [O'Brien, 1998].

La bioprothèse fabriquée à partir de péricarde bovin consiste en trois fragments de tissu péricardial de veau fixé sur un support, que ce soit un stent ou par couture sur une matrice, dans une configuration similaire à la xéno greffe porcine.

Les homogreffes de valves sont des tissus humains obtenus à partir d'organes prélevés chez des donneurs, conservés par cryoprotection en tant que valve aortique ou pulmonaire entière. La pièce de valve est ensuite remodelée pour satisfaire à la configuration physiologique du patient au cours de l'implantation [Melina, 2004; Gonzalez-Lavin, 1970].

Ces trois types de bioprothèses de valves peuvent être utilisés en position pulmonaire ou aortique et peuvent également être inversées selon les besoins.

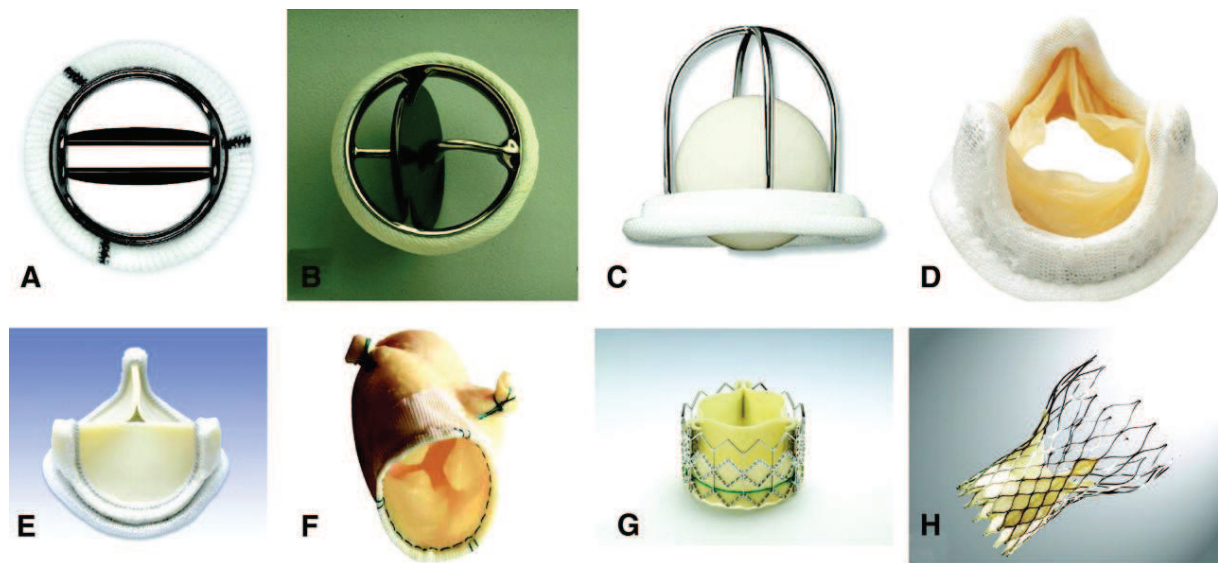


Figure 19. Différents modèles mécaniques et biologiques de prothèses de valves cardiaques. A) Bivalve mécanique (St Jude) ; B) Monovalve mécanique (Metronic Hall) ; C) Valve mécanique à bille encagée (Starr Edwards); D); Bioprothèse porcine en stent (Medtronic Mosaic) ; E) Bioprothèse avec péricarde porcin en stent (Carpentier-Edwards Magna) ; F) Bioprothèse porcine sans stent (Medtronic Freestyle) ; G) Bioprothèse percutanée étendue sur ballonnet (Edwards Sapien) ; H) Bioprothèse auto-extensible percutanée (CoreValve).

D'après Pibarot et Dumesnil, 2009

Une stratégie d'ingénierie tissulaire est envisagée pour pallier aux problèmes d'histocompatibilité et de durabilité des prothèses, par des processus d'acellularisation et de régénération de valves biologiques. L'ingénierie tissulaire de valves cardiaques permettrait à la bioprothèse de conserver une capacité d'agir comme un organe vivant, capable de répondre aux stimuli physiologiques et contrainte physique par une croissance de la même façon que le ferait une valve native.

Des études précliniques ont tenté de mettre en évidence l'utilisation des cellules progénitrices autologues pour améliorer leur biocompatibilité et leur durabilité *ex vivo* [Sales, 2006; Barrilleaux, 2006] ou *in vivo* [Hegen, 2011].

Cependant, deux problèmes majeurs subsistent: a) l'acellularisation des valves conduit à une détérioration de la structure des fibres de collagène et d'élastine, générant une perte de leur élasticité et durabilité et b) la très faible survie des cellules apportées sur les valves acellularisées.

c) La bioingénierie de prothèses de valves biologiques

Concernant la bioingénierie de prothèses de valves cardiaques, deux principales approches ont été développées lors des 20 dernières années, la régénération et la repopulation. La régénération implique l'utilisation d'une matrice résorbable pouvant remodeler ses fonctions *in vivo* et produire une valve fonctionnelle composée de cellules et de protéines tissulaires provenant du patient.

La « repopulation » comprend l'implantation d'une bioprothèse de valve nettoyée au préalable des cellules de l'animal dont elle est extraite (procédé d'acellularisation) en laissant la structure intacte capable de se connecter mécaniquement aux tissus cardiaque et vasculaire. Il est suggéré dans cette méthode qu'une fois implantée, les cellules du patient puissent repeupler et revitaliser la matrice acellulaire en générant un véritable tissu vivant présentant déjà un niveau de complexité nécessaire à la microstructure pour assurer ses fonctions biologiques de façon durable [Vesely, 2005].

Les expérimentations animales de ces deux approches n'ont à ce jour pas donné de résultats probants et les recherches de nouvelles stratégies alternatives sont en cours actuellement.

d) Modifications apportées aux valves et procédés d'ingénierie : limites et perspectives dans le potentiel de régénération/repopulation

Les valves biologiques sont acellularisées selon deux méthodes, soit par digestion enzymatique, soit par l'utilisation d'un détergent. Il a été démontré que la méthodologie peut faire varier le rendement d'acellularisation, mais aussi la qualité et l'intégrité des composants matrices [Wilczek, 2010].

Les bioprothèses porcines et bovines sont conservées et fixées dans une solution contenant du glutaraldéhyde à faible concentration [Carpentier, 1977]. Le glutaraldéhyde permet de réduire leur potentiel immunogène et stabiliser le tissu contre une dégradation par protéolyse entraînant la dégénération de la bioprothèse.

Les valves d'origine animales sont également traitées par des agents chimiques pour minimiser leur propension à induire une calcification du conduit et de la valve, afin d'augmenter leur longévité [Schoen, 2005].

Ces traitements chimiques ne sont pas sans conséquences sur le potentiel régénératif et la biocompatibilité des valves. À cause de la cytotoxicité résiduelle du glutaraldéhyde, les valves traitées et conservées dans une solution de glutaraldéhyde restent acellulaires sans possibilité de repopulation et de régénération. Ce procédé n'induit cependant pas de thromboembolisme lorsque les valves sont réimplantées et demeurent des tissus inertes qui n'induisent pas d'effets indésirables en outre mesure de la dégradation naturelle de la bioprothèse [Vesely, 2005].

Au vu de ces limites actuelles dans le développement de bioprothèses de valves cardiaques, il apparaît clairement un besoin dans la recherche de nouvelles approches méthodologiques permettant la l'amélioration des bioprothèses fonctionnelles et durables. Les propriétés biologiques des polysaccharides sulfatés (GAGs et mimétiques) dans la bioingénierie, notamment sur la rétention de facteurs de croissance, mais aussi le recrutement l'adhérence, la prolifération et la différenciation cellulaire, les désignent comme candidats pour subvenir à ces besoins en modifiant les propriétés de régénération ou repopulation des bioprothèses de valves.

Buts de la thèse

Le travail de recherche présenté dans cette thèse vise plusieurs objectifs dans les deux thématiques que sont :

1) Le fractionnement et l'analyse physico-chimique du fucoïdane de bas poids moléculaire utilisé dans nos expériences et l'étude de son effet sur la formation de réseaux vasculaire et la migration des cellules endothéliales en absence ou présence des glycosaminoglycans (GAG) endogènes (article 1).

Au vu des données hétérogènes concernant les activités du fucoïdane dans les phénomènes liés à l'angiogenèse, il semblait nécessaire de déterminer plus précisément les mécanismes sous-jacents et la structure optimale du fucoïdane en amont d'un développement d'une biothérapie traitant l'ischémie. Dans cette thèse, j'ai cherché à établir un modèle d'étude structure/fonction d'un fucoïdane extrait d'*Ascophyllum nodosum* sur ses capacités à induire un phénotype cellulaire pro-angiogénique en condition basale. L'expression des GAGs endothéliaux ayant montré son importance dans l'effet pro-angiogénique du fucoïdane, nous avons poursuivi les travaux engagés afin de déterminer comment agit le fucoïdane en leur absence et établir un modèle d'activité du fucoïdane vis-à-vis des GAGs endogènes dans le processus d'angiogenèse *in vitro*. Enfin, nous avons exploré au niveau moléculaire la localisation et le trafic du fucoïdane dans les cellules endothéliales dans le temps afin de corréliser sa localisation avec ses effets biologiques.

2) Le développement de prothèses de valves cardiaques fonctionnelles prêtes à l'implantation dans un modèle animal : Application de fucoïdane et de VEGF pour la régénération de valves porcines acellularisées (article 2).

Les limites actuelles des prothèses de valves cardiaques justifient l'importance de nouvelles approches dans leur développement. Compte-tenu des données prometteuses dans l'utilisation de biomatériaux, notamment les polysaccharides, comme support matriciel aidant à la régénération tissulaire, le fucoïdane a été proposé afin d'améliorer la régénération de prothèse de valve cardiaque acellularisée.

Nous avons supposé que l'application d'un film en multicouche de fucoïdane/VEGF faciliterait l'adhérence, la survie et la prolifération de cellules endothéliales sur le support acellulaire en condition statique et dynamique tout en protégeant la prothèse de la formation de thrombus vasculaire.

PARTIE 2

-

RESULTATS

Chapitre 1. Fractionnement du fucoïdane, analyse physico-chimique et étude de ses effets biologiques sur les cellules endothéliales HUVECs

Chapitre 2. Bioingénierie tissulaire : Régénérescence de prothèses biologiques de valves cardiaques acellularisées

Chapitre I : Fractionnement du fucoïdane, analyse physico-chimique et étude de ses effets biologiques sur les cellules endothéliales HUVECs

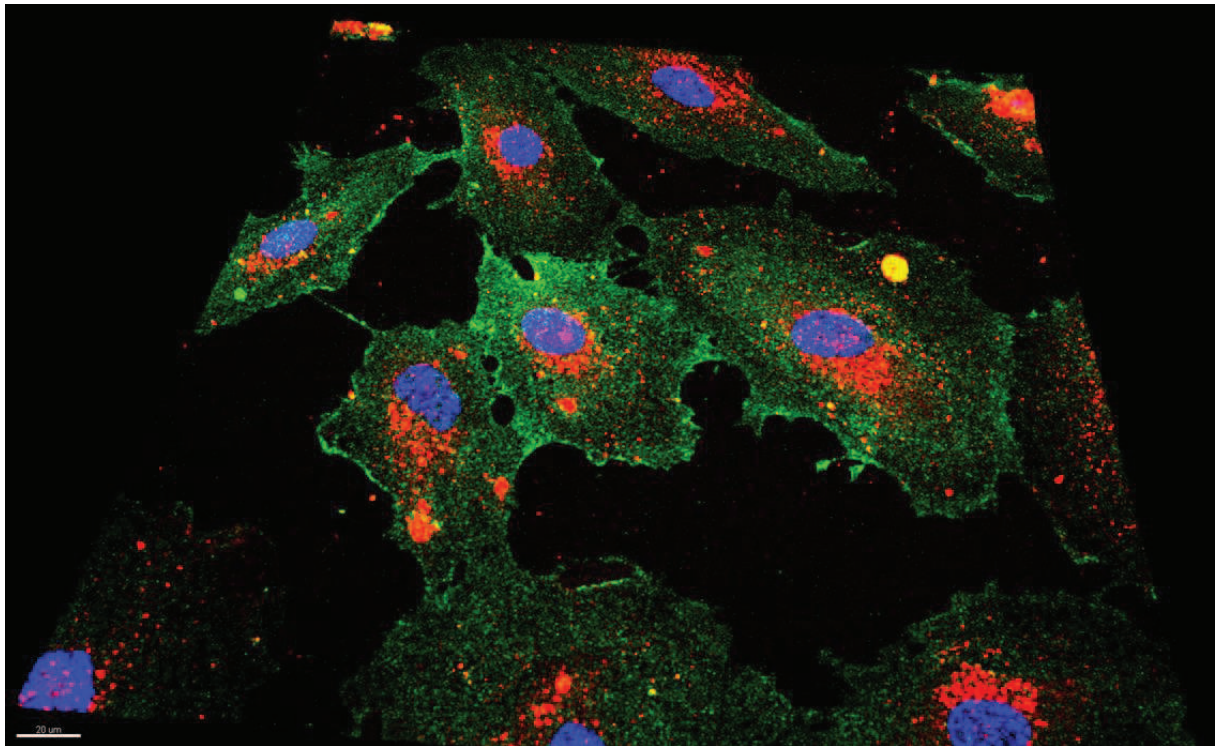


Figure 20. Localisation du LMWF dans les cellules HUVECs observée par microscopie confocale en 3-dimensions. LMWF-Alexa en rouge, CD31 en vert, Chromatine en bleu. Données non montrées issues de Marival et al., 2016.

Hypothèses et objectifs

Le fucoïdane ayant prouvé son potentiel thérapeutique dans le domaine cardiovasculaire, mais restant une molécule complexe et variée, il semble essentiel de pouvoir cadrer cette molécule par une étude structure/fonction afin de mieux contrôler et optimiser ses effets biologiques. Nous avons choisi de réaliser cette étude sur un fucoïdane extrait de l'algue *Ascophyllum nodosum* dans son potentiel à favoriser une angiogenèse *in vitro*.

Objectif 1 du projet : caractérisation physico-chimique et corrélation fonctionnelle dans la migration et l'angiogenèse

Dans un premier temps, un fractionnement par chromatographie d'exclusion stérique du fucoïdane brut a été réalisé afin de générer une banque de fucoïdanes variant selon leur poids moléculaire. Puis, la caractérisation de la composition (oses et taux de sulfatation) et de la structure chimique (spectroscopie Raman et infrarouge) de ces fucoïdanes par différentes méthodes d'analyse a permis d'asseoir une compilation de données structurales propres à chaque fucoïdane et utile pour les distinguer. Ces variations de composition peuvent être corrélées avec des différences d'effet dans des modèles d'études biologiques. Les modèles choisis dans cette étude sont les mécanismes cellulaires intervenant dans l'angiogenèse au niveau des cellules endothéliales humaines HUVECs, à savoir, la migration et la formation de réseaux vasculaire *in vitro*.

Objectif 2 du projet : rôle des GAGs dans l'effet angiogénique du fucoïdane

D'autre part, comme il a été démontré récemment dans la littérature scientifique, les mimétiques de glycosaminoglycanes ne sont pas sans effet sur les fonctions des GAGs endogènes et peuvent moduler leur expression. Il nous a semblé nécessaire d'évaluer le potentiel de ces fucoïdanes sur l'expression des GAGs endothéliaux sur ces mêmes modèles d'étude.

Ces travaux permettant de déterminer les effets fonctionnels du fucoïdane en présence ou en absence de GAGs endogènes devraient alimenter les connaissances sur le mécanisme d'action du fucoïdane et le rôle des GAGs dans l'angiogenèse thérapeutique induite par le fucoïdane.

Objectif 3 : Localisation et mécanismes d'internalisation par les cellules HUVECs du LMWF fonctionnalisé avec un fluorochrome (Alexa) en cinétique

Enfin, en dernière partie de l'étude, l'interaction cellulaire du fucoïdane démontrant le plus important potentiel angiogénique *in vitro* a été observée par une technique de microscopie à fluorescence après avoir réalisé un couplage et une purification du fucoïdane avec un fluorochrome.

Matériels et méthodes

Polysaccharides

Le fucoïdane brut (ASPHY) a été collecté depuis l'espèce d'algue marine *Ascophyllum nodosum* (Algues & Mer, Ascophyscient, batch #ASPHY12399, Ouessant, France), puis subi une dépolymérisation par voie radicalaire. Le fucoïdane Ascophyscient a été précédemment caractérisé par notre laboratoire [Saboural, 2014]. Un dextrane non-sulfaté de 10 000 g/mol (Dextran T-10, Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK) et un dextrane couplé à un fluorenyl-isothiocyanate (Dextran-FITC, TdB consultancy, Uppsala, Sweden) ont été choisis comme contrôles négatifs en comparaison avec les effets biologiques du fucoïdane. Une héparine de bas poids moléculaire (LMWH, Mw= 6 300 g/mol, Tinzaparin sodium Innohep, Ballerup, Denmark) a été utilisée comme contrôle positif de ces études sur l'angiogénèse.

Fractionnement

Le fucoïdane brut ASPHY a été fractionné dans un gel d'exclusion. La colonne (XK 50/60, GE Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France, id: 50 mm, L: 50 cm) a été préparée avec un Bio-Gel P60 (Bio-Rad, Marne-la-Vallée, France). Une quantité de 0,15 M de NaCl et 0,02% (p/v) d'azide de sodium ont été utilisés comme transporteur après avoir réalisé une filtration avec précaution à travers des pores d'unité de 0.45 µm (Millipore, Billerica, MA, USA) à 1,5 mL/min de débit. 10 mg d'Ascophyscient® (30%, p/v) a été élué à travers la colonne et 100 mL ont été collectés dans plusieurs fractions. Les fractions ont ensuite été dialysées 5 fois contre de l'eau (Spectra/Por, MWCO 1 kDa, Dominique Dutscher, Brumath, France) et lyophilisées. Chaque fraction a été analysée en fonction de sa teneur en fucose, acide uronique et taux de sulfatation par dosage colorimétrique.

Le poids moléculaire a été mesuré par une technique de chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion de la lumière multi angles et un réfractomètre différentiel (HPSEC/MALLS-DRI) system [Saboural, 2014]. Nous avons collecté et utilisé deux fractions obtenue après l'élué du produit brut, un fucoïdane de petit poids moléculaire (LMWF, $M_w = 4\ 900$ g/mol) et de poids moléculaire moyen (MMWF, $M_w = 26\ 600$ g/mol).



Figure 21. *Système analytique de détermination des masses molaires par chromatographie d'exclusion stérique avec une double détection par réfractométrie différentielle et diffusion de la lumière et de la polydis (HPSEC-MALLS-dRI).*

Site de Villetaneuse, laboratoire Inserm U1148 (Cliché © Nicolas Marival).

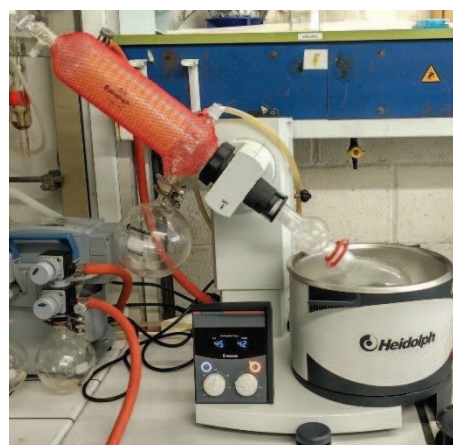


Figure 22. *Système d'évaporation des polysaccharides en solution (rotavap).*

Site de Villetaneuse, laboratoire Inserm U1148 (Cliché © Nicolas Marival).

Spectroscopie Raman

Les spectres Raman ont été enregistrés avec un microspectromètre Raman confocal commercial de 200 à 1 800 cm^{-1} . Un spectromètre Horiba Scientific Xplora a été utilisé à 660 nm de longueur d'onde d'excitation avec une résolution spectrale de 3 cm^{-1} . Les mesures de Raman exécutés dans une configuration de rétrodiffusion au travers d'un objectif 10x ($NA = 0,25$). L'incidence du laser de puissance a été mesurée en position d'échantillonnage et configurée à 20 mW. Les spectres Raman spectra ont été enregistrés après 60 secondes de temps d'acquisition et la ligne de base corrigée par l'utilisation du logiciel Labspec (HJY, Japan).

Spectroscopie Infrarouge Transformée de Fourier

Les spectres des échantillons ont été obtenus par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, FT-IR) après dilution des échantillons dans une solution de D₂O (>99,8% pureté, Euriso-Top; CEA, Saclay, France) ou dans une solution d'H₂O et enregistrés avec un spectrophotomètre Tensor 27 (Bruker, Karlsruhe, Germany). Les solutions ont été déposées entre deux fenêtres de ZnSe à une concentration de 333 µg/µL. Les expériences ont été réalisées par le séchage des échantillons et leur dissolution dans une solution à pH ~7. Vingt scans ont été accumulés (région spectrale 4 000–400 cm⁻¹, résolution 1 cm⁻¹). Le traitement des données a été réalisé grâce au logiciel opus et consistait en de multiples corrections de la ligne de base.

Résonance plasmonique de surface

L'affinité des fucoïdanes pour les cytokines SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 or VEGF165A a été évaluée avec un BIAcore X100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Les SDF-1/CXCL12, -RANTES/CCL5 or VEGF165A-biotinylés ont été couplés à la surface d'une puce de capteur SA (dextrane carboxyméthylaté avec de la streptavidine immobilisée pour la capture du ligand biotinylé). Les SDF-1 ou RANTES/CCL5 biotinylés (20 µL of 5 µg/mL dans du tampon HEPES salin-50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, et 0.05% tensioactif P-20) ont ensuite été injectés à 5 µL/min de débit, et immobilisés au niveau de la puce capteur recouverte de streptavidine à une unité de résonance (RU) d'une valeur de 110 pour SDF1/CXCL12 et 235 pour RANTES/CCL5. Le VEGF165A a été immobilisé sur une puce capteur CM5 avec le kit aminé BIAcore à 1 913 RU. Les surfaces non couplées ont été utilisées comme contrôles, 1 M NaCl a été utilisé pour régénérer le capteur de surface. Les échantillons ont été dilués dans un tampon d'exécution (50 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, and 0,05 % P-20). Nous avons sélectionné avec le logiciel de contrôle du BIAcore: la température (25°C), le débit (30 µL/min), le temps de contact (180 sec), et le volume d'échantillon (GE Healthcare) dans une méthode en cycle unique. Les échantillons ont été injectés consécutivement à 1,2, 3,7, 11,1, 33,3, and 100 nM.

Les affinités des fucoïdanes pour SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 ou VEGF165A ont été déterminées en utilisant un modèle de Langmuir de 1:1 par l'analyse de la cinétique de l'association et de la dissociation avec le logiciel d'évaluation du BIAcore.

Réactifs

L'Alexa Fluor Succinimidyl Ester (NHS Ester) a été fourni par Molecular Probes (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). La Transferrin-biotine labeled human (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) a été fournie par Sigma-Aldrich et utilisée comme contrôle positif de l'endocytose médiée par la clathrine.

Inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation

Le LY294002 (Sigma-Aldrich), est un inhibiteur de la voie de signalisation PI3K et a été utilisé à 30 μ M dans la culture cellulaire pendant 24 h. Le PD98059 (Sigma-Aldrich) est un inhibiteur de la voie de signalisation de MAPKK (MEK1 et MEK2) et a été utilisé à 30 μ M dans la culture cellulaire pendant 24 h.

Inhibiteurs pharmacologiques des voies d'internalisation/endocytose

La Cytochalasine D (C8273, Sigma-Aldrich) est un inhibiteur de la phagocytose et de la micropinocytose par l'induction de la dépolymérisation de l'actine-F et a été utilisé à 100 μ M dans la culture cellulaire pendant 2 h. La Filipin (F9765, Sigma-Aldrich) est un inhibiteur de la voie d'endocytose indépendante de la clathrine en se liant au cholestérol et empêchant la formation de radeaux lipidiques et les mouvements membranaires. Cet inhibiteur a été utilisé à 1 μ g/mL dans la culture cellulaire pendant 1 h. Le Dynasore (D7693, Sigma-Aldrich) est un inhibiteur de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine en bloquant l'activité de la GTase dynamine et a été utilisé à 80 μ M dans la culture cellulaire pendant 30 min.

Inhibition de l'expression des chaînes GAGs endogènes

Le β DX (4-Nitrophenyl β -D-xylopyranoside, Sigma-Aldrich), un substitut de glycosaminoglycane (GAG) a été utilisé comme un inhibiteur spécifique de l'élongation de la chaîne de GAGs. Le β DX a été ajouté à hauteur de 2 g/mol pendant 48h dans la culture des HUVECs afin d'inhiber l'expression des GAGs endogènes avant de réaliser les tests cellulaires.

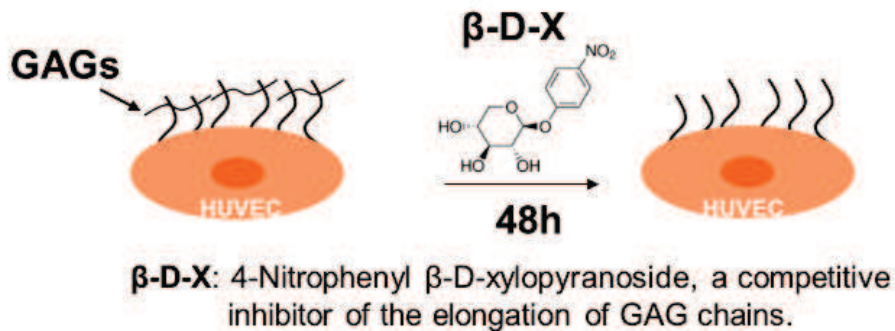


Figure 23. Effet de β DX sur l'expression des GAGs endogènes. Le schéma représente les cellules endothéliales HUVECs mises en présence d'un inhibiteur de l'élongation des chaînes GAGs - β DX - pendant 48 h, et présentant une diminution de l'expression de leurs GAGs membranaires.

L'Héparinase I (5U, 1/100e) provenant de *Flavobacterium heparinum* (H2519), l'héparinase III (10U, 1/50e) provenant de *Flavobacterium heparinum* (H8891), et la chondroïtinase ABC (10U, 1/50e) provenant de *Proteus vulgaris* ont été toutes obtenues depuis Sigma-Aldrich et utilisées 2 h à 37°C pour dépolymériser les GAGs endogènes dans les cultures d'HUVECs culture avant des expériences de temps court jusqu'à 6h maximum.

Anticorps

Un anticorps primaire dirigé contre les chaînes d'héparane sulfate (Souris IgM, Clone F58-10E4, AMS Biotechnology, Abingdon, UK) a été utilisé pour observer leur expression en cytométrie en flux. Un anticorps primaire dirigé contre les chaînes de clathrine lourdes (CLTC, Souris IgG1, Everest Biotech, Ramona, CA, USA).

L'anticorps primaire CAV-1 est dirigé contre la cavéoline-1 (PA5-17447, Lapin IgG, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Les isotypes monoclonaux produits chez la souris (IgG1 et IgM κ) ont été obtenus par BD Biosciences (BD Biosciences, Bedford, MA, USA), l'isotype polyclonal produit chez le lapin (IgG) a été conçu par R&D (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN USA). Les anticorps secondaires produits chez la chèvre anti souris (Goat anti Mouse, IgG Alexa fluor 488) et chèvre anti lapin (Goat anti Rabbit IgG Alexa fluor 488) ont été conçus par Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

Culture de cellules endothéliales

Les cellules humaines de veine de cordon ombilical ou « Human umbilical vascular endothelial cells » (HUVECs, CRL-1730, ATCC, LGC Molsheim, France) ont été cultivées dans un milieu « endothelial cell basal medium 2 » (ECBM2, PromoCell, Heidelberg, Germany) supplémenté avec 12% de sérum de veau fœtal (SVF ou « Fœtal Bovin Serum », FBS), EGF (epidermal growth factor, 5,0 ng/mL), hydrocortisone (0,2 μ g/mL), VEGF (vascular endothelial growth factor, 0,5 ng/mL), bFGF (basic fibroblast growth factor, 10 ng/mL), R3 IGF-1 (insulin like growth factor, 20 ng/ml), ascorbic acid (1 μ g/mL) et les antibiotiques (penicilline–streptomycine, 1%, Invitrogen, Cergy, France) à 37 C dans 5% CO₂. Les cellules HUVECs ont été cultivées à 60-90% de confluence. Le milieu de culture a été changé deux fois par semaine tous les trois jours. La présence de facteurs de croissance comme VEGF, EGF, bFGF and IGF-dans le milieu de culture des HUVECs, miment les conditions angiogéniques de cultures in vitro. L'héparine a été enlevée du kit de complément de milieu lors des expériences menées avec le fucoïdane, étant donné son homologie structurale et fonctionnelle avec le fucoïdane, comme un polysaccharide sulfaté, afin d'éviter une compétition d'action.

Cytométrie en flux

Le niveau d'expression des héparanes sulfates à la surface des cellules HUVECs a été quantifié par cytométrie en flux ou « fluorescence-activated cell sorting » (FACS). Les cellules ont été préincubées pendant 1 h à 4°C avec un anticorps anti-héparane sulfate (10 µg/mL, Clone 10E4) ou avec un isotype (IgM). Après plusieurs lavages, les cellules ont été marquées pendant 30 minutes à 4°C avec une streptavidine couplée à un Alexa Fluor 488 (1/200e, Molecular Probes, Invitrogen). Les cellules ont été fixées par du paraformaldéhyde 1% et analysées par un FACScan (Becton Dickinson, Le Pont de-Claix, France).

Test de viabilité cellulaire

La viabilité des HUVECs a été démontrée en utilisant un test MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich). Un total de 5000 cellules par puits ont été incubées dans un plaqué 96-puits pendant 24, 48 et 72 h avec ou sans polysaccharides (LMWF, MMWF and ASPHY) à une des concentrations (1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL et 1000 µg/mL). L'héparine (LMWH) et le dextrane de bas poids moléculaire ont été utilisés comme contrôles à 10 µg/mL. La solution de MTT à 1 mg/mL a été ajoutée au milieu d'incubation des cellules pendant 2 h et la coloration a été révélée en ajoutant du diméthylsulfoxyde (DMSO). L'activité métabolique résultant du clivage par la succinate deshydrogénase de l'anneau de tétrazolium en formazan coloré en bleu peut être corrélée avec l'absorbance de la solution lue à 570 nm avec un photomètre (Bio-rad® Microplate reader, Model 680).

Test de migration cellulaire en chambre de Boyden

La migration des HUVECs a été effectuée avec des chambres de migration cellulaire Bio-coat (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Brièvement, les chambres ont été recouvertes de fibronectine (100 µg/mL, BD Biosciences).

Les polysaccharides (LMWF, MMWF, ASPHY, Dextran or LMWH) ont été directement ajoutés dans la chambre supérieure à 10 µg/mL communément avec 40×10^4 cellules par puits contenues dans 500 µL de milieu complet et incubées pendant 24 h. La chambre inférieure a été remplie de 500 µL de milieu complet. Les cytokines naturellement contenues dans le milieu complet ont été considérées comme un inducteur naturel de la migration par chimiotactisme.

Afin de tester le rôle des GAGs endogènes, les HUVECs ont été pré-incubées pendant 48 h avec βDX, et conservées dans des conditions d'inhibition pour les besoins de l'expérience. Vingt-quatre heures plus tard, le milieu et les cellules de la chambre supérieure ont été doucement retirées. Les cellules ayant migré dans la chambre inférieure ont été fixées avec du méthanol et marquées avec une solution d'hémalum de Mayer (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany). Les cellules ont ensuite été comptées manuellement par deux différents observateurs réalisant une quantification en aveugle. Pour cela, les inserts ont été placés sous un microscope à contraste avec un objectif x 4 de phase et les HUVECs marquées ont été photographiées (Nikon© Coolpix 8400, Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Les images ont été quantifiées en utilisant le logiciel Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

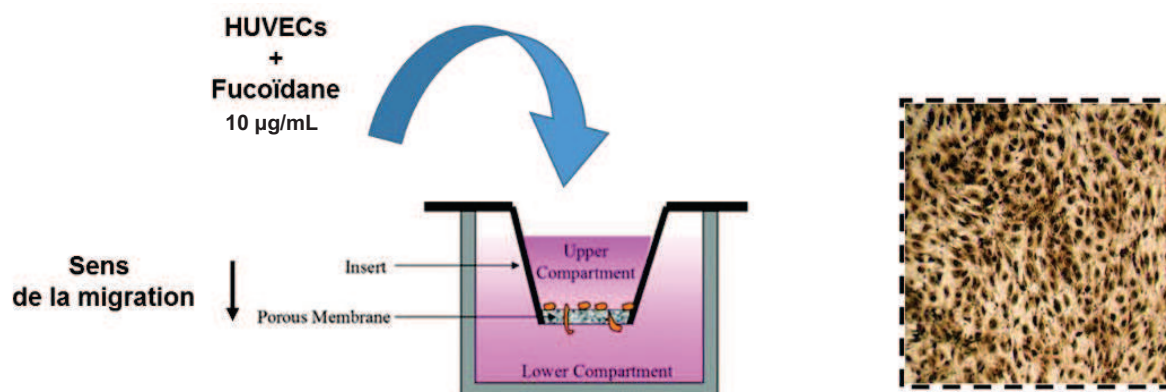


Figure 24. Méthodologie de la migration en chambre de Boyden. Le schéma (partie gauche) représente le dépôt conjoint de cellules HUVECs et du fucoïdane dans le compartiment supérieur de la chambre de Boyden. Les cellules vont se déplacer dans le sens de migration vers la chambre inférieure et seront photographiées pour être quantifiées (partie droite)

Formation de réseau vasculaire en 2 dimensions

Le test de formation d'un réseau vasculaire en deux dimensions a été effectué avec des HUVECs cultivées sur des puits recouverts de Matrigel (Corning, Bedford, MA, USA). Des chambres de culture Labtek 16-puits (Dominique Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France) ont été utilisées où 1×10^4 cellules par puits ont été incubées pendant 6 h à 37°C dans du milieu de culture complet avec ou sans 10 µg/mL de polysaccharides (LMWF, MMWF, ASPHY, Dextran ou LMWH). Le réseau microvasculaire a été photographié directement à la fin de l'incubation, après avoir été fixé au paraformaldehyde 4 %, en utilisant un microscope à contraste de phase couplé à un appareil photo (Nikon© Coolpix 8400). Les images ont été analysées suivant cinq paramètres angiogéniques comprenant la longueur totale du réseau, le nombre de nœuds (interactions cellulaires), le nombre et le périmètre et l'aire des mailles formées. Les mesures ont été estimées pour chaque condition d'expérimentation en utilisant le logiciel d'analyse Image J. Toutes les mesures montrent les mêmes tendances et nous avons choisi de ne montrer qu'un des paramètres, le nombre de nœuds, qui montrent les différences les plus importantes entre chaque groupe de traitement.

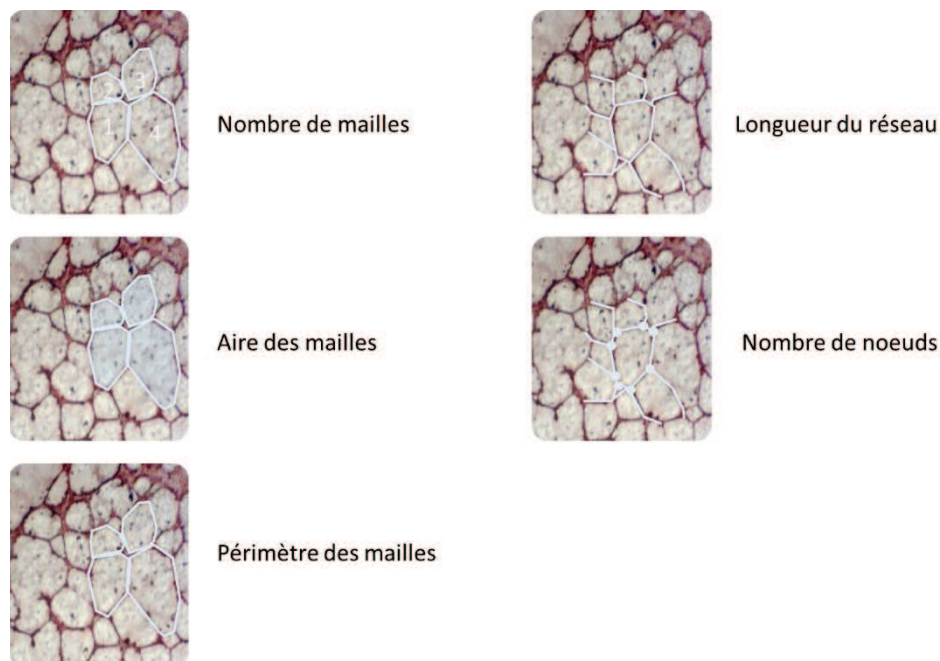


Figure 25. Différents paramètres quantifiés pour les réseaux vasculaires en 2-dimensions Les images montrent les 5 paramètres de morphologie cellulaire mesurés pour quantifier la densité du réseau vasculaire.

Marquage du fucoïdane de bas poids moléculaire avec un fluorochrome

Le couplage du LMWF avec un fluorochrome a nécessité une amination LMWF sur le groupement aldéhyde terminal de la chaîne de fucose par une amination réductrice.

R = Fucoïdane

R' = Diaminopropane

R'' = Alexa Fluor 555

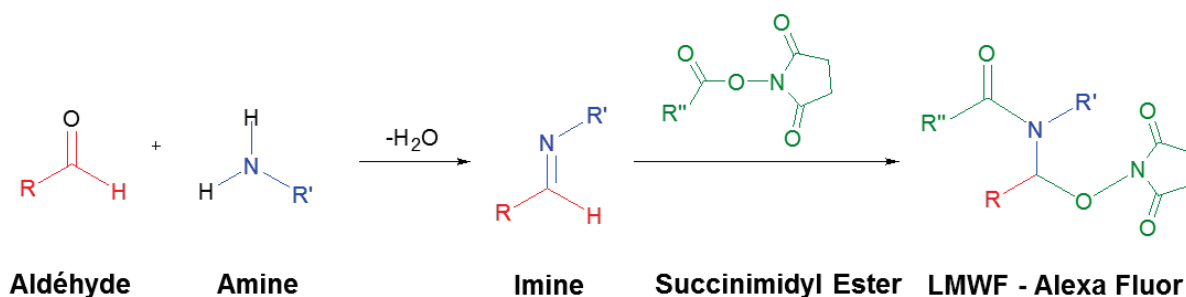


Figure 26. Réaction simplifiée de l'amination du fucoïdane et du couplage avec le fluorochrome. Le schéma représente les modifications chimiques apportées pour réaliser le couplage du fucoïdane avec le fluorochrome.

Dans cette étude, 50 mg de LMWF ont été dissout dans 0.54 mL de solution de diaminopropane 1.5 M dans un bain d'acide acétique glacial et chauffé pendant 3 h à 90°C. Ensuite, une réduction a été réalisée en ajoutant 0.15 mL of dimethylborane 3 M dans la solution chauffée 3 h à 90°C. Les échantillons obtenus ont été dialysés (cut-off 1000 Da) puis lyophilisés. LMWF a ensuite été couplé à un fluorochrome rouge (Alexa Fluor® 555 NHS Ester, Thermo Fisher scientific). 1 mg de cet Alexa-Fluor 555 NHS a été dissout dans 100 µL de DMSO (VWR BDH Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France), tandis que 10 mg du fucoïdane aminé a été dissout dans 1 mL de tampon carbonate à 0.1 M à pH 8.3 et 50 µL de la solution portant le fluorochrome a été ajouté à la solution sous agitation à l'obscurité pendant 1 h à température ambiante. Le fluorophore libre non couplé a été précipité dans de l'éthanol pour purifier la solution de fucoïdane marqué à l'Alexa-fluor, et élué deux fois dans une colonne PD-10 (GE Healthcare Life Sciences).

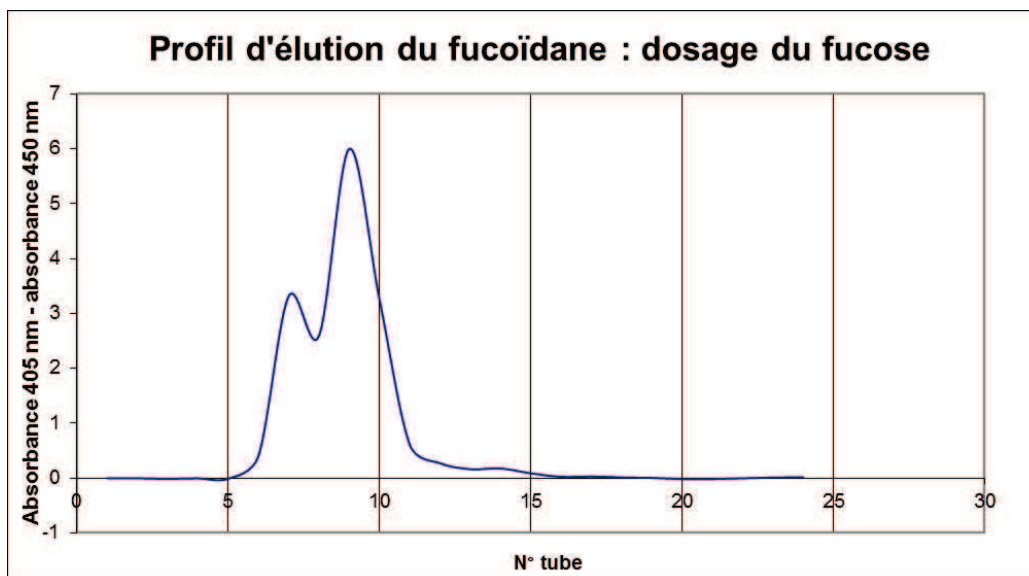


Figure 27. Profil d'élution du fucoïdane fluorescent après chromatographie et lecture de l'absorbance. La présence de fucose a été mesurée par dosage colorimétriques dans les tubes après élution du fucoïdane en chromatographie d'exclusion stérique afin de vérifier son profil d'élution.

Cinétique de la localisation cellulaire du LMWF-Alexa

Les polysaccharides fluorescents LMWF-Alexa et Dextran-FITC (contrôle négatif) ou la transferrine-biotinylée (contrôle positif de l'internalisation médiée par la clathrine) ont été ajoutés dans le milieu de culture des HUVECs à hauteur de 10 µg/mL. Les cultures ont été maintenues et arrêtées en cinétique (30 min, 2 h and 6 h) après fixation au paraformaldéhyde 4 %, à 37°C et 4°C. Dans certains cas, les enzymes héparinases et chondroïtinase ont été ajoutées à la culture des HUVECs pour s'affranchir de l'expression des glycosaminoglycanes et étudier la localisation des polysaccharides fluorescents en leur absence. Les cellules ont ensuite été marquées au Dapi (noyau), montées entre lame et lamelle, et observées sous un microscope confocal (Leica SP8 tandem, Wetzlar, Germany). En moyenne, de 30 cellules par conditions de traitement ont été photographiées « en stack » dans l'axe z et l'intensité totale de leur fluorescence a été mesurée et quantifiée par le logiciel d'analyse tridimensionnelle Imaris (Bitplane, Belfast, UK). Pour l'acquisition, le gain de l'appareil modulant l'intensité de fluorescence a été normalisée sur l'autofluorescence des cellules.

Etude des voies d'internalisation du fucoïdane

Les inhibiteurs pharmacologiques des principales voies d'internalisation (endocytose dépendante et indépendante de clathrine, macropinocytose et phagocytose) tels que le Dynasore, Filipin et la Cytochalasin D (décrits dans le paragraphe des réactifs) ont été choisis pour étudier la cinétique d'internalisation du LMWF-Alexa pour chacune d'elles.

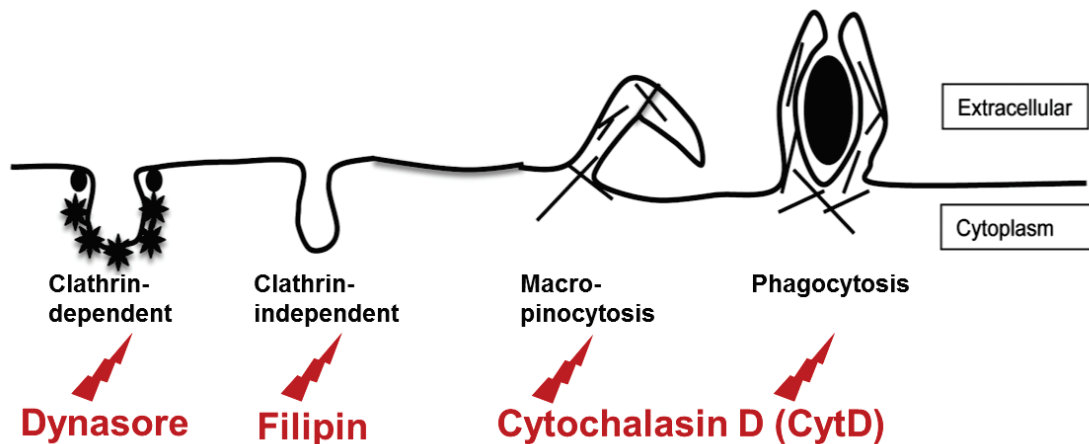


Figure 28. Les principales voies d'internalisation cellulaire et leurs inhibiteurs. L'inhibiteur dynasore inhibe l'activité GTPase de la dynamine et par conséquent, la voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Le filipin empêche la formation de radeaux lipidiques par sa fixation au cholestérol membranaire et inhibe la voie d'endocytose indépendante de la clathrine. La cytochalasine D dépolymérise l'actine-F mobilisée pour générer des extensions membranaires et inhibe donc la macro-pinocytose et la phagocytose.

D'après : Dutta, 2012.

Test de colocalisation du LMWF-Alexa avec la clathrine et la caveoline-1

Les HUVECs ont été incubées en présence du LMWF-Alexa pendant 2 h dans les mêmes conditions décrites précédemment, puis fixées et perméabilisées avec de la saponine 0.1% (Fluka, Sigma-Aldrich).

Les cellules endothéliales ont ensuite été marquées par du Dapi et les anticorps dirigés contre les chaînes légères de la clathrine (CLTC), contre la cavéoline-1 (CAV-1) ou des isotypes non spécifiques (Souris IgG1; Lapin IgG) ont été utilisés, puis révélés par un anticorps secondaire fluorescent (Goat anti mouse Alexa Fluor 488 and Donkey anti goat Alexa Fluor 488). Le test de colocalisation a été réalisé en utilisant une corrélation des mesures d'intensité de fluorescence avec les coefficients de Pearson et de Mander's par le logiciel de quantification Imaris.

Analyse statistique

Pour la détermination d'une significativité statistique, un test ANOVA a été réalisé par l'intermédiaire du logiciel de mesure statistique Statview (StatView 4.5 Abacus Concepts, Berkeley, USA). Une valeur d'intervalle de confiance à 95% traduite par une « p value » inférieure à 0.05 a été utilisée comme critère de significativité statistique.

Article 1. Marinval et al., 2016

Objectif: Nous avons exploré dans cette étude la relation structure/fonction de fucoïdanes extraits de l'algue *Ascophyllum nodosum* pour analyser et comparer leurs effets pro-angiogéniques et leur absorption cellulaire dans des cellules endothéliales exprimant ou n'exprimant pas de glycosaminoglycanes endogènes.

Hypothèse : Nous avons émis l'hypothèse que la taille et le taux de sulfatation des fucoïdanes influencent leur capacité à induire des processus angiogéniques indépendamment des GAGs.

Méthodes : Pour réaliser ces travaux, nous avons choisi d'utiliser un fucoïdane brut que nous avons fractionné par une technique de chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC-MALLS-DRI) qui sépare les populations macromoléculaires en fonction de leur taille. Nous avons récolté 5 fractions de 4 900 à 26 700 g/mol et analysé par mesure colorimétrique leur composition en fucose, sulfate et acide uronique. Chaque fraction présentait une composition propre et variée mais nous avons observé une part importante de composition inconnue non mesurée. Ces données ont été confrontées à des mesures spectroscopiques (FT-IR et Raman) dans un but de contrôle qualité des mesures et d'offrir un spectre entier de la composition des fractions. L'affinité de ces fucoïdanes pour des facteurs de croissance (VEGF) et chimiokines (SDF-1/CXCL12 et RANTES/CCL5) a été vérifiée et mesurée en résonance plasmonique de surface (Biacore) et comparée avec l'affinité d'une héparine et d'un dextrane non sulfaté (utilisés en contrôles positifs et négatifs, respectivement). Chaque fraction, ainsi que le fucoïdane brut, ont ensuite été testés indépendamment et leurs effets biologiques sur des cellules endothéliales (HUVECs) ont été comparés. L'expérimentation fonctionnelle des fucoïdanes a été réalisée dans des tests d'activité métabolique (MTT), migration en chambre de Boyden et formation de réseaux vasculaires en 2 dimensions sur Matrigel. L'analyse des données nous a permis d'écarter 3 fractions qui présentaient des variations dans les tests et nous avons choisi les deux fractions les plus extrêmes en taille et composition et taux de sulfatation (LMWF et MMWF respectivement).

Dans un premier temps, ces expériences ont été réalisées sur des HUVECs exprimant des GAGs endogènes dans des conditions basales.

Nous avons également effectué ces tests en traitant les cellules avec un inhibiteur de l'élongation des chaînes GAGs (β DX) pour étudier les rôles des GAGs endogènes dans les effets pro-angiogéniques des fucoïdanes.

Enfin, nous avons choisi d'étudier les mécanismes d'action sous-jacents d'un fucoïdane d'intérêt (LMWF) afin d'établir une première étude de localisation et d'internalisation dans les cellules endothéliales exprimant ou non les GAGs endogènes. Cette partie a pu être réalisée par le couplage du LMWF avec une molécule fluorescente (Alexa Fluor) afin de visualiser sa localisation et de quantifier son accumulation au sein des cellules à partir d'une analyse en microscopie confocale. Des inhibiteurs des différentes voies d'internalisation (endocytose médiée par la clathrine, endocytose médiée par la cavéoline et macropinocytose/phagocytose) ont été utilisés afin de déterminer quelle voie d'internalisation emprunte le LMWF-Alexa pour s'accumuler dans les cellules.

Résultats : Nos résultats présentés dans la publication suivante montrent que les fucoïdanes ont une affinité comparable aux VEGF, SDF-1CXL12 et RANTES/CCL5 d'intensité similaire à l'héparine. Nous mettons en évidence des effets pro-angiogénique plus élevés pour LMWF comparé au MMWF dans la migration endothéliale et la formation de réseaux vasculaires. Nous démontrons que le LMWF garde un potentiel pro-angiogénique dans les mêmes expériences avec des cellules HUVECs n'exprimant pas de GAGs endogènes. En dernière partie de nos résultats, nous montrons que le LMWF-Alexa-Fluor peut être majoritairement internalisé par une endocytose dépendante de la clathrine dans laquelle les GAGs seraient partiellement impliqués.

Conclusion : En résumé, nos données nous permettent de conclure qu'une meilleure caractérisation de la relation entre la structure du fucoïdane et son potentiel pro-angiogénique dans un modèle de cellules endothéliales est nécessaire pour identifier un fucoïdane qui serait adapté pour améliorer la réparation vasculaire après une ischémie.

Article

Identification of a Pro-Angiogenic Potential and Cellular Uptake Mechanism of a LMW Highly Sulfated Fraction of Fucoidan from *Ascophyllum nodosum*

Nicolas Marinval¹, Pierre Saboural¹, Oualid Haddad¹, Murielle Maire¹, Kevin Bassand¹, Frederic Geinguenaud², Nadia Djaker², Khadija Ben Akrouit², Marc Lamy de la Chapelle², Romain Robert¹, Olivier Oudar¹, Erwan Guyot^{1,3}, Christelle Laguillier-Morizot^{1,3}, Angela Sutton^{1,3}, Cedric Chauvierre¹, Frederic Chaubet¹, Nathalie Charnaux^{1,3} and Hanna Hlawaty^{1,*}

¹ Inserm U1148, LVTS, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Paris 75018, France; nicolas.marinval@inserm.fr (N.M.); sabouralpierre@yahoo.fr (P.S.); haddad.oualid@univ-paris13.fr (O.H.); murielle.maire@univ-paris13.fr (M.M.); bassand.k@gmail.com (K.B.); robert.romain@gmail.com (R.R.); olivier.ouidar@univ-paris13.fr (O.O.); erwan.guyot@aphp.fr (E.G.); christelle.laguillier@aphp.fr (C.L.-M.); angela.sutton@aphp.fr (A.S.); cedric.chauvierre@inserm.fr (C.C.); frederic.chaubet@univ-paris13.fr (F.C.); nathalie.charnaux@aphp.fr (N.C.)

² Laboratoire CSPBAT, CNRS UMR 7244, UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Bobigny F-93017, France; frederic.geinguenaud@univ-paris13.fr (F.G.); nadia.djaker@univ-paris13.fr (N.D.); khadijabenakrouit@hotmail.fr (K.B.A.); marc.lamydelachapelle@univ-paris13.fr (M.L.d.l.C.)

³ Laboratoire de Biochimie, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bondy 93140, France

* Correspondence: hania.hlawaty@inserm.fr; Tel.: +33-01-48-38-85-14

Academic Editor: Paola Laurienzo

Received: 28 September 2016; Accepted: 10 October 2016; Published: 17 October 2016

Abstract: Herein we investigate the structure/function relationships of fucoidans from *Ascophyllum nodosum* to analyze their pro-angiogenic effect and cellular uptake in native and glycosaminoglycan-free (GAG-free) human endothelial cells (HUVECs). Fucoidans are marine sulfated polysaccharides, which act as glycosaminoglycans mimetics. We hypothesized that the size and sulfation rate of fucoidans influence their ability to induce pro-angiogenic processes independently of GAGs. We collected two fractions of fucoidans, Low and Medium Molecular Weight Fucoidan (LMWF and MMWF, respectively) by size exclusion chromatography and characterized their composition (sulfate, fucose and uronic acid) by colorimetric measurement and Raman and FT-IR spectroscopy. The high affinities of fractionated fucoidans to heparin binding proteins were confirmed by Surface Plasmon Resonance. We evidenced that LMWF has a higher pro-angiogenic (2D-angiogenesis on Matrigel) and pro-migratory (Boyden chamber) potential on HUVECs, compared to MMWF. Interestingly, in a GAG-free HUVECs model, LMWF kept a pro-angiogenic potential. Finally, to evaluate the association of LMWF-induced biological effects and its cellular uptake, we analyzed by confocal microscopy the GAGs involvement in the internalization of a fluorescent LMWF. The fluorescent LMWF was mainly internalized through HUVEC clathrin-dependent endocytosis in which GAGs were partially involved. In conclusion, a better characterization of the relationships between the fucoidan structure and its pro-angiogenic potential in GAG-free endothelial cells was required to identify an adapted fucoidan to enhance vascular repair in ischemia.

Keywords: fucoidan; glycosaminoglycans; glycocalyx; angiogenesis; endocytosis

1. Introduction

Glycosaminoglycans (GAGs) are linear and sulfated carbohydrate chains covalently bound to a protein core to form a proteoglycan (PG), including syndecans [1]. The GAGs are shaped of sulfated disaccharide units composed of galactose or glucuronic/iduronic acid and *N*-acetyl-glucosamine/-galactosamine. As major components of the glycocalyx, GAGs, which cover the luminal outermost endothelial cell layer, are involved in angiogenesis, inflammation, as well as in cell proliferation, adhesion and migration [2,3]. Thus, reorganization of microenvironment, damages and modifications in the endothelial glycocalyx, caused by ischemia are widely studied [4]. Highly sulfated GAGs, such as heparan sulfate, mostly bind the signaling proteins (cytokines, chemokines and growth factors) and allow their retention/release, therefore contributing to glycocalyx and extracellular matrix reorganization [5]. It is known that the interaction of GAGs with signaling proteins involves the negative charges of the sulfates. However, we have previously shown that the relation between GAG expression and their potential in regulation of angiogenesis is difficult to characterize, mainly caused by the heterogeneity of their chain structure, sulfation level and position. Moreover, we also showed that the GAGs expression is subjected to modulation of expression pattern in size and sulfation levels during ischemia, modifying their ability to bind proteins [6].

Fucoidan, a marine sulfated polysaccharide from brown seaweeds that has similar biological activities of heparin, has been shown to promote revascularization in a rat critical hindlimb ischemia [7] and re-endothelialization in rabbit intimal hyperplasia [8]. Its polysaccharidic structure is mainly composed by fucose and uronic acid units, and confers to the fucoidan some properties which are similar in a certain extent to endogenous GAGs. It is noteworthy that this natural GAG mimetic could have comparable affinities for heparin binding proteins, such as chemokines and growth factors [9]. Depending of the type and size of polysaccharide fragments, the fucoidan could have a pro-angiogenic activity by modulating the bioavailability of angiogenic cytokines in soluble or matrix-associated forms [10,11]. Recently, we demonstrated that the low molecular weight fucoidan (LMWF) modified the heparan sulfate expression pattern in modulating heparanase and syndecans expressions [12]. In addition, we have previously shown that the functionalized fucoidan present in three dimensional porous scaffolds was shown to retain the vascular endothelial growth factor (VEGF) and increased subcutaneous angiogenesis in mouse [13].

Upstream of developing a bio-engineering therapy based on fucoidan to regenerate damaged-vasculature, we propose the structure/function analysis to study its beneficial effect on angiogenesis and the endogenous GAG involvement in this process. Based on recent literature which showed the correlation between low molecular weight sulfated GAG-mimetics and their ability to regenerate damaged tissue [14], we hypothesized that the size and sulfation level of fucoidan could have an influence on cell migration and angiogenesis in glycocalyx-damaged human endothelial cells. We hypothesized that endogenous GAGs expression is altered in cardiovascular diseases and exogenous polysaccharides could modify the GAGs expression that we and others has already shown [12,15].

In our work we analyzed the correlation between the structure of the fucoidans and their functions on in vitro vascular network formation and endothelial cell migration in GAG-free human endothelial cells.

2. Results

2.1. LMWF and MMWF Fractions Collection and Characterization

2.1.1. Fractionation and Composition of ASPHY, MMWF and LMWF

A column of size exclusion chromatography was used to elute the crude fucoidan Ascophyscient (ASPHY, 4100 g/mol) and collect two fractions with different molecular weight (Table 1), a medium molecular weight fucoidan (MMWF, 26,600 g/mol) and a low molecular weight fucoidan (LMWF,

4900 g/mol). Polydispersity analysis showed a very homogeneous population distribution of both polysaccharides LMWF and MMWF, as compared to the heterogeneous crude ASPHY (Table 1 and Figure S1). The composition of the three fucoidans (ASPHY, MMWF and LMWF) was analyzed then to determine sulfate, fucose and uronic acid mass percentage using the colorimetric measurement. The results showed the presence of fucose, sulfate and uronic acid in different percentage rate, 29%, 25%, and 27% for ASPHY, 36%, 29%, and 14% for MMWF and 21%, 23%, and 18% for LMWF, respectively (Table 2). The average density of sulfates for each fucoidan was calculated with a molecular rate of sulfate per fucose unit and showed that all fucoidans displayed a high sulfation rate (>1). The highest sulfation rate was attributed to LMWF (1.55), as compared to MMWF (1.14) and ASPHY (1.22) (Table 2).

Table 1. Molecular weight determination of fractionated fucoidans by HPSEC-MALLS-dRI.

Fucoidans	Mn (g/mol)	M _w (g/mol)	Ip (M _w /Mn)
ASPHY	4100	10800	2.8 ± 0.6
MMWF	26,600	27,400	1.0 ± 1.2
LMWF	4900	5600	1.1 ± 1.2

Table 2. Composition of the fucoidans in fucose, sulfate, uronic acid and expression of the molar ratio sulfate/fucose.

Fucoidans	Fucose	Sulfate	Uronic Acid	Unknown	Ratio Sulfate/Fucose
ASPHY	29%	25%	27%	19%	1.22
MMWF	36%	29%	14%	21%	1.14
LMWF	21%	23%	18%	39%	1.55

2.1.2. Raman and Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analysis

Complementary to colorimetric measurement, the spectroscopic analysis of the three polysaccharides (ASPHY, MMWF and LMWF) was performed with Raman and Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy. The Raman band at 1458 cm⁻¹ was assigned to scissoring vibration of CH₂ and asymmetric bending vibration of CH₃ for absorption at around 1455 cm⁻¹, as suggested previously by Synytsya [16]. The Raman shoulder at 1360 cm⁻¹ is originated from symmetric bending vibration of methyl and the FT-IR spectroscopy band at 1389 cm⁻¹ could be the corresponding band already described at 1380 cm⁻¹ (Figure 1A,B). The main pyranoid ring vibrations (HCC, HCO and COH) were observed in Raman band at 1336 cm⁻¹, while COC stretching of glycosidic bonds and also CC and CO stretching covered the region located at 1200–900 cm⁻¹. In Raman the β-glycosidic linkages between monosaccharide units was described at 890 cm⁻¹. The characteristic band for sulfated polysaccharides attributed to asymmetric O=S=O stretching vibration (with some contribution of carbohydrate vibrations) was founded around 1253 cm⁻¹ in FT-IR and 1268 cm⁻¹ in Raman, although symmetric O=S=O stretching of sulfate was founded at 1082 cm⁻¹ in Raman [17]. The Raman spectra of the three samples of fucoidans showed that LMWF exhibited a strong vibration at 1082 cm⁻¹ and 1268 cm⁻¹ compared to MMWF. For both LMWF and MMWF spectra, the Raman band at 845 cm⁻¹ was attributed to COS bending vibration of sulfate substituents at the axial C2 and the equatorial C4 positions [18], both the 722 cm⁻¹ and 820 cm⁻¹ bands were attributed to the angular deformations of CH bonds. Otherwise the Raman band at 577 cm⁻¹ and 540 cm⁻¹ were attributed to the asymmetric and symmetric O=S=O deformation of sulfates [19]. The FT-IR analysis in D₂O revealed the intensity of carboxylic groups (COO⁻) at the band 1609 cm⁻¹ for LMWF and MMWF and 1598 cm⁻¹ for ASPHY (Figure 1B). The data exhibited stronger intensities in the crude ASPHY and fractionated LMWF, as compared to MMWF.

In the next part of our work, in order to study the structure/function correlation of fucoidans, we analyzed the impact of ASPHY, MMWF and LMWF size and sulfation rate on human endothelial cell viability, angiogenesis and migration.

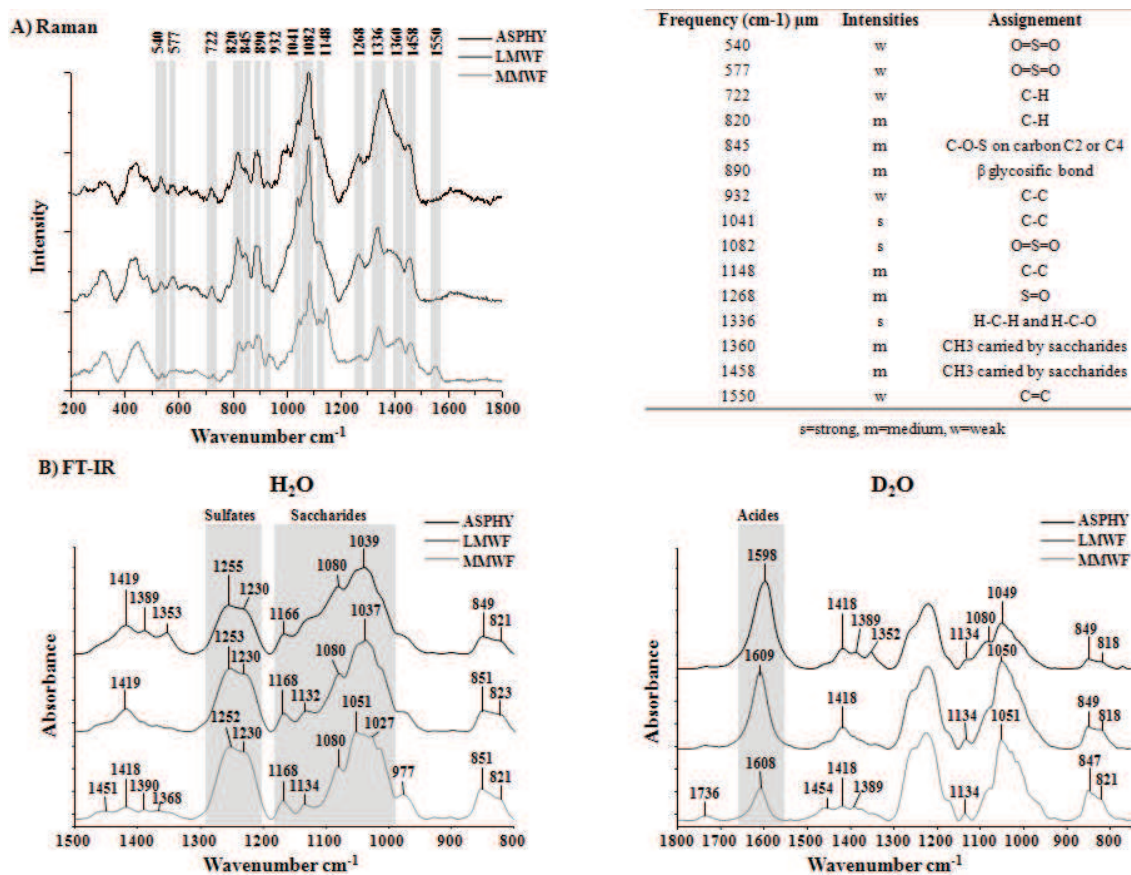


Figure 1. Raman and Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy analysis. Fucoidan spectra are represented in black for crude Ascophyscient (ASPHY), dark grey for the low molecular weight fucoidan (LMWF) and light grey for the medium molecular weight fucoidan (MMWF) for (A) Raman and (B) FT-IR (in H₂O and in D₂O). The numbers indicates the characteristics bands for polysaccharides.

2.2. Biological Effects of LMWF and MMWF in GAG-Free Endothelial Cells

2.2.1. LMWF and MMWF Affinities towards Heparin-Binding Proteins

We measured and compared the affinity of all the fucoidans towards the heparin-binding proteins (HBP) stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES/CCL5) and vascular endothelial growth factor (VEGF) by Surface Plasmon Resonance analysis. We used a low molecular weight heparin (LMWH) and a non-sulfated dextran (Dextran) as positive and negative control, respectively. Our data showed a characteristic model with a rapid association of the polysaccharide to the HBP and a slow dissociation as we have previously described [20] (Figure 2A–C). The results confirmed the direct interaction between fucoidans and HBP, characterized by an affinity KD (Kd/Ka), for SDF-1/CXCL12 (8.2×10^{-11} M for ASPHY, 1.4×10^{-10} M for MMWF and 8.4×10^{-11} M for LMWF) (Figure 2A), for RANTES/CCL5 (5.4×10^{-9} M for ASPHY, 4.7×10^{-9} M for MMWF and 2.1×10^{-9} M for LMWF) (Figure 2B) and for VEGF (8.1×10^{-10} for ASPHY, 2.3×10^{-10} for LMWF and 1.9×10^{-10} for MMWF) (Figure 2C).

There were no significant differences between the affinities of all fucoidans towards SDF-1/CXCL12 and RANTES/CCL5 and the affinities of LMWH (1.0×10^{-10} M, 1.4×10^{-8} M and 5.2×10^{-11} M respectively).

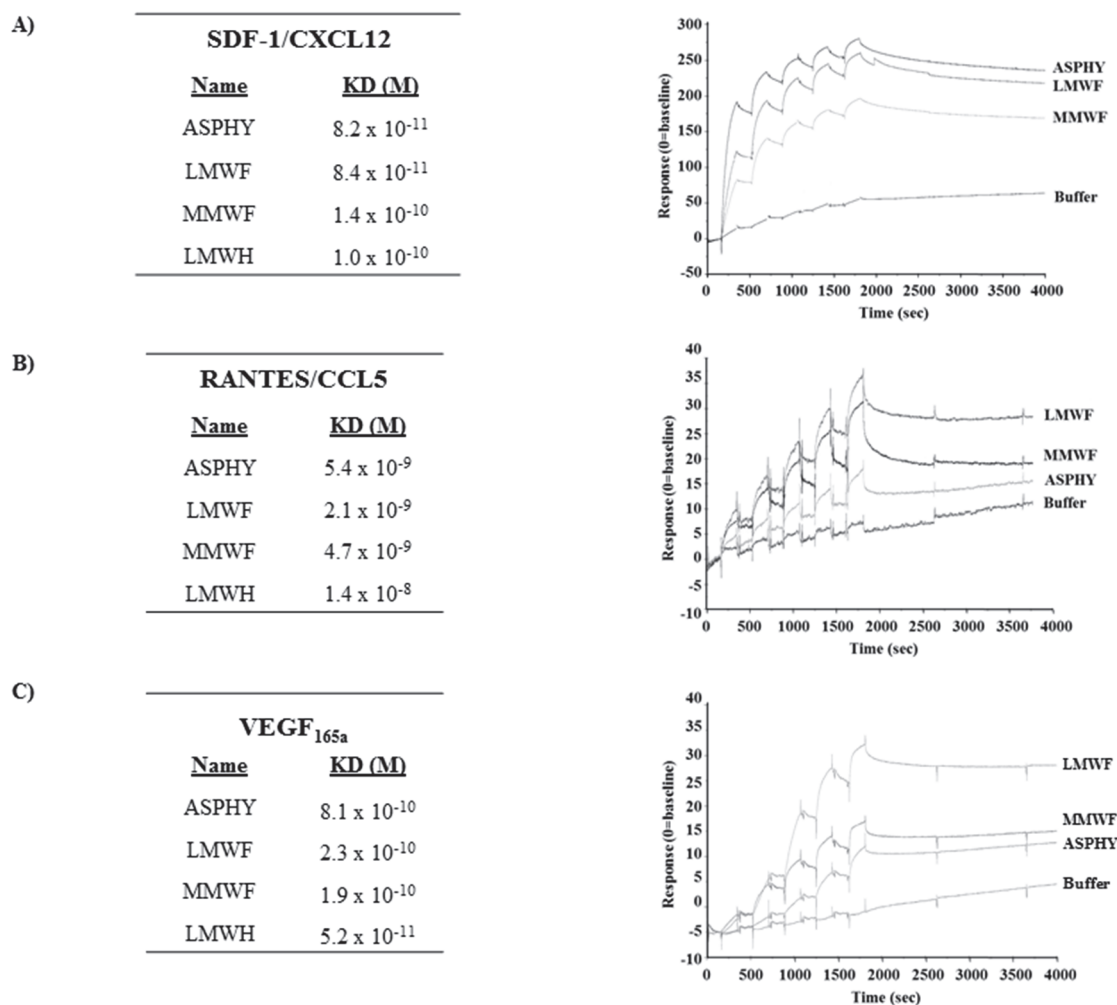


Figure 2. Affinity measurement of fucoidans to SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 and VEGF. The binding responses of ASPHY, MMWF, LMWF and low molecular weight heparin (LMWH) to SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 and VEGF were measured by Surface Plasmon Resonance. We immobilized biotinylated SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 or VEGF on streptavidin chip. Each polysaccharide was injected over flow of a BIAcore sensor chip pre-coated with streptavidin biotinylated SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 or VEGF. Each set of sensorgrams was obtained by injecting increasing concentration of polysaccharides (1.2, 3.7, 11.1, 33.3, and 100 nM). The response unit (RU) was recorded as a function of time (sec) and the affinities are expressed in molar (M) with the equilibrium dissociation constant KD (Kd/Ka). LMWH was used as a positive control of sulfated polysaccharide whereas non-sulfated dextran was used as a negative control (not shown). Affinity of polysaccharides to (A) SDF-1/CXCL12; (B) RANTES/CCL5 and (C) VEGF, and their corresponding representative sensorgrams.

2.2.2. LMWF and MMWF Effects on Endothelial Cell Viability

We first studied the effects of fucoidans on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) viability using metabolic activity MTT test (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) after 24, 48, and 72 h of ASPHY, MMWF and LMWF treatments. Our results demonstrated that all fucoidans showed no toxicity for HUVECs from 1 to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, as compared to untreated cells (Figure 3 and data not shown). There was a light increase of cell viability after 24 h of LMWF treatment at 10, 100, and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 3A,C). However, only the highest concentration of MMWF at 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ increased the HUVEC viability (Figure 3B). At 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LMWF increased the HUVEC viability (Figure 3C), but ASPHY and dextran did not have any effect on HUVEC viability at this concentration

(Figure 2C and data not shown). In addition, there was no increase of HUVEC viability after 48 and 72 h of fucoidan treatment (data not shown). This assay established the viable culture conditions to measure angiogenesis and cell migration assays where we decided to use the fucoidans to analyze its biological activities at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and up to 24 h of fucoidan treatment.

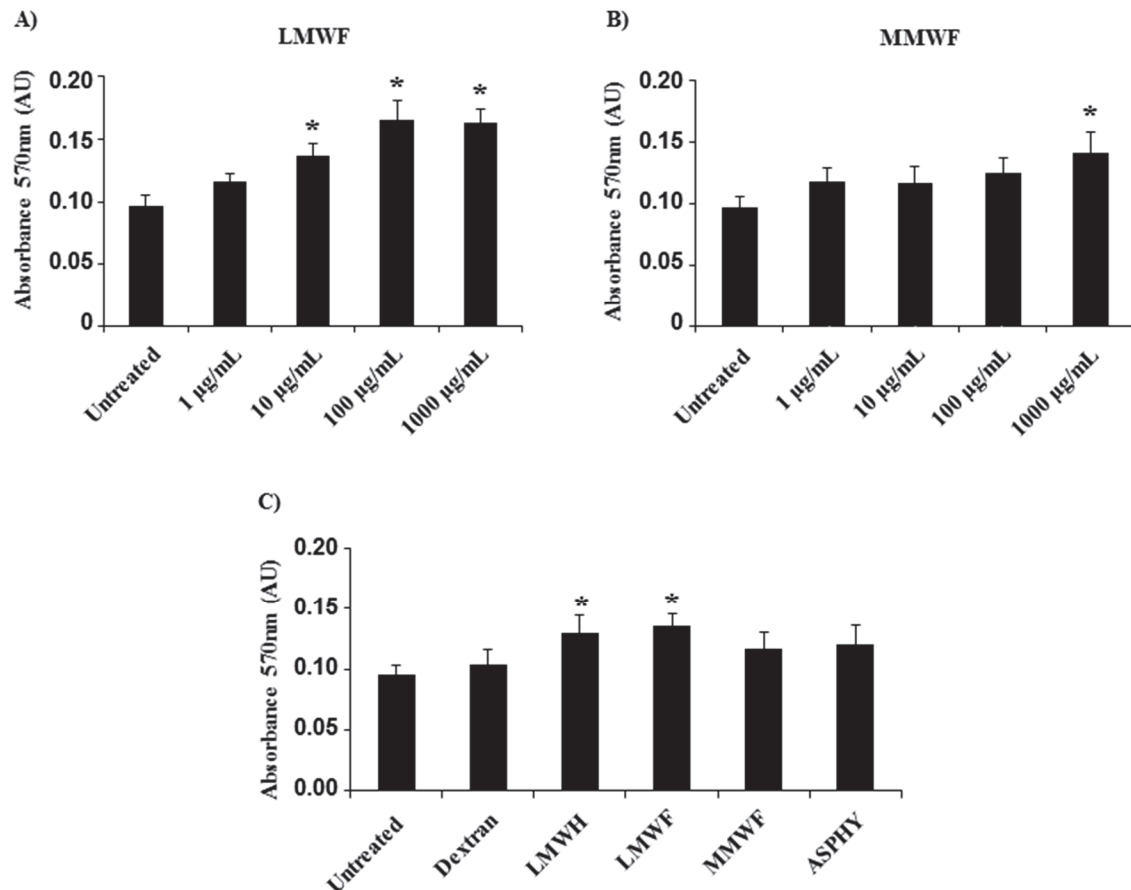


Figure 3. Effect of fucoidans on cell viability. The viability of HUVECs was analyzed by using MTT assay after fucoidan treatment for 24 h. The absorbance was read with a spectrophotometer (at 570 nm). HUVECs were incubated with (A) LMWF and (B) MMWF at increasing concentration (1, 10, 100, and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (C) HUVECs were incubated 24 h with polysaccharides (dextran, LMWH, LMWF, MMWF and ASPHY) at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Values are expressed as means \pm SEM ($n \geq 3$). AU-Arbitrary units. * $p < 0.05$ versus Untreated.

2.2.3. LMWF and MMWF Effects on Angiogenesis In Vitro

In order to analyze the fucoidan structure/function relation in the angiogenesis processes, we established a 2-dimensional (2D) vascular network formation assay on Matrigel in vitro. The pro-angiogenic potential of ASPHY, MMWF, and LMWF at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on HUVECs was analyzed as the percentage of cellular connection resulting in nodes formation per well at 6 h of incubation. Our results showed the significant increase of nodes formation by $56\% \pm 16\%$ and by $57\% \pm 12\%$, after LMWF and LMWH treatments, respectively, as compared to control (Figure 4A, black bars). However, dextran, MMWF and ASPHY did not induce any changes in node formation (Figure 4A).

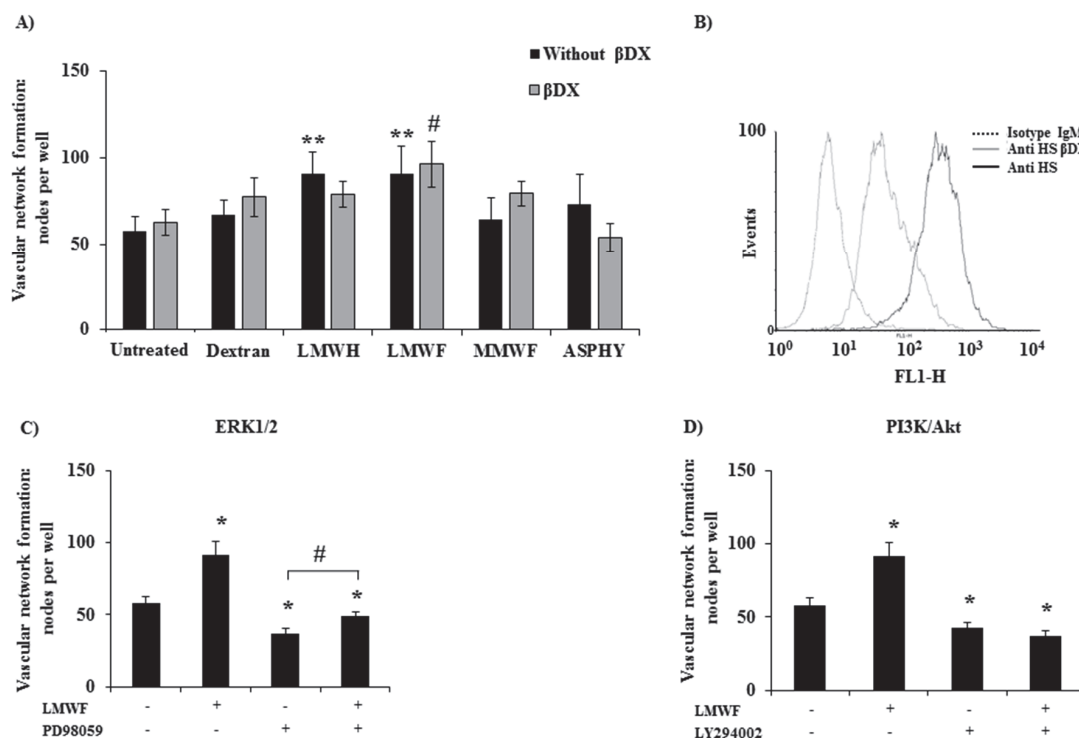


Figure 4. Pro-angiogenic potential of fucoidans on GAG-free HUVECs. (A) HUVECs pre-treated or not with β DX (4-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranoside) were seeded on Matrigel and incubated with dextran, LMWH, LMWF, MMWF or ASPHY for 6 h. The cells were then stained with Hemalun Mayer's and photographed for analysis. Values are expressed in number of nodes per well. ** $p < 0.01$ LMWF or LMWH versus Untreated (all without β DX). # $p < 0.05$ LMWF versus Untreated (all with β DX); (B) Endogenous GAGs expression analyzed by flow cytometry on HUVECs pre-treated or not 48 h with β DX; (C) PD98059, a pharmacological inhibitor of ERK1/2 and (D) LY294002, a pharmacological inhibitor of PI3K/AKT were added in HUVEC culture, then HUVECs were seeded on Matrigel for 6 h and vascular network formation was observed as described before. Values are expressed in nodes per well ($n \geq 3$). * $p < 0.05$ LMWF, PD98059, LY294002, LMWF + PD98059, LY294002 + LMWF versus Untreated; # $p < 0.05$ LMWF + PD98059 versus PD98059.

Recently, Kim et al. [21] reported that fucoidan from *Laminaria japonica* acts synergistically with fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in promoting HUVEC angiogenesis by AKT signaling pathways via activation of the p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathways. Based on these results, we performed the Western Blot analysis to verify whether MAPK/Erk1/2 or PI3K/AKT signaling pathways are implied in the pro-angiogenic effect of LMWF. To this aim, we incubated the cells with two pharmacological inhibitors PD98059 (for MAPK/Erk1/2) and LY294002 (for PI3K/AKT) before adding LMWF to cell culture. Our data attested that these two inhibitors significantly reduced the number of LMWF-induced nodes, by $46\% \pm 4.6\%$ for PD98059 and by $59\% \pm 5.8\%$ for LY294002, and evidenced the involvement of these signaling pathways in LMWF-induced angiogenesis from *Ascophyllum nodosum* (Figure 4C,D).

We have previously shown that fucoidan treatment can influence the syndecan-1/-4 and the glycosaminoglycan (GAG) expression level in HUVECs [12]. Since GAGs have been demonstrated to play an important role in angiogenesis processes, we studied the endogenous GAGs involvement in LMWF pro-angiogenic response. We established a GAG-free HUVEC model through the 4-nitrophenyl- β -D-Xylopyranoside (β DX) cell treatment for 48 h to inhibit GAG elongation. The efficiency of β DX on endogenous GAG abolition was verified by flow cytometry (Figure 4B). In these conditions, LMWF increased the vascular network formation by $53\% \pm 13\%$, whereas ASPHY, MMWF, LMWH and dextran had no effect (Figure 4A, grey bars). These results were similar with

those obtained in basic condition with HUVECs expressing GAGs ($56\% \pm 16\%$), demonstrating that the β DX treatment did not affect LMWF-induced angiogenesis.

These data suggests that endogenous GAGs were not involved in LMWF-induced angiogenesis, highlighting that LMWF had still a pro-angiogenic effect even in GAG-free condition.

2.2.4. LMWF and MMWF Effects on HUVEC Migration In Vitro

To study the LMWF-migratory potential on HUVECs we assessed cell migration in a Boyden chamber. The HUVECs were incubated with ASPHY, MMWF or LMWF in the upper chamber (insert) and allowed to migrate through fibronectin-coated $8 \mu\text{m}$ -porous membrane to the lower chamber. The results showed a significant increase in HUVEC migration by $35\% \pm 16\%$ for ASPHY, by $40\% \pm 11\%$ for LMWF and by $36\% \pm 7\%$ for LMWH, while MMWF and dextran did not have any effect on HUVEC migration (Figure 5).

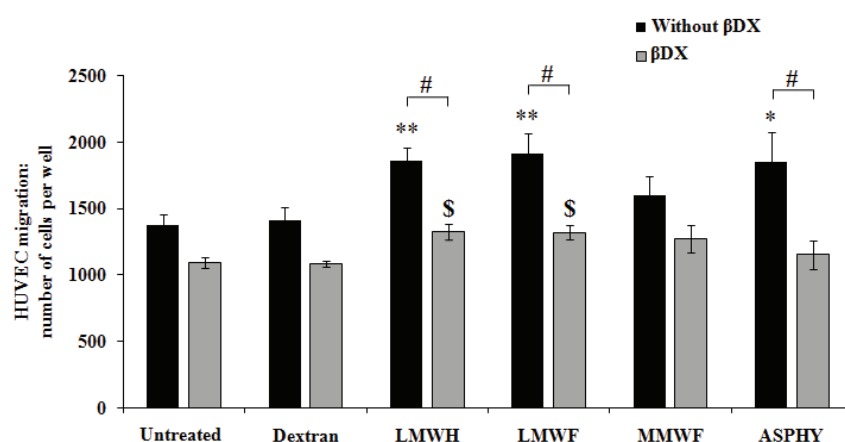


Figure 5. Pro-migratory potential of fucoidans on GAG-free HUVECs. HUVECs were seeded and incubated 24 h in the upper chamber with the polysaccharides dextran, LMWH, LMWF, MMWF or ASPHY at $10 \mu\text{g}/\text{mL}$. The basal migration was performed in complete medium with 12% FBS. In the aim to remove the GAGs, the cells were pre-treated with β DX for 48 h, then the migration assay was performed with the same treatments as described above. The cells were fixed, stained with Mayer's hemalun solution and counted after migration. Values are expressed as cell number per well. * $p < 0.05$ ASPHY versus Untreated (all without β DX); ** $p < 0.01$ LMWH and LMWF versus Untreated (all without β DX); \$ $p < 0.05$ LMWH and LMWF versus Untreated (all with β DX); # $p < 0.05$ LMWH and LMWF and ASPHY (all without β DX) versus LMWH and LMWF and ASPHY (all with β DX).

Then we analyzed the involvement of endogenous GAGs in the pro-migratory effect of fucoidans. HUVECs were treated with β DX for 48 h and seeded in the upper chamber to obtain cell migration in GAG-free conditions. Our result showed that in this GAG-damaged condition, the effects of LMWF and LMWH on cell migration were significantly reduced by $31\% \pm 4\%$ and $29\% \pm 4\%$, respectively. Both, LMWF and LMWH induced the migration in a light manner by $21\% \pm 5\%$ and $22\% \pm 5\%$, respectively (Figure 5), suggesting that GAGs were partially involved in fucoidan-induced endothelial cell mobility.

In summary, LMWF was able to induce endothelial cell migration in Boyden chamber and this activity required the expression of endogenous GAGs to be fully effective.

2.3. Cellular Uptake of LMWF-Alexa in Endothelial Cells

2.3.1. Regulation of LMWF Cell Uptake: Involvement of Endogenous GAGs

Very little is known about fucoidan localization and cellular uptake, which can be involved in HUVEC migration and vascular network formation. The fucoidan's mechanism of action on the cells is

still not well understood, however, heparin is known to be accumulated and internalized in endothelial cells by clathrin-mediated endocytosis [22] and it has been shown that the internalization pathway is related to the size of the polysaccharides [23].

A fluorescent LMWF was designed by coupling the LMWF with a red fluorophore Alexa Fluor 555 (LMWF-Alexa). This technique allowed us to analyze the LMWF-Alexa cell uptake at physiological temperature (37 °C) and at low temperature (4 °C) that slow down the cell activity linked to membrane fluidity, dynamics and cell trafficking, thus reducing endocytosis. We measured the LMWF-Alexa accumulation in vesicle-like spots in HUVECs by the quantification of the red fluorescence intensity by confocal microscopy (Figure 6A). These vesicles-like spots reminded membrane movements similar to endocytosis. The control conditions were performed with Dextran-FITC (green fluorescence) and Alexa Fluor 555 (Alexa) alone (red fluorescence). The intracellular fluorescence was detected from 30 min of HUVEC incubation with LMWF-Alexa and reached the maximum of fluorescence intensity at 2 h of incubation at 37 °C. There was a very weak signal of fluorescence intensity detected for Dextran-FITC and Alexa alone at 2 h of incubation at 37 °C (Figure 6A, right panel). In addition, the LMWF-Alexa cell uptake was significantly decreased by $90\% \pm 2\%$ at 2 h of incubation at low temperature at 4 °C (Figure 6A, left panel). These results evidenced the implication of the molecular chain structure of fucoidan (as compared to non-sulfated-dextran), membrane fluidity and dynamics in HUVEC uptake. The fluorescence intensity did not change after 2 h of incubation (Figure 6C, black bars and data not shown) showing that the maximum of cell capacity of LMWF-Alexa uptake was reached at 2 h of incubation at 37 °C (Figure 6C, black bars).

We then used the HUVEC GAG-free model and tested the influence of endogenous GAG on LMWF-Alexa cell uptake up to 6 h. We performed an enzymatic degradation of the GAG using the heparinases I, III and chondroitinase ABC mix-solution (H/C) instead of long term culture with β DX treatment which was more appropriate for longer assays (from 6 h up to 24 h). The total endogenous GAG degradation was confirmed by flow cytometry (Figure 6B). Our results showed that the HUVEC pre-treated with H/C solution decreased significantly the fluorescence intensity by $40\% \pm 10\%$ at 2 h of LMWF-Alexa incubation (Figure 6C, grey bars). Interestingly, H/C treatment (for GAG degradation) slow down the LMWF-Alexa cell uptake and the maximum fluorescence intensity was reached at 6 h of incubation at 37 °C. These results suggested that LMWF-Alexa cell uptake reached the saturable capacity of cells internalization starting from 2 h of incubation and the endogenous GAGs are involved but not exclusive to regulate this process. In order to determine the mechanism of LMWF internalization in HUVECs we analyzed the different endocytic pathways.

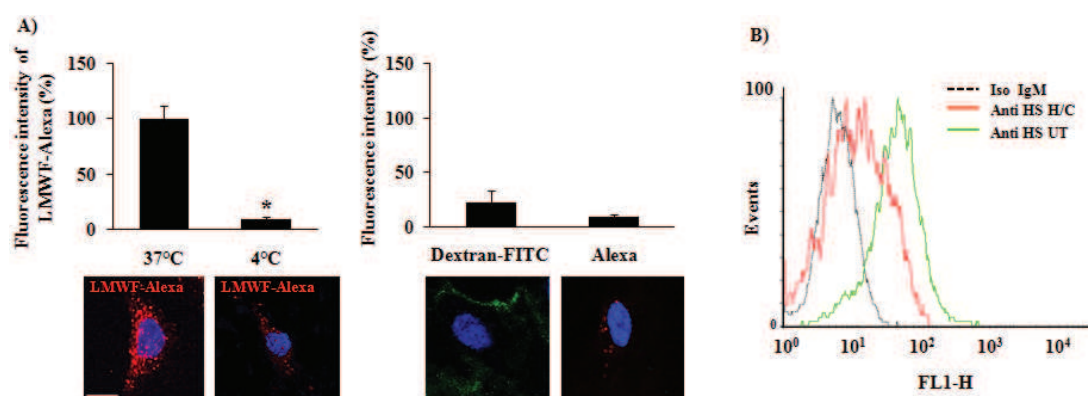


Figure 6. Cont.

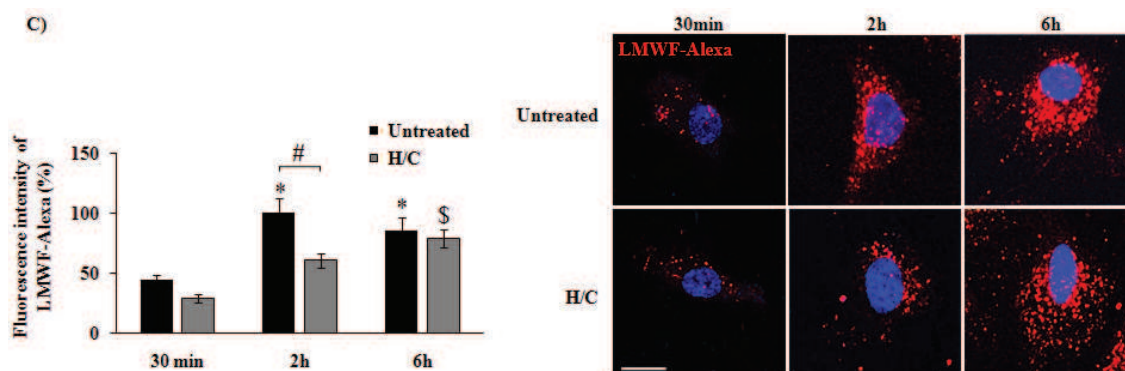


Figure 6. LMWF-Alexa localization in HUVECs by confocal microscopy. LMWF was previously coupled with the fluorophore Alexa Fluor 555. (A) LMWF-Alexa was added in HUVEC culture medium at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ during 2 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ and 4 $^{\circ}\text{C}$. Dextran-FITC and Alexa fluor alone (Alexa) were used as negative control. Pictures were taken by confocal microscopy and the intensity of the accumulated fluorescence per cell was quantified by using specific quantification software (DAPI—blue, LMWF-Alexa—red, Dextran-FITC—green, bar = 10 μm). Values are expressed as percentage of the intensity. * $p < 0.01$ 37 $^{\circ}\text{C}$ versus 4 $^{\circ}\text{C}$; (B) Endogenous GAGs expression on HUVECs treated by heparinase I, II, and III and chondroitinase ABC (H/C); (C) LMWF-Alexa was incubated with HUVECs (30 min, 2 h, and 6 h) with or without heparinase I, II, and III and chondroitinase ABC (H/C) and the intensity of fluorescence per cell was measured by flow cytometry. Values are expressed as percentage of the intensity normalized on the maximum intensity reached at 2 h. The right panel shows the confocal observation. (DAPI—blue, LMWF-Alexa—red, bar = 10 μm). * $p < 0.05$, 2 h, and 6 h versus 30 min (all Untreated with H/C); \$ $p < 0.05$, 6 h versus 30 min (all treated with H/C); # $p < 0.05$, 2 h of treated with H/C versus 2 h of Untreated.

2.3.2. Mechanism of LMWF Uptake: Implication of Clathrin

In this last part of our work we analyzed the mechanism of LMWF-Alexa endocytosis at 2 h of incubation using two specific markers of the receptor-dependent and receptor-independent endocytic pathways, clathrin and caveolin-1, respectively. We realized a co-localization assay of LMWF-Alexa (red fluorescence) with clathrin or caveolin-1 (green fluorescence) using confocal microscopy. A merge of the green and red fluorescent pictures were performed to see the co-localization of LMWF-Alexa with clathrin or caveolin-1. The fluorescence intensity per cell was quantified and the co-localization level was measured by scoring the proportion of red spots on green spots. The results showed that LMWF-Alexa was co-localized with clathrin at $70\% \pm 6\%$ (Figure 7A, upper panel, arrows in the merge), but less co-localization was observed with caveolin-1 at $27\% \pm 7\%$ (Figure 7A, lower panel, merge). This result suggested that LMWF-Alexa was mainly internalized by HUVECs in a clathrin-mediated endocytosis at 2 h of incubation.

To confirm this observation we used specific inhibitors of the major endocytic pathways: (a) the Cytochalasin D (CytD), inhibitor of F-actin which acts on macropinocytosis/phagocytosis; (b) the dynasore inhibitor of the GTPase activity of dynamin which prevents the clathrin-coated pit formation and (c) the filipin which binds to cholesterol and inhibits the formation of lipid rafts and caveolin-vesicles. Our data demonstrated that at 2 h of incubation, the accumulation of LMWF-Alexa was decreased by $49\% \pm 6\%$ in presence of dynasore, as compared to control (Figure 7B), however there was no changes of LMWF-Alexa cell uptake after CytD and filipin treatments. The transferrin was used as a positive control of clathrin-mediated endocytosis, and the results showed that the dynasore treatment decreased its cell uptake by $63\% \pm 4\%$ (Figure S2).

In conclusion, our data evidenced that LMWF was internalized in HUVECs in a clathrin-dependant endocytosis.

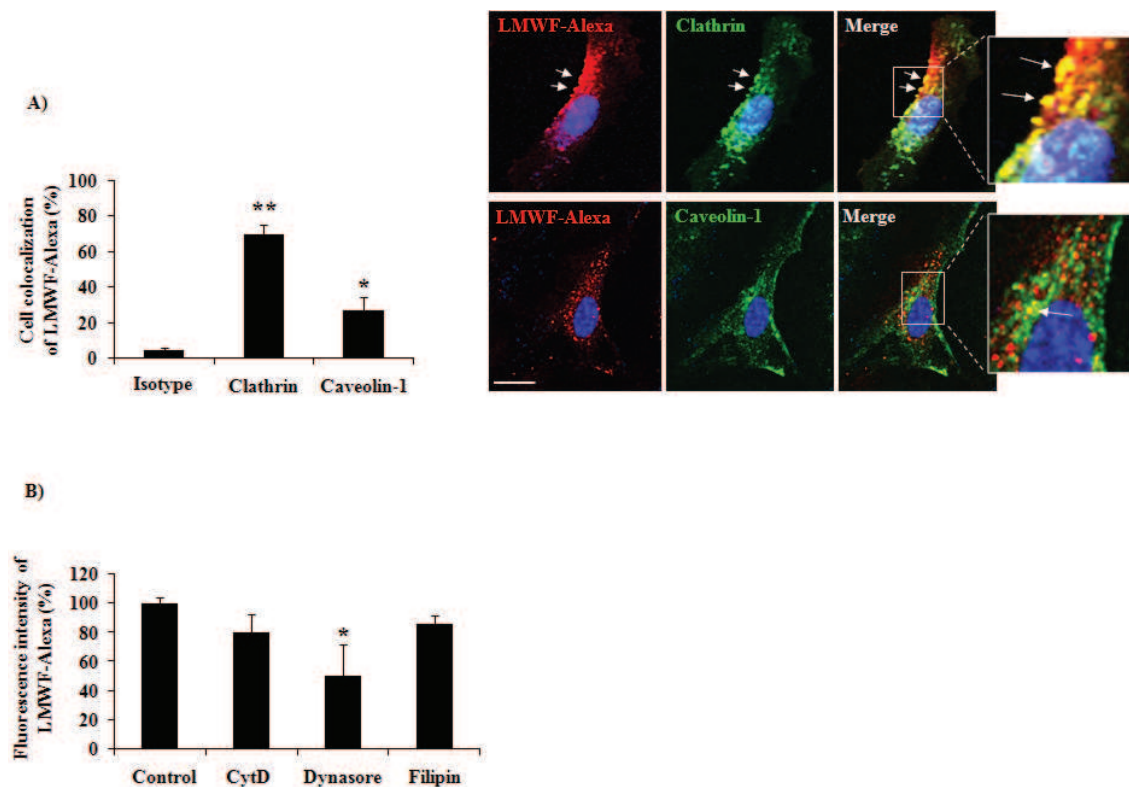


Figure 7. Internalization pathways of LMWF-Alexa in HUVECs analyzed by confocal microscopy. (A) HUVECs were incubated 2 h with LMWF-Alexa, fixed, permeabilized and the clathrin or caveolin-1 was revealed by immunofluorescence. A non-specific isotype of immunoglobulin was used as negative control (Isotype). The pictures were taken by confocal microscopy and the staining overlapped in merge (DAPI—blue, LMWF-Alexa—red, Clathrin—green, bar = 10 μ m) high view inserts. The intensity of the fluorescence was quantified and the co-localization of markers was measured with the rate red/green represented in the histogram and dot plots. The intensity of fluorescence in HUVECs was quantified using specific software. * $p < 0.05$ Caveolin-1 versus Isotype; ** $p < 0.01$ Clathrin versus Isotype; (B) HUVECs were pre-treated or not (control) with specific inhibitors of endocytosis: Cytochalasin D (CytD—inhibits phagocytosis and micropynocytosis), Dynasore (inhibits clathrin mediated endocytosis) and Filipin (inhibits lipid raft formation) before adding LMWF-Alexa in the culture medium for 2 h. The intensity of fluorescence by cells was quantified as described above. * $p < 0.05$ Dynasore versus Control.

3. Discussion

3.1. Structure-Function Correlation

For decades, natural marine sulfated fucanes named fucoidans, demonstrated anti-coagulant [24,25] and anti-thrombotic [9,26] effects comparable to heparin. We have previously shown that the fucoidans have therapeutic potential in cardio-vascular diseases in animal models with an important role in preventing intimal hyperplasia [8,27] and promoting revascularization after ischemia development [7]. We and other studies have shown the therapeutic effects of low molecular weight fucoidans (LMWF) on angiogenesis in vitro and in vivo [10–13,21,28].

Fucoidans are heterogeneous sulfated polysaccharides (size, composition and degree of sulfation), which can be obtained from different brown algae, such as *Laminaria saccharina*, *L. digitata*, *Fucus evanescens*, *F. serratus*, *F. distichus*, *F. spiralis*, and *Ascophyllum nodosum*. Their structural diversity has been widely analyzed and described, highlighting an average structure based on a linear sulfated poly-fucose backbone with sometimes a few amount of uronic acids and traces of galactose and xylose. Many reports evidenced relationship between the structural features of fucoidans and their

most potent biological activity, the widely admitted role of the molecular weight, and the sulfate groups content and distribution closely depending on the starting material and the method of preparation [9,25,29,30]. Thus, to conclude about structure-activity relationships could be tricky when considering different fucoidan fractions from the same origin. This is precisely well illustrated by works about the anti- and pro-angiogenic activity. Pomin et al. evidenced that fucoidans from various origins exhibit an anti-angiogenic activity due to their ability to interfere with Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and basic Fibroblast growth factor (FGF-2) [30]. However, Matou et al. showed the pro-angiogenic effect of fucoidans, also extracted from *A. nodosum*, by enhancing the expression of α_6 , β_1 integrin subunits and platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) on the surface of endothelial cells, resulting in an increase of FGF-2-induced angiogenesis [10]. Recently, Nifantiev et al. reviewed numerous studies on the angiogenic activities of fucoidans from different brown algae to highlight structure-activity relationships. They could only conclude that fucoidan fractions from *A. nodosum* with high molecular weight ($>30,000$ g/mol) exhibited anti-angiogenic activity whereas fucoidan fraction with low molecular weight ($<30,000$ g/mol) exhibited pro-angiogenic activity [31].

Furthermore, the heterogeneity in structure and composition of fucoidans appeared to correlate with heterogenous activities and the relation between the sulfate content and their anti-coagulant and anti-thrombotic potential was demonstrated by Ustyuzhanina et al. [32]. In this study, a native fucoidan with a degree of sulfation of 1.3 (*Saccharina latissima*) showed stronger activities than higher sulfated fucoidan from the same species, rather than other native fucoidans with a lower sulfation degree of 0.9 or 0.4 (*Fucus vesiculosus* or *Cladosiphon okamuranus*, respectively).

Only few publications presented the fucoidan effects on angiogenesis in endothelial cells or in cancer cells under hypoxic conditions. Chen et al. showed that a low molecular weight fucoidan (LMWF) obtained from *Sargassum hemiphyllum* ($M_w = 760$ g/mol, 40% sulfate) dose-dependently reduced hypoxia effect on VEGF-induced capillary tube-like structure formation in Human Umbilical Endothelial Cells (HUVEC) in vitro, and did not affect angiogenesis under normoxic condition [33]. In addition, they showed that LMWF treatment inhibited the migration and invasion of hypoxic Human Bladder Cancer Cells (T24). Interestingly, they suggested that under hypoxic conditions, the anti-angiogenic activity of LMWF in bladder cancer may be associated with suppressing Hypoxia-Induced Factor-1 (HIF-1)/VEGF-regulated signaling. Their experiments were performed in presence with both VEGF and fucoidan and it is well established that there are electrostatic interactions between negative charges from fucoidan and positive charges from VEGF, leading to depletion of both molecules that can explain their anti-angiogenic results. Cho et al. investigated the role of a fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* (M_w and composition non mentioned) [34]. They showed the decrease on Hepatocellular Carcinoma Cell (HCC) invasion in normoxic and hypoxic conditions and showed that fucoidan suppressed cells proliferation and invasion in a NDRG-1/CAP43-dependent manner. Teng et al. demonstrated that fucoidan from *Undaria pinnatifida sporophylls* ($M_w = 104356$ g/mol, 21% sulfate) significantly inhibits cell invasion and lymphatic metastasis in a mouse hepatocarcinoma Hca-F cell line under hypoxic conditions by suppressing HIF-1 α /VEGF-C, which attenuates the PI3K/Akt/mTOR signaling pathways [35]. In conclusion, it is very difficult to compare these results with ours, since the experiments of Chen et al., Cho et al. and Teng et al. were performed with the fucoidans prepared from different seaweeds with different molecular weights, compositions and concentrations.

In this study, the characterization using Fourier Transform Infrared (FT-IR) and Raman Spectroscopy indicated that the crude ASPHY and the fractionated low and medium molecular weight fucoidans (LMWF and MMWF, respectively) demonstrated the characteristic bands of the O=S=O stretching vibration of sulfate, as determined through the observation of strong vibrational bands. The observation of the Raman band at 1268 cm^{-1} exhibited variations in intensity between the fucoidans with stronger band for LMWF. The Raman band of both LMWF and MMWF also exhibited vibrations at approximately 845 cm^{-1} , which indicates the presence of sulfate groups at positions 2 and 4, respectively. Bilan et al. [36] obtained similar findings for the fucoidan extracted from *Fucus serratus Linnaeus*.

The FT-IR spectra showed that the intensity of COO- groups is higher in ASPHY and LMWF than in MMWF that can be compared to the amount of uronic acid measured in the fucoidans (27%, 18%, and 14%, respectively).

The spectroscopic data related to sulfate and carboxylic groups of the fucoidans can be correlated to the sulfation rate and uronic acid content obtained with colorimetric measures.

The negative charges carried by these native sulfated polysaccharides allows electrostatic interactions with numerous positively charged proteins, such heparin binding proteins (HBP), shown with stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) [37] and growth factors, such as FGF-2 [10,38]. These interactions were thought to induce HUVEC cell migration and lead to new vessels formation in animal models of ischemia [7,13]. In the current paper, we showed that crude (ASPHY) and fractionated fucoidans from *A. nodosum* (MMWF and LMWF) bound to HBP (SDF-1/CXCL12, regulated on activated T cell expressed and secreted RANTES/CCL5 and vascular endothelial growth factor VEGF) with a high affinity. However, our results highlighted a tendency in the affinity between the fractionated fucoidans both highly sulfated (1.55 and 1.14) and two of the HBP SDF-1/CXCL12 and RANTES/CCL5. LMWF presents a higher sulfation rate and relative higher affinity (KD) for both, compared with MMWF, which owns a weaker KD with both. ASPHY and LMWF behave similarly considering the interaction with HBP. This result is in accordance with the hypothesis of the modulation of the affinity by the sulfation rate, however the difference in sulfate degree for LMWF and MMWF was probably not enough significant to distinguish strong variations in the affinity to bind HBP. We hypothesized that the molecular model of interaction of fucoidans with the HBP fixed on the chip was polyvalent and related to the fast association and the slow dissociation phases in accordance with previous study with the GAG-mimetics [20]. The hypothesis was proposed that the amino acids present in the binding site of SDF-1/CXCL12 (BBXB) to heparin can be similar to those which interact with fucoidans. We suggest for the further study the use of adapted sensorgram designed to measure the interaction of fucoidan with the HBP and compete with heparin on the heparin binding-site to validate this model. Structural studies could also evidence that the size of fucoidan is also an important criterion to discriminate its affinity to HBP by using a range of fucoidan owning the same degree of sulfation.

In Boyden chamber migration assay, both LMWF and ASPHY increased the HUVEC migration. The structural analysis of fucoidan could explain the reason why the native fucoidan had a pro-migratory activity similar to LMWF. As shown on the polydispersity measurement, ASPHY contains LMWF populations in majority as its molecular mass was measured at 4100 g/mol. We analyzed distinct effects on HUVEC migration influenced by LMWF and MMWF. These data suggested that the size of LMWF was important, as a high sulfation rate, for the sulfated polysaccharide to have a pro-migratory activity on HUVECs.

The same results were observed in 2 dimensional (2D) vascular network formation on Matrigel with LMWF which shown higher potential to induce nodes formation than MMWF. However the native fucoidan ASPHY did not shown any activity in this assay, demonstrating that the fucoidan activity analyzed in HUVEC migration could act in a different pathway than 2D angiogenesis assay. We also revealed in this study that 2D-angiogenesis induced by LMWF involved PI3K/AKT and the MAPK Erk1/2 pathways, in line with recent study that evidenced the activation of P-38 and JNK pathways [21].

In our studies we evidenced the role of the sulfate groups content and molecular weight of fucoidan fractions on their angiogenic properties, and we proposed some preliminary mechanisms. This is possible because the fractions were obtained from a reliable and reproducible industrial process, that constituted a prerequisite for relevant studies. Anyway these fractions remain complex mixtures of macromolecules and determining a complete structure-activity is a difficult task that we had undertaken.

3.2. Influence of the Endogenous GAGs in Pro-Angiogenic Effect of Fucoidans in GAG-Free HUVEC Migration

Beside, in this study we explored the role of endogenous GAGs fucoidan-induced angiogenesis and HUVEC migration. We hypothesized that in basal condition, fucoidan could act as an intermediate

actor between receptors and chemokines by increasing their concentration at the cell surface in co-operation with the endogenous GAGs. This interaction could enhance the formation of co-receptors (proteoglycans) and receptors complexes, their internalization and could lead to an amplification of the cell signal and response. While in absence of GAG expression, fucoidan could substitute the GAG function, prevent glycocalyx degradation and finally restore its function by enhancing the revascularization process. However, other hypothesis assumed that exogenous GAG-mimetics such as fucoidans, as they bind to HBP, could compete with endogenous GAGs for their binding sites leading to the inhibition of HBP activating pathways. Thus, suggesting that the pro-angiogenic activity of LMWF was not linked to its ability to bind HBP but mostly related to intrinsic activity.

We showed that LMWF still has a pro-migratory activity on HUVECs in GAG-free condition but in a lesser extent ($40\% \pm 11\%$ in basal condition versus $21\% \pm 5\%$ in GAG-free condition). These results were not found for 2D-angiogenesis assay in GAG-free condition, where LMWF still induced nodes formation in the same range than basal condition. Endogenous GAGs shown in this field to be partially required for the fucoidan activity. This suggests that fucoidan could acts independently, depending on the biological effect. Otherwise, it has been proposed that fucoidan acts as a competitor for endogenous GAGs while binding HBP with higher affinity [11]. Considering the high affinity of LMWF to HBP, this model could partially correlate with our results as the tendencies showed that LMWF has stronger effect when the GAGs are expressed.

3.3. Internalization of LMWF

Our results attested that fluorescent LMWF was internalized in 2 h in HUVECs and localized in a perinuclear region. These observations correlated with a previous study focused on the heparin internalization in vascular smooth muscle cells, where the biphasic endocytic pathway of this sulfated polysaccharide was demonstrated [22].

The delay observed in the accumulation of LMWF-Alexa between untreated and Heparinase/Chondroitinase treated HUVECs demonstrated that endogenous GAGs were necessary to internalize the LMWF in 2 h. We evidenced that this internalization was temperature and clathrin-dependent. Proteoglycans are mobilized to induce clathrin-mediated endocytosis, and LMWF, as GAG-mimetic, could also interact with proteoglycan core or HBP at the cell surface and could be internalized and finally induced the biological effects on endothelial cells.

Previous studies have shown the importance of the size of polysaccharide in their cellular fluid internalization pathways with fluorescent low molecular weight dextran (10,000 g/mol) internalized in a clathrin and dynamin mediated micro- and macropinocytosis while medium molecular weight dextran (70,000 g/mol) used the amiloride-sensitive and clathrin-independent macropinocytosis [23]. Lately soluble exogenous GAGs have been demonstrated to improve cellular uptake of coated peptide-DNA complexes and escape from endosomal pathway until final localization in perinuclear region [39]. As suggested by our results, LMWF showed higher pro-angiogenic effect than MMWF. We then chose the LMWF to study its internalization and the potential implication of the GAGs on these mechanisms, which could explain the particular biological effects of LMWF on endothelial cells. Further trafficking studies should be proposed in correlation with cell signaling pathways to determine more accurately the cellular and molecular effects of LMWF on endothelial cells and its role inside the cells (signaling pathways) to induce angiogenesis.

4. Experimental Section

4.1. Reagents

Alexa Fluor Succinimidyl Ester (NHS Ester) was furnished by Molecular Probes (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Transferrin-biotin labeled human (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) was furnished by Sigma-Aldrich and used as a positive control of clathrin-mediated endocytosis.

4.2. Pharmacological Inhibitors

LY294002 (Sigma-Aldrich), is an inhibitor of the PI3K signaling pathway and was used at 30 μM in cell culture. PD98059 (Sigma-Aldrich) is an inhibitor of the MAPKK MEK1 and MEK2 signaling pathway and was used at 30 μM in cell culture. Cytochalasin D (C8273, Sigma-Aldrich) is an inhibitor of the phagocytosis and micropinocytosis by depolymerizing actin-F and was used at 100 μM in cell culture for 2 h. Filipin (F9765, Sigma-Aldrich) is an inhibitor of the clathrin independent endocytosis which binds to cholesterol and blocking membrane movements. This inhibitor was used at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in cell culture for 1 h. Dynasore (D7693, Sigma-Aldrich) is an inhibitor of the clathrin mediated endocytosis by blocking the GTPase activity of dynamin and was used at 80 μM in cell culture for 30 min.

4.3. Enzymes and Glycosaminoglycan Substitute

βDX (4-Nitrophenyl $\beta\text{-D}$ -xylopyranoside, Sigma-Aldrich), a substitute of glycosaminoglycans (GAGs) was used as specific inhibitor of the GAG chain elongation. βDX was added at 2 g/mol for 48 h in HUVEC culture to inhibit the endogenous GAGs expression before assays. Heparinase I (5U, 1/100) from *Flavobacterium heparinum* (H2519), Heparinase III (10U, 1/50) from *Flavobacterium heparinum* (H8891), and chondroitinase ABC (10U, 1/50) from *Proteus vulgaris* were all obtained from Sigma-Aldrich and used 2 h at 37 °C to depolymerize endogenous GAGs in HUVEC culture before short time assays up to 6 h.

4.4. Antibodies

We used an antibody directed against heparan sulfate chains (Mouse IgM, Clone F58-10E4, AMS Biotechnology, Abingdon, UK) to observe their expression in flow cytometry CLTC is a primary antibody directed against clathrin heavy chain 1 (Mouse IgG1, Everest Biotech, Ramona, CA, USA). CAV-1 is a primary antibody directed against caveolin-1. PA5-17447 was obtained from Pierce (Rabbit IgG, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). The isotype Mouse IgG1 and the isotype Mouse IgM κ was obtained by BD Biosciences (BD Biosciences, Bedford, MA, USA), the isotype Rabbit IgG was produced by R&D (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). The secondary antibodies Goat anti Mouse IgG Alexa fluor 488 was produced by Santa Cruz Biotechnology and Goat anti Rabbit IgG Alexa fluor 488 were produced by Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

4.5. Polysaccharides

The crude fucoidan (ASPHY) was obtained from the marine alga species *Ascophyllum nodosum* (Algues & Mer, Ascophyscient, batch #ASPHY12399, Ouessant, France). The Ascophyscient fucoidan was previously characterized by our laboratory [40]. A 10,000 g/mol non-sulfated dextran (Dextran T-10, Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK) and a Dextran-FITC (TdB consultancy, Uppsala, Sweden) were chosen as negative controls. A low molecular weight heparin was used as a positive control (LMWH, $M_w = 6300$ g/mol, Tinzaparin sodium Innohep, Ballerup, Denmark).

4.6. Fractionation

The crude fucoidan ASPHY was fractionated using size exclusion gel. The column (XK 50/60, GE Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France, id: 50 mm, L: 50 cm) was prepared with Bio-Gel P60 (Bio-Rad, Marne-la-Vallée, France). 0.15 M NaCl and 0.02% (w/v) sodium azide were used as carrier after careful filtration through 0.45 μm -filter unit (Millipore, Billerica, MA, USA) at 1.5 mL/min flow rate. 10 mg of Ascophyscient[®] (30%, w/v) was eluted through the column and 100 mL were collected in several fractions. Then, the fractions were dialyzed five times against water (Spectra/Por, MWCO 1 kDa, Dominique Dutscher, Brumath, France) and freeze-dried. Each fraction was analyzed: fucose, uronic acid and sulfate rate were assessed by colorimetric assay and the molecular weight measured

using size-exclusion chromatography with multi-angle laser light scattering-differential refractive index detection (HPSEC/MALLS-DRI) system [40]. We collected and used two fractions from the elution, a low molecular weight fucoidan (LMWF, $M_w = 4,900$ g/mol) and medium molecular weight fucoidan (MMWF, $M_w = 26,600$ g/mol).

4.7. Raman Spectroscopy

Raman spectra were recorded with a commercial confocal Raman microspectrometer from 200 to 1800 cm^{-1} . A Horiba Scientific Xplora spectrometer was used at 660 nm excitation wavelength with 3 cm^{-1} spectral resolution. The Raman measurements were carried out in backscattering configuration through a $10\times$ objective (NA = 0.25). The incident laser power was measured at the sample position and set at 20 mW. Raman spectra were acquired during 60 s acquisition time and baseline corrected using Labspec software (HJY, Kyoto, Japan).

4.8. Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) spectra of the samples diluted either in D_2O (>99.8% purity, Euriso-Top, CEA, Saclay, France) or in H_2O solution were recorded on a Tensor 27 spectrophotometer (Bruker, Karlsruhe, Germany). Solutions were deposited between two ZnSe windows at a concentration of $333\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Experiments were performed by drying the samples and dissolving them in solution at pH ~7. Twenty scans were accumulated (spectral region $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, resolution 1 cm^{-1}). Data treatment was performed using the opus software and consisted of multiple point base line correction.

4.9. Surface Plasmon Resonance

Affinity of fucoidans for SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 or VEGF₁₆₅ was assessed with a BIAcore X100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Biotinylated-SDF-1/CXCL12, -RANTES/CCL5 or VEGF₁₆₅ was coupled to the surface of a SA sensor chip (carboxymethylated dextran with immobilized streptavidin for capture of biotinylated ligand). Biotinylated-SDF-1 ($20\text{ }\mu\text{L}$ of $5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ in HEPES buffer saline-50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, and 0.05% surfactant P-20) was then injected, at $5\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate, of the streptavidin-coated sensor chip to a resonance unit (RU) value of 110 for SDF1/CXCL12 and 235 for RANTES/CCL5. VEGF₁₆₅ was immobilized on a CM5 sensorchip with the BIAcore amine kit at 1913 RU. Non coupled surfaces were used as controls, 1 M NaCl was used to regenerate the sensor surface. Samples were diluted in running buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, and 0.05% P-20). We selected with the BIAcore control software: temperature ($25\text{ }^\circ\text{C}$), flow rate ($30\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$), contact time (180 s), and sample volume (GE Healthcare) in single cycle method. Samples were injected consecutively at 1.2, 3.7, 11.1, 33.3, and 100 nM. The affinities of fucoidan for SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 or VEGF₁₆₅ were determined using a 1:1 Langmuir model by analysis the kinetic of the association and dissociation with the BIAcore evaluation software.

4.10. Endothelial Cell Culture

Human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs, CRL-1730, ATCC, LGC Molsheim, France) were cultured in endothelial cell basal medium 2 (ECBM2, PromoCell, Heidelberg, Germany) supplemented with 12% fetal bovine serum, EGF (epidermal growth factor, $5.0\text{ ng}/\text{mL}$), hydrocortisone ($0.2\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$), VEGF (vascular endothelial growth factor, $0.5\text{ ng}/\text{mL}$), bFGF (basic fibroblast growth factor, $10\text{ ng}/\text{mL}$), R3 IGF-1 (insulin like growth factor, $20\text{ ng}/\text{mL}$), ascorbic acid ($1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) and antibiotics (penicillin-streptomycin, 1%, Invitrogen, Cergy, France) at $37\text{ }^\circ\text{C}$ in 5% CO_2 . HUVECs were cultured at 60%–90% of confluence. The media were changed twice a week. The presence of growth factors such as VEGF, EGF, bFGF and IGF-1 in the culture medium of HUVECs, mimics the angiogenic conditions of in vitro cultures. We removed the heparin from the supplemented kit when the fucoidan treatment was performed, since heparin as a sulfated polysaccharide, could be considered as a competitor of fucoidan because of its structural and functional homologies.

4.11. Flow Cytometry

The level of heparan sulfate on HUVEC cell surface was quantified by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Cells were pre-incubated for 1 h at 4 °C with anti-heparan sulfate antibody (10 µg/mL, Clone 10E4) or with isotypes (IgM). After washing, cells were labeled for 30 min at 4 °C with streptavidin-Alexa Fluor 488 complex (1/200, Molecular Probes, Invitrogen). Cells were fixed in 1% paraformaldehyde and analyzed with a FACScan (Becton Dickinson, Le Pont de-Claix, France).

4.12. Cell Viability Assay

The viability of HUVECs was demonstrated using MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich). 5000 cells/well were incubated in a 96-wells plate for 24, 48, and 72 h with or without polysaccharides (LMWF, MMWF and ASPHY) at increasing concentration (1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL and 1000 µg/mL). LMWH and dextran were used as a control at 10 µg/mL. MTT solution at 1 mg/mL was added to the medium for 2 h and coloration was revealed in DMSO. The metabolic activity was correlated by the absorbance read at 570 nm with a photometer (Bio-rad[®] Microplate reader, Model 680).

4.13. Cell Migration Assay

HUVEC migration was performed with Bio-coat cell migration chambers (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) as described [26]. Briefly, inserts were coated with fibronectin (100 µg/mL, BD Biosciences). The polysaccharides (LMWF, MMWF, ASPHY, Dextran or LMWH) were added directly in the upper chamber at 10 µg/mL with 40 × 10⁴ cell/wells in 500 µL of complete medium for 24 h. The lower chamber was filled with 500 µL of complete medium. The cytokines naturally contained in the complete medium were considered as basal inducer of chemotaxis migration. To test the role of endogenous GAGs, the cells were pre-incubated 48 h with βDX, and kept in inhibition condition for the experiment. Twenty-four hours later, medium and cells in the upper chamber were gently removed. Migrated cells in the lower chamber were fixed with methanol and stained with Mayer's hemalun solution (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany). The cells were counted manually by two different observers who performed the blind data acquisition. HUVECs were photographed with phase contrast microscopy (Nikon[®] Coolpix 8400, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) at objective ×4 and quantified by using the Image J software (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

4.14. 2D Vascular Network Formation Assay

The 2 dimensional (2D)-vascular network formation assay was performed with HUVECs cultured on Matrigel-coated (Corning, Bedford, MA, USA) 16-wells Labtek or 96 wells microplate. 1 × 10⁴ cells/well and incubated for 6 h at 37 °C in complete culture medium with or without 10 µg/mL of polysaccharides (LMWF, MMWF, ASPHY, Dextran or LMWH). The microvascular network was photographed using a phase contrast microscopy coupled camera (Nikon[®] Coolpix 8400). The pictures were analyzed with 5 parameters: the total length network, the number of nodes (cell interactions), the number, the perimeter and the area of the generated meshes. The measures were estimated for each experimental condition using Image J analysis system. All measures showed same tendencies and we chose to exhibit the number of nodes that demonstrated higher differences between the treatments.

4.15. Labeling of the LMWF with a Fluorophore

LMWF was first aminated on the terminal aldehyde group of fucose chain by a reductive amination [41]. In this study, 50 mg of LMWF were solved in 0.54 mL solution of diaminopropan 1.5 M in glacial acetic acid and heated for 3 h at 90 °C, then a reduction was performed by adding

0.15 mL of dimethylboran 3 M in the solution and heated 3 h at 90 °C. Samples were dialyzed (cut-off 1000 Da) and freeze-dried. LMWF was then coupled with a red fluorophore (Alexa Fluor® 555 NHS Ester, Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA). 1 mg of Alexa-Fluor 555 NHS was dissolved in 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO, VWR BDH Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France), beside, 10 mg of Aminated-LMWF was dissolved in 1 mL of carbonate buffer 0.1 M at pH 8.3 and 50 µL of the solution carrying the label was added to the solution stirred in darkness for 1 h at room temperature. The labeled compound was precipitated in ethanol to remove the free labels and eluted two times in column PD-10 (GE Healthcare Life Sciences).

4.16. Kinetic of the Cellular Localization of LMWF

Fluorescents LMWF-Alexa or Dextran-FITC (negative control) were added in HUVECs culture medium at 10 µg/mL in kinetic (30 min, 2 h and, 6 h) at 37 °C and 4 °C. The heparinases and chondroitinase were added to HUVECs culture. Cells were then fixed in paraformaldehyde 4%, stained with Dapi and observed under confocal microscopy (Leica SP8 tandem, Wetzlar, Germany) An average of 30 cells per condition was photographed in stack in the Z axe and the intensity of the accumulated fluorescence per cell was quantified by using specific quantification software (Imaris, Bitplane, Belfast, UK). The intensity gain was normalized on the auto fluorescence of the cells.

4.17. Co-Localization Assay of LMWF with Clathrin and Caveolin-1

HUVECs were incubated in presence of the fluorescent LMWF-Alexa for 2 h in the same conditions as described above, then fixed and permeabilized with saponine 0.1% (Fluka, Sigma-Aldrich). Cells were stained with Dapi and antibodies directed against light chain of clathrin (CLTC), caveolin-1 (CAV-1) or isotypes (Mouse IgG1; Rabbit IgG), then revealed by secondary antibodies (Goat anti mouse Alexa Fluor 488 and Goat anti goat Alexa Fluor 488) coupled with fluorophore. The colocalization assay was performed by using the specific quantification software Imaris.

4.18. Statistical Analysis

For the determination of statistical significance, an ANOVA test was performed with the Statview software (StatView 4.5 Abacus Concepts, Berkeley, USA). A *p* value of <0.05 was used as the criterion of statistical significance.

5. Conclusions

In summary, we showed in this study that from the heterogeneous crude fucoidan ASPHY collected from *A. nodosum*, we could distinguish two different fucoidans, LMWF and MMWF in their composition and through their pro-angiogenic effects. LMWF showed a higher activity to induce vascular network formation and endothelial cell migration than MMWF and ASPHY. These variations observed in their biological activities are mostly related to the size of the polysaccharide rather than their sulfation rate which were not enough different to distinguish significant variations in the affinity to chemokines SDF-1/CXCL12 and RANTES/CCL5. In addition, we demonstrated that the ability of LMWF to increase the vascular network formation at 6 h was regulated by Erk1/2 and PI3K/AKT cell signaling pathways. Localization study of LMWF-Alexa showed that the endothelial cells responded to fluorescent fucoidan presence by its uptake in a clathrin-mediated endocytosis and reached the maximum of cell capacity in 2 h with its accumulation in a perinuclear region.

Interestingly, we highlighted that the endogenous GAGs which were expressed at the surface of HUVECs, were partially involved in the pro-angiogenic activity of LMWF in vascular network formation and endothelial cell migration. LMWF activities were stronger when the endogenous GAGs were expressed, however in their absence LMWF has still an effect and showed that it could act as a substitute to induce angiogenesis and endothelial cell migration. The internalization of LMWF-Alexa was not inhibited but slowed down in GAG-free HUVECs. This work opens the way to use the most pro-angiogenic fucoidan as therapeutic GAGs substitute after glycocalyx injuries.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/1660-3397/14/10/185/s1, Figure S1: Polydispersity analysis, Figure S2: Transferrin endocytosis.

Acknowledgments: This work was supported by the Direction de la Recherche et des Enseignements Doctoraux (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche), the University Paris 13 and Inserm. N.M. was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We would like to particularly thank Samira Benadda from Inserm U1149 for her technical assistance with confocal microscopy.

Author Contributions: N.M., H.H. and N.C. conceived and designed the experiments; N.M., P.S., O.H., M.M., K.B., K.B.A., F.G. and R.R. performed the experiments; N.M., H.H., N.C., O.H., F.G., N.D. and M.L.C. analyzed the data; A.S., E.G., O.O., C.L.M., F.C. and C.C. contributed reagents/materials/analysis tools; N.M., H.H. and N.C. wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tkachenko, E.; Rhodes, J.M.; Simons, M. Syndecans: New kids on the signaling block. *Circ. Res.* **2005**, *96*, 488–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sutton, A.; Friand, V.; Papy-Garcia, D.; Dagouassat, M.; Martin, L.; Vassy, R.; Haddad, O.; Sainte-Catherine, O.; Kraemer, M.; Saffar, L.; et al. Glycosaminoglycans and their synthetic mimetics inhibit RANTES-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 2948–2958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Koo, A.; Dewey, C.F.; Garcia-Cardena, G. Hemodynamic Shear Stress Characteristic of Atherosclerosis-Resistant Regions Promotes Glycocalyx Formation in Cultured Endothelial Cells. *AJP Cell Physiol.* **2012**, *304*, C137–C146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Chappell, D.; Dörfler, N.; Jacob, M.; Rehm, M.; Welsch, U.; Conzen, P.; Becker, B.F. Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion. *Shock* **2010**, *34*, 133–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Peysseon, F.; Ricard-Blum, S. Heparin-protein interactions: From affinity and kinetics to biological roles. Application to an interaction network regulating angiogenesis. *Matrix Biol.* **2014**, *35*, 73–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Chevalier, F.; Arnaud, D.; Henault, E.; Guillevic, O.; Siñeriz, F.; Ponsen, A.C.; Papy-Garcia, D.; Barritault, D.; Letourneur, D.; Uzan, G.; et al. A fine structural modification of glycosaminoglycans is correlated with the progression of muscle regeneration after ischaemia: Towards a matrix-based therapy? *Eur. Cells Mater.* **2015**, *30*, 51–68.
7. Luyt, C.; Ho-tin-noe, B.; Collic-jouault, S.E.A.M.; Jacob, M.; Osborne-pellegrin, M.; Guezennec, J.; Louedec, L.; Herv, E.; Letourneur, D.; Michel, J. Low-Molecular-Weight Fucoidan Promotes Therapeutic Revascularization in a Rat Model of Critical Hindlimb Ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *305*, 24–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Deux, J.F.; Meddahi-Pellé, A.; le Blanche, A.F.; Feldman, L.J.; Collic-Jouault, S.; Brée, F.; Boudghène, F.; Michel, J.B.; Letourneur, D. Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia in rabbit iliac artery in-stent restenosis model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 1604–1609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Berteau, O.; Mulloy, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* **2003**, *13*, 29–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Matou, S.; Helley, D.; Chabut, D.; Bros, A.; Fischer, A. Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro. *Thromb. Res.* **2002**, *106*, 213–221. [[CrossRef](#)]
11. Boisson-Vidal, C.; Zemani, F.; Calliguirri, G.; Galy-Fauroux, I.; Collic-Jouault, S.; Helley, D.; Fischer, A.-M.; Caligiuri, G.; Galy-Fauroux, I.; Collic-Jouault, S.; et al. Neoangiogenesis induced by progenitor endothelial cells: Effect of fucoidan from marine algae. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **2007**, *5*, 67–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Haddad, O.; Guyot, E.; Marinval, N.; Chevalier, F.; Maillard, L.; Gadi, L.; Laguillier-Morizot, C.; Oudar, O.; Sutton, A.; Charnaux, N.; et al. Heparanase and Syndecan-4 Are Involved in Low Molecular Weight Fucoidan-Induced Angiogenesis. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 6588–6608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Purnama, A.; Aid-launais, R.; Haddad, O.; Maire, M.; Letourneur, D.; le Visage, C. Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2013**, *2*, 187–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Ikeda, Y.; Charef, S.; Ouidja, M.O.; Barbier-Chassefière, V.; Sineriz, F.; Duchesnay, A.; Narasimprakash, H.; Martelly, I.; Kern, P.; Barritault, D.; et al. Synthesis and biological activities of a library of glycosaminoglycans mimetic oligosaccharides. *Biomaterials* **2011**, *32*, 769–776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Barbosa, I.; Morin, C.; Garcia, S.; Duchesnay, A.; Oudghir, M.; Jenniskens, G.; Miao, H.; Guimond, S.; Carpentier, G.; Cebrian, J.; et al. A synthetic glycosaminoglycan mimetic (RGTA) modifies natural glycosaminoglycan species during myogenesis. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 253–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Synytsya, A.; Choi, D.J.; Pohl, R.; Na, Y.S.; Capek, P.; Lattová, E.; Taubner, T.; Choi, J.W.; Lee, C.W.; Park, J.K.; et al. Structural Features and Anti-coagulant Activity of the Sulphated Polysaccharide SPS-CF from a Green Alga *Capsosiphon fulvescens*. *Mar. Biotechnol.* **2015**, *17*, 718–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Pereira, L.; Amado, A.M.; Critchley, A.T.; van de Velde, F.; Ribeiro-Claro, P.J.A. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocoll.* **2009**, *23*, 1903–1909. [[CrossRef](#)]
18. Qiu, X.; Amarasekara, A.; Doctor, V. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of fucoidan. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *63*, 224–228. [[CrossRef](#)]
19. Sekkal, M.; Legrand, P. A spectroscopic investigation of the carrageenans and agar in the 1500–100 cm⁻¹ spectral range. *Spectrochim. Acta* **1993**, *49*, 209–221. [[CrossRef](#)]
20. Friand, V.; Haddad, O.; Papy-Garcia, D.; Hlawaty, H.; Vassy, R.; Hamma-Kourbali, Y.; Perret, G.-Y.; Courty, J.; Baleux, F.; Oudar, O.; et al. Glycosaminoglycan mimetics inhibit SDF-1/CXCL12-mediated migration and invasion of human hepatoma cells. *Glycobiology* **2009**, *19*, 1511–1524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Kim, B.S.; Park, J.Y.; Kang, H.J.; Kim, H.J.; Lee, J. Fucoidan/FGF-2 induces angiogenesis through JNK- and p38-mediated activation of AKT/MMP-2 signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *450*, 1333–1338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Castellot, J.J.; Wong, K.; Herman, B.; Hoover, R.L.; Albertini, D.F.; Wright, T.C.; Caleb, B.L.; Karnovsky, M.J. Binding and internalization of heparin by vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* **1985**, *124*, 13–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Li, L.; Wan, T.; Wan, M.; Liu, B.; Cheng, R.; Zhang, R. The effect of the size of fluorescent dextran on its endocytic pathway. *Cell Biol. Int.* **2015**, *39*, 531–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mauray, S.; de Raucourt, E.; Chaubet, F.; Maïga-Revel, O.; Sternberg, C.; Fischer, A.M. Comparative anticoagulant activity and influence on thrombin generation of dextran derivatives and of a fucoidan fraction. *J. Biomater. Sci. Polym.* **1998**, *9*, 373–387. [[CrossRef](#)]
25. Cumashi, A.; Ushakova, N.; Preobrazhenskaya, M.; D’Incecco, A.; Piccoli, A.; Totani, L.; Tinari, N.; Morozovich, G.E.; Berman, A.E.; Bilan, M.I.; et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* **2007**, *17*, 541–552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Thorlacius, H.; Vollmar, B.; Seyfert, U.T.; Vestweber, D.; Menger, M.D. The polysaccharide fucoidan inhibits microvascular thrombus formation independently from P- and L-selectin function in vivo. *Eur. J. Clin. Investig.* **2000**, *30*, 804–810. [[CrossRef](#)]
27. Hlawaty, H.; Suffee, N.; Sutton, A.; Oudar, O.; Haddad, O.; Ollivier, V.; Laguillier-morizot, C.; Gattegno, L.; Letourneur, D.; Charnaux, N. Low molecular weight fucoidan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2 expression. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 233–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lake, A.C.; Vassy, R.; di Benedetto, M.; Lavigne, D.; le Visage, C.; Perret, G.Y.; Letourneur, D. Low molecular weight fucoidan increases VEGF165-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF165 binding to VEGFR-2 and NRP1. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 37844–37852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Patankars, M.S.; Oehningerq, S.; Barnett, T.; Williams, R.L.; Clark, G.F. A Revised Structure for Fucoidan May Explain Some of Its Biological Activities. *J. Biol. Chem.* **1993**, 21770–21776.
30. Pomin, V.H. Fucanomics and galactanomics: Current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1820*, 1971–1979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Ustyuzhanina, N.E.; Bilan, M.I.; Ushakova, N.A.; Usov, A.I.; Kiselevskiy, M.V.; Nifantiev, N.E. Fucoidans: pro- or antiangiogenic agents? *Glycobiology* **2014**, *24*, 1265–1274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ustyuzhanina, N.E.; Ushakova, N.A.; Zyuzina, K.A.; Bilan, M.I.; Elizarova, A.L.; Somonova, O.V.; Madzhuga, A.V.; Krylov, V.B.; Preobrazhenskaya, M.E.; Usov, A.I.; et al. Influence of fucoidans on hemostatic system. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2444–2458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Chen, M.C.; Hsu, W.L.; Hwang, P.A.; Chou, T.C. Low Molecular Weight Fucoidan Inhibits Tumor Angiogenesis through Downregulation of HIF-1/VEGF Signaling under Hypoxia. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 4436–4451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cho, Y.; Cho, E.J.; Lee, J.H.; Yu, S.J.; Kim, Y.J.; Kim, C.Y.; Yoon, J.H. Fucoidan-induced ID-1 suppression inhibits the in vitro and in vivo invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 607–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Teng, H.; Yang, Y.; Wei, H.; Liu, Z.; Liu, Z.; Ma, Y.; Gao, Z.; Hou, L.; Zou, X. Fucoidan Suppresses Hypoxia-Induced Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis in Mouse Hepatocarcinoma. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 3514–3530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Bilan, M.I.; Grachev, A.A.; Ustuzhanina, N.E.; Shashkov, A.S.; Nifantiev, N.E.; Usov, A.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 719–730. [[CrossRef](#)]
37. Fernas, S.; Gonnet, F.; Sutton, A.; Charnaux, N.; Mulloy, B.; Du, Y.; Baleux, F.; Daniel, R. Sulfated oligosaccharides (heparin and fucoidan) binding and dimerization of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL 12) are coupled as evidenced by affinity CE-MS analysis. *Glycobiology* **2008**, *18*, 1054–1064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Nakamura, S.; Nambu, M.; Ishizuka, T.; Hattori, H.; Kanatani, Y.; Takase, B.; Kishimoto, S.; Amano, Y.; Aoki, H.; Kiyosawa, T.; et al. Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex-hydrogel on in vitro and in vivo vascularization. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *85*, 619–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Naik, R.J.; Sharma, R.; Nisakar, D.; Purohit, G.; Ganguli, M. Exogenous chondroitin sulfate glycosaminoglycan associate with arginine-rich peptide-DNA complexes to alter their intracellular processing and gene delivery efficiency. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2015**, *1848*, 1053–1064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Saboural, P.; Chaubet, F.; Rouzet, F.; Al-Shoukr, F.; Azzouna, R.B.; Bouchemal, N.; Picton, L.; Louedec, L.; Maire, M.; Rolland, L.; et al. Purification of a Low Molecular Weight Fucoidan for SPECT Molecular Imaging of Myocardial Infarction. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 4851–4867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Bachelet, L.; Bertholon, I.; Lavigne, D.; Vassy, R.; Jandrot-Perrus, M.; Chaubet, F.; Letourneur, D. Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2009**, *1790*, 141–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Discussion et perspectives du chapitre 1

L'un des intérêts des travaux présentés dans cette thèse est de caractériser les effets pro-angiogéniques induits par des fucoïdanes issus de l'algue *Ascophyllum nodosum*, par la réalisation d'une étude structure/fonction. Dans cette optique, le premier travail a porté sur la caractérisation physico-chimique de fucoïdanes fractionnés. Les données structurales ont été collectées et confrontées aux résultats obtenus lors d'essais de migration de cellules endothéliales et de formation de réseau vasculaire en 2-dimensions en présence de ces fucoïdanes.

De nombreuses études démontrent que ces fucanes sulfatés, composants pariétaux des algues marines, appelés également fucoïdanes, présentent des activités anticoagulantes [Mauray, 1998; Cumashi, 2007] et antithrombotiques [Thorlacius, 2000; Berteau et Mulloy, 2003], comparables à celles de l'héparine. Dans une étude précédente, les travaux de l'équipe ont mis en évidence que les fucoïdanes possèdent un potentiel thérapeutique dans le traitement de maladies cardio-vasculaires étudiées dans des modèles animaux avec, par ailleurs, un rôle important dans la prévention de l'hyperplasie intimale [Deux, 2002; Hlawaty, 2011] et la promotion de la revascularisation dans les zones ischémiées [Luyt, 2003]. Nos travaux et d'autres études ont par ailleurs démontré les effets thérapeutiques du fucoïdane de bas poids moléculaire (Low Molecular Weight Fucoïdan, LMWF) sur l'angiogénèse *in vitro* et *in vivo* [Matou, 2002; Boisson-Vidal, 2007; Haddad, 2015; Purnama, 2013; Lake, 2006 and Kim, 2014].

Caractérisation et relation structure/fonction des fucoïdanes dans leurs activités pro-angiogéniques

Les fucoïdanes sont des polysaccharides sulfatés hétérogènes (au niveau de leur taille, composition et degré de sulfatation) qui peuvent être obtenus à partir de différentes espèces marines, dont les plus répandues sont les algues brunes.

Leur diversité structurale a été largement analysée et étudiée, décrivant une structure moyenne basée sur un squelette linéaire de poly-L-fucose quelques fois ponctué d'une proportion variable d'acides uroniques et contenant des traces de galactose et xylose.

Plusieurs études ont fait état de la relation entre les caractéristiques structurales du fucoïdane et sa nature ainsi que la puissance de ses activités biologiques. Le rôle structural le plus largement admis implique le poids moléculaire et le taux et la distribution de groupements sulfate sur la chaîne de polyfucoses, dont la répartition dépend également du type de préparation (extraction, fractionnement, purification) du fucoïdane [Berteau et Mulloy, 2003 ; Cumashi, 2007 ; Patankar, 1993 ; Pomin, 2012]. Dans cette optique, essayer de généraliser sur la relation entre les effets biologiques dans l'angiogenèse *in vitro* et la structure d'une molécule aussi variable et complexe qu'est le fucoïdane, est une tâche ardue lorsque l'on considère ses différentes origines marines (algues, concombres de mer). Ce concept a d'ailleurs été précisément illustré par le travail sur les activités pro- et anti-angiogénique réalisé par Ustyuzhanina *et al.* [Ustyuzhanina, 2014].

De même, Pomin *et al.* ont montré que les fucoïdanes d'origines variées manifestent une activité anti-angiogénique due à leur capacité à interagir avec les facteurs de croissance Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) [Pomin, 2012]. Cependant Matou *et al.* ont démontré les effets pro-angiogéniques des fucoïdanes, aussi extraits de l'algue brune *Ascophyllum nodosum*, par l'augmentation de l'expression des sous unités $\alpha 6$ et $\beta 1$ d'intégrines et Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1) à la surface des cellules endothéliales, ce qui augmente l'angiogenèse induite par FGF-2 [Matou, 2002].

Récemment, Nifantev *et al.* ont revu un nombre important d'études sur les activités angiogéniques de fucoïdanes provenant de plusieurs algues brunes pour mettre en lumière les relations entre leurs structures et leur fonctions. Dans leur étude, les auteurs ont seulement pu conclure que les fractions d'*Ascophyllum nodosum* ayant un haut poids moléculaire (>30 000g/mol) présentaient des activités anti-angiogéniques, tandis que les fractions de fucoïdane de bas poids moléculaire (<30,000g/mol) ont montré une activité pro-angiogénique [Ustyuzhanina, 2014].

Les homologues moléculaires et fonctionnelles des fucoïdanes avec les glycosaminoglycannes (GAG) endogènes, basées sur une structure de polysaccharides sulfatés et sur les interactions avec les FC et CK, les définissent en qualité de mimétiques naturels de GAGs d'origine exogène. Une comparaison des études structurales réalisées sur les GAGs exprimés par les cellules humaines pourrait paraître judicieuse. Les études structure/fonction des GAGs ont permis d'identifier des sites d'interactions avec des facteurs de croissance (FGF-2 et VEGF) présentant une singularité structurale. Le positionnement des sulfates sur une N-glucosamine et en position 2-O des unités iduronate est requis pour l'interaction des GAGs endogènes avec FGF-2 tandis que les résidus glucosamine sulfatés en position 6-O sont nécessaires pour l'activité mitogène du complexe FGF-2/GAGs [Pye, 1998; Goodger, 2008]. Plus particulièrement, le VEGF interagit préférentiellement avec les chaînes héparane sulfate (HS) contenant deux résidus saccharidiques hautement sulfatés espacés de fragments partiellement sulfatés [Robinson, 2006]. Ces données pourraient être transposées sur une analyse structurale du fucoïdane précisément focalisée sur sa capacité interactionnelle avec les mêmes protéines signalisantes. D'autre part, les études des activités anti-coagulantes et anti-thrombotiques des fucoïdanes ont signalé l'importance du taux de sulfatation, notamment dans les travaux réalisés par Ustyuzhanina *et al.* portant sur le potentiel de différents fucoïdanes [Ustyuzhanina, 2013]. Dans cette étude, un fucoïdane brut (*Saccharina latissima*) avec un degré de sulfatation élevé (1,3) a montré une plus forte activité que ce même fucoïdane plus hautement sulfaté, mais aussi que d'autres fucoïdanes plus faiblement sulfatés (0,9 et 0,4) provenant d'autres espèces d'algues (*Fucus vesiculosus* et *Cladosiphon okamuranus*, respectivement). Les auteurs en concluent que l'hétérogénéité dans la structure et la composition des fucoïdanes paraît être corrélée avec l'intensité et la nature de leurs activités en faisant varier la teneur en sulfate.

Dans notre étude, la caractérisation physico-chimique des fucoïdanes par l'utilisation de spectroscopies infrarouge (FT-IR) et Raman a démontré que le fucoïdane brut (ASPHY) et les fucoïdanes fractionnés de bas et de moyen poids moléculaire (LMWF et MMWF) possédaient tous les bandes caractéristiques de la vibration en étirement du sulfate O=S=O déterminée par l'observation et l'identification de bandes de vibration de fortes intensités.

L'observation de la bande Raman à 1268 cm⁻¹ a montré une variation de l'intensité de vibration entre les fucoïdanes avec la plus forte bande pour LMWF, en accord avec son taux de sulfatation mesuré (1,55). Les bandes Raman pour LMWF et MMWF ont également montré des vibrations à approximativement 845 cm⁻¹, suggérant la présence de groupements sulfate aux positions -2 et -4, respectivement. Bilan *et al.* ont obtenu des résultats similaires pour un fucoïdane extrait de *Fucus serratus linnaeus* [Bilan, 2002].

Les spectres FT-IR ont dévoilé une intensité des groupements COO⁻ plus forte pour les fucoïdanes brut ASPHY et LMWF que pour MMWF, révélant une tendance comparable aux proportions d'acide uronique mesurées pour ces fucoïdanes (27, 18 et 14% respectivement). Les données spectroscopiques obtenues démontrent que les groupements sulfate et carboxyliques des fucoïdanes peuvent être corrélés à leur taux de sulfatation et de teneur en acide uronique mesurés par des méthodes colorimétriques.

Des mesures complémentaires impliquant la modification structurelle de ces fucoïdanes au niveau du taux de sulfatation (désulfatation enzymatique ou sursulfatation) pourraient être proposées pour poursuivre les travaux engagés afin de cibler et identifier précisément les bandes correspondant aux groupements sulfate. La densité du degré de sulfate, la position et des motifs particuliers pourraient être révélés par une telle étude en complément ou en parallèle d'une analyse d'interaction avec des protéines signalisantes dans l'angiogenèse (par exemple, VEGF, SDF-1/CXCL12 ou RANTES/CCL5).

Il est communément admis que les charges négatives portées par ces polysaccharides naturellement sulfatés permettent des interactions électrostatiques avec un grand nombre de protéines cationiques, telles que les protéines liant l'héparine ou heparin binding protein (HBP), comme démontré avec la chimiokine SDF-1/CXCL12 [Fermas, 2008] et les facteurs de croissance tel que FGF-2 [Matou, 2002; Nakamura, 2008]. Ces interactions ont été associées à l'induction de la migration des cellules endothéliales et à la formation de nouveaux vaisseaux dans les modèles d'ischémie chez les animaux [Lyut, 2003; Purnama, 2013].

Dans nos études, nous avons pu montrer que le fucoïdane brut (ASPHY) et les fucoïdanes fractionnés (LMWF et MMWF) peuvent se fixer avec une haute affinité aux HBPs (SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 et VEGF). Cependant, nos résultats ont mis en évidence une tendance dans les différences d'affinité entre les fucoïdanes fractionnés tous les deux hautement sulfatés (1,14 et 1,55) et les deux chimiokines SDF-1/CXCL12 et RANTES/CCL5. LMWF présente un taux de sulfatation plus élevé et une affinité (KD) relative plus élevée, également pour les deux HBPs, comparé au MMWF qui présente un taux de sulfatation et un KD plus faible. Le fucoïdane brut et le LMWF se comportent de façon similaire en considérant leur interaction avec les HBPs. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse de la modulation de l'affinité par le taux de sulfatation, cependant la différence de degré de sulfatation entre LMWF et MMWF est probablement insuffisante pour être significative et induire une variation plus importante d'affinité aux HBPs.

Ikeda *et al.* ont démontré l'importance de la sulfatation de mimétiques de glycosaminoglycanes de bas poids moléculaires dans leur capacité à se lier à un facteur de croissance. Leurs auteurs ont démontré que les polysaccharides hautement sulfatés se fixent préférentiellement au FGF-2 comparé à des polysaccharides non sulfatés [Ikeda, 2011]. Nous avons ainsi émis l'hypothèse, à partir de ces données, que le modèle d'interaction moléculaire des fucoïdanes avec les HBPs fixées était polyvalent par la présence de phases asymétriques caractéristiques (association rapide et dissociation lente) en accord avec la précédente étude d'interaction de mimétique de GAGs [Friand, 2009]. L'hypothèse proposée dans ces travaux suggère que les acides aminés présents dans le site de fixation de SDF-1/CXCL12 (BBXB) à l'héparine pourraient être similaires à ceux qui interagissent avec les fucoïdanes.

Nous avons suggéré pour valider ce modèle dans des études complémentaires, l'utilisation de sensorgrammes adaptés pour mesurer l'interaction du fucoïdane avec les HBPs et réaliser une compétition avec l'héparine sur ces mêmes sites d'interaction requis par l'héparine. Des études structurales pourraient aussi mettre en évidence que la taille du fucoïdane est aussi un critère important pour discriminer son affinité aux HBPs en utilisant une gamme de fucoïdane de différentes tailles possédant le même degré de sulfatation.

Enfin, le taux de sulfatation peut également faire varier les interactions comme il a été supposé et démontré auparavant par Ikeda *et al.*

Les travaux présentés dans cette thèse font état d'activités de fucoïdanes sur des modèles cellulaires, cultivés en conditions de normoxie (15-20% O₂ et 5% CO₂). Nous nous sommes focalisés sur l'influence que les fucoïdanes pourraient avoir sur des modèles d'interaction avec les cellules endothéliales dans des conditions de normoxie. Nous n'avons pas modélisé des conditions hypoxiques ($\leq 1\%$ O₂) se rapprochant des conditions physio-pathologiques présentées en aval d'une ischémie. Au regard de la littérature, des études sur les effets des fucoïdanes présentant un potentiel thérapeutique pour le traitement de l'ischémie avec des modèles cellulaires cultivés en condition hypoxique apporteraient des éléments importants pour définir dans son ensemble le comportement cellulaire en condition pathologique induite par un stress hypoxique.

Un nombre restreint de travaux décrit des effets des fucoïdanes sur l'angiogenèse dans un modèle de cellules endothéliales cultivées *in vitro* ou sur des modèles de cellules cancéreuses cultivées en condition hypoxique. Chen *et al.* ont montré qu'un LMWF extrait de *Sargassum hemiphyllum* ($M_w = 760$ g/mol, 40% sulfate) a réduit de façon dose-dépendante les effets de l'hypoxie sur la formation de réseau vasculaire en 2 dimensions (2D) par des HUVECs *in vitro*, et n'a pas affecté l'angiogenèse en condition de normoxie [Chen, 2015]. Ils ont également montré que le traitement au LMWF a inhibé la migration et l'invasion de cellules cancéreuses de la rate (T24). De façon intéressante, ils ont suggéré que sous condition hypoxique, l'activité anti-angiogénique du LMWF dans ce contexte de cellules tumorales, pourrait être associé à la suppression du signal régulé par le couple HIF-1/VEGF.

Leurs expériences ont été réalisées en présence de VEGF et de fucoïdane. L'existence des interactions électrostatiques entre les charges négatives des polysaccharides sulfatés et les charges positives du VEGF, pourrait conduire à la rétention des deux molécules et inhiber leur signalisation. Ce phénomène pourrait expliquer leur effet anti-angiogénique. Cho *et al.* ont exploré le rôle d'un fucoïdane obtenu chez *Fucus vesiculosus* (M_w et la composition n'ont pas été mentionnés) sur l'invasion de cellules de carcinome hépatocellulaire (HCC) en normoxie et en hypoxie [Cho, 2016].

Ils ont pu mettre en évidence dans leur étude que ce fucoïdane supprime la prolifération des cellules HCC et leur invasion par une régulation dépendante des voies NDRG-1/CAP43. Teng *et al.* ont démontré que le fucoïdane provenant de *Undaria pinnatifida sporophylls* (Mw = 104356 g/mol, 21% sulfate) inhibe significativement l'invasion cellulaire et le développement de métastases lymphatiques à partir d'hépatocarcinome chez la souris (Hca-F) en condition hypoxique en bloquant le complexe HIF-1 α /VEGF-C atténuant les voies de signalisation PI3K/AKT/m-TOR [Teng, 2015]. En conclusion, il est très difficile de comparer ces résultats avec ceux obtenus dans notre étude, car les expériences de Chen *et al.*, Cho *et al.* et Teng *et al.* ont été réalisés avec des fucoïdanes préparés à partir d'algues diverses ayant des poids moléculaires, compositions et concentrations différentes.

Dans les tests de migration cellulaire en chambre de Boyden présentés dans notre étude, aussi bien le fucoïdane fractionné LMWF que le fucoïdane brut ASPHY ont augmenté la migration des HUVECs. L'analyse structurale des fucoïdanes pourrait expliquer la raison pour laquelle le fucoïdane brut a une activité pro-migratoire comparable au LMWF. L'observation des mesures de polydispersité indique que le fucoïdane brut contient une majorité de populations de bas poids moléculaire dont le LMWF fait partie, en accord avec son poids moléculaire mesuré à 4100 g/mol. Nous avons analysé des effets distincts sur la migration des HUVECs induits par LMWF et MMWF. Ces données ont suggéré que le poids moléculaire de LMWF était important, aussi bien que son taux de sulfatation, pour que les polysaccharides sulfatés puissent avoir une activité pro-migratoire sur les HUVECs. Les mêmes résultats ont été observés dans les tests de formation de réseaux vasculaires en 2D sur Matrigel avec le LMWF. Ceux-ci ont mis en évidence un potentiel plus élevé du LMWF pour induire la formation de nœuds endothéliaux dans les réseaux vasculaires que MMWF.

Cependant, à l'inverse du test de migration, le fucoïdane brut ASPHY n'a pas montré d'activité particulière dans cette expérience, suggérant que l'activité du fucoïdane mise en évidence dans les tests de migration des cellules HUVECs agirait sur une voie cellulaire différente que celle empruntée pour induire la formation nœuds endothéliaux.

Nous avons également montré dans cette étude que l'angiogenèse en 2D induite par LMWF implique les voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK Erk1/2, en accord avec la récente étude qui a également mis en lumière l'activation des voies p-38 et JNK par le fucoïdane de bas poids moléculaire [Kim, 2014].

Dans notre étude, nous avons souligné le rôle des groupements sulfate et du poids moléculaire des fractions de fucoïdanes sur leurs activités pro-angiogéniques, et nous avons proposé des mécanismes qui sous-tendent ses effets. Ceci est rendu possible car les fractions sont obtenues à partir d'une méthode industrielle fiable et reproductible, permettant de constituer un prérequis pour des études pertinentes. Cependant, ces fractions restent des mélanges complexes de macromolécules de polysaccharides et déterminer une étude complète de la relation entre structure et activité est une tâche difficile que nous avons entreprise.

Influence des GAGs endogènes dans les effets pro-angiogéniques des fucoïdanes

A côté de cette étude sur la relation structure/fonction, nous avons exploré le rôle des GAGs endogènes dans l'angiogenèse et la migration de cellules endothéliales induites par le fucoïdane. Nous avons émis l'hypothèse qu'en condition basale, le fucoïdane pourrait agir comme un intermédiaire entre les récepteurs et les chimiokines en augmentant leur concentration à la surface cellulaire. Cette interaction pourrait augmenter la formation de clusters de corécepteurs (protéoglycanes) complexés avec les récepteurs membranaires, leur internalisation, et pourrait conduire à une amplification du signal et de la réponse cellulaire. A l'inverse, le fucoïdane pourrait en absence de l'expression des GAGs, substituer leurs fonctions par un rôle préventif sur la dégradation du glycocalyx et finalement restaurer le processus de revascularisation.

Cependant, d'autres hypothèses proposent que les mimétiques de GAGs exogènes comme les fucoïdanes, ayant la capacité de se lier aux HBPs, pourraient également entrer en compétition avec les GAGs endogènes au niveau de leur site de liaison conduisant à l'inhibition des effets des HBPs. Ceci suggérant que l'activité pro-angiogénique du LMWF n'est pas liée à sa capacité à se lier aux HBPs, mais plus proche d'une activité propre [Boisson-Vidal, 2007].

Afin de vérifier le rôle des GAGs dans les effets des fucoïdanes sur la migration cellulaire et l'angiogenèse in vitro, nous avons utilisé un modèle de cellules endothéliales dépourvues de l'expression de GAGs endogènes. Nos résultats ont montré que LMWF possédait toujours une activité pro-angiogénique sur les HUVECs n'exprimant plus les GAGs, mais dans une moindre mesure. Ces résultats n'ont pas été retrouvés pour les tests d'angiogenèse 2D en absence de GAGs, où LMWF a toujours induit la formation de nœuds endothéliaux dans la même gamme d'intensité qu'en condition basale. L'activité du fucoïdane a montré dans ce champ une implication partielle des GAGs. Ceci suggère que le fucoïdane pourrait agir indépendamment des GAGs, selon le type d'effet biologique. Par ailleurs, il a été proposé que le fucoïdane puisse agir comme un compétiteur des GAGs lorsqu'il peut fixer les HBPs avec une haute affinité [Boisson-Vidal, 2007, 2013]. En considérant la forte affinité de LMWF pour les HBPs, ce modèle pourrait partiellement être en accord avec nos résultats obtenus.

Exploration des voies d'internalisation et trafic intracellulaire du fucoïdane

Nos résultats attestent que le fucoïdane fluorescent (LMWF-Alexa) a été internalisé en 2 heures dans les HUVECs et se localise dans une région périnucléaire. Ces observations sont en accord avec une étude précédente focalisée sur l'internalisation de l'héparine dans les cellules musculaires lisses vasculaires, où les auteurs ont démontré une voie d'endocytose biphasique du polysaccharide sulfaté [Castellot, 1985].

Le délai observé dans l'accumulation du LMWF-Alexa dans les HUVECs non traitées et traitées par le couple enzymatique Héparinases/Chondroïtinases semble montrer que les GAGs endogènes sont nécessaires pour l'internalisation du LMWF en 2 heures. Nous avons mis en évidence que cette internalisation était dépendante de la température et en partie de la voie médiée par la clathrine.

Les protéoglycanes (PG) sont mobilisés pour induire une endocytose médiée par la clathrine, et le LMWF, en tant que mimétique de GAGs, pourrait également interagir avec le corps protéique des PGs ou des HBPs à la surface cellulaire et pourrait être internalisé afin d'induire des effets biologiques sur les cellules endothéliales.

Des études précédentes ont montré l'importance de la taille des polysaccharides dans leur voie d'internalisation. L'utilisation d'un dextrane de bas poids moléculaire (10,000 g/mol) a montré une prise en charge par des voies dépendantes de la clathrine et la dynamine dans des processus de micro- et macropinocytose, tandis qu'un dextrane fluorescent de poids moléculaire moyen (70,000 g/mol) utilise une voie sensible à l'amiloride et indépendante de la macropinocytose [Li, 2015]. Récemment il a été démontré que les GAGs exogènes solubles peuvent améliorer l'endocytose de complexes associant des peptides et de l'ADN recouverts de ces polysaccharides et échapper à la voie endosomale/lysosomiale pour se localiser dans une région périnucléaire [Naik, 2015]. Des études complémentaires de trafic intracellulaire devraient être couplées avec des études des voies de signalisation pour déterminer plus précisément les effets moléculaires et cellulaires du LMWF sur les HUVECs et son rôle dans le compartiment intracellulaire pour induire l'angiogenèse.

Nous avons cependant atteint des limites techniques durant cette étude qui nous ont imposé de travailler avec un seul type de fucoïdane fluorescent. Il serait judicieux de réaliser cette étude en développant plusieurs fucoïdanes de divers poids moléculaire notamment avec le MMWF auparavant étudié.

Les voies d'internalisation des polysaccharides sulfatés sont relativement peu étudiées et pourraient donner des éléments de compréhension sur les interactions moléculaires et les voies de signalisation mises en évidence par les études actuelles.

En dehors des voies de signalisation, les polysaccharides sulfatés comme le fucoïdane, pourraient éventuellement avoir d'autres rôles biologiques une fois internalisé dans la cellule. La localisation de vésicules périnucléaire ne semble pas indiquer de rôle précis quant au devenir du fucoïdane qui pourrait être pris en charge dans un procédé de recyclage en empruntant la même voie que les GAGs.

Les outils de visualisation et de colocalisation sont des moyens efficaces pour évaluer ces interactions compte tenu de la grande diversité d'anticorps disponible pour identifier des partenaires moléculaires. Ces études sont essentielles quant à la faible étendue des connaissances actuelles sur la biodisponibilité et le devenir du fucoïdane dans un modèle cellulaire ou animal.

Les études de fonctionnalisation en cours utilisant le fucoïdane, que ce soit en imagerie pour le diagnostic ou pour développer des outils thérapeutiques, devraient bénéficier de ces données pour améliorer le développement et la formulation de ces produits.

Les limites des modèles d'étude sur la migration endothéliale et la formation de réseau vasculaire *in vitro*

Les modèles d'étude cellulaires de l'angiogenèse *in vitro* sont classés en deux catégories d'expériences en deux dimensions et en trois dimensions (3D) ou les cellules endothéliales sont cultivées sur une matrice simplifiée (collagène, fibrine ou Matrigel) mimant l'environnement matriciel de l'endothélium. Les tests réalisés en deux dimensions incluent les mesures de prolifération, migration (test de blessure) ou la production d'enzymes protéolytiques comme les MMPs. Les tests en 3D, quant à eux, comprennent la formation de structures mimant les capillaires en micro-réseau vasculaire tubulaire sur une surface plane ou à travers une matrice ou un gel en suspension plus épais.

La migration endothéliale : test de blessure ou en chambre de Boyden

Deux techniques de migration sont couramment utilisées pour mesurer l'effet d'une molécule ou substance sur la mobilité endothéliale. La migration en surface plane ou migration après un « scratch » ou « blessure » consiste à observer le déplacement cellulaire libre et spontané dans le temps. La migration mise en jeu est mécanique ou haptotactique et n'est pas dirigée. La deuxième méthode appelée migration en chambre de Boyden s'intéresse à la migration induite par chimiotactisme.

Les cellules sont ainsi séparées de la molécule d'intérêt par une membrane poreuse qu'elles vont traverser pour rejoindre cette molécule qui les attire. Nous avons effectué ces deux types de méthodes dans nos expériences sur l'effet des fucoïdanes à induire la migration endothéliale.

La migration en chambre de Boyden a été présentée dans nos résultats car elle correspond mieux au modèle d'étude de l'effet fucoïdane sur le chimiotactisme provoqué par la présence de facteurs de croissance et de chimiokines dans le milieu de culture cellulaire.

La formation de micro-réseaux vasculaires en 2D et 3D sur une matrice

Les formations de micro-réseaux vasculaires s'opèrent dans des puits couverts de fines ou épaisses couches de protéines matricielles mimant la membrane basale permettant la jonction cellulaire en surface plane. Des suspensions cellulaires endothéliales dans un gel sont utilisées pour mettre en évidence la formation de réseaux vasculaires en 3D. Lorsque qu'un facteur pro-angiogénique, comme le VEGF ou le FGF-2, est rajouté à la culture, les cellules endothéliales commencent à s'étendre et s'allonger pour rejoindre leurs congénères afin de générer des réseaux tubulaires jointifs en forme de maille. Nous avons choisi ce modèle en deux dimensions souvent reproduits pour montrer les effets pro-angiogénique d'une molécule bioactive.

Autres modèles d'étude de l'angiogenèse in vitro et in vivo

Il existe cependant d'autres approches méthodologiques qui permettent de visualiser et quantifier les propriétés angiogéniques de produits testés. Parmi ces méthodes notables, on relève le bourgeonnement de tubules vasculaires à partir d'un corps embryonnaire intégré dans une matrice. Des modèles d'études *ex vivo* telles que la culture d'anneaux aortique de rats ou de souris permettent d'observer la migration, puis la formation de réseaux vasculaire en 2 dimensions sur une matrice de collagène ou Matrigel *ex vivo* dans une boîte de culture.

L'étude de la formation d'un véritable réseau vasculaire chez l'animal se fait par l'injection ou l'infusion d'une substance générant un contexte d'angiogenèse dans un organe choisi.

Les principaux modèles utilisés sont la membrane chorioallantoïque de l'embryon de poulet et la cornée de lapin, mais aussi des modèles d'angiogenèse sous-cutanée chez les rongeurs comme le rat ou la souris (injection de Matrigel riche en FC).

La plupart du temps l'addition par implantation d'une matrice tridimensionnelle (émulsion de pullulane-dextrane, éponges de polyesters, tubes de polyfluorotetraéthylène étendu rempli de collagène, disques en mousse d'alcool polyvinyle recouverts de part et d'autre de filtres millipore, ou encore de Matrigel, une membrane basale riche en matrice extracellulaire), est requise afin d'y insérer des facteurs putatifs activant l'angiogenèse (facteurs de croissance, enzymes).

Cependant les résultats de ces techniques d'études *in vivo* sont souvent limités par des aspects inflammatoires générés par la modification corporelle amenée lors de l'étude, qui peuvent tout aussi bien influencer l'angiogenèse et masquer les effets des substances testées [Montesano, 2000].

Dans cette étude, nous avons choisi de visualiser et modéliser les activités des fucoïdanes sur un modèle cellulaire endothéliale en choisissant les cellules HUVECs. Le niveau d'oxygénation de la circulation sanguine dans les veines de cordon ombilical est proche de celui des artères de l'organisme et en fait un modèle convenable pour étudier les effets sur l'angiogenèse *in vitro*. D'autres modèles de cellules endothéliales provenant d'artères peuvent être étudiées.

Il serait judicieux d'étudier les mêmes effets avec ces fucoïdane sur des cellules HUVECs cultivées en hypoxie. De plus, il serait envisageable d'étudier la poursuite de ces travaux sur les capacités pro-angiogéniques *in vivo* du LMWF issu de cette étude dans le modèle d'ischémie de la patte chez la souris et d'utiliser le fucoïdane pour induire une néo-vascularisation. Le fucoïdane pourrait être administré localement par une injection intramusculaire dans une formulation aqueuse, ou bien formulé dans une matrice biodégradable de type pullulane-dextrane développée par notre laboratoire, pour contrôler sa biodisponibilité et permettre de moduler la fonctionnalisation de la matrice par l'ajout de facteurs de croissance définis. Les 2 techniques d'application des fucoïdanes ont été déjà mis en évidence dans notre laboratoire préalablement [Lyut, 2003; Purnama, 2013].

Conclusion

En résumé, nous avons montré dans cette étude qu'il est possible, depuis un fucoïdane brut ASPHY extrait de l'algue *Ascophyllum nodosum*, de distinguer deux différentes fractions de fucoïdane, LMWF et MMWF, dans leur composition et au travers de leurs effets pro-angiogéniques. LMWF a montré une plus forte activité à induire la formation d'un réseau vasculaire en 2 dimensions et la migration de cellules endothéliales que MMWF et ASPHY. Ces variations observées dans leurs activités biologiques sont plus fortement liées à leur taille qu'à leur taux de sulfatation. Ce dernier qui n'était pas suffisamment différent pour mettre en évidence des variations significatives dans leur affinité aux cytokines liant l'héparine VEGF, SDF-1/CXCL12 et RANTES/CCL5. De plus, nous avons démontré que la capacité du LMWF à augmenter la formation de réseau vasculaire en 2 dimensions à 6 heures était régulée par les voies de signalisation cellulaire Erk1/2 et PI3K/AKT. Dans les cellules endothéliales, le fucoïdane fluorescent (LMWF-Alexa) est principalement internalisé par une voie régulée par la clathrine. Le maximum de la capacité d'internalisation cellulaire a été atteint en 2 heures par l'accumulation du LMWF-Alexa dans une région périnucléaire. Nos données s'accordent sur la littérature scientifique qui décrit l'internalisation cellulaire des polysaccharides sulfatés par la démonstration d'une endocytose avec un plateau atteint à 2h pour l'héparine. De plus, l'effet de la taille sur le type d'internalisation a été démontré avec l'emploi d'une endocytose médiée par la clathrine pour les petits polysaccharides (dextrane) et une macropinocytose pour les molécules d'une taille supérieure à 70,000 g/mol.

D'autre part, les conclusions de cette étude ont permis de mettre en évidence que le fucoïdane modifie l'expression des GAGs endogènes et que son effet pro-angiogénique peut également être influencé par les GAGs. De façon intéressante, nous avons montré que les GAGs endogènes exprimés à la surface des HUVECs, étaient partiellement impliqués dans l'activité pro-angiogénique de LMWF dans la formation de réseau vasculaire et la migration cellulaire. Les activités de LMWF sur la migration des cellules endothéliales étaient plus importantes lorsque les GAGs étaient exprimés, cependant, en leur absence, LMWF a gardé une activité suggérant qu'il pourrait agir comme un substitut aux GAGs pour induire l'angiogenèse et la migration cellulaire.

L'internalisation de LMWF-Alexa n'a pas été inhibée mais ralentie en absence de GAGs. Ce travail ouvre la voie pour l'utilisation de fucoïdane susceptible d'être optimisé pour l'angiogenèse selon un procédé de sélection structurelle, comme un substitut thérapeutique aux dommages du glycocalyx endothélial lors d'un accident vasculaire.

Perspectives

Nous proposons les hypothèses que le LMWF pourrait intervenir comme un intermédiaire entre les FC/CK et leurs récepteurs ; et adopter un rôle coopératif avec les GAGs endogènes pour induire une endocytose du LMWF plus importante et un effet pro-migratoire plus élevé qu'en absence de GAGs.

Pour vérifier ces hypothèses, nous proposons d'analyser le trafic intracellulaire du LMWF pour définir le rôle de cette internalisation dans les effets biologiques du LMWF. Dans cette optique l'emploi des inhibiteurs d'endocytose sur les modèles de migration et de réseaux vasculaire induits par le LMWF serait intéressant pour confirmer cette hypothèse. Enfin la co-internalisation du complexe LMWF-Alexa / FC/CK / Co-récepteur / Récepteur pourrait être vérifiée par une analyse de la colocalisation en microscopie confocale par l'emploi de marqueurs spécifiques.

Article 2. Haddad et al., 2016

Au cours de ma thèse, j'ai participé à un travail de recherche en cours, qui a donné lieu à une publication dans la revue *Marine drugs* en 2015 [Haddad, 2015]. Ce travail s'articule sur la définition des rôles de protéoglycanes (syndécanes-1 et -4) et de leurs chaînes glycaniques dans les effets pro-angiogéniques d'un fucoïdane de bas poids moléculaire extrait de *Fucus vesiculosus*. Ces travaux sont présentés dans l'article suivant.

Objectif : Dans cette étude, nous avons exploré le rôle potentiel de deux enzymes responsables du métabolisme des héparanes sulfates (HS), l'exostosine-2 (EXT-2) et l'héparanase (HPSE), et de deux protéoglycanes à héparanes sulfate membranaires, les syndécanes-1 et -4 (SDC-1 et -4), dans l'angiogenèse induite par un fucoïdane de bas poids moléculaire (LMWF).

Hypothèse : Nous supposons que le LMWF peut moduler l'expression, la quantité et la distribution d'une part des chaînes GAGs à HS exprimées à la surface des cellules endothéliales, et d'autre part par des SDC-1 et -4, conduisant à des modifications dans les propriétés cellulaires favorisant les facultés pro-angiogéniques.

Méthode : Un fucoïdane commercial (Kraeber) de bas poids moléculaire (8000 g/mol, contenant 35% de fucose 34% sulfate et 3% d'acide uronique) extrait de *Fucus vesiculosus* a été choisi pour réaliser cette étude. Nous l'avons utilisé à 10 µg/mL dans la culture des HUVECs et mesuré l'expression des GAGs au niveau cellulaire (membrane) par cytométrie en flux et dans leurs formes sécrétées dans les surnageants par dosage colorimétrique. La mesure de l'expression des SDCs a été réalisée au niveau génique (RT-qPCR) et au niveau protéique (Western blot). Des siRNA ont été utilisés pour éteindre l'expression des EXT-2, HPSE, SDC-1 et SDC-4. L'activité enzymatique de l'HPSE a été mesurée dans les surnageants cellulaires. Nous avons procédé à des tests pro-angiogéniques induits par le LMWF *in vitro* (migration en chambre de Boyden et formation de tubes vasculaires en 2 dimensions) sur des cellules HUVECs transfectées ou non avec les siRNAs.

Nous avons terminé cette étude par une expérimentation animale afin d'étudier le potentiel de ré-endothélialisation après hyperplasie induite par ballonnet dans l'aorte thoracique de rats ayant reçu une injection intramusculaire de LMWF (5 mg/kg/jour, n = 6) ou de solution saline (animaux contrôle, n = 6) pendant 14 jours. Des coupes histologiques de l'aorte thoracique ont permis la révélation par immunohistochimie des SDC-1 et -4 afin d'observer leur expression et répartition au sein des tuniques artérielles.

Résultats : Nos résultats rapportent que l'expression et l'activité de l'héparanase sur la dégradation des héparanes sulfates était augmentée après un traitement au LMWF dans les cellules HUVECs. Les effets pro-angiogéniques induits par le LMWF sur des cellules traitées transfectées avec des siRNA contre EXT-2, HPSE ont été fortement affectés, suggérant un rôle important de ces acteurs (EXT-2 et HPSE) dans les mécanismes mis en jeu par le LMWF. D'autre part, nous avons mis en évidence que LMWF régule l'expression des SDCs en augmentant celle de SDC-1 et en diminuant celle de SDC-4 *in vitro* et en modifiant leur expression et leur répartition *in vivo* dans un modèle d'hyperplasie de l'aorte thoracique de rats. Nous avons montré que les effets du LMWF dépendent de l'expression du SDC-4 car lorsque l'expression des EXT-2 et HPSE est éteinte dans les cellules HUVECs, l'expression de SDC-4 est augmentée.

Conclusion : L'ensemble des données indiquent que les enzymes EXT-2 et HPSE, mais aussi le SDC-4 sont impliqués dans l'effet pro-angiogénique du LMWF.

Article

Heparanase and Syndecan-4 Are Involved in Low Molecular Weight Fucoidan-Induced Angiogenesis

Oualid Haddad ¹, Erwan Guyot ^{1,2}, Nicolas Marinval ¹, Fabien Chevalier ³, Loïc Maillard ¹, Latifa Gadi ¹, Christelle Laguillier-Morizot ^{1,2}, Olivier Oudar ¹, Angela Sutton ^{1,2}, Nathalie Charnaux ^{1,2,†} and Hanna Hlawaty ^{1,†,*}

¹ Inserm U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Groupe Biothérapies et Glycoconjugués, 93000 Bobigny, France; E-Mails: haddad.oualid@univ-paris13.fr (O.H.); erwan.guyot@jvr.aphp.fr (E.G.); nmarinval@yahoo.fr (N.M.); loic_maillard95@hotmail.fr (L.M.); latifa.gadi@yahoo.fr (L.G.); christelle.laguillier@jvr.aphp.fr (C.L.-M.); olivier.oudar@univ-paris13.fr (O.O.); angela.sutton@jvr.aphp.fr (A.S.); nathalie.charnaux@jvr.aphp.fr (N.C.)

² Laboratoire de Biochimie, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 93140 Bondy, France

³ ERL CNRS 9215, CRRET Laboratory, Université Paris Est Créteil, 94010 Créteil, France; E-Mail: fabien.che@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: hanna.hlawaty@univ-paris13.fr; Tel.: +33-1-48-38-76-97 or +33-1-48-38-77-52; Fax: +33-1-48-38-13-22.

Academic Editor: Paola Laurienzo

Received: 29 July 2015 / Accepted: 19 October 2015 / Published: 28 October 2015

Abstract: Induction of angiogenesis is a potential treatment for chronic ischemia. Low molecular weight fucoidan (LMWF), the sulfated polysaccharide from brown seaweeds, has been shown to promote revascularization in a rat limb ischemia, increasing angiogenesis *in vivo*. We investigated the potential role of two heparan sulfate (HS) metabolism enzymes, exostosin-2 (EXT2) and heparanase (HPSE), and of two HS-membrane proteoglycans, syndecan-1 and -4 (SDC-1 and SDC-4), in LMWF induced angiogenesis. Our results showed that LMWF increases human vascular endothelial cell (HUVEC) migration and angiogenesis *in vitro*. We report that the expression and activity of the HS-degrading HPSE was increased after LMWF treatment. The phenotypic tests of LMWF-treated and EXT2- or HPSE-siRNA-transfected cells indicated that EXT2 or HPSE expression

significantly affect the proangiogenic potential of LMWF. In addition, LMWF increased SDC-1, but decreased SDC-4 expressions. The effect of LMWF depends on SDC-4 expression. Silencing *EXT2* or *HPSE* leads to an increased expression of SDC-4, providing the evidence that *EXT2* and *HPSE* regulate the SDC-4 expression. Altogether, these data indicate that *EXT2*, *HPSE*, and SDC-4 are involved in the proangiogenic effects of LMWF, suggesting that the HS metabolism changes linked to LMWF-induced angiogenesis offer the opportunity for new therapeutic strategies of ischemic diseases.

Keywords: fucoidan; angiogenesis; human endothelial cell; glycosaminoglycan; syndecan; heparanase

1. Introduction

Heparan sulfate proteoglycans (HSPG) are integral components of the cell surface and extracellular matrix (ECM) of animal cells. These complex molecules consist of sulfated carbohydrate chains of glycosaminoglycans (GAGs) covalently bound to a protein core. The GAGs are composed of disaccharide units composed of galactose or glucuronic/iduronic acid and *N*-acetyl-glucosamine/-galactosamine. Heparan sulfate (HS) chain compositions are cell-specific and can evolve during the development or tissue regeneration. All HS chains are synthesized *de novo*, and it is still unclear what determines their structures. The enzymes involved in the biosynthesis of a carbohydrate chain have been identified. Two main categories have been described: the enzymes responsible for chain polymerization, mainly exostosin-1 and -2 (*EXT1*, *EXT2*), and the enzymes responsible for chain modifications (*N*-deacetylase/*N*-sulfotransferases (*NDST*), 2-*O*-sulfotransferases (*2OST*), 3-*O*-sulfotransferases (*3OST*), 6-*O*-sulfotransferases (*6OST*), and heparanase (*HPSE*). Syndecans (*SDCs*) are heparan-sulfate containing transmembrane proteoglycans [1]. They bind various components of the ECM and are important regulators of cell-cell and cell-ECM interactions. Syndecans are involved in cell migration and angiogenesis [2,3]. Syndecan-4 (*SDC-4*) is a component of the focal contacts and its activation is associated with cell cytoskeletal rearrangement leading to cell migration [4]. Syndecan-1 (*SDC-1*) modulates β -integrin- and interleukin-6-dependent breast cancer cell adhesion and migration, and its overexpression in human fibrosarcoma cells leads to increased proliferation and migratory ability [5,6]. Low molecular weight fucoidan (LMWF), a sulfated polysaccharide from brown seaweeds that mimics some biological activities of heparin, has been shown to promote revascularization in a rat critical hindlimb ischemia [7]. It increases human vascular endothelial growth factor (*VEGF*₁₆₅)-induced endothelial cell migration by enhancing *VEGF*₁₆₅ binding to *VEGFR-2* and neuropilin 1 (*NRP1*) [8]. Furthermore, fucoidan induces the adoption by endothelial colony-forming cells (*ECFC*) of an angiogenic phenotype *in vitro* and greatly increases *ECFC*-mediated angiogenesis *in vivo* [9]. We have previously demonstrated that LMWF, injected in rats, prevented intimal hyperplasia in the thoracic aorta by increasing human vascular endothelial cell (*HUVEC*) migration, but decreasing vascular smooth muscle cell migration through the modulation of matrix metalloproteinase-2 (*MMP-2*) expression [10]. Nevertheless, the effects of fucoidan on angiogenesis are somehow controversial. Indeed, depending on the seaweed origin, the sulfatation level, or the size, fucoidan may have antiangiogenic effects.

Soeda *et al.* reported that oversulfated fucoidan (100 kDa) from *Fucus vesiculosus* significantly inhibited the fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induced HUVEC migration and tube formation by increasing the release of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) [11]. In contrast, Kim *et al.* reported that fucoidan acts synergistically with FGF-2 in promoting HUVEC proliferation and angiogenesis by AKT and MMP-2 signalling via activation of the p38 and JNK signalling pathways [12]. In this study, we hypothesized that LMWF (8 kDa) from *Fucus vesiculosus* can also modify the amount and the distribution of heparan sulfate (HS) chains exposed at the endothelial cell surface and of two major heparan sulfate membrane proteoglycans, SDC-1 and SDC-4, causing modifications of cell properties related to proangiogenic abilities.

2. Results and Discussion

2.1. Effects of LMWF on Endothelial Cell Abilities (Migration and 2D-Angiogenesis)

LMWF at 10 $\mu\text{g/mL}$, but not high molecular weight fucoidan (HMWF) (600 kDa) increased HUVEC migration through fibronectin-coated 8 μm -porous membranes by $36\% \pm 8\%$ (Figure 1A and data not shown). Confocal microscopy confirmed that LMWF induced the formation of lamellipodia and ruffles, which characterize a migration phenotype and reorganized actin cytoskeleton (Figure 1B). Using a 2D-angiogenesis assay, we demonstrated that LMWF induced the formation of capillary tubes in Matrigel by increasing their length by 4 fold and their area up to $84\% \pm 8\%$, as compared to untreated (UT) control cells (Figure 1C).

2.2. LMWF and Level of Glycosaminoglycan Chains Expressed in HUVECs

We first investigated whether LMWF could modify the GAG chain level expressed by HUVECs. For that purpose, the level of total GAGs, HS chains, and chondroitin sulfate (CS) chains were determined by DMMB assays in the lysate of endothelial cells after 24 h of 10 $\mu\text{g/mL}$ LMWF treatment and compared to UT control cells. There was no significant difference in the level of GAGs, HS, and CS after LMWF incubation (Figure S1). Following LMWF treatment, the amount of total GAGs in the conditioned medium of LMWF-treated cells decreased by $28\% \pm 8\%$ at 24 h, as compared to untreated control cells ($p < 0.05$, $n = 3$, Figure 2A). Further analysis revealed that HS amounts decreased by $25\% \pm 5\%$ in the conditioned medium of the LMWF-treated cells, whereas there was no variation of CS chain amount (Figure 2A). These data suggests that LMWF may modify the HS and HSPG turnover (HS synthesis or cleavage and HSPG shedding).

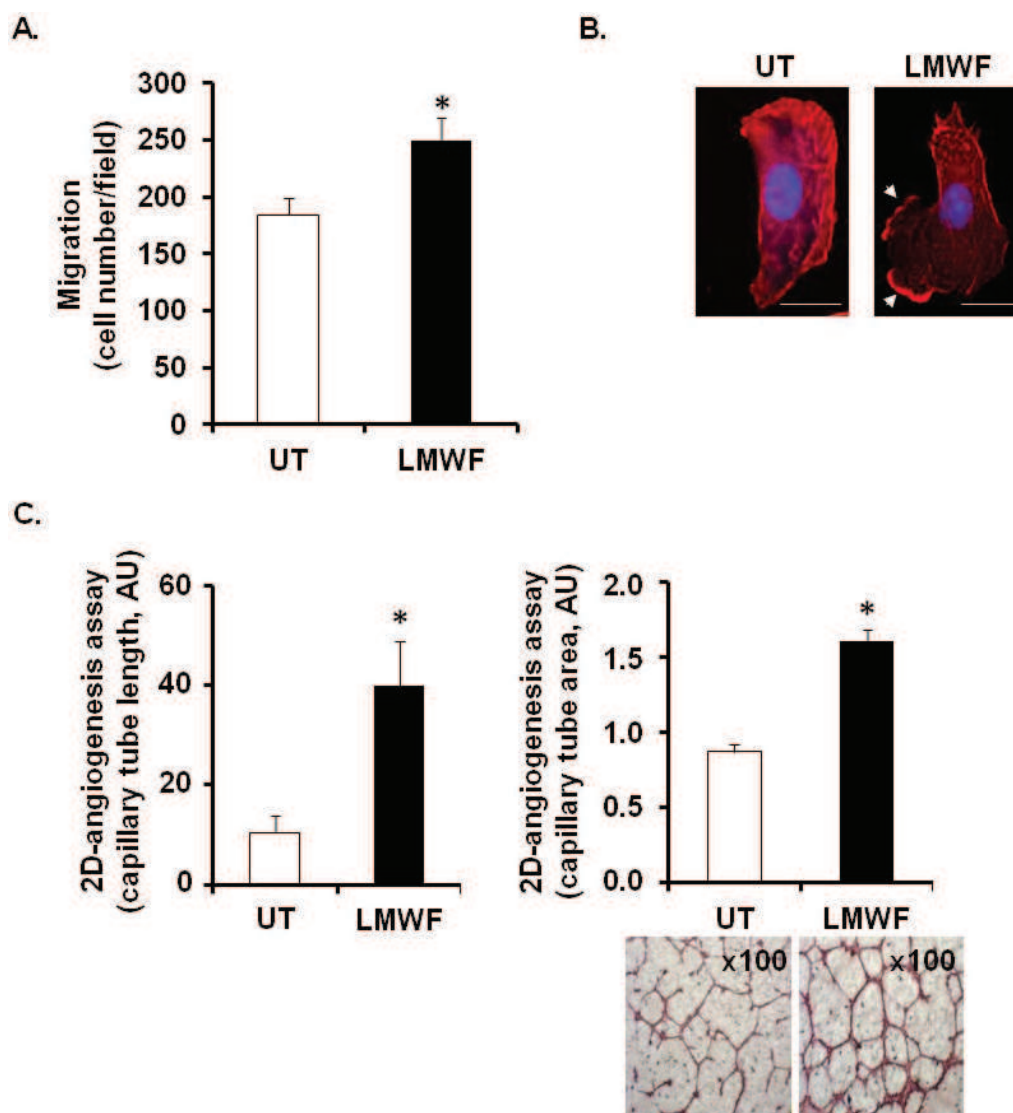


Figure 1. Effects of Low molecular weight fucoidan (LMWF) on endothelial cell abilities: migration and 2D-angiogenesis. Human vascular endothelial cells (HUVEC) were incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LMWF for 24 h and the migration (A), the lamellipodia formation (B) and the capillary tube formation (length and area) (C) were determined. (A) Migration chamber assay. HUVECs incubated with or without 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LMWF, were allowed to migrate through the porous fibronectin-coated membrane. They were stained with Mayer's hemalum and counted. The results are expressed as cell number per field; (B) Lamellipodia formation. LMWF induced the formation of lamellipodia and ruffles (white arrows indicate lamellipodia/ruffle formation, DAPI-nucleus (blue), Phalloidin-F-actin (red)). Bar = 10 μm ; (C) Capillary tube formation (2D-angiogenesis assay) on Matrigel. Left and right panels show the length (left) and area (right) of endothelial capillaries formed by HUVECs treated with or without 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LMWF. Lower right panel shows a representative image of capillary network, as photographed with phase contrast microscopy (magnification $\times 100$). * $p < 0.05$ versus control untreated (UT) cells. A.U.: arbitrary unit.

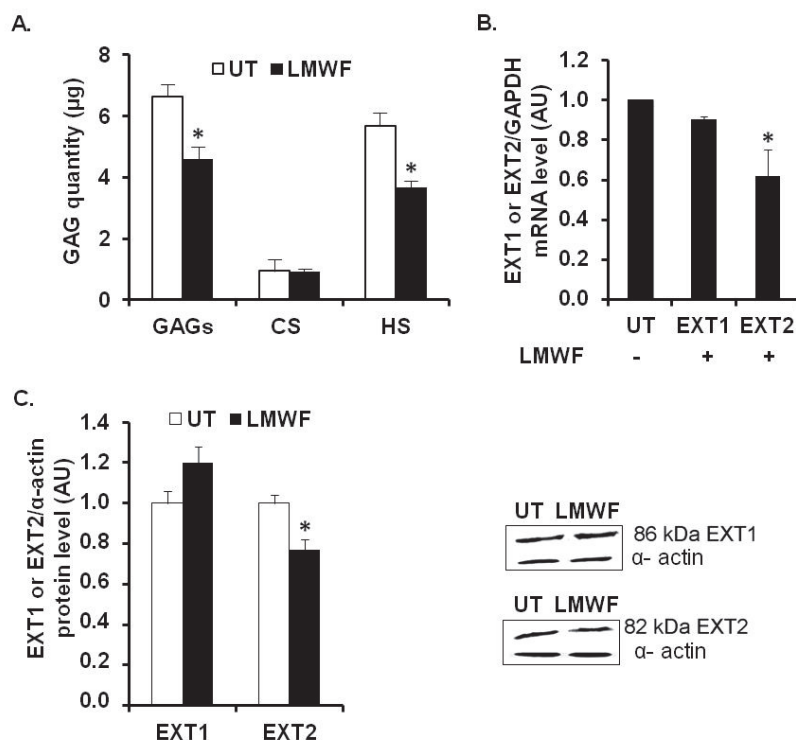


Figure 2. LMWF and glycosaminoglycan chain level in HUVECs. (A) Glycosaminoglycan quantification. HUVECs were incubated with 10 µg/mL LMWF for 24 h and the amount of total GAGs, CS and HS chains were determined in the supernatant according to a dimethyl-methylene blue (DMMB) assay; (B) Exostosin-1 and -2 (EXT1 or EXT2) mRNA levels were determined by real-time RT-PCR in cells treated with or without 10 µg/mL LMWF. (C) EXT1 or EXT2 protein levels were determined by western blot in cells treated with or without 10 µg/mL LMWF. Right panel shows a representative image of the western blot assay. * $p < 0.05$ versus control untreated (UT) cells. A.U.: arbitrary unit.

2.3. LMWF and Heparan Sulfate Biosynthesis and Degradation Enzymes in HUVECs

We have first studied the effects of LMWF on enzymes involved in HS biosynthesis (EXT1, EXT2) or degradation (heparanase). These glycosyltransferases EXT1 and EXT2 are responsible for the elongation of HS by catalyzing the addition of alternating β -D-glucuronate (GlcA) and α -D-N-acetylglucosamine (GlcNAc) units to the tetrasaccharide linker of GAGs. We assessed the glycosaminoglycan polymerization (EXT1 and EXT2) mRNA levels by quantitative RT-PCR. The mRNA expression level of EXT2 in LMWF-treated cells was decreased by $36\% \pm 13\%$, as compared to untreated cells at 24 h ($p < 0.05$), whereas the level of mRNA encoding for EXT1 was unaffected (Figure 2B). The EXT1 and EXT2 protein levels were measured by western blot analysis in HUVEC lysates. A slightly decreased EXT2 level by $23\% \pm 5\%$ was observed in the LMWF-treated cells ($p < 0.05$). No significant difference was observed for EXT1 (Figure 2C).

The HS-degrading enzyme heparanase (HPSE) is an endo- β -D-glucuronidase, which plays an important role in remodeling of the basement membrane and extracellular matrix during process of inflammation [13–15]. HPSE is synthesized as an inactive 65 kDa pro-form enzyme (pro-HPSE), can be transformed into active heterodimer consisting of 50 and 8 kDa subunits (active HPSE), and cleaves HS

chains attached to proteoglycans, such as syndecans and perlecan [15,16]. *HPSE* mRNA expression, as assessed by quantitative RT-PCR, was increased by 2.4 fold in LMWF-treated cells, as compared to untreated control cells (Figure 3A). Active HPSE form (50 kDa) expression, as assessed by western blot, was significantly increased up to 2 fold in the supernatant or by 20% ± 5% in the lysate of the LMWF-treated cells (Figure 4B). HPSE activity was slightly but significantly increased up to 20% ± 3% in the lysate of LMWF-treated cells (Figure 3C), whereas it was not detected in the respective conditioned medium.

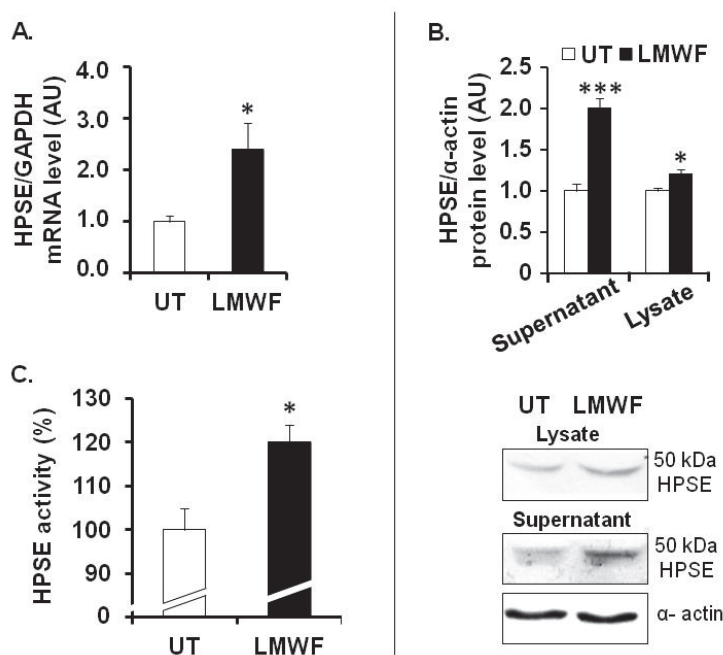


Figure 3. LMWF and heparanase in HUVECs. (A) *HPSE* mRNA levels were determined by real-time RT-PCR in cells treated with or without 10 µg/mL LMWF; (B) *HPSE* protein levels were determined by western blot in the supernatant or in the lysate of cells treated with or without 10 µg/mL LMWF. Lower panel shows a representative image of the western blot assay. (C) Heparanase activity was checked in the lysate of LMWF-treated cells. *HPSE* activity in untreated cells was arbitrary set to 100%. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0005$, LMWF-treated cells *versus* LMWF-untreated cells (UT). A.U.: arbitrary unit.

2.4. Effects of LMWF on the Syndecan Expression

We therefore focused on the effect of LMWF on the expression of the heparan sulfate transmembrane proteoglycans belonging to the syndecan family, SDC-1 and SDC-4.

In HUVECs, we demonstrated that LMWF increased the level of mRNA encoding for SDC-1 by 48% ± 12% ($p < 0.005$), whereas it decreased that of SDC-4 by 38% ± 9% ($p < 0.05$) (Figure 4A). We then analyzed SDC-1 and SDC-4 levels by western blot. The SDCs contains the core protein (ectodomain, transmembrane, and cytoplasmic domains) and the GAG, which are attached in the ectodomain part of SDCs. As shown previously, it is well known that the western blot expression pattern is heterogeneous (many bands from 20 kDa to 250 kDa) and show many forms of SDC-1 and SDC-4 in the cell lysate [17]. Our results of SDC protein expression showed the presence of 3 different forms for SDC-1 and SDC-4

(Figure 4B,C). Upon LMWF treatment, protein level was significantly increased by $22\% \pm 2\%$ (33 kDa), $13\% \pm 5\%$ (75 kDa) and $18\% \pm 4\%$ (250 kDa) for SDC-1 or decreased by $28\% \pm 5\%$ (22 kDa), $41\% \pm 9\%$ (75 kDa), and $48\% \pm 5\%$ (150 kDa) for SDC-4, respectively (Figure 4B,C). As assessed by dot blot, the shedded ectodomain level of SDC-1 in the supernatant of LMWF-treated cells was increased by 2 fold, as compared to untreated control cells, whereas that of SDC-4 was decreased by $35\% \pm 8\%$ ($p < 0.05$) (Figure 4D).

Taken together, LMWF modulate SDC-1 and SDC-4 gene expression and ectodomain shedding in HUVEC *in vitro* culture.

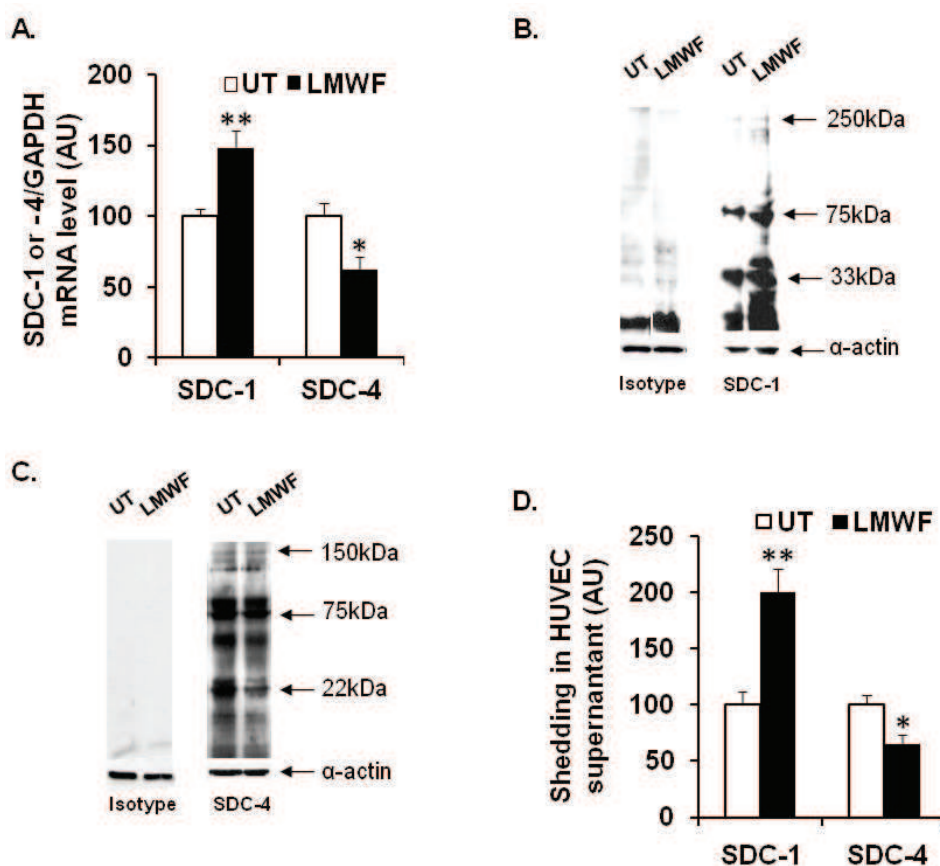


Figure 4. Effects of LMWF on the SDC expression in HUVECs. *SDC-1* and *SDC-4* mRNA or protein levels in endothelial cells treated or not with $10 \mu\text{g/mL}$ LMWF were analyzed respectively by real time RT-PCR (A) or western blot (B,C). SDC-1 and SDC-4 ectodomains in the supernatant of cells treated with or without $10 \mu\text{g/mL}$ LMWF were analyzed by dot blot (D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, significantly different to LMWF-untreated cells (UT). A.U.: arbitrary unit.

In vivo, the influence of LMWF on SDCs expression was assessed in a Sprague Dawley Rat model of intimal hyperplasia. We have already used this model to show the pro-angiogenic effect of LMWF treatment [10]. In addition, SDC-1 and SDC-4 have been shown to play an important role in the pathological response of a balloon-injured wall artery [18]. Briefly, rats were subjected to balloon injury into the thoracic artery to create local destruction of endothelial layer leading to inflammation and intimal

hyperplasia development. Two weeks after LMWF-intramuscular injection the level of SDC-1 and SDC-4 in the balloon-injured artery was analyzed.

Our results demonstrated that the expression of SDC-1 and SDC-4 was very low in healthy arteries in the media (M) and adventitia (A) layers, whereas it increased in the neointima (N), media and adventitia layers in balloon-injured, and NaCl-treated arteries (vehicle), leading to development of intimal hyperplasia (Figure 5A–E). The LMWF treatment of injured artery increased SDC-1 expression in the neointima and in the adventitia layers, as compared to vehicle (Figure 5C). Furthermore, upon LMWF treatment, the SDC-4 expression was decreased in the neointima and media, but largely increased in the adventitia layer, as compared to vehicle (Figure 5F). These *in vivo* results were in concordance with our previously described observation obtained in the HUVECs *in vitro* culture [10].

All these results suggest that LMWF has an important influence on the proteoglycan distribution in the endothelial cells and can increase SDC-1 and decrease SDC-4 expression *in vitro* and *in vivo*.

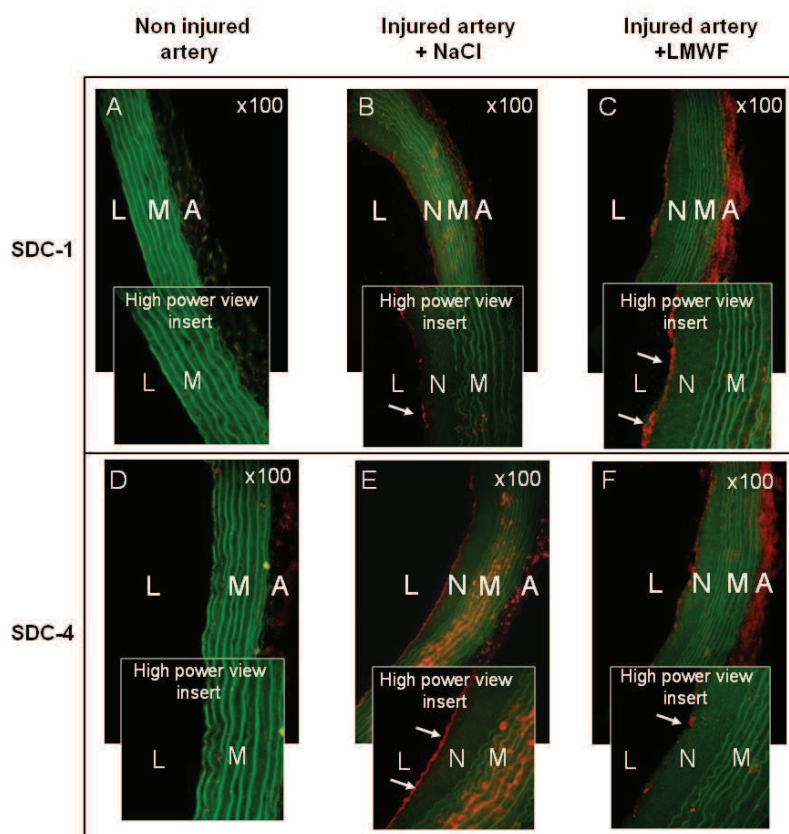


Figure 5. Effects of LMWF on the SDC distribution in rat balloon injured artery. SDC-1 and SDC-4 expressions were assessed using immunohistochemistry in rat model of intimal hyperplasia. (A) SDC-1 or (D) SDC-4 expressions in non injured arteries; (B) SDC-1 or (E) SDC-4 expressions in injured arteries treated with NaCl; (C) SDC-1 or (F) SDC-4 expressions in injured arteries treated with LMWF. White arrows indicate SDC expressions in the neointima layer in high power view inserts (red). Green: autofluorescence of the elastic fibers of the lamina. Magnification $\times 100$, L: lumen, N: neointima, M: media, A: adventitia.

2.5. Assessment of *EXT*-, *HPSE*- or *SDC* Involvement in Biological Effects of LMWF

To assess the potential role of *EXT1/EXT2*, *HPSE* or *SDC-1/SDC-4* in the biological effects induced by LMWF, specific siRNAs were carried out.

Quantitative RT-PCR showed that the expression of the mRNAs and proteins of *EXT2* in *EXT2*-siRNA- and *EXT1* in *EXT1*-siRNA-transfected cells was reduced up to $72\% \pm 16\%$ and $71\% \pm 15\%$, respectively, as compared to the *SNC*-siRNA-transfected control cells (Figure 6A). The flow cytometry assay showed that the binding of 10E4 anti-HS antibodies to *EXT2*-siRNA- or *EXT1*-siRNA-transfected cells was respectively reduced by $75\% \pm 8\%$ or by $80\% \pm 9\%$, as compared to *SNC*-siRNA-transfected control cells (Figure 6B).

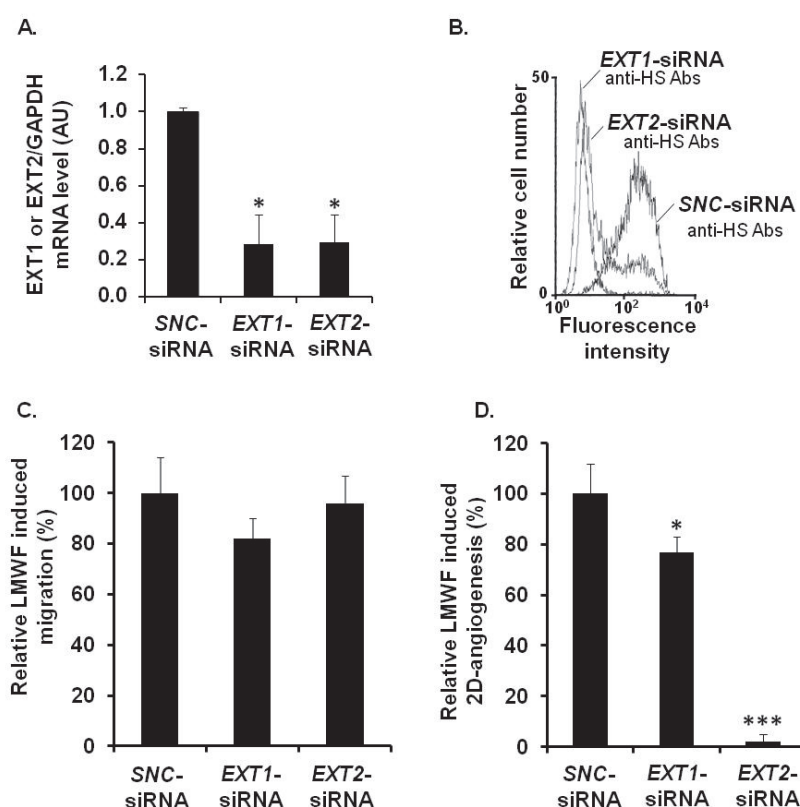


Figure 6. Assessment of *EXT* involvement in biological effects of LMWF in HUVECs. HUVECs were transfected with *EXT1*-siRNA or *EXT2*-siRNA or with *SNC*-siRNA control. (A) *EXT1* or *EXT2* mRNA levels were determined in *EXT1*-siRNA- or *EXT2*-siRNA- or *SNC*-siRNA-transfected control cell by real-time RT PCR. *EXT1*- or *EXT2* mRNA level normalized to *GAPDH* mRNA level in *SNC*-siRNA-transfected control cells was arbitrarily set to 1; (B) The binding of 10E4 anti-HS antibodies to *EXT2*- or *EXT1*-siRNA transfected cells was compared to that of *SNC*-siRNA-transfected cells; (C) Migration was assayed in cells treated with or without 10 $\mu\text{g/mL}$ LMWF; (D) 2D-angiogenesis was assayed in cells treated with or without 10 $\mu\text{g/mL}$ LMWF. The difference in the capillary network length between LMWF-treated and untreated cells in each RNA interference condition (*EXT1* or *EXT2* silencing) was compared to that in *SNC*-siRNA-transfected cells. Control LMWF induction was arbitrary set at 100% for *SNC*-siRNA-transfected cells. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0005$ versus *SNC*-siRNA-transfected control cells. A.U.: arbitrary unit.

There were no significant difference in cell migration after LMWF treatment in *EXT1*-siRNA- or *EXT2*-siRNA-transfected cells, as compared to *SNC*-siRNA-transfected cells (Figure 6C). In contrast, the LMWF induction of 2D-angiogenesis was abolished in LMWF-treated *EXT2*-siRNA-transfected cells by $98\% \pm 5\%$, or decreased in LMWF-treated *EXT1*-siRNA-transfected cells by $33\% \pm 5\%$ ($p < 0.05$), as compared to *SNC*-siRNA-transfected control cells (Figure 6D). These latter data suggest that *EXT2* and, to a lesser extent *EXT1*, affect the pro-angiogenic effect of LMWF.

HPSE-siRNA-transfected cells were used for 2D-angiogenesis or migration assays. Quantitative RT-PCR showed that the expression of the mRNAs encoding for heparanase in *HPSE*-siRNA-transfected cells was reduced up to $74\% \pm 8\%$, as compared to the *SNC*-siRNA-transfected control cells (Figure 7A). Under basal conditions (in the absence of LMWF), *HPSE*-siRNA transfection decreased endothelial cell migration by $37\% \pm 5\%$ ($p < 0.05$), but had no effect on 2D-angiogenesis (Figure S2A,B). However, upon LMWF stimulation and *HPSE*-siRNA transfection, the ability of HUVECs to form capillary network in Matrigel 2D-angiogenesis assay was altered. The capillary network length induced by LMWF treatment was largely decreased by $51\% \pm 11\%$ in *HPSE*-siRNA-transfected cells, as compared to *SNC*-siRNA-transfected control cells (Figure 7B). In contrast, the cell migration induced by LMWF was significantly increased by $56\% \pm 9\%$ ($p < 0.05$) in *HPSE*-siRNA-transfected, as compared to *SNC*-siRNA-transfected cells (Figure 7C).

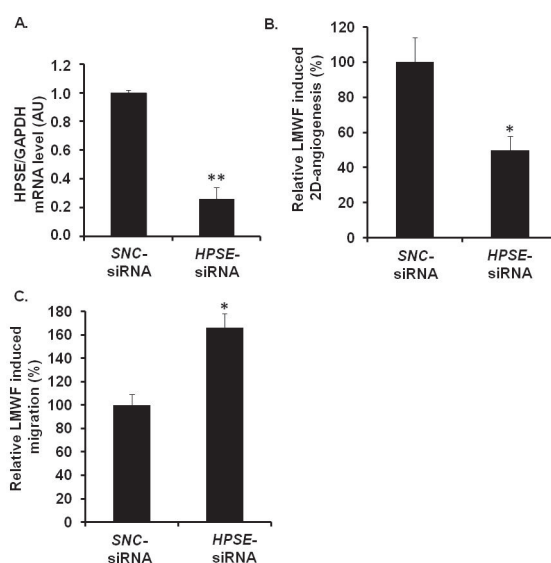


Figure 7. Assessment of *HPSE* involvement in biological effects of LMWF in HUVECs. HUVECs were transfected with *HPSE*-siRNA or *SNC*-siRNA control. **(A)** *HPSE* mRNA levels were determined in *HPSE*-siRNA- or *SNC*-siRNA-transfected cells by real-time RT-PCR. *HPSE* mRNA level normalized to *GAPDH* mRNA level in *SNC*-siRNA-transfected control cells was arbitrary set to 1; **(B)** 2D-angiogenesis was assayed in cells treated with or without 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LMWF. The difference in the capillary network length between LMWF-treated and untreated cells in *HPSE* RNA interference condition was compared to that in *SNC*-siRNA-transfected cells; **(C)** Migration was assayed in cells treated with or without 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LMWF. Control LMWF induction was arbitrary set at 100% for *SNC*-siRNA-transfected cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ versus *SNC*-siRNA-transfected control cells. A.U.: arbitrary unit.

LMWF biological effects have been checked in *SDC-1*-siRNA- or *SDC-4*-siRNA-transfected cells or in cells treated with specific anti-SDC-1 or anti-SDC-4 antibodies. As described [19,20], quantitative RT-PCR showed that the expression of the mRNAs encoding for SDC-1 in *SDC1*-siRNA- or SDC-4 in *SDC4*-siRNA-transfected cells was reduced up to $69\% \pm 14\%$ and $73\% \pm 17\%$ respectively, as compared to *SNC*- siRNA-transfected control cells.

Under basal conditions, the 2D-angiogenesis assays showed a significant decrease in cell capillary network length by $23\% \pm 4\%$ in *SDC-1*- and by $54\% \pm 7\%$ in *SDC-4*-siRNA-transfected cells, as compared to *SNC*-siRNA-transfected control cells (Figure S3A). Upon LMWF cell treatment, the LMWF-induction of 2D-angiogenesis was unchanged in *SDC-1*-siRNA-transfected cells, whereas it was significantly increased in *SDC-4*-siRNA-transfected cells by $62\% \pm 5\%$ ($p < 0.005$), as compared to *SNC*-siRNA-transfected control cells (Figure 8A).

Under basal conditions, endothelial cell migration assayed in modified Boyden chambers was decreased by $43\% \pm 5\%$ and by $40\% \pm 8\%$ in *SDC-1*-siRNA-transfected and anti-SDC-1 antibody-incubated cells, respectively (Figure S3B). LMWF induction of endothelial cell migration was decreased in *SDC-1*-siRNA-transfected cells by $20\% \pm 5\%$ and in anti-SDC-1 antibody-incubated cells by $47\% \pm 3\%$, as compared to respective control cells (Figure 8B). These data were confirmed by a wound healing assay (Figure S3C). Regarding RNA silencing experiments, these data suggest that SDC-1 does not play a crucial role in LMWF-induced effects.

Basal endothelial cell migration was decreased by $68\% \pm 5\%$ and by $67\% \pm 9\%$ in *SDC-4*-siRNA-transfected and anti-SDC-4 antibody-incubated cells, respectively (Figure S3B). However, LMWF-induction of endothelial cell migration was largely increased by $87\% \pm 5\%$ in *SDC-4*-siRNA-transfected cells or by 2 fold in anti-SDC-4-antibody incubated cells, as compared to respective control cells (Figure 8B). These data were confirmed by a wound healing assay (Figure S3C). These results demonstrated that SDC-4 expression limits the LMWF effect on the cells.

Altogether, we have demonstrated that on the one hand EXT2 (and EXT1 to a lesser extent) and HPSE expression, and on the other hand SDC-4, play critical roles in LMWF pro-angiogenic effects. We have then addressed the question whether silencing of endothelial HPSE or EXT2 could affect SDC-4 level. In *HPSE*- or *EXT2*-siRNA-transfected cells, *SDC-4* mRNA level was up-regulated respectively by $64\% \pm 19\%$ or $35\% \pm 10\%$, as compared to *SNC*-siRNA-transfected control cells (Figure 8C). In addition, there was no effect on *SDC-1* mRNA level in *HPSE*- or *EXT2* silenced cells (Figure 8C).

2.6. Discussion

Fucoidan exhibits various biological effects, among them anti-inflammatory, low anti-coagulant and anti-thrombotic activities. We have previously shown the therapeutic potential of low molecular weight fucoidan (LMWF) in reduction of in-stent restenosis in a rabbit model, vascular tissue repair [21], and in critical hind limb ischemia in a rat model [7].

In this study, we hypothesized that LMWF could modify the amount and the distribution of heparan sulfate chains expressed in endothelial cells and of syndecan-1 (SDC-1) and syndecan-4 (SDC-4), two major heparan sulfate (HS) membrane proteoglycans.

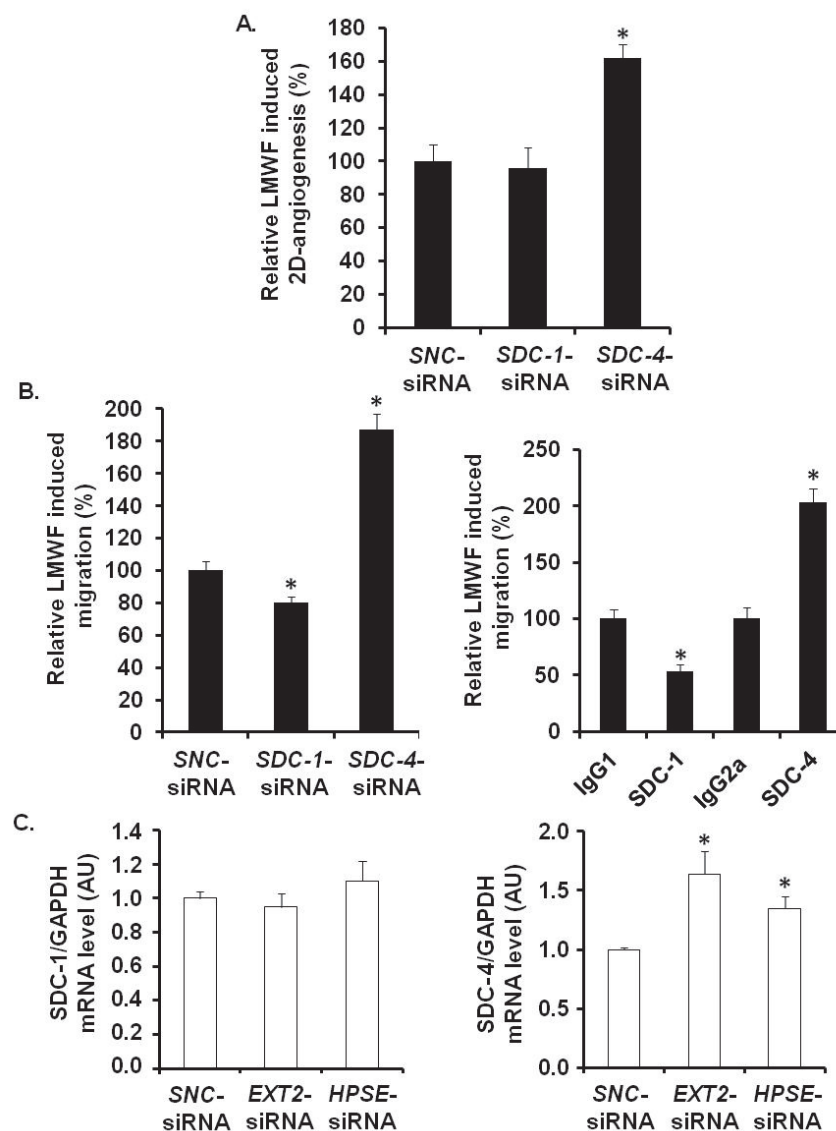


Figure 8. Assessment of SDC involvement in biological effects of LMWF in HUVECs. 2D-angiogenesis (A) and migration (B) assays were performed in *SDC-1*-siRNA- or *SDC-4*-siRNA- or *SNC*-siRNA-transfected control cells (B, left panel), or in cells treated with specific anti-SDC-1 or anti-SDC-4 antibodies (B, right panel). Control LMWF induction was arbitrary set at 100% for *SNC*-siRNA-transfected cells or isotypes. (C) *SDC-1* and *SDC-4* mRNA expression was analyzed in *EXT2*- or *HPSE*-siRNA-transfected cells. * $p < 0.05$ versus *SNC*-siRNA-transfected control cells or isotypes. A.U.: arbitrary unit.

Our results could be summarized as follows: 1/LMWF increased endothelial cell migration and vascular tube formation; 2/LMWF modified HS- and SDC metabolism (increased heparanase (HPSE) level and activity, change in SDC-1/-4 expression and shedding); 3/*EXT2*, *HPSE* and *SDC-4* are involved in LMWF cellular effects since silencing *EXT2*, *HPSE*, or *SDC-4* affect LMWF-induced angiogenesis; 4/Our data also evidenced a link between *EXT2*, *HPSE*, and *SDC-4* level since silencing *EXT2* or *HPSE* led to increased translational expression of *SDC-4*.

Fucoidan as a heparin-like molecule can physically interact with several heparin-binding growth factors and chemokines. Fucoidan may promote or inhibit growth factor effects by trapping

endogenously-released growth factors, or by displacing its ligands from their storage sites, increasing their bioavailability. Thus, LMWF has been shown to release the glycosaminoglycan-bound stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12, which mobilizes progenitor cells [22]. (SDF-1)/CXCL12 may participate in angiogenesis together with vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) [23]. In this context, one could suppose that the modification in HS chain synthesis or degradation would affect LMWF activities. For example, it has been demonstrated that the overall size of HS chains, as well as the specific features of HS chains, including the sulfated patterns, can affect FGF signaling activation [24]. Our data suggest that LMWF effects depend on HS, since LMWF-mediated angiogenesis is decreased either in *EXT2* (involved in HS biosynthesis) or *HPSE* (involved in HS degradation) silencing conditions. Furthermore, our data also demonstrated that LMWF increased HPSE expression and activity, and does not really affect *EXT1* and *EXT2* expression in endothelial cells. It is of note that LMWF treatment only slightly affects the HS level in our *in vitro* condition of HUVEC culture. This could be related to the low sensitivity of the dimethyl-methylene blue (DMMB) assay.

Interestingly, the inverse relations among HS, *EXT1*, and *HPSE* expressions are observed in cancer cell models. Cancer cells with higher *EXT1* expression exhibited lower *HPSE* expression, whereas cancer cells with lower *EXT1* expression exhibited higher *HPSE* expression [25]. In addition, the *EXT1* knockdown with siRNA led to up-regulation of *HPSE* expression and potentiation of metastatic capacity [25]. Similarly, Huegel *et al.* recently demonstrated that interfering with HS function, both with the chemical antagonist Surfen or treatment with bacterial heparitinase, up-regulated endogenous *HPSE* gene expression, suggesting a feedback mechanism that would result in further HS reduction and increased signaling [26]. With our data, it suggests that a coordinated regulation of key features of HS expression (*EXT* enzymes and *HPSE*) does exist even no mechanism has been brought out yet.

Our results also highlight a more important role of *EXT2* than *EXT1* in LMWF-induced angiogenesis. This could be related to the fact that these enzymes can act differently on HS biosynthesis as demonstrated by Busse *et al.* [27].

Besides, *HPSE* overexpression has already been involved in *in vivo* angiogenesis in mice models. Homozygous transgenic mice that overexpress *HPSE* demonstrate both a deep reduction in the size of HS chains, as well as enhanced neovascularization of mammary ducts [28], some conclusions that seem consonant with our observations. The overexpression of *HPSE* by tumors may activate tumor angiogenesis through various mechanisms in addition to promoting the release of growth factor-decorated HS fragments. *HPSE* has been demonstrated to be a mediator of angiogenesis by different mechanisms [29]. *HPSE* promotes: 1/endothelial cell migration and degradation of the subendothelial basal lamina; 2/release of active HS-bound FGF and VEGF; 3/release of HS degradation fragments that promote FGF receptor binding, dimerization and signaling. In addition, *HPSE* has been demonstrated to be related to changes in the distribution of SDC-1, in particular by acting on SDC-1 ectodomain shedding [30]. We have investigated effects of LMWF on SDC-1 and SDC-4. Both heparan sulfate proteoglycans are involved in cell migration through cell cytoskeletal rearrangement, spreading, and 2D-angiogenesis. We have demonstrated that LMWF increases endothelial cell SDC-1 expression and shedding, and has an opposite effect on the same SDC-4 features. In rat injured thoracic aorta, our recent *in vivo* results demonstrate that LMWF treatment increased SDC-1 expression in the neointima layer of the injured artery, but decreased the SDC-4 expression in the neointima and media layers, therefore strengthening

the *in vitro* data [10]. *SDC-4*, but not *SDC-1* silencing in HUVECs increases the LMWF-induced angiogenesis and cell migration, suggesting that *SDC-4* expression partially counteracts LMWF effects.

Furthermore, our data also evidenced an unknown link between *EXT2*, *HPSE*, and *SDC-4* level since silencing *EXT2* or *HPSE* led to increased translational expression of *SDC-4*. In these conditions, *SDC-1* expression remains unchanged. These data suggested that the amount of HS present on *SDC-4* core proteins could regulate the rate of *SDC-4* core protein synthesis. Similarly, Ramani *et al.* recently demonstrated that HS-chains of *SDC-1* regulate ectodomain shedding accompanied by a very high increase in core protein synthesis [31].

Altogether, we hypothesize that LMWF affects SDCs shedding and expression by acting through both enzymes *HPSE* and matrix metalloproteinase-2 [10], leading to change in the binding and the signaling and/or the bioavailability of heparin-binding proteins in the process of angiogenesis.

3. Experimental Section

3.1. Cell Culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, N^oCRL-1730, ATCC) were cultured in Endothelial Cell Basal Media 2 (PromoCell, Heidelberg, Germany) supplemented with 10% of fetal calf serum (Lonza, Levallois-Perret, France), and a mix from PromoCell containing EGF (5.0 ng/mL), Hydrocortisone (0.2 µg/mL), VEGF (0.5 ng/mL), bFGF (10 ng/mL), R3 IGF-1 (20 ng/mL), Ascorbic Acid (1 µg/mL), Heparin (22.5 µg/mL), 1% Penicillin Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Austria). Cells were divided two times per week at a sub cultivation ratio of 1:3.

3.2. Low Molecular Weight Fucoidan

Low molecular weight fucoidan (LMWF) was isolated and hydrolyzed by a radical depolymerization process [32] from high molecular weight (HMW) extracts from *Fucus vesiculosus*, a brown seaweed (Kraeber & Co GmbH, Ellerbek, Germany). The characteristics of LMWF according to previously reported analytical methods [33] are: weight average molecular mass 8 ± 1 kDa; fucose content 35% (wt/wt); uronic acid content 3% (wt/wt); and sulfate content 34% (wt/wt). The structural model of fucoidan prepared from *Fucus vesiculosus* was determined previously by others [34,35].

3.3. Glycosaminoglycan Extraction

Frozen supernatant from HUVEC cell culture were freeze-dried and suspended in the extraction buffer (50 mM Tris pH 7.9, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ and 1% of Triton X-100). Samples were digested by proteinase K (PK) (50 µg/mL final sample concentration; Merck, Molsheim, France) at 56 °C for 24 h. After PK inactivation (90 °C, 30 min), samples were treated by DNase (10 U/mL final sample concentration; Qiagen, Courtaboeuf, France) at 37 °C, overnight. Then, samples were centrifuged (13,000× g, 10 min) through a 0.22 µm filter unit (Pall, Saint-Germain-en-Laye, France). NaCl was added to a final concentration of 4 M and the filtered samples were vigorously agitated for 30 min. Proteins were precipitated with TCA (10% final sample concentration; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at 4 °C. Pellets were discarded and supernatants were cleared by chloroform washing. Finally, aqueous phases were immediately dialysis (Spectrum, 3500 MWCO) against buffer (50 mM Tris

pH 7.5, 50 mM CH₃COONa, 2 mM CaCl₂) and then pure water before freeze-drying. Identities of the extracted GAGs were analyzed by specific digestion with chondroitinase ABC (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), or by nitrous acid treatment as previously described [36].

3.4. Glycosaminoglycan Quantification

Sulfated GAGs were quantified according to the 1–9 dimethyl-methylene blue (DMMB) assay as previously described [35]. Briefly, an aliquot of each sample was pipetted and completed up to 100 µL with pure water, 1 mL of DMMB solution was added and then vigorously agitated. Then samples were centrifuged (13,000× g, 10 min) to sediment the GAG/DMMB complex and supernatants were discarded. The pellet was then dissolved in 250 µL of the decomplexating solution by shaking and the absorbance of the resulting solution was measured at 656 nm. A calibration curve constructed with known amounts of chondroitin sulfate (CS) A or HS standard was included in each assay.

3.5. Flow Cytometry Analysis

To identify the level of heparan sulfate on HUVEC cell surface, cells were preincubated for 1 h at 4 °C with anti-HS Abs (10 µg/mL, Clone 10E4; Seikagaku COGER, Paris, France) or with isotypes. After washing, cells were labeled for 30 min at 4 °C with anti-mouse Ig-FITC (1:50; Becton Dickinson, Le Pont de-Claix, France). Cells were fixed in 1% paraformaldehyde (PFA) and analyzed with a FACScan (Becton Dickinson, Le Pont de-Claix, France).

3.6. Real-Time RT-PCR

Real-time RT-PCR were performed using an Applied Step-One device with EXT1 (Hs00609162_m1), EXT2 (Hs00925442_m1), SDC-1 (Hs Hs00896423_m1), SDC-4 (Hs Hs01120909_m1) and Heparanase (Hs00180737_m1) TaqMan Inventoried Assay and TaqMan Gene Expression Master Mix kit (Life Technologies, Saint Aubin, France). The mRNA levels were normalized with *GAPDH* housekeeping gene levels as described in the manufacturer's instructions (Hs02758991_g1, TaqMan Inventoried Assay; Life Technologies, Saint Aubin, France).

3.7. RNA Interference

EXT1 and *EXT2* gene-specific sense and antisense 21-nt single stranded RNAs with symmetric 2 nt 3'(2'-deoxy) thymidine overhangs validated by Life Technologies (s4891 and s4894, Silencer Select siRNA, Life Technologies, Saint Aubin, France). *EXT1*, *EXT2*, *SDC-1*, *SDC-4*, *Heparanase (HPSE)* and scramble *SNC* silencing were carried out as previously described [18,19]. HUVEC cells were transfected with 50 nM siRNA in serum-free medium using INTERFERIN transfectant reagent (Polyplus, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) following the manufacturer's instructions. In each experiment, a negative siRNA control *SNC* (Eurogentec, Angers, France) was used as a negative control. Cells transfected with specific siRNA or *SNC*-siRNA were used 48 h post transfection for RNA analysis.

3.8. Migration

Cell migration was measured from 6×10^4 HUVECs with Bio-coat cell migration chambers (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) [37]. Briefly, inserts of Bio-coat cell migration chamber were coated with fibronectin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Beckton Dickinson, Le Pont de-Claix, France). 6×10^4 HUVECs treated with *SDC-1*-, *SDC-4*-, *EXT1*-, *EXT2*-siRNA or *SNC*-siRNA for 48 h were resuspended in basal media supplemented or not with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LMWF. Cells were added in the upper chamber and complete media was added in the lower chamber. After 24 h, cells migrated through the porous membrane were stained with Mayer's hemalum (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and counted manually by two different observers who performed the blind data acquisition. The cell migration rate was $[(D1 - D2)/D1] \times 100$; D1 was the difference between the number of migrated *SNC*-siRNA-transfected cells stimulated by LMWF and that of unstimulated migrated *SNC*-siRNA-transfected cells; D2 was the difference between the number of migrated specific siRNA-transfected cells stimulated with LMWF and that of unstimulated specific siRNA-transfected cells. Alternatively, 6×10^4 cells were pre-incubated or not for 2 h with the following antibodies: anti-SDC-1 (Clone DL101, IgG1; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-SDC-4 (Clone 5G9, IgG2a; Santa Cruz, Heidelberg, Germany) or their isotype (Becton-Dickinson, Le Pont de-Claix, France) at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The cell migration rate was $[(D3 - D4)/D3] \times 100$; D3 was the difference between the number of migrated isotype-preincubated cells stimulated with LMWF and that of migrated unstimulated isotype-preincubated cells. D4 was the difference between the number of migrated antibodies-preincubated cells stimulated with LMWF and that of migrated unstimulated antibodies-preincubated cells.

3.9. Immunocytochemistry

HUVECs were harvested and put into the labtek chamber (10×10^4 per well), than incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LMWF for 2 h and lead to spread. Then the cells were permeabilized in 0.05% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), stained with Alexa Fluor 546 phalloidin (F-actin, dilution 1/100; Life Technologies, Saint Aubin, France) and lamellipodia formation were observed with a confocal microscopy (LSM 510; Carl Zeiss, Marly le Roi, France).

3.10. In Vitro Angiogenesis Assay

2D-angiogenesis assay (capillary tube formation in Matrigel) was performed with 9×10^4 cells/well seeded on Matrigel-coated 24-well plate (Beckton Dickinson, Le Pont de-Claix, France) and treated for 24 h with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LMWF. Endothelial cells were pre-treated with *EXT1*-, *EXT2*-siRNA or *SNC*-siRNA (control) 48 h before. The capillary tubes were fixed with 4% PFA and stained with 1% Hematoxylin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and photographed in phase contrast microscopy (CK40; Olympus, Rungis, France) after 24 h. The average length of vascular capillary tubes was evaluated using the open source ImageJ Software (Open Source, ImageJ ver 1.47r, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

3.11. Western Blot

HUVECs were incubated with 10 µg/mL of LMWF for 24 h and assayed for western blot as previously described [38]. The supernatant was collected and cell lysate protein concentration was determined by bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Total protein was probed using anti-SDC-1 and anti-SDC-4 (respectively: mouse monoclonal IgG1, clone DL101 and rabbit polyclonal IgG, H-140, for both dilution 1/500; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-EXT1 and anti-EXT2 (respectively: rabbit polyclonal IgG, H-114 and goat polyclonal IgG, C-17, for both dilution 1/500; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-HPSE (rabbit polyclonal IgG, H-80, 1/500; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), or using their isotypes (all at 1/200) and revealed with horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-mouse, anti-rabbit, or anti-goat IgG (dilution 1/2500; Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK). For comparison α -actin (rabbit polyclonal IgG, I-19-R, dilution 1/500; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) was used as relevant standard house-keeping protein and revealed with horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-rabbit IgG (dilution 1/2500; Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK). Proteins were detected using Enhanced chemiluminescence detection reagents (GE Healthcare, Orsay, France). The statistical analysis was done after the protein bands quantification by Scion Image Software (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

3.12. Heparanase Activity Assay

HUVEC cell lysate or supernatant was used to determine heparanase activity using Cisbio Heparanase assay (Cisbio, Codolet, France). HepOne (InSight, Rehovot, Israel) was used for heparanase standard range. Briefly, cells lysate, supernatant, or HepOne was mixed with HS labeled with biotin and Eu³⁺ in reaction buffer (20 mM citrate phosphate buffer pH 5.4, 50 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA, 0.1% Chaps) for 3 h at 37 °C. Then for the detection step we add streptavidin-d2 (300 mM phosphate buffer pH 7, 800 mM potassium fluoride, 0.1% BSA, 2 mg/mL heparin) for 15 min at ambient temperature. Then the fluorescence was read using the following setup: excitation 337 nm, emissions 620 nm and 665 nm on M200 Pro reader (Tecan, Lyon, France).

3.13. Experimental Model of Intimal Hyperplasia

The experimental design was approved by the Bichat University Institutional Animal Care and use Committee (N°2011-14/698-0038). Adult male Wistar rats ($n = 12$, purchased from Janvier, CERJ, Laval, France), weighing 280 to 300 g and aged 8 weeks, were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital (0.1 mL/kg) (CEVA Santé Animal, Libourne, France). 2F Fogerty balloon catheter (Baxter Healthcare, Maurepas, France) was inserted through an incision made in the external carotid artery and advanced along the length of the common carotid artery to the thoracic aorta [39]. The balloon was then inflated and passed three times along the length of the aortas. The balloon catheter was removed, the external carotid artery was permanently ligated and the skin wound was repaired. Then, the animals were divided into two groups: the first one received the LMWF solution (5 mg/kg/day, $n = 6$) and the second one received the saline solution (control animals, $n = 6$) via intramuscularly injection in the right leg for 14 days. Two weeks after balloon injury, rats were sacrificed by pentobarbital overdose. The thoracic aortas were harvested and divided into two groups. The first one

($n = 6$) was fixed in 4% paraformaldehyde (PFA), embedded in paraffin, and cut in 9- μm -thick cross sections for histology study. The second one ($n = 6$) was embedded in Tissue-Tek OCT Compound (Tissue-Tek, Hatfield, PA, USA), frozen in liquid nitrogen and cut in 9- μm -thick cross sections with a cryostat (Leica CM 1900, Rueil-Malmaison, France) for immunohistochemistry study.

After fixation in 4% PFA, rat aortas were stained with hematoxylin and eosin solution. Digital-slide were acquired and analyzed with a NanoZoomer (Hamamatsu, Massy, France). At least 3 sections of each stained samples were used for analysis representing different levels of the arterial segment.

Adjacent 9- μm -thick fresh arterial cross sections were immunostained with mouse anti-human endothelium CD31 (rat cross-reactive, clone RECA-1, MCA970, dilution 1/20; Abcam, Paris, France) and mouse anti-human smooth-muscle α -actin (α -SMA) (rat cross-reactive, clone 1A4, M0851, dilution 1/100; Dako, Trappes, France) as previously described [40]. Afterwards, slides were co-incubated with the appropriate secondary antibodies (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Life Technologies, Saint Aubin, France). Negative control sections were incubated only with the secondary antibodies. Representative immunofluorescence photomicrographs were taken using a Leica DMRXA. Specific software (HistoLab Software, Microvision Instruments, Evry, France) allowed the tissue analysis.

3.14. Statistical Analysis

For the determination of statistical significance, ANOVA tests were performed with the StatView software (StatView 4.5 Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). All results are expressed as mean \pm SEM for minimum three independent experiments ($n = 3$). A p -value of 0.05 was used as the criterion of statistical significance.

Acknowledgments

This work was supported by the Direction de la Recherche et des Enseignements Doctoraux (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche), the University Paris 13 and INSERM. N. Marinval and L. Maillard were supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The authors would like to thank Liliane Louedec (INSERM U1148, LVTS) for her technical assistance with the animal experiments. This work was supported by Region Ile-de-France doctoral fellowship for F. Chevalier (STEMP-RVT- UNIVPARISEST-AD-P10).

The authors would like to thank Julien Trébaux and Fabienne Chevallier from Cisbio Assays Company for their technical assistance with the analysis of heparanase activity.

Author Contributions

O.H., H.H. and N.C. conceived and designed the experiments; O.H., H.H., N.M., F.C., L.G. and L.M. performed the experiments; H.H., N.C., O.H., A.S. and O.O. analyzed the data; E.G., O.H., N.M. and C.L.M. contributed reagents/materials/analysis tools; N.C., H.H. and O.H. wrote the paper.

Conflicts of Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Nikolova, V.; Koo, C.Y.; Ibrahim, S.A.; Wangs Z.; Spillmann, D.; Dreier, R.; Kelsch, R.; Fischgräbe, J.; Smollich, M.; Rossi, L.H.; *et al.* Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 397–407.
2. Zong, F.; Fthenou, E.; Mundt, F.; Szatmári, T.; Kovalszky, I.; Szilák, L.; Brodin, D.; Tzanakakis, G.; Hjerpe, A.; Dobra, K. Specific syndecan-1 domains regulate mesenchymal tumor cell adhesion, motility and migration. *PLoS ONE* **2011**, *6*, doi:10.1371/journal.pone.0014816.
3. Corti, F.; Finetti, F.; Ziche, M.; Simons, M. The syndecan-4/protein kinase C α pathway mediates prostaglandin E2-induced extracellular regulated kinase (ERK) activation in endothelial cells and angiogenesis *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 12712–12721.
4. Longley, R.L.; Woods, A.; Fleetwood, A.; Cowling, G.J.; Gallagher, J.T.; Couchman, J.R. Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 3421–3431.
5. Hassan, H.; Greve, B.; Pavao, M.S.; Kiesel, L.; Ibrahim, S.A.; Götte, M. Syndecan-1 modulates β -integrin-dependent and interleukin-6-dependent functions in breast cancer cell adhesion, migration, and resistance to irradiation. *FEBS J.* **2013**, *280*, 2216–2227.
6. Péterfia, B.; Füle, T.; Baghy, K.; Szabadkai, K.; Fullár, A.; Dobos, K.; Zong, F.; Dobra, K.; Hollósi, P.; Jeney, A.; *et al.* Syndecan-1 Enhances Proliferation, Migration and Metastasis of HT-1080 Cells in Cooperation with Syndecan-2. *PLoS ONE* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0039474.
7. Luyt, C.E.; Meddahi-Pellé, A.; Ho-Tin-Noe, B.; Collic-Jouault, S.; Guezennec, J.; Louedec, L.; Prats, H.; Jacob, M.P.; Osborne-Pellegrin, M.; Letourneur, D.; *et al.* Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *305*, 24–30.
8. Lake, A.C.; Vassy, R.; di Benedetto, M.; Lavigne, D.; le Visage, C.; Perret, G.Y.; Letourneur, D. Low molecular weight fucoidan increases VEGF165-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF165 binding to VEGFR-2 and NRP1. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 37844–37852.
9. Sarlon, G.; Zemani, F.; David, L.; Duong van Huyen, J.P.; Dizier, B.; Grelac, F.; Collic-Jouault, S.; Galy-Fauroux, I.; Bruneval, P.; Fischer, A.M.; *et al.* Therapeutic effect of fucoidan-stimulated endothelial colony-forming cells in peripheral ischemia. *J. Thromb. Haemost.* **2012**, *10*, 38–48.
10. Hlawaty, H.; Suffee, N.; Sutton, A.; Oudar, O.; Haddad, O.; Ollivier, V.; Laguillier-Morizot, C.; Gattegno, L.; Letourneur, D.; Charnaux, N. Low molecular weight fucoidan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2 expression. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 233–243.
11. Soeda, S.; Kozako, T.; Iwata, K.; Shimeno, H. 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* **2000**, *1497*, 127–134.
12. Kim, B.S.; Park, J.Y.; Kang, H.J.; Kim, H.J.; Lee, J. Fucoidan/FGF-2 induces angiogenesis through JNK- and p38-mediated activation of AKT/MMP-2 signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *450*, 1333–1338.
13. Vlodaysky, I.; Friedmann, Y. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J. Clin. Investig.* **2001**, *108*, 341–347.

14. Levy-Adam, F.; Abboud-Jarrous, G.; Guerrini, M.; Beccati, D.; Vlodavsky, I.; Ilan, N. Identification and characterization of heparin/heparan sulfate binding domains of the endoglycosidase heparanase. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20457–20466.
15. Levy-Adam, F.; Miao, H.Q.; Heinrikson, R.L.; Vlodavsky, I.; Ilan, N. Heterodimer formation is essential for heparanase enzymatic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *308*, 885–891.
16. Parish, C.R.; Freeman, C.; Hulett, M.D. Heparanase: A key enzyme involved in cell invasion. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1471*, 99–108.
17. Crescimanno, C.; Marzioni, D.; Paradinas, F.J.; Schrurs, B.; Mühlhauser, J.; Todros, T.; Newlands, E.; David, G.; Castellucci, M. Expression pattern alterations of syndecans and glypican-1 in normal and pathological trophoblast. *J. Pathol.* **1999**, *189*, 600–608.
18. Adhikari, N.; Carlson, M.; Lerman, B.; Hall, J.L. Changes in Expression of Proteoglycan Core Proteins and Heparan Sulfate Enzymes in the Developing and Adult Murine Aorta. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **2011**, *4*, 313–320.
19. Friand, V.; Haddad, O.; Papy-Garcia, D.; Hlawaty, H.; Vassy, R.; Hamma-Kourbali, Y.; Perret, G.Y.; Courty, J.; Baleux, F.; Oudar, O.; *et al.* Glycosaminoglycan mimetics inhibit SDF-1/CXCL12-mediated migration and invasion of human hepatoma cells. *Glycobiology* **2009**, *19*, 1511–1524.
20. Charni, F.; Friand, V.; Haddad, O.; Hlawaty, H.; Martin, L.; Vassy, R.; Oudar, O.; Gattegno, L.; Charnaux, N.; Sutton, A. Syndecan-1 and syndecan-4 are involved in RANTES/CCL5-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 1314–1326.
21. Deux, J.F.; Meddahi-Pelle, A.; Le Blanche, A.F.; Feldman, L.J.; Collic-Jouault, S.; Brée, F.; Boudghène, F.; Michel, J.B.; Letourneur, D. Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia in rabbit iliac artery in-stent restenosis model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 1604–1609.
22. Sweeney, E.A.; Lortat-Jacob, H.; Priestley, G.V.; Nakamoto, B.; Papayannopoulou, T. Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: Involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood* **2002**, *99*, 44–51.
23. Salvucci, O.; Yao, L.; Villalba, S.; Sajewicz, A.; Pittaluga, S.; Tosato, G. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood* **2002**, *99*, 2703–2711.
24. Ferreras, C.; Rushton, G.; Cole, C.L.; Babur, M.; Telfer, B.A.; van Kuppevelt, T.H.; Gardiner, J.M.; Williams, K.J.; Jayson, G.C.; Avizienyte, E. Endothelial heparan sulfate 6-O-sulfation levels regulate angiogenic responses of endothelial cells to fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 36132–36146.
25. Wang, Y.; Yang, X.; Yamagata, S.; Yamagata, T.; Sato, T. Involvement of Ext1 and heparanase in migration of mouse FBJ osteosarcoma cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2013**, *373*, 63–72.
26. Huegel, J.; Enomoto-Iwamoto, M.; Sgariglia, F.; Koyama, E.; Pacifici, M. Heparanase stimulates chondrogenesis and is up-regulated in human ectopic cartilage: a mechanism possibly involved in hereditary multiple exostoses. *Am J Pathol.* **2015**, *185*, 1676–1685.
27. Busse, M.; Feta, A.; Presto, J.; Wilén, M.; Gronning, M.; Kjellén, L.; Kusche-Gullberg, M. Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 32802–32810.

28. Zcharia, E.; Metzger, S.; Chajek-Shaul, T.; Aingorn, H.; Elkin, M.; Friedmann, Y.; Weinstein, T.; Li, J.P.; Lindahl, U.; Vlodavsky, I. Transgenic expression of mammalian heparanase uncovers physiological functions of heparan sulfate in tissue morphogenesis, vascularization and feeding behavior. *FASEB J.* **2004**, *18*, 252–263.
29. Vlodavsky, I.; Blich, M.; Li, J.P.; Sanderson, R.D.; Ilan, N. Involvement of heparanase in atherosclerosis and other vessel wall pathologies. *Matrix Biol.* **2013**, *32*, 241–251.
30. Purushothaman, A.; Uyama, T.; Kobayashi, F.; Yamada, S.; Sugahara, K.; Rapraeger, A.C.; Sanderson, R.D. Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood* **2010**, *115*, 2449–2457.
31. Ramani, V.C.; Pruett, P.S.; Thompson, C.A.; DeLucas, L.D.; Sanderson, R.D. Heparan sulfate chains of syndecan-1 regulate ectodomain shedding. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 9952–9961.
32. Nardella, A.; Chaubet, F.; Boisson-Vidal, C.; Blondin, C.; Durand, P.; Jozefonvicz, J. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr. Res.* **1996**, *289*, 201–208.
33. Chevolut, L.; Foucault, A.; Chaubet, F.; Kervarec, N.; Sinquin, C.; Fisher, A.M.; Boisson-Vidal, C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: Relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr. Res.* **1999**, *319*, 154–165.
34. Li, B.; Lu, F.; Wei, X.; Zhao, R. Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules* **2008**, *13*, 1671–1695.
35. Patankar, M.S.; Oehninger, S.; Barnett, T.; Williams, R.L.; Clark, G.F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 21770–21776.
36. Barbosa, I.; Garcia, S.; Barbier-Chassefière, V.; Caruelle, J.P.; Martelly, I.; Papy-García, D. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* **2003**, *13*, 647–653.
37. Sutton, A.; Friand, V.; Brulé-Donneger, S.; Chaigneau, T.; Zioli, M.; Sainte-Catherine, O.; Poiré, A.; Saffar, L.; Kraemer, M.; Vassy, J.; *et al.* Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. *Mol. Cancer Res.* **2007**, *5*, 21–33.
38. Charnaux, N.; Brule, S.; Hamon, M.; Chaigneau, T.; Saffar, L.; Prost, C.; Lievre, N.; Gattegno, L. Syndecan-4 is a signaling molecule for stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12. *FEBS J.* **2005**, *272*, 1937–1951.
39. Mao, C.; Malek, O.T.; Pueyo, M.E.; Steg, P.G.; Soubrier, F. Differential expression of rat frizzled-related *frzb-1* and frizzled receptor *fz1* and *fz2* genes in the rat aorta after balloon injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2000**, *20*, 43–51.
40. Suffee, N.; Hlawaty, H.; Meddahi-Pelle, A.; Maillard, L.; Louedec, L.; Haddad, O.; Martin, L.; Laguillier, C.; Richard, B.; Oudar, O.; *et al.* RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. *Angiogenesis* **2012**, *15*, 727–744.

Chapitre 2: Bioingénierie tissulaire : Régénérescence de prothèses biologiques de valves cardiaques acellularisées

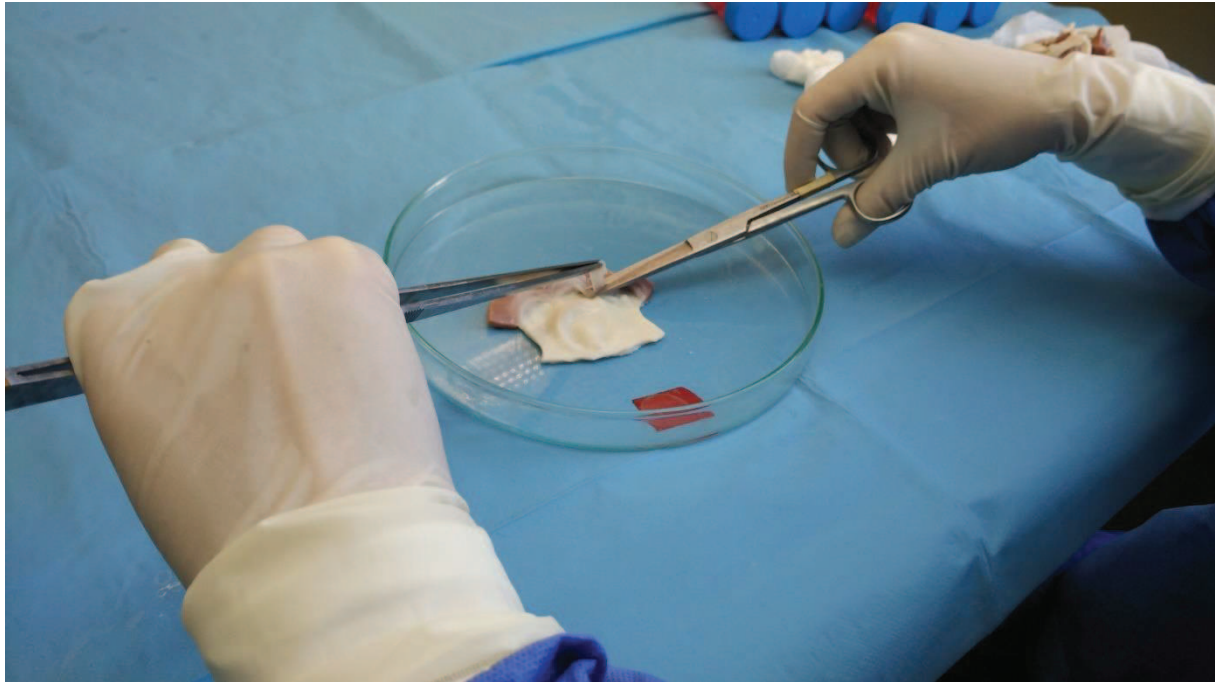


Figure 29. Dissection des valves pulmonaires porcines acellulaires. *Laboratoire de Bioingénierie*
(site : Fondation FRK, Zabrze, Pologne) (Cliché © Nicolas Marival).

Hypothèses et objectifs

Dans ce projet, est présentée l'étude de la régénérescence des valves cardiaques porcines acellularisées afin de développer une prothèse biologique fonctionnelle biocompatible et durable. La régénérescence est favorisée par l'application d'un bio film de polyélectrolytes en multicouches (poly électrolyte multi layer, PEM) constitué de fucoïdane et de VEGF associé à un ensemencement de cellules endothéliales.

L'hypothèse de l'étude se base sur les propriétés chimiques des microfilms de PEM fabriqués à partir de polysaccharides qui sont susceptible d'améliorer l'adhérence, la viabilité et la prolifération des cellules hétérologues sur une matrice tissulaire acellularisée afin d'en augmenter le potentiel régénératif.

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de bioingénierie du Dr. Piotr Wilczek (Fondation FRK, Zabrze, Pologne).

Objectif du projet: régénération de prothèses de valves pulmonaires porcine acellularisées

En l'absence de thérapie conventionnelle adéquate, l'ingénierie tissulaire par thérapie cellulaire est devenue une alternative dans l'élaboration de bioprothèses de valves cardiaques. Dans ce contexte, le but de notre projet est de développer une nouvelle approche thérapeutique basée sur l'utilisation des facteurs stimulants la régénération tissulaire, tels que le fucoïdane et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), associés à un ensemencement cellulaire. Les fucoïdanes, en tant que mimétiques des glycosaminoglycanes, possèdent, en fonction de leur degré de sulfatation et leurs poids moléculaire, des affinités pour les protéines dont le VEGF, comme il a été démontré dans notre étude précédente.

Ces caractéristiques permettent ainsi de concevoir l'assemblage d'un film de polyélectrolytes (le fucoïdane étant chargé négativement et le VEGF positivement à pH physiologique) en multicouches pour recouvrir la surface des valves en leur conférant un potentiel régénératif.

Le caractère naturel et biodégradable de ces biomatériaux leur confère des propriétés adéquates pour des applications dans la médecine régénérative dans le domaine cardiovasculaire, grâce à leurs propriétés anti-coagulantes et anti-thrombotiques, leur bas potentiel immunogène et leur biodégradation. Leur utilisation courante dans l'ingénierie tissulaire a permis une grande variété de formes et de formulations pour les fucoïdanes, ce qui a permis d'envisager leur usage dans le développement des matrices de synthèse biocompatible et biodégradable à des fins de régénération tissulaire [**Silva, 2012**].

L'activité pro-angiogénique du fucoïdane, similaire à l'héparine, semble être liée à son aptitude à interagir avec des « heparin-binding proteins » (HBP) dont le VEGF et les chimiokine (SDF-1/CXCL12 et RANTES/CCL5). Nos résultats obtenus par résonance plasmonique de surface montrent que le fucoïdane a une haute affinité particulièrement avec VEGF, mais aussi SDF-1/CXCL12 et RANTES/CCL5 [**Marinval, 2016**]. Il a été précédemment mis en évidence que l'injection intraveineuse du fucoïdane augmente les taux sériques de SDF-1/CXCL12 jouant un rôle important dans la néo-vascularisation, en participant avec le VEGF au processus angiogénique [**Luyt, 2003**]. Le fucoïdane peut moduler ainsi la migration et la prolifération cellulaire. Nos résultats montrent aussi l'effet thérapeutique du fucoïdane dans le traitement de la resténose intra-stent chez le lapin hypercholestérolémique [**Hlawaty, 2011**]. Récemment, une étude montre la restauration partielle d'une valve aortique porcine en appliquant de l'héparine et du VEGF en présence de cellules endothéliales humaines (HUVEC) [**Ye, 2013**].

Nous avons émis l'hypothèse, à la vue de ces données encourageantes, que le fucoïdane pourrait d'une part interagir avec les protéines matricielles des valves acellularisées, en recouvrir la surface dépourvue en glycocalyx et induire un potentiel anti-thrombotique et anticoagulant.

Dans un deuxième temps, l'utilisation du fucoïdane dans la constitution du PEM permettrait de retenir le VEGF et contrôler sa biodisponibilité. Cette propriété pourrait être utilisée dans l'optique de générer un signal pour le recrutement et la prolifération de cellules endothéliales qui pourraient adhérer plus facilement au support recouvert du PEM.

Démarche expérimentale.

Grâce à notre collaboration avec le laboratoire du Dr P. Wilczek en Pologne, nous avons pu étudier la régénération du tissu valvulaire acellulaire porcin. Pour cela, nous avons recolonisé les valves acellulaires porcines avec des HUVECs, en présence du fucoïdane et du VEGF (facteurs stimulant l'adhérence, la prolifération et la migration des HUVECs). Un film en PEM de fucoïdane/VEGF a été appliqué sur les valves cardiaques puis un ensemencement *in vitro* des HUVECs a été réalisé.

La démarche expérimentale est construite autour des axes suivants :

1. L'étude du recouvrement des valves acellularisées par le film de PEM de fucoïdane/VEGF mimant le glycocalyx natif (analyses histologiques).
2. L'étude du potentiel préventif lié au revêtement du film sur, la coagulation sanguine (activation et agrégation plaquettaire) et la calcification.
3. L'effet du film sur l'adhérence, la viabilité, la prolifération de cellules endothéliales et analyse du sécrétome cellulaire dans le surnageant (facteurs de croissance, chimiokines, facteurs pro- et anti-inflammatoires, protéines impliquées dans la synthèse et le remodelage matriciel).
4. La culture des valves re-cellularisées en condition dynamique dans un bioréacteur et test de résistance mécanique.

A la fin de ma thèse, je me focaliserai plus particulièrement sur l'analyse des valves cultivées en bioréacteur et sur l'étude de leur résistance mécanique et la réponse cellulaire (inflammation et remodelage matriciel).

Matériels et méthodes

Anticorps

Les anticorps utilisés pour l'analyse de protéines membranaires des cellules sanguines en cytométrie en flux sont dirigés contre le CD45 (HI30, Souris IgG1 κ conjugué au PerCP ou FITC) pour identifier les leucocytes, le CD61 (VI-PL2, Souris IgG1 κ , conjugué au FITC) ou aussi appelée intégrine- β 3 exprimée à la surface des plaquettes sanguines et CD62P (AK4, Souris IgG1 κ , conjugué à la PE), nom donné pour la P-sélectine exprimée par les plaquettes activées, ont tous été conçus par BioLegend (San Diego, CA, USA).

Récolte, préparation et acellularisation de valves pulmonaire porcine

Le prélèvement des cœurs frais, auquel j'ai participé et été formé par le personnel du laboratoire, a été effectué sur les entrailles fraîches de porc préparées dans un abattoir (H.a.m. S.j., Radzionkow, Poland). Les animaux dont les cœurs ont été récoltés étaient tous destinés à la production de l'industrie alimentaire. Les cœurs frais ont été transportés au laboratoire dans une solution de Ringer's (Braun, Melsungen, Germany). La valve pulmonaire y a été disséquée du cœur sous conditions aseptisées, puis placée et conservée dans une solution d'antibiotiques contenant 0,4% de Fluconazole 2 mg/ml (B. Braun), 0,1% de Ciprinol 10mg/ml (KRKA), 1% de Penicillin – Streptomycin 5mg/ml (Sigma Aldrich) pendant 24 h à 4°C. Une méthode enzymatique a été choisie afin de réaliser la procédure d'acellularisation. Nous avons incubé les valves 48 h avec le couple Trypsine/EDTA (Trypsine porcine 1X à 0.5 g/l et EDTA à 0.2 g/l) à 37°C. Une fois la digestion enzymatique réalisée, les tissus matriciel ou supports de valve dépourvu de cellules ont été placés 30 min à température ambiante dans une solution de Ringer's contenant 0,5% de détergent Sodium dodecyl sulfate (SDS 0,5%). Trois rinçages successifs dans la solution de Ringer's sont ensuite nécessaire pour enlever toute trace de détergent et les débris cellulaires. Chaque étape de la procédure d'acellularisation a été réalisée sous condition d'agitation. Une fois que les supports matriciels de valves acellularisées ont été obtenus, ces derniers ont été conservés dans la solution d'antibiotique à 4°C.

Ces étapes ont été réalisées chaque semaine en binôme pour assurer le renouvellement de cœurs frais nécessaire aux expériences. J'ai participé à toutes les étapes en dehors de la dissection de la valve qui nécessite une expertise délivrée sous une formation longue. Les membres de l'équipe participant au projet ont assurés le prélèvement et la préparation des valves acellulaires lorsque c'était nécessaire.

Revêtement des supports de valve par le film en multicouche de Fucoïdane/VEGF

Nous avons choisi de diviser les supports de valves en deux groupes. Dans le premier groupe, les supports de valves acellulaires ont été préservés dans la totalité de leur structure en une seule pièce entière de valve acellularisée, tandis que dans le second groupe, les trois valvules et des fragments du conduit artériel ont été disséqués en échantillons de 1,5 cm². Au moins trois donneurs ont été requis par conditions de traitement pour chaque expérience afin de respecter une proportion statistique satisfaisante. Le support de valve acellulaire entière a été installé dans un bioréacteur programmé sur un dispositif rotatif (FRK, Zabrze, Poland) dans l'intention d'obtenir un revêtement optimal de la surface du support (**Figure 30**). Les fragments de support de valve acellulaire ont été placés dans des chambres de culture d'une plaque 24 puits afin de réaliser un dépôt en condition statique.

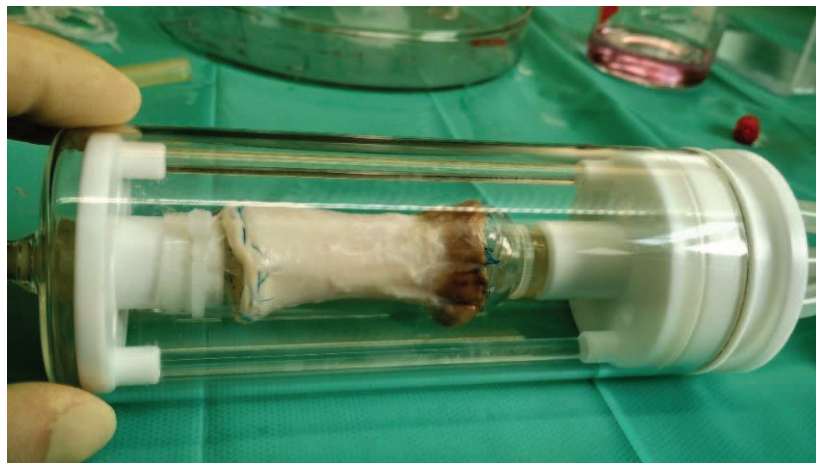


Figure 30. Support acellulaire de valve porcine installée dans un bioréacteur. Bioréacteur expérimental non breveté développé au laboratoire de Bioingénierie (site : Fondation FRK, Zabrze, Pologne) (Cliché © Nicolas Marinval).

Le revêtement consiste en l'application de trois bicouches de fucoïdane et de VEGF pour générer un film de polyélectrolytes (Polyelectrolyte Multilayer, PEM). Une solution de fucoïdane de moyen poids moléculaire (MMWF, Ascophyscient 12399, Algues&mer, Ouessant) concentrée à 100 µg/mL a été appliquée et adsorbée par le support pendant 15 minutes à 37°C avant d'être rincée par une solution saline de Phosphate Buffer Saline (PBS) à pH physiologique. La seconde couche a été réalisée avec l'incubation d'une solution de VEGF (354107, BD Biosciences, Bedford, MA, USA) à 50 nM ou 0,1ug/mL, pendant 15 minutes à 37°C pour permettre son adsorption au fucoïdane. Pour le support de valves entières, 10 mL de chaque solution contenant le fucoïdane ou le VEGF ont été nécessaires et 100 µL pour les fragments de valves cultivés en condition statique. Ces étapes ont été répétées 3 fois afin de générer le film de trois bicouches exposant le VEGF dans la couche la plus externe (**Figure 31**). Les supports recouverts du film de polyélectrolytes ont ensuite été conservés 24h dans le milieu de culture de cellules endothéliales (Lonza EGM-2, FBS 2%, hydrocortisone, Walkerville, MD, USA) à 37°C et 5% CO₂.

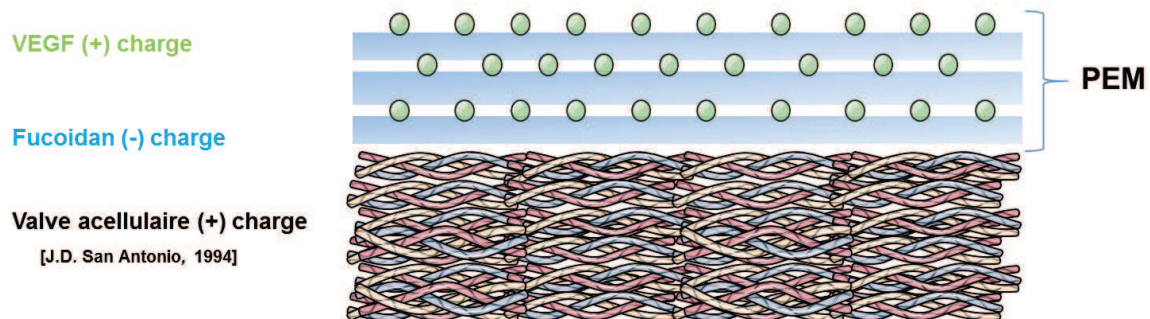


Figure 31. Revêtement des supports de valves acellulaires par le PEM composé de MMWF/VEGF. Le schéma représente le recouvrement de la matrice valvulaire acellularisée par l'application et l'adsorption de bicouches successives de fucoïdane et de VEGF, ainsi que les interactions électrostatiques des molécules entre elles.

Ensemencement cellulaire

Les cellules endothéliales humaines (HUVECs, C2517A, Lonza) ont été cultivées jusqu'à 90% de confluence dans du milieu de culture complet EGM-2 contenant 2% de SVF sans héparine (Lonza EGM-2, FBS 2%, hydrocortisone 0,2 mL, hFGF 2 mL, VEGF 0,5 mL, R3-IGF 0,5 mL, hEGF 0,5 mL, Ascorbic Acid 0,5 mL GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin-B), Walkerville, MD, USA).

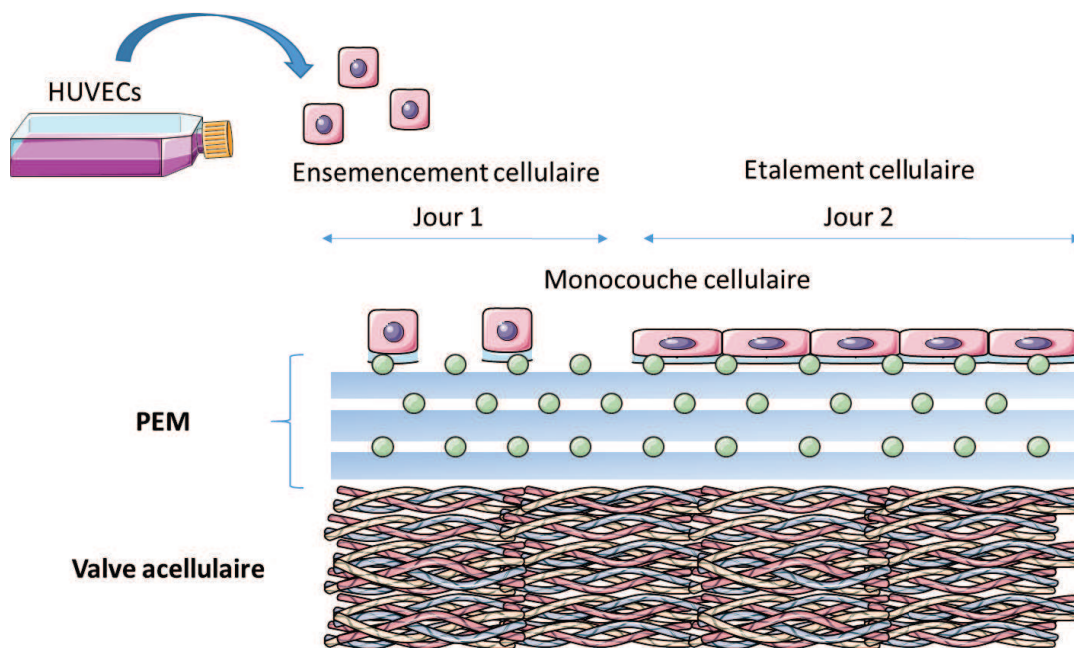


Figure 32. Méthode d'ensemencement cellulaire à la surface des supports de valves acellulaires recouvert du PEM fucoidane/VEGF. Le schéma représente l'ensemencement (jour 1) et l'étalement (jour 2) des cellules HUVECs sur les supports de valves en monocouche.

Pour procéder à l'ensemencement, les cellules ont été décollées sous l'action de la trypsine, comptées et resuspendues dans leur milieu de culture. Un total de $4,0 \times 10^6$ de cellules endothéliales contenues dans 10 mL de leur milieu de culture ont été déposées dans la lumière de la chambre centrale du bioréacteur contenant le support acellulaire de valve entière et cultivées sous rotation (1 tour par minute) et incubées de 6 h à 24 h à 37°C et 5% CO₂ sous la même rotation. Pour la condition statique de culture cellulaire sur les valves, 150×10^5 cellules endothéliales ont été déposées sur les fragments de supports dans 200 µL de milieu de culture et incubées 6 h à l'étuve.

Après, 1 h d'incubation, 1 mL de milieu de culture a été rajouté à chaque puits de culture. Les fragments ont été déplacés vers des puits plus larges (une plaque de 12 puits) en conservant leur milieu de culture et laissés incuber de 24 à 72 h à l'étuve.

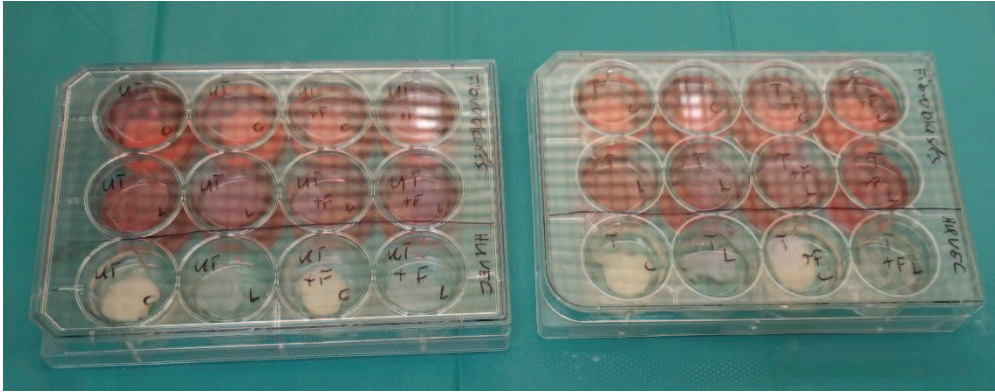


Figure 33. Plaques de culture 12 puits pour les valvules et fragment de conduits acellulaires cultivés en condition statique. Laboratoire de Bioingénierie (site : Fondation FRK, Zabrze, Pologne) (Cliché © Marival Nicolas).

Analyse de la viabilité cellulaire

La viabilité des HUVECs ensemencées sur les supports de valves recouverts ou non de film de polyelectrolytes a été réalisée après 24, 48 et 72 h d'incubation en condition statique et 6 et 24 h en condition dynamique en bioréacteur. Les supports ont été placés dans des boîtes de Pétri où une analyse de la viabilité cellulaire a été réalisée par l'utilisation du couple de marqueurs fluorescents de viabilité FDA/PI (Fluoresceine diacetate, FDA qui est clivée par activité enzymatique dans le cytosol et dont le produit métabolique fluorescent résulte de l'activité cellulaire ; l'iodure de propidium, IP qui marque les noyaux perméables des cellules mortes). Les cellules non fixées sont incubées 15 minutes avec la FDA (1mg/mL), puis 100 μ L de PI (1mg/mL) est rajouté dans la boîte de Pétri puis incubé 2 minutes. Le marquage est observé directement au microscope à fluorescence (Axio Observer Z1, Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

Analyses histologiques

Des coupes transversales ont été effectuées à partir de fragments de supports de valves acellularisées et recellularisées préalablement fixées dans une solution de formaline à 4% et enrobées de paraffine.

Les coupes ont été réalisées au microtome (Leica RM 2125RT, Wetzlar, Allemagne) d'une précision de 10 µm d'épaisseur, puis déposée sur une lame de verre avant d'être déshydratées, puis déparaffinée par des bains successifs croissants de xylène et réhydratées par des bains d'alcool décroissant. Les colorants suivants ont été utilisés pour réaliser les marquages histologiques :

- Hématoxyline (Dako, Glostrup, Denmark) et éosine (POCH, Gliwice, Pologne) : colore les noyaux cellulaires en bleu et le cytoplasme en rose.
- Trichrome de Masson (Bio-Optica, Milan, Italie) : colore les fibres de collagène en vert et les fibres musculaires en violet.
- Bleu alcian (Bio-Optica) : colore les glycosaminoglycanes en bleu.
- Verhoeff van Gieson (Bio-Optica), colore les fibres d'élastine en violet.
- L'acide Périodique de Schiff (DiaPath, Martinengo, Italie), colore les polysaccharides matriciels en rose.

Les coupes transversales obtenues à partir des échantillons de supports de valves marqués ont été observées au microscope optique (Axio Vert A1, Zeiss) et photographiés (Canon EOS 5D Mark II, Tokyo, Japan) en lumière blanche.

L'utilisation d'un fucoïdane fluorescent (tagué avec un Alexa fluor 555, ThermoFischer, Waltham, MA, USA) a été nécessaire pour vérifier sa présence sur les valves et observer la localisation du fucoïdane après revêtement du PEM sur des coupes transversale de valves. Des fragments de valves recouverts et non recouverts du PEM ont été enrobés et conservés dans un milieu de congélation (Polysciences, Warrington, PA, USA) à -20°C avant d'être découpés en coupes d'une épaisseur fine (10 µm) à l'aide d'un cryostat (Tissue-Tek Cryo3, Sakura, Leiden, Pays-Bas) et déposés sur une lame de verre. Les observations ont été réalisées sous un microscope à fluorescence ZEISS. Pour visualiser la présence du VEGF adsorbé dans la constitution du PEM, nous avons utilisé un anticorps dirigé

contre le VEGF (ab46154, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) sur des coupes transversales de valves acellulaires. La présence du VEGF est révélée par un anticorps secondaire couplé au 3, 3 –diaminobenzidine (DAB), substrat qui se colore de couleur marron lorsqu'il est clivé par l'enzyme Horseradish peroxydase (HRP).

Les coupes ont été observées sous un microscope optique (Axio vert, Zeiss) en lumière blanche.

La quantification du fucoïdane adsorbé à la surface des valves acellularisées lors de la procédure de revêtement, a été permise par l'utilisation d'un fucoïdane fluorescent et d'un modèle de collagène I commercial (Corning, New York, NY, USA). Le fucoïdane fluorescent a été utilisé de la même manière que son homologue froid pour la formation du PEM complexé avec le VEGF. La quantification de l'intensité de fluorescence présente à la surface du support de collagène a été mesurée en fluorimétrie (Tecan, Männedorf, Suisse).

Sécrétome

Le surnageant des cellules HUVECs cultivées à la surface des valves a été récolté après 24, 48 et 72 h d'incubation à l'étuve et conservé à -20°C. L'expression de 12 analytes protéiques (VEGF, FGF, PDGF, MMP-1, MMP-2, MMP-9, RANTES/CCL5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , INF- γ) a été effectuée par l'utilisation d'un kit Luminex (LXASHM, R&D). Le principe de cette technique repose sur la fabrication commerciale de microbilles magnétiques autofluorescentes chargées de tous les anticorps de chaque analyte à mesurer. La révélation du couple antigène se fait par l'incubation avec des anticorps-biotinylés spécifiques de chaque analyte suivi d'une incubation avec de la streptavidine couplée à la phycoérythrine (PE). La plateforme Bio-plex fournie par Bio-rad (Hercules, CA, USA) a permis l'analyse des signaux de fluorescence. Le système d'analyse aligne les microbilles magnétiques en monocouche qui sont ensuite illuminées par deux diodes électroluminescentes (LEDs), l'un pour identifier l'analyte en cours de détection et l'autre pour déterminer la magnitude du signal relatif à la PE directement proportionnel à la quantité d'analyte fixé.

Analyse de la thrombogénicité des supports de valves en flux

Le sang frais humain total a été collecté à la Regional Blood Donation and Transfusion Center (Katowice, Pologne) et conservé en présence de citrate.

Les valves natives, acellularisées non-recouvertes et recouvertes du PEM de fucoïdane/VEGF ont été installées dans un bioréacteur monté sur un circuit fermé pour réaliser une culture en flux (**Figure 34**).

Le flux a été généré pendant 15 minutes par une pompe péristaltique (Ismatec, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Allemagne) à un débit de 40 mL/min. Plusieurs aliquots de sang ont été prélevés avant et après le passage dans le bioréacteur et ont été analysés en cytométrie en flux (Cytomics FC 500 MPL Beckman Coulter). Les cellules exprimant CD45 (leucocytes), CD61 (plaquettes totales) et CD62P (plaquette activées) ont ainsi été quantifiées. D'autre part, des fragments de valves natives et acellularisées ont été disséqués après le flux en bioréacteur et les mêmes méthodes de marquage avec les anticorps décrits précédemment, ont été utilisées pour observer l'adhésion et l'agrégation des plaquettes activées à la surface de ces fragments en microscopie à fluorescence (ZEISS). L'intensité du marquage a été quantifiée par l'utilisation d'un logiciel de mesure d'images ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016).

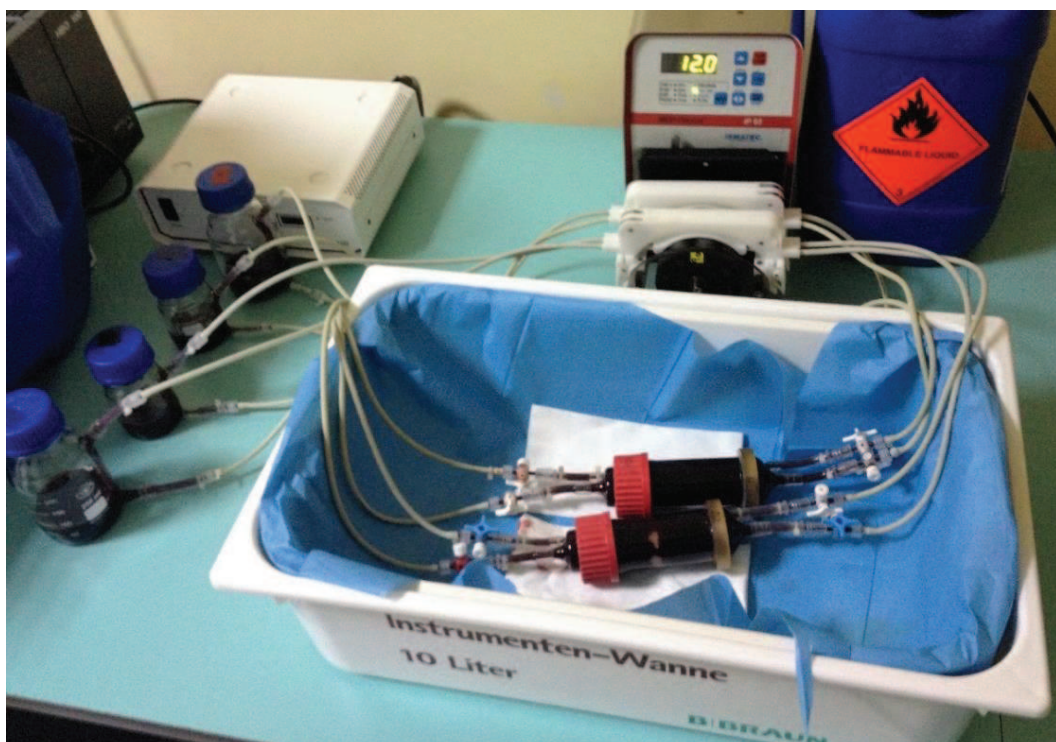


Figure 34. Circuits de deux Bioréacteurs pour l'analyse de la thrombogénicité des valves en flux. Chaque bioréacteur est monté en circuit fermé installé sur une pompe péristaltique. Système non breveté, laboratoire de bioingénierie, Fondation FRK, Zabrze (Cliché © Małgorzata Morenc).

Analyse du potentiel de calcification de fragments de valves acellularisées

Un total de 12 supports de valves porcines acellulaires (6 valvules et 6 fragments de conduits) provenant de plusieurs individus a été étudié pour chaque condition de traitement (Non recouverts et recouverts du PEM MMWF/VEGF). Chaque échantillon a été découpé en deux fragments et placé dans un flacon différent pour réaliser l'expérience de calcification. Les flacons ont été préalablement remplis avec une solution de calcification (0,065g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 0,079g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,28g CaCl_2 , 0,30g KCl , 8,19g NaCl , 1g NaN_3 et 5g of Albumin pour 1 litre d'eau déionisée) avec respectivement 5 mL pour les valvules et 10 mL pour les conduits. L'induction de la calcification s'est réalisée sur une durée de 21 jours d'incubation à 37°C. Après ce terme, les échantillons ont été prélevés et des coupes histologiques ont été réalisées pour effectuer une analyse de la calcification par l'utilisation d'un colorant histologique (Alizarine Rouge S). Une technique de quantification basée sur l'établissement d'une échelle de l'intensité du marquage de calcification tissulaire a permis d'identifier un score de calcification pour chaque échantillon.

Collection de sang frais humain total et isolation des plaquettes

Le sang humain total a été récolté chez des volontaires en bonne santé exempté de traitements médicaux pour au moins 10 jours, après information et obtention de leur consentement total, en accord avec la Déclaration d'Helsinki. Le sang a été prélevé via une ponction vénale dans des tubes siliconés Vacutainer™ (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) contenant du tampon sodium citrate (0.129 M) en prenant soin d'enlever le premier tube. Le sang total a été centrifugé à 120 g pendant 15 min à température ambiante pour préparer le plasma riche en plaquette (platelet-rich-plasma, PRP). Le décompte des plaquettes a été ajusté à la concentration désirée par dilution avec un plasma sans plaquettes (platelet-free-

plasma, PFP). Le PFP a été préparé par centrifugation du sang à 2000 g pendant 15 min suivi d'une centrifugation à 13000 g pendant 2 min pour enlever les dernières plaquettes restantes.

Activité du fucoïdane sur l'agrégation plaquettaire et la génération de thrombine *in vitro*

Un collagène-I fibrillaire (Horm, Takeda, Linz, Autriche) et un collagène-I non-fibrillaire reconstitué (Corning, Life Sciences, Brandford, CT, USA) ont été utilisés à 1 ou 5 µg/mL en suspension. Le fucoïdane, et l'héparine étudiée en contrôle positif de l'inactivation des plaquettes et de la thrombine, ont été utilisés à 1, 10 ou 50 µg/mL en suspension.

L'activation plaquettaire a été étudiée en PRP par une agrégométrie optique (light transmittance aggregometry), comme reporté précédemment [Ajzenberg, 2005] après induction par le collagène en l'absence ou présence de fucoïdane ou héparine.

La génération de thrombine a été mesurée dans du PRP fraîchement préparé (1.5×10^8 plaquettes/mL) et en PFP au moyen d'un thrombogramme calibré automatique (Calibrated Automated Thrombogram, CAT) (Hemker HC. *et al.*, 2002). Les mesures ont été conduites avec 80µL de PRP ou PFP dans un volume total de 120 µL. La génération de thrombine a été réalisée en absence de facteur tissulaire. Les échantillons ont été enrichis avec 20µL de calibrateur thrombine (Diagnostica Stago, Asnières, France) et testés en parallèle avec un cycle propre pour chaque échantillon. La génération de thrombine a été déclenchée par l'addition de 20 µL FluCa (2.5 mM fluorogenic substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC, 87 mM calcium chloride). La fluorescence a été lue par un lecteur Fluoroskan Ascent reader (ThermoLabsystems, ThermoFischer) équipé avec un jeu de filtres 390/460 nm, et la courbe de génération de thrombine a été calculée en utilisant un logiciel thrombinoscope. La génération de thrombine a été réalisée en l'absence ou en présence d'un collagène non fibrillaire (5 µg/mL) en suspension. Le fucoïdane a été directement ajouté au PRP ou PFP juste avant le démarrage de la génération de thrombine par induction. L'index de vélocité (nM/min) a été calculé au ratio Peak/ (time to Peak-LagTime); Le LagTime (LT) est relié à l'initiation de la phase de coagulation, le time to Peak (ttPeak) et le Peak sont le reflet de la phase d'amplification de la coagulation et du potentiel endogène de la

thrombine (Endogenous Thrombin Potential, ETP) reflétant la quantité globale de thrombine produite lors de l'expérience.

Analyse de la résistance mécanique

Les supports de valves acellulaires ont été soumis à des tests de résistances biomécaniques pour doser leur capacité d'étirement (test de traction uniaxial ou "break test") et de souplesse (test d'hystérésis). Les résultats ont été comparés aux valves porcines natives non modifiées.

Ces deux types de tests ont été réalisés sur des fragments de valves découpés dans deux directions décrites selon l'orientation du tissu dans le conduit artériel (directions longitudinale et circonférenciel) et effectués grâce à un appareil universel de mesure de déformation biomécanique (MTS Tyrton 250). L'essai de traction uniaxial a été employé pour estimer les propriétés biomécaniques des valves pulmonaires porcines par l'utilisation d'une force jusqu'à la rupture de l'échantillon (**Figure 35**).

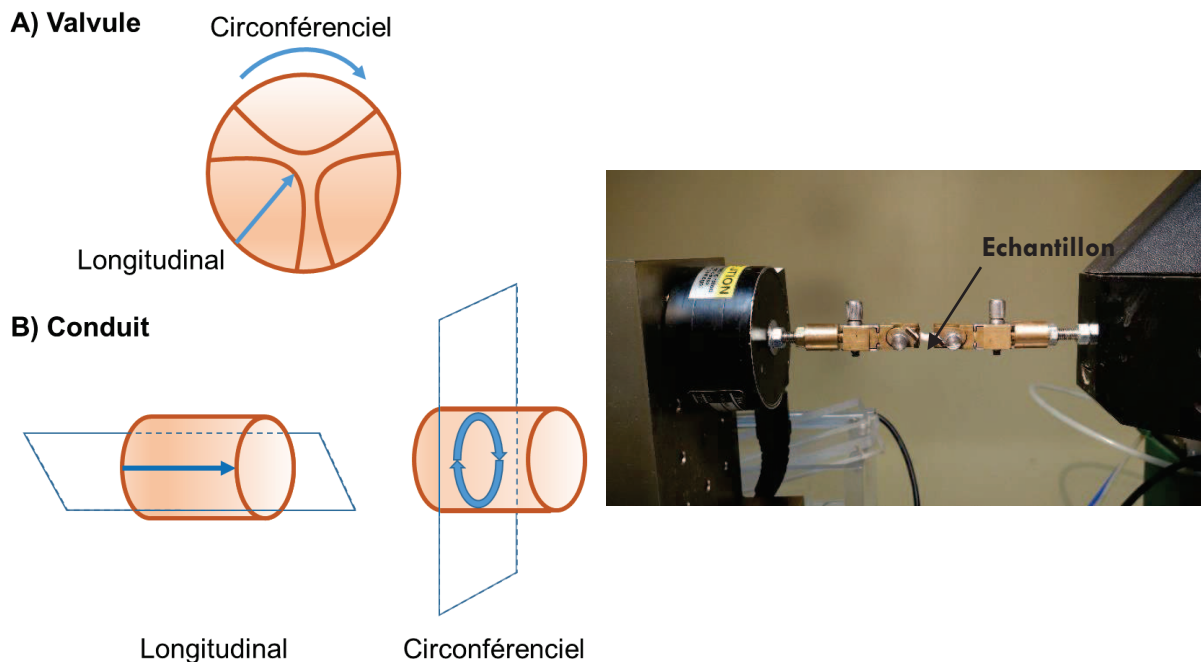


Figure 35. Schéma de la direction de l'orientation des fragments de valves pulmonaire et appareil de mesure de réponse au stress biomécanique. Les mesures de résistances biomécaniques des valves au test de traction uniaxial et au test d'hystérésis ont été réalisées au moyen de cet appareil. Laboratoire de bioingénierie (Site : Fondation FRK, Zabrze, Pologne) (Cliché © Nicolas Marinval).

Article 3. Marinval et al., 2017- en cours

Objectif : Les prothèses biologiques de valves cardiaques d'origine porcine ou bovine, peuvent être intégrées dans le corps humain et constituent un avantage biologique sur les prothèses mécaniques. Les prothèses de valves acellularisées pourraient substituer une valve humaine. Cependant, les processus d'acellularisation entraînent une dégradation matricielle des prothèses (perte et modification des fibres de collagène, élastine et glycosaminoglycanes) et une diminution de la résistance aux contraintes mécaniques ainsi qu'une plus forte sensibilité à la thrombose artérielle et à la calcification. Les fucoïdanes sont couramment utilisés dans la composition de bioprothèses. Nous voulons tester dans cette étude le potentiel antithrombotique et régénératif de l'application d'un film de polyélectrolytes en multicouche (PEM) composé de fucoïdane/VEGF sur des valves porcines acellularisées et leur ré-endothélialisation.

Hypothèse : L'hypothèse de notre travail se base sur les capacités du fucoïdane, molécule polyanionique, à interagir avec des molécules du matrisome cationique comme le collagène et les facteurs de croissance (VEGF) et à favoriser la prolifération endothéliale conduisant à la ré-endothélialisation du tissu modifié. Nous pensons que l'origine naturelle du fucoïdane, son absence de cytotoxicité et ses activités biologiques en font un candidat potentiel pour le développement de bioprothèses auto-régénératives à partir de l'application d'un film de PEM de fucoïdane/VEGF.

Méthode : Un fucoïdane provenant de l'algue *Ascophyllum nodosum* de moyen poids moléculaire (26600 g/mol, contenant 36% de fuucose, 29% de sulfate et 14% d'acide uronique) et hautement sulfaté (degré de substitution des sulfate de 1,14) a été sélectionné pour constituer le PEM. Nous avons collecté et soigneusement disséqué les valves pulmonaires de porcs que nous avons gardées intactes ou découpées en échantillons de 1 cm² (conduit vasculaire et valvules).

Les valves entières ou les fragments de valves ont été acellularisées par digestion enzymatique. Le film de PEM a été appliqué sur la surface des valves acellulaires à pH physiologique avec le fucoïdane en première couche et le VEGF exposé en dernière couche. Nous avons étudié la localisation des composants du PEM (fucoïdane et VEGF) par des coupes transversales et cryosections des valves recouvertes. Les valves entières (non modifiées, acellularisées et acellularisées et traitées au PEM) ont ensuite été cultivées dans des bioréacteurs en système dynamique (flux) avec du sang humain total. Nous avons quantifié d'une part le niveau d'activation des plaquettes en suspension (Cytométrie en flux) et leur agrégation à la surface des valves au microscope à fluorescence. Nous avons également mesuré le potentiel de calcification de ces fragments de valves *ex vivo* et leur résistances à tests de contrainte mécanique (test d'élongation jusqu'à la rupture et hystérésis). Les propriétés du PEM sur l'adhérence et la viabilité des cellules endothéliales (HUVECs)ensemencées sur les fragments de valves acellulaires recouvertes du PEM ou non, ont été testées à différents temps d'incubation (24, 48 et 72h) et sur des valves entières cultivées en bioréacteur (culture dynamique en rotation). Les cellules ont été quantifiées (test live/dead) et observées sur des coupes histologiques. L'expression de facteurs immunogènes, de facteurs de croissance et d'enzymes responsables du remodelage matriciel ont été dosées dans le surnageant des HUVECs cultivées sur les fragments des valves modifiées (Luminex).

Résultats : Nous montrons dans cette étude que le fucoïdane et le VEGF sont bien présents et se localisent à la surface des valves acellulaires. L'application du PEM sur les valves acellularisées favorise leur potentiel antithrombotique et n'induit pas leur calcification ou de modification de leurs propriétés biomécaniques. Nous mettons en évidence que le PEM augmente l'adhérence et la viabilité des HUVECs à la surface des valves modifiées. L'analyse des cellules endothélialesensemencées sur les fragments de valves recouvertes du PEM montre que les HUVECs sont bien attachées au tissu, plus denses, plus étalées et reconstituent un endothélium en monocouche viable pendant 72h. Ces données ont été également retrouvées dans les HUVECsensemencées sur les valves entières cultivées dans les bioréacteurs en rotation.

Conclusion : Nous avons mis en évidence dans cette étude que l'application d'un film de PEM de fucoïdane/VEGF sur des valves pulmonaires porcines acellularisées induit un potentiel antithrombotique et permet l'adhérence et la survie de cellules endothéliales humaines. Ces travaux suggèrent que cette stratégie est un bon procédé pour étudier la ré-endothélialisation de valves acellulaires pour le développement de bioprothèses auto-régénératives.

Fucoidan/VEGF-based surface modification of tissue engineered pulmonary heart valve improves the anti-thrombogenic and re-endothelialization potential of the bioprosthesis.

Marinval N¹, Morenc M^{2,3}, Samotus A², Niemiec-Cyganec A², Jesse K², Jacob MP¹, Ollivier V¹, Chaubet F¹, Charnaux N^{1,4}, Wilczek P^{2*}, Hlawaty H^{1*}

¹Inserm U1148, LVTS, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

²Laboratory of Bioengineering, Foundation of Cardiosurgery, Zabrze, Poland.

³University of Silesia, Katowice, Poland.

⁴Laboratoire de Biochimie, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bondy, France.

*- contributed equally to this work.

#Corresponding author: Hanna Hlawaty

Inserm U1148, LVTS Bio-ingénierie Cardiovasculaire, Groupe Biothérapies et Glycoconjugués, UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny Cedex, France ; Tel: (+33) 01.48.38.76.97/85.14, e-mail: hanna.hlawaty@univ-paris13.fr

Running head: Fucoidan and valve regeneration

Key words: Fucoidan/VEGF/Pulmonary valve/Re-endothelialization/Tissue engineering

Supplementary data: 1 and 2

Abstract

Biological prosthesis valves obtained from animals (porcine or bovine origin) have a high potential to be integrated as a vital part of the patient heart and are not thrombogenic. However their durability is limited due to histocompatibility issues and they are subjected to degeneration and calcification. Tissue engineering methods use acellularization procedure of bioprosthesis that can deteriorate the support fibers and glycans (collagen, elastin, fibronectin, glycocalyx) contained in the matrix which cause a lower mechanical resistance and durability of the tissue.

Fucoidan, as heparin-like anti-thrombotic polyanionic molecule, has electrostatic interactions with matrix (cytokines and matrix component likewise collagen positively charged) and carries pro-angiogenic properties. The natural origin of fucoidan, its absence of cytotoxicity and its biological activities shape it an excellent candidate to design and develop self-regenerative valve bioprosthesis based on the application of polyelectrolytes multilayer biofilm (PEM) coupled with the vascular endothelial growth factor VEGF.

We applied these protective and proliferative features of fucoidan to regenerate acellularized porcine pulmonary valve in attempt to produce functional and durable bioprosthesis of cardiac valve.

We investigated the interactions of the biofilm with acellular porcine pulmonary valves and its colonization by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Our experimental approaches focused first on the effects of the biofilm on the quality and integrity of the valve matrix (histological cross sections) and the valve biomechanical resistance (tensile and hysteresis tests). Then, the thrombogenic potential of the scaffolds in bioreactor for dynamic culture (aggregation and activation of platelets) and the *in vitro* calcification were measured. We then tested the adherence, viability and proliferation after cell seeding (HUVEC) on valve scaffold up to three days of culture (fluorescence microscopy) in static and dynamic conditions (bioreactor). Finally, HUVECs cytokines, growth factor and matrix metalloproteases expression were analyzed in the supernatant (Luminex).

We showed in this study that fucoidan localized at the surface of the scaffold and restored anti-thrombotic feature to the valve scaffold. In the same manner, the biofilm did not affect the calcification potential of the scaffold. Interestingly, its application increased the HUVEC adhesion (6 h) on acellular coated tissues with a high rate of viability from 6 up to 72 h. Seeded cells were attached to the tissue in a monolayer. However some proliferating niches were observed after three days of culture and observations of the cell morphology showed well spread and connective endothelium-like layer. The biomechanical assays performed on coated scaffold were similar to uncoated acellular tissue. These results suggested that the PEM biofilm coating on acellularized valve can improve their regenerative properties by increasing endothelial cells adhesion, proliferation and reduce the thrombogenic potential. Thus, fucoidan is a promising tool to develop self-regenerative bioprosthesis for clinical application.

Introduction

On average the human heart valve operates 108,000 times every 24 hours [Gaşior, 2016]. Disruption to the function of a heart valve means a reduction in quality of life for patients and catastrophic failure of a valve ultimately results in death. Currently patients who demonstrate heart valve failure are managed by surgical intervention which involves replacing the failing valve with a prosthesis. The choice of prosthesis falls broadly into two categories, mechanical and biological (xenografts or cryopreserved homografts). The life span of existing replacement mechanical valves is approximately 30 years [Vongpatanasin, 1996]. However the use of mechanical valves can create a high shear stress, which can cause platelet activation, and high risk of coagulation and consequently embolization. Therefore, all patients who underwent a mechanical heart valve require long term anticoagulant therapy using the vitamin K agonists such, as warfarin. Warfarin effectively reduces the risk of clotting, but also increases the possibility of bleeding complications [Hammermeister, 1993; Puvimanasinghe, 2001]. Moreover, the risk of bleeding increases with age. In patients above 60 years of age, with mechanical heart valves in whom anticoagulant therapy was applied, the risk of bleeding is a 7-fold higher than in patients younger than 60 years [Rahimtoola, 2010]. The use of mechanical valves poses the risk of complications, in the situation of having to discontinue anticoagulation therapy, for example in the case of surgery or pregnancy [Hung, 2003]. Mechanical valves are also prone to infections and failure or separation of valve elements that can cause an embolism [Usprech, 2016].

Conversely biological valves don't require anticoagulant therapy but suffer from a process of calcification and deterioration (possibly due to an immunological response), because of this, the life span of biological valves is currently limited to approximately 15 years [Vongpatanasin, 1996; Neuenschwander, 2004]. The short life span of the biological valve leads to increased morbidity due to repeated surgical interventions. In many patients, the structural degeneration of the bio-prosthesis starts about 5 year after implantation of the valve, and progresses rapidly. This is particularly true in pediatric patients where calcification and accelerated degeneration require early reoperation [Alsoufi, 2009].

Currently used heart valves prosthesis have many limitations. Both of the types of valves substitutes - mechanical and biological available for use are not viable (except pulmonary autografts) and do not have growth and remodeling capability [Usprech, 2016]. There is a demonstrable need for a long lasting valve that does not require anticoagulant therapy and which is viable and able to remodel as a patient requires.

Alternatives to the current therapies are investigated in tissue engineering (TE). One of the principal of TE concept is proper alteration of suitable scaffold that after transplantation in a dysfunctional site, should allow for integration with patients tissue and restore its natural function [Neuenschwander, 2004]. The new tissue engineered heart valve should be completely viable (able to remodel and grow), should offer the same anticoagulant and hemodynamic properties as the heart valve of a healthy individual and characterize life time durability [Harpa, 2016]. In attempted to engineer a superior, longer lasting heart valve TE methods use acellular tissue scaffold that can be seeded with autologous cells either *ex vivo* [Sales, 2006; Barrilleaux, 2006] or *in vivo* [Hegen, 2011]. For the success of a tissue engineering strategy in clinical applications, the scaffold is required to provide a non-thrombogenic and biocompatible microenvironment. However, during the decellularization process, highly thrombogenic collagen structures are exposed [Stamm, 2004]. This may result in platelet activation or adhesion.

One of the strategies for limiting the activation of platelets cascade is covering the scaffold with the monolayer of endothelial cells, which form a natural layer protecting against platelet activation. Moreover, the acellularization process can cause changes in the extracellular matrix, limiting the seeding and growth ability of endothelial cells. Another strategy provides for the use of acellular scaffold not seeded with the cells, implanted *in vivo*. Scaffold should be protected against clot formation and thrombotic events. This may be particularly important in the cases of human valves or vascular grafts, due to lack of endothelial cell ingrowths, even after years of implantation [Weng, 2012].

To improve cell adhesion and proliferation, studies used various strategies. A recent work showed an improvement in acellular valve biocompatibility by changes in adhesive properties of the valve wall toward endothelial cells after applying several bilayers of heparin-VEGF165 on the tissue. This study evidenced the ability of multilayer film of polyelectrolyte coupled with growth factor to retain endothelial cells and increase their viability [Ye, 2013]. Whilst the problem of thrombosis has previously been addressed by using heparin to seed an acellular frame, although it is a known anticoagulant, the animal origin, immune thrombocytopenia is the major limitation of heparin.

The fucoidan act as a glycosaminoglycan mimetic and has comparable antithrombotic and anticoagulant properties than heparin with lower hemorrhagic effect. It has been shown that fucoidan also can prevent intimal hyperplasia in stent-restenosis in animal models and lead to reendothelialization. In vitro fucoidan proved pro-angiogenic effect and increase the proliferation of endothelial cells [Deux, 2002; Hlawaty, 2011]. Advances in the understanding of Fucoidan as a vehicle for angiogenesis, as an anticoagulant and as a polyelectrolyte molecule have been explored in previous studies. The results of these studies encouraged us to explore the concept that Fucoidan could be used to populate acellular frame and that this polyelectrolyte would reduce the risk of thrombosis as Fucoidan is known to be haemocompatible [Ye, 2016]. It also maintains an adhesiveness to collagen due to its polarity, in effect this should mean improved coverage of the acellular scaffold. In addition to Fucoidan we elected to use vascular endothelial growth factor (VEGF), a known endothelial proliferation and adhesion agent [Neufel, 1999].

The concept of a multilayer approach was decided upon to combine the properties of both Fucoidan and VEGF. Our research explores the viability of using Fucoidan and VEGF to seed an acellular frame.

Fucoidan and VEGF were used in bioengineering development by constructing porous scaffold able to realize homing of endothelial cells and induce angiogenesis subcutaneous/hindlimb ischemia. Fucoidan can be used as a tool in tissue engineering and help the cells to adhere to acellular scaffold. Moreover it could restore a glycosaminoglycan protection on the luminal surface of the valve and decrease the thrombogenic potential.

In our study we are using scaffolds obtained from pig pulmonary heart valve which is in congenital population one of the most common replaced valve [**Henaine, 2012**]. We are combining properties of fucoidan and VEGF in presence of HUVECs. In this paper we present the influence of polyelectrolyte multilayer on endothelial cells adhesion and viability, as well as the effect on trombogenicity and calcification of scaffolds.

Results

Histology

The porcine pulmonary valves were isolated from the heart and subjected to acellularization by enzymatic digestion (**Figure 1A**). The observations of histological cross sections of two tissues component of the valve (leaflet and conduit) (**Figure 1B and C**) stained by hematoxylin and eosin (H&E) showed the full cell removal from the acellular tissues after enzymatic digestion (**Figure 2A**). The acellularization procedure decreased the integrity of the collagen and elastin fibers observed after Masson's Trichrome (Masson) and Verhoeff's Van Gieson (EVG) colorations respectively (**Figure 2B**). Thus, these alterations likewise highly decreased the content of glycosaminoglycans (Alcian blue) (**Figure 2C**). We proceeded the application of the biofilm composed of three bilayers of fucoidan/VEGF on the acellular scaffolds and detected the presence of fucoidan by histological coloration. We observed a thin layer of polysaccharides on the coated surface of the valves (leaflet and conduit) stained by Alcian blue coloration (**Figure 2C**).

This observation was confirmed by the use of fluorescent fucoidan detected in fluorimetry showing that fluorescent fucoidan bound to collagen I with a range of 9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (**data not shown**) and by using fluorescence microscopy after cryo-section of the tissues (**Figure 2D**). The pictures showed a higher intensity of fluorescence on the tissue coated with fucoidan than uncoated one (control), demonstrating the specific binding of fucoidan to structural fibers of the scaffold. VEGF was observed by immunohistochemistry (**Figure 2E**) with primary antibody used to visualize its localization. We confirmed that on coated tissue the whole coverage with VEGF was obtained. The histological analysis suggested that the application of the biofilm MMWF/VEGF partially restored the glycocalyx loss after enzymatic digestion during acellularization procedure.

Mechanical assays

Native valves and valves scaffolds uncoated or coated with the biofilm were subjected to biomechanical assays such as tensile and hysteresis tests (**Figure 3**).

The results showed that as expected, acellular scaffold (conduits) have lower elastic properties expressed in modulus (Mpa) than native valves subjected to both tensile and hysteresis tests. However, no differences were found in the elasticity of the uncoated and coated acellular scaffolds (conduits and leaflets), suggesting that the application of the MMWF/VEGF multilayer biofilm has not changed the stiffness and biomechanical resistance of acellular pulmonary valve, as well as for leaflets or conduits.

Protection of thrombogenicity and coagulation

The thrombogenicity and coagulation properties of the scaffold coating was performed in *ex vivo* assays with whole valves scaffolds cultured with human blood in flow and *in vitro* assays in static condition with plasma rich and free in platelets. Native, acellular and acellular coated whole valves were installed in bioreactors and incubated in flow with fresh human whole blood at 40 mL/min. We measured the activation of platelets with a staining of the P-selectin (CD62P), whose expression is increased in platelets after their activation, compared to integrin- β 3 (CD61), constitutively expressed in inactivated and activated platelets. The cytometry analysis of the blood content after flow culture showed an increase of the platelets activation (CD62P/CD61) in the acellular valves (**Figure 4A**). However, the coating of the valve by the biofilm of MMWF/VEGF reduced from platelet activation which showed a basal rate of activated platelet comparable to the control (native valve). These data were confirmed by the observation and quantification of activated platelets adhesion on valve scaffold surface. The valves were dissected in fragments and the activated platelets were stained (CD62P) and observed under fluorescent microscope (**Figure 4B**). The analysis of the intensity of fluorescence demonstrated an increase of platelets adhesion on acellular scaffold which were drastically reduces by the application of the biofilm of MMWF/VEGF.

In parallel, we analyzed the aggregates of activated platelets (CD62P) and leukocytes (CD45) in the blood by flow cytometry. The results showed an increase of the generation of aggregates in the acellular valves as compared to native (**data not shown**). As for the platelets activation assay, the aggregates generation was highly reduced in the acellular valves coated with the multilayer of MMWF/VEGF.

In a second series of *in vitro* experiments, we analyzed the potential of fucoidan alone on the activation of the isolated platelets from human blood and the thrombin generation in platelet rich (PRP) and platelet free plasma (PFP). We used a commercial fibrillar and non-fibrillar collagen I (Horm and Corning, respectively) as positive controls and low molecular weight heparin as negative control for thrombin activation. The results showed both in PRP and PFP a basal activation of the thrombin in control condition. The fibrillary collagen I enhanced the thrombin activation while fucoidan highly reduced its activation (**Supplementary Figure 1A and B**).

In the same manner, we measured the potential of fucoidan on the platelets aggregation. This assay was performed by using aggregometer with plasma rich platelets. The results showed that the fibrillary collagen I (Horm) in suspension generated the aggregation of platelets in dose-dependent manner with 10% of the aggregation at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 77% of the aggregation at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Supplementary Figure 1C**). The aggregation of the platelets was always lower than 5% with fucoidan used at different concentrations (1, 10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), demonstrating the potential prevention on the aggregation of platelets in thrombogenicity *in vitro*.

Calcification

Samples of valves scaffolds uncoated and coated with the biofilm were incubated in calcification solution for 21 days, then stained and calcification was scored for each condition. There were no significant changes in the calcification process by the application of the multilayer film of MMWF/VEGF on the valve scaffolds. This results demonstrated that the biofilm did not modified the scaffold properties by not inducing the calcification (**figure 5 A and B**).

Cell seeding in static conditions

The re-endothelialization of the valves scaffold in static conditions was performed by seeding human endothelial cells (HUVEC) on isolated samples of leaflet and conduits kept in culture up to seven days.

The cell morphology and viability was analyzed every 24 h after seeding cells by direct fluorescence and histological cross section of the tissues, respectively. Cell engineered samples were stained with *fluorescein diacetate* (FDA) and *propidium iodide* (PI) to quantify the number of living and dead cells respectively on the surface of the tissue. The analysis of the cell morphology after culture in static conditions showed that HUVECs were able to adhere and kept a viable behavior on the acellular conduits and leaflets uncoated and coated with the multilayer biofilm of MMWF/VEGF (**Figure 6A**). The analysis of the living cells density on the surface showed a higher potential for the coated tissues (351 ± 106) for conduits and 1174 ± 147 for leaflets) than uncoated (25 ± 15 for conduits and 729 ± 219 for leaflet) as well (**Figure 3B, left panel**). The results showed that, cells adopted a wider spreading and cobblestone morphology on the coated samples as compared to uncoated ones which have round shape and sparse localization (**Figure 3 B, right panel**). In the same manner, the rate of viability (FDA/PI) was quantified and showed a higher viability rate for the coated scaffolds (6.8 ± 3.3) as compared to uncoated samples (0.1 ± 0.1). The histological cross sections analysis of the samples demonstrated that the endothelial cells spread in a monolayer on the surface of the acellular scaffolds coated with fucoidan/VEGF and did not penetrate inside the matrix of the valve (**Figure 6C**). In some cases for the coated samples with fucoidan/VEGF, we observed a stronger staining in H&E and Masson colorations surrounding the cells.

Secretome of HUVECs seeded on valve scaffold

The cytokines secretion of HUVECs cultured on valve scaffolds by the analysis of conditioned supernatant at 24 h, 48 h and 72 h of incubation. Several types of cytokines involved in inflammatory, proliferation and matrix remodeling were analyzed. The expression of platelet derived growth factor (PDGF) showed to be increased in time at 48 and 72 h in HUVECs supernatants cultured on acellular scaffold and was highly increased in supernatant of HUVECs seeded onto MMWF/VEGF-biofilm coated scaffold (**Figure 6D**).

Other cytokines were quantified such as growth factors (VEGF, FGF-2), enzymes of matrix remodeling (MMP-1, MMP-2 and MMP-9) or inflammatory cytokines (TNF- α , INF- γ , RANTES/CCL5, IL-6, IL-8 and IL-10). Only VEGF, FGF-2, MMP-1 and MMP-2 were detected but no variation in their expression were measured (**Supplementary Figure 2**). MMP-9 and the inflammatory cytokines were not detected in the supernatant by this assay.

Cell seeding on whole valve scaffold in bioreactor under rotation

The whole valve scaffolds uncoated and coated with the multilayer biofilm were installed in two separated bioreactor systems in the same conditions with an optimal tubular position for cell adhesion and culture. HUVECs were injected in the natural direction of the blood flow, from muscle matrix to conduit and cultured under rotation (1 round per minute) for 6 h and 24 h. The valves were then dissected and the viability (FDA and PI staining) of the endothelial cells was quantified on leaflet and conduits samples. The results showed a higher ability of HUVECs to adhere to the whole valve scaffold coated with MMWF/VEGF (1717 ± 208 and 526 ± 58 living cells for conduits and leaflets respectively) than uncoated (0 ± 0 and 37 ± 25 living cells for conduits and leaflets respectively) at 6 h of incubation (**Figure 7A and B**). We also performed a trial in flow culture for 24h after seeding HUVEC in bioreactor (n=1). The cell viability was analyzed directly after cell seeding and 24h after a flow culture at 250mL/min debit. Our preliminary results showed the same tendency for HUVECs to be highly viable on the coated valve scaffold (2822 ± 1641 living cells for leaflet respectively) than uncoated (63 ± 28 living cells for leaflet respectively) after 24 h of incubation (**data not shown**).

Discussion and Perspectives

Currently, surgical replacement of diseased heart valves is commonly accepted method of treatment of the patients with heart valve disease. For the valve replacement the biological or mechanical prosthesis can be used, however some limitations remains. The use of mechanical valves can create a high shear stress, which can cause platelet activation, and high risk of coagulation and consequently embolization. Therefore, all patients who underwent a mechanical heart valve require long term anticoagulant therapy using the vitamin K agonists such, as warfarin. The use of biological valves reduces the risk of thrombotic events, although they are less durable caused by degeneration.

The process of structural degeneration of the valves is poorly understood. In many patients, the structural degeneration of the bio-prosthesis starts about 5 years after implantation of the valve, and progresses rapidly. The data show that, despite the significant advances in the area of surgical replacement of diseased heart valve, current methods of biological heart valves preparations have many limitations. Therefore, the methods for tissue engineering are increasingly used. These methods use the acellular tissue scaffold that can be seeded with autologous cells either *ex vivo* [Sales, 2010; Barrilleaux, 2006] or *in vivo* [Hegen, 2011]. For the success of a tissue engineering strategy in clinical applications, the scaffold is required to provide a non-thrombogenic and biocompatible microenvironment. However, during the decellularisation process, highly thrombogenic collagen structures are exposed [Stamm, 2004]. This may result in platelet activation or adhesion. One of the strategies for limiting the activation of platelets cascade is covering the scaffold with the monolayer of endothelial cells which form a natural layer which protect against platelet activation. *Ex vivo* endothelialization, consists to obtain autologus cells from the patient, which is inconvenient, and the bioprosthesis implantation. Another strategy provides for the use of acellular scaffold not seeded with cells, implanted *in vivo*. Scaffold should be protected against clot formation and thrombotic events. This may be particularly important in the cases of human valves or vascular grafts, due to lack of endothelial cell ingrowths, even after years of implantation [Weng,2012].

The methods to improve the hemocompatibility *in vivo* includes the surface modification of scaffolds. High expectations are associated with natural sulfated polysaccharide such as fucoidan. Fucoidan exhibits various biological effects, among them anti-coagulant, anti-inflammatory and anti-thrombotic activities, but also abilities to integrate a scaffold, increasing growth factors retention and improving cellularization of the scaffold. Low molecular weight fucoidan (LMWF) has a better arterial anti-thrombotic potential in animals than low molecular weight heparin (LMWH), since it prevents arterial thrombus growth with less hemorrhagic propensity than LMWH [Millet, 1999; Collic-Jouault, 2003]. We have previously shown the therapeutic potential of LMWF in reduction of cell-associated protease nexin-1 (PN-1) and thrombin/PN-1 complexes and increasing the anti-thrombin activity of PN-1s [Richard, 2006]. Our work also established that a medium molecular weight fucoidan (MMWF) was more interesting than LMWF while associated with a biodegradable matrix to retain VEGF and lead *in vivo* to increase neovascularization [Purnama, 2013]. Fucoidan, being anti-thrombotic and potentially proangiogenic, could constitute an interesting natural agent to initiate endothelial cell proliferation and colonization during the regeneration of acellular porcine pulmonary valves.

In this study, we hypothesized that fucoidan could have anti-thrombotic activities, no impact on calcification and improve the endothelial cell adhesion and viability during the regeneration of acellular porcine pulmonary valves prosthesis.

Polysaccharide-based biofilm for tissue engineering: new approach for regenerative medicine.

Polyelectrolyte multilayers (PEM) films are described as functional soft matter coatings for surface and capsule [Kerdjoudj, 2010; Costa and Mano, 2014; Ho, 2015]. The hyaluronic acid is commonly used as a polyanion in the construction of polysaccharide-based PEMs, and other polysaccharides have been also used to form PEMs such as alginate [Correia, 2013; Cuomo, 2012], heparin [Lundin, 2011; Ye, 2013], carboxymethyl cellulose [Guyomard, 2005], dextran sulfate [Serizawa, 2002] and fucoidan [Ho, 2015; Ye, 2016].

The PEMs polysaccharides-based belong to a define sub group that provide specific advantages for biomaterials application [**Crouzier, 2010**], especially in the field of controlled release of bioactive molecules [**Costa and Mano, 2014; Hsu, 2014**] and for protein [**Thierry, 2003**] and cell attachment [**Almodóvar, 2013; Saha, 2013**].

According to formation of polyanion-polycation pair, some biochemical parameters may vary such as thickness, water content and stability conditioned by the method used for their formation (salt concentration, counter ion identity and pH) [**Shen, 2011; Quinn, 2012; Zhou, 2008**]. Fucoidans are strong polyelectrolytes with a pKa located between 1.0 and 2.5 [**Sheng, 2004**] and at pH 6 the molecules are likely to be fully negatively charged. They have heterogeneous chemical structures depending of their species origins, and their extraction and purification methods [**Berteau and Mulloy, 2003; Silva, 2012**], that can alter the properties of fucoidan-based PEMs and their different biological application. Fucoidan containing acetyl groups are willing to produce thinner, denser and smoother multilayers compared to fucoidans without these groups. It has been shown that the content of acetyl groups can increase the number of interaction with polycationic molecules by adding intramolecular hydrogens bonds as demonstrated with chitosan/fucoidan-based PEMs [**Ho, 2015**]. However, the variation in fucoidan composition does not affect their abilities to form PEMs [**Ho, 2015**].

In our work, we used the MMWF fraction extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. This selected fraction exhibit large amount of fucose (36 %) with high sulfate content (29 %) and lower content of uronic acid (14 %), as described in our previous study [**Marinval, 2016**]. These chemical features were thought to optimize the interaction of MMWF with Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) leading to generation of PEM film. The PEM MMWF/VEGF-based film was used as the coating layer for acellular pulmonary valve tissue to analyze their effect on valves calcification, thrombosis and endothelial cell colonization and viability.

Calcification rate of MMWF/VEGF-coated acellular valve

Experiments in the field of cardiac valve calcification, with the influence of sulfated polysaccharides in tissue engineering, are not widely explored since the studies are still at early stages. Recently, Yang *et al.* have performed *in vivo* calcification assays on acellular valve scaffold modified with glutaraldehyde and covered with heparin explanted in rabbit model [Yang, 2015]. The authors observed a slight decrease of the calcification and conclude that this effect was induced by heparin properties. In our study, we observed that the use of MMWF/VEGF-based coating on valves did not induce the calcification process in *in vitro* assays.

Thrombogenicity and coagulation activities of MMWF/VEGF-coated acellular valve

We assessed the effect of MMWF on thrombogenicity and coagulation activities in two models, *ex vivo* in presence of MMWF/VEGF-coating valves in bioreactor flow assays [Wilczek, 2015] and *in vitro* in platelet-rich-plasma (PRP) and platelet-free-plasma (PFP) conditions in presence of MMWF. We could expect the anti-thrombotic properties of MMWF, as it was widely studied [Mauray, 1998; Cumashi, 2007; Thorlacius, 2000]. Our *ex vivo* results attested that MMWF/VEGF-coating treatment decreased the platelets activation and adhesion leading to protection of acellular valves from platelets response. In addition, the *in vitro* assays confirmed the inhibition of thrombin generation (calibrated automated thrombogram) in PRP and PFP conditions and platelet activation in PEP condition (aggregometry) studied in presence of MMWF (supplementary data). All these results evidenced the anti-thrombotic, anti-coagulant and anti-aggregant effect of MMWF. The use of MMWF for tissue engineering of acellular valve can be very useful to perform non-thrombogenic and compatible bioprosthesis for clinical application.

HUVEC adhesion and proliferation on MMWF/VEGF-coating acellular valve

It has been previously described, by Harpa *et al* that, the xenograft of tissue engineered repopulated acellular porcine pulmonary valves could be transplanted in sheeps. The authors showed the difficulties of the use of autologous adipose derived stem cells to improve the regeneration of the bioprosthesis 6 months after transplantation. However, they demonstrated the promising potential of acellular scaffold that they consider as reliable, stable, non-immunogenic, non-thrombogenic and non-calcifying scaffolds with good hemodynamics [Harpa, 2015].

In our study, we highlighted that MMWF/VEGF-coated acellular porcine scaffold increased the adherence and viability of human endothelial cells (HUVEC) in static *ex vivo* condition. The MMWF/VEGF-coated scaffold remains a porous scaffold that can be designed to allow cell migration and proliferation to establish a well colonized bio-scaffold. Herein, we chose the HUVECs to demonstrate that this cell model could be used as a proof of concept to colonize the acellular valves and form a natural layer able to protect against platelet activation. However, further explorations are needed to evaluate the scaffold regeneration using the cells with high potential of proliferation, like human stem or progenitor cells (mesenchymal, endocardocyte or endothelial origins) [Ye, 2013; Weymann, 2013].

It will be interesting in the near future, to improve the acellular valves colonization by the cells, not in static but in dynamic condition in bioreactor flow culture. We would expect to measure more intensively the repopulation of the valve scaffold cultured in bioreactor as other studies performed before [Lichtenberg, 2006]. Lichtenberg *et al.* observed the repopulation of bovine acellular heart valves with the monolayer of autologous endothelial cells after 7 days of dynamic cell culture with pulsatile flow debit up to 2 L/min.

Mechanical proprieties of MMWF/VEGF-coated acellular porcine valves

We have measured the mechanical responses of MMWF/VEGF-coated biological scaffold. Our results showed that, the biomechanical resistances were not changed in the assay suggesting that the coating with MMWF/VEGF did not modify the matrix scaffold organization and properties.

In the other hand, as fucoidan could interact with the matter of extracellular matrix proteins positively charged, we could expect an increase of the stiffness, as a cross-linking agent would do, but in this case, the MMWF/VEGF coating did not changed the elastic properties. However, we expect to improve the mechanical resistance of the acellularized and MMWF/VEGF-coated valve to mechanical stress using long term cell culture on it. Further studies are needed to measure the ability of MMWF/VEGF-coated and cell-seeded scaffold to enhance the biomechanical proprieties of valves before its transplantation *in vivo*.

Conclusion

In our study we demonstrated that the MMWF/VEGF coating can be used to modify the acellular valve scaffold, leading to protection from thrombosis (dynamic *ex vivo* culture in bioreactor) and increase of adhesion and viability of HUVEC seeded on the acellular valve (static *in vitro* condition), without any effect on calcification process *in vitro*. This study evidenced that the MMWF/VEGF coating can be used to develop the functional acellular heart valve bioprosthesis for clinical application, since it has anti-thrombotic potential and increases cell viability.

Figures and captions.

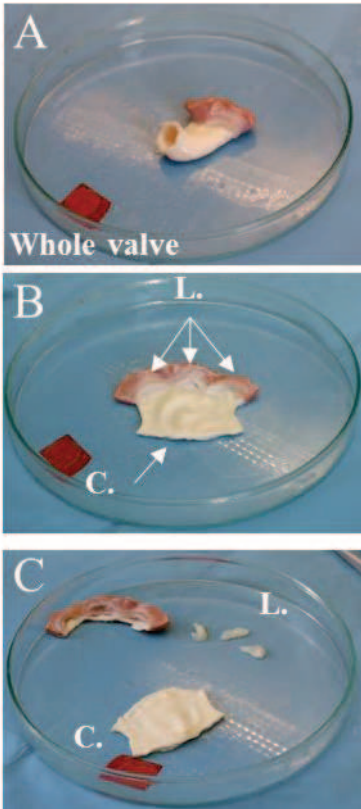


Figure 1. Dissection of the porcine pulmonary valve. In **A)**, the whole porcine pulmonary valve was isolated from porcine heart and prepared for dissection. **B)** A longitudinal section revealed two compartments of the valve, the conduit (C.) and the leaflets (L.). **C)** The two tissues were separated for analysis in static conditions.

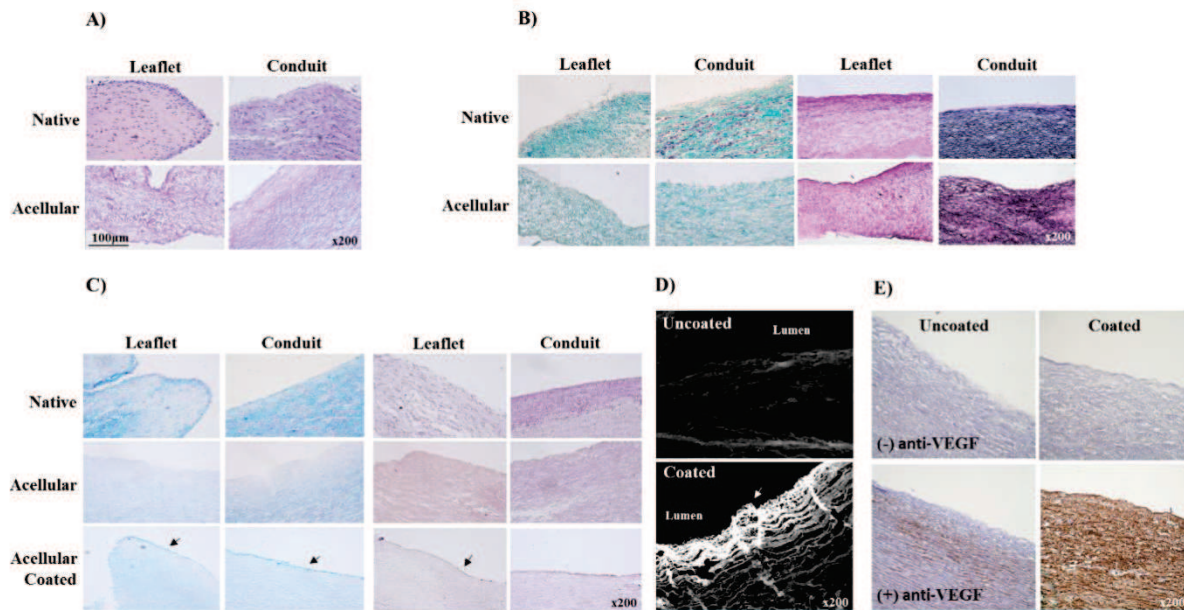


Figure 2. Analysis of acellularization and coating of valve scaffold. Cross sections of native and acellular porcine leaflets and conduits were stained with **A)** Hematoxylin and Eosin to reveal the cell presence of native cells, **B)** Masson' Trichrome to visualize the collagen fibers and Verhoeff van Gieson for elastin, **C)** Alcian blue and periodicacid-Schiff to observe glycosaminoglycans and polysaccharides expression respectively. **D)** A fluorescent-fucoidan was used to detect its presence and observe its localization on the acellular scaffold coated with multilayer biofilm of MMWF/VEGF (Coated). A non-coated scaffold (Uncoated) was used to set autofluorescence. The observations were performed under fluorescence microscopy after cryosection. The arrows show the stained fucoidan. **E)** The localization of VEGF before (Uncoated) and after the multicoding of the scaffolds (Coated) was observed by immunohistochemistry with ((+) anti-VEGF) or without ((-) anti-VEGF) antibody directed against VEGF.

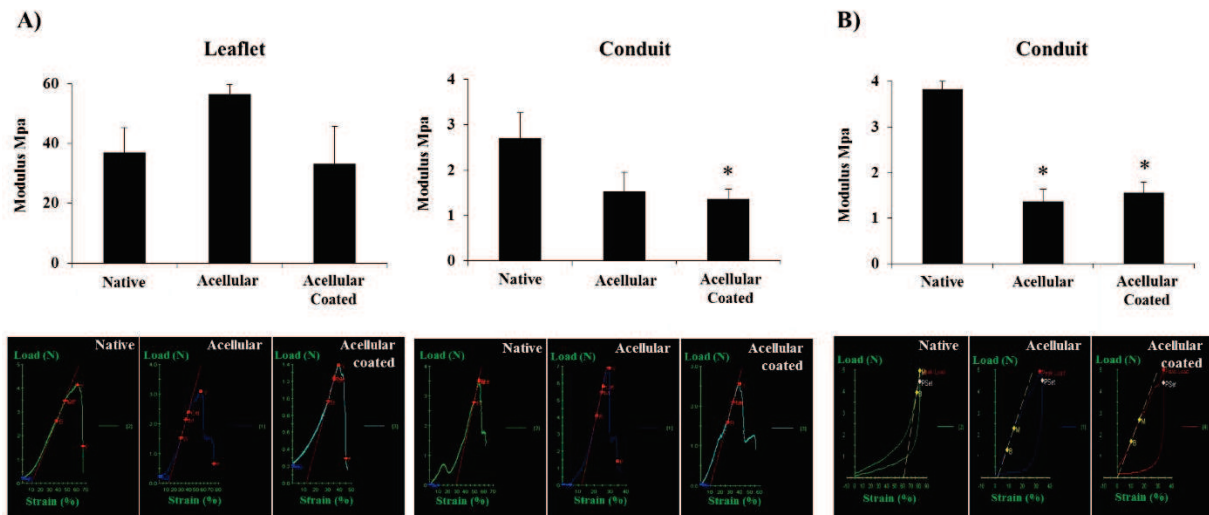


Figure 3. Biomechanical assays on the valves fragments. The biomechanical resistances of the samples (native, acellular and acellular coated valve fragments) was performed with **A)** tensile stress until break and **B)** hysteresis bending stress, by using universal mechanical device. Top: the modulus (Mpa) was recorded and represented in graphics. Bottom: the curves represents the load (N) per strain (%). $n \geq 3$, * $p < 0.001$ Acellular, Acellular coated vs Native.

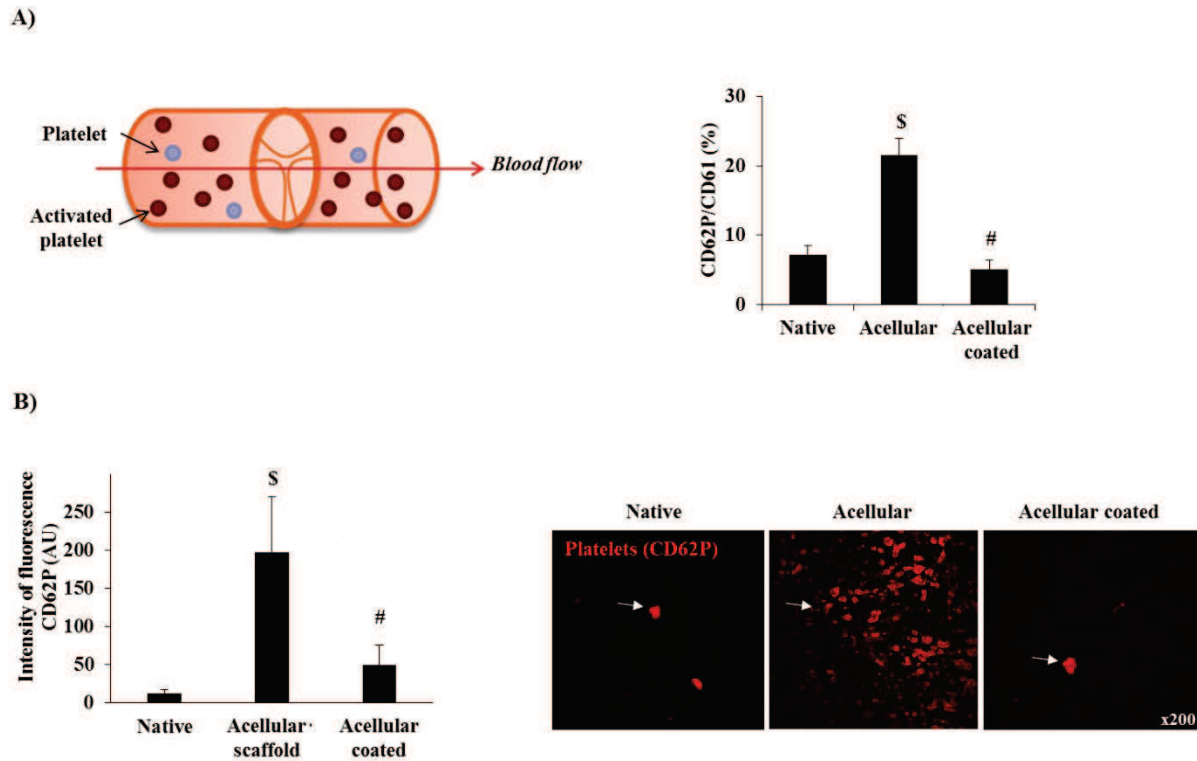


Figure 4. Thrombogenicity of valve scaffolds cultured in flow. Whole native, acellular and acellular coated valves with the biofilm MMWF/VEGF were submitted to human whole blood flow culture by using bioreactor in a circuit. **A)** Platelets were analyzed in blood after 15 min of flow by flow cytometry by using antibodies directed against CD61 (total platelets) and CD62P (activated platelets). The activation of platelets was quantified with the ratio CDG2P/CD61 and expressed in percentage. $n \geq 3$ \$ $p < 0.001$ Acellular vs Native; # $p < 0.001$ Acellular coated vs Acellular. **B)** The valves were collected, dissected and stained (CD62P) after the flow culture. The luminal platelets adhesion and aggregation to the valve surface was observed and quantified by fluorescence microscopy. The left panel shows the quantification of platelets adhesion to the valves expressed in intensity of fluorescence and the right panel shows the staining of CD62P (red) on the valves dissections observed in epifluorescence. $n \geq 3$, \$ $p < 0.05$ Acellular vs Native; # $p < 0.005$ Acellular coated vs Acellular.

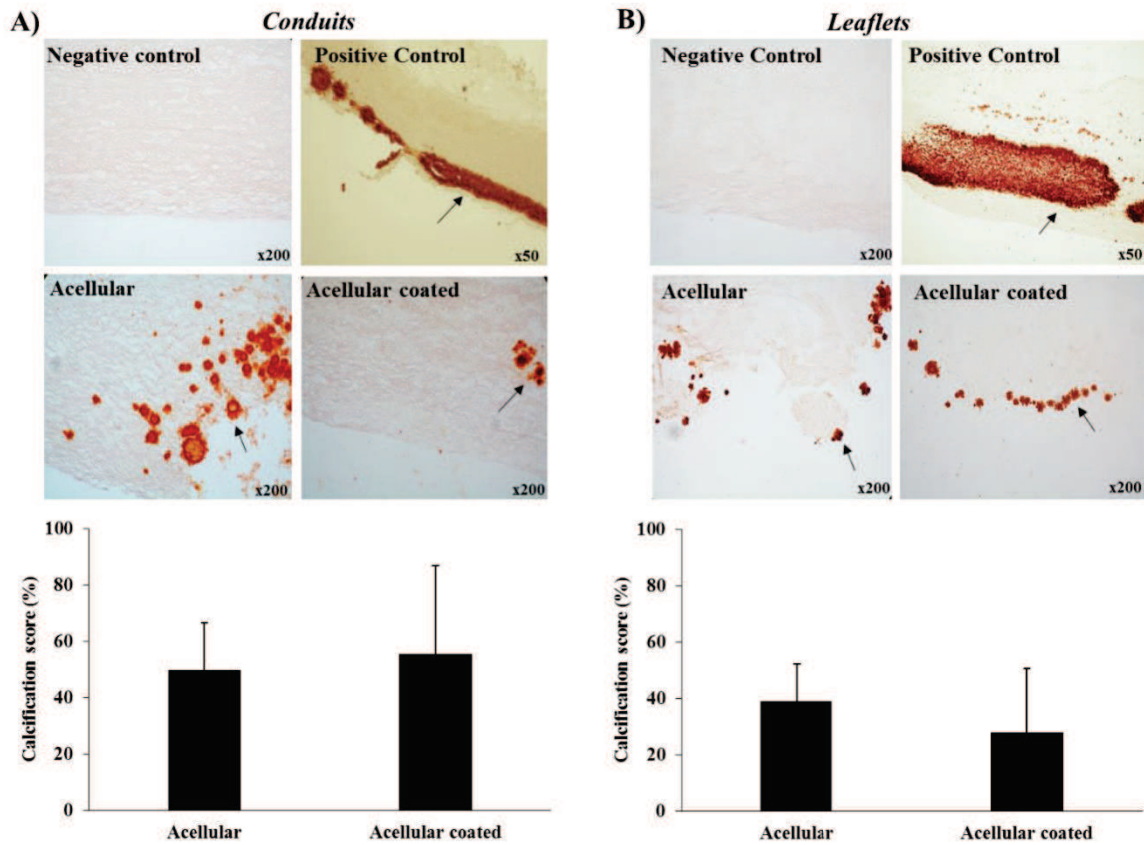


Figure 5. Calcification assay. Acellular valve scaffolds coated or uncoated with the biofilm MMWF/VEGF were incubated with a calcification solution for 21 days. Histological analysis was performed on cross section with Alizarin red staining to observe the calcification on the samples. The calcification level was scored and normalized in percentage of calcification with the maximum score (100%) related to positive control. The data are presented in the graphics for **A)** conduits and **B)** leaflets.

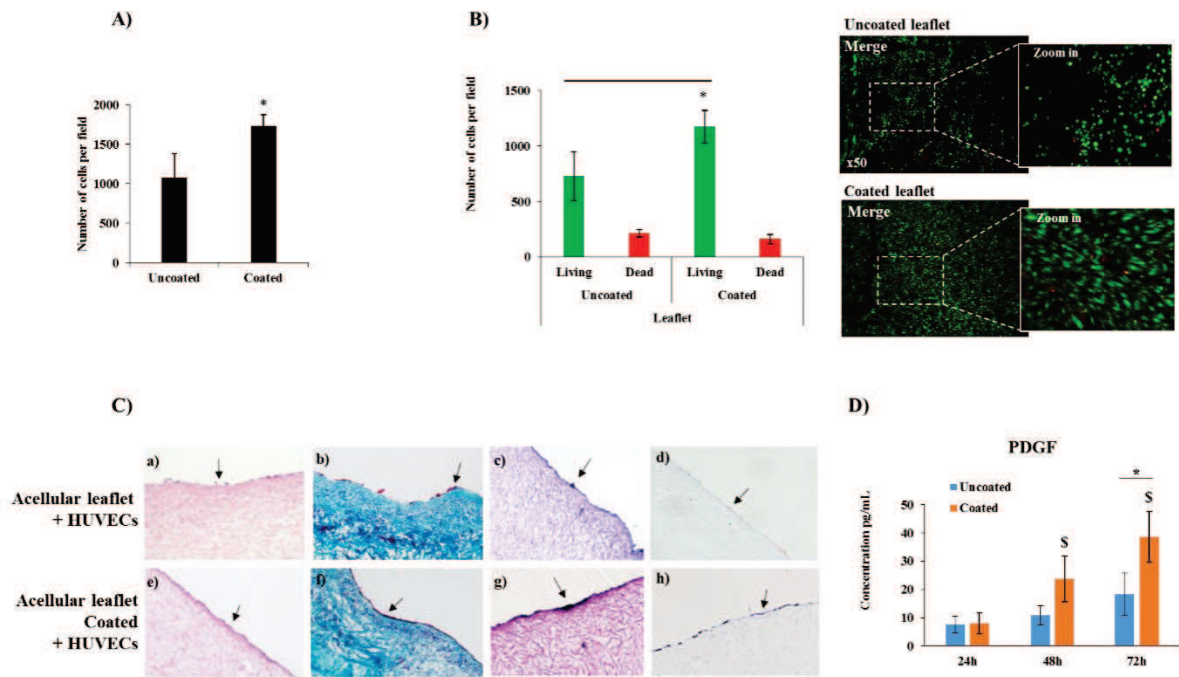


Figure 6. Cell seeding on valve scaffold in static condition. HUVECs were seeded on acellular scaffolds of porcine pulmonary valves coated (Coated) or not (Uncoated) with the biofilm of MMWF/VEGF. **A)** The adhesion of cells was quantified 6h after seeding. $n \geq 3$, * $p < 0.01$ Coated vs Uncoated. **B)** Living cells were stained up to 72h after seeding with FDA (green) and dead cells revealed by PI (red). The cell viability on valve surface is expressed in graphics by the ratio FDA/PI for leaflet (left panel) and observed under fluorescence microscopy (right panel). Representative data are shown according to all times. $n \geq 3$, * $p < 0.01$ Coated vs. Uncoated. **C)** Cross section of the re-endothelialized (HUVECs) acellular valve scaffolds coated or not with the biofilm were stained in Hematoxylin and Eosin (a, e), Masson' Trichrome (b,f), Verhoeff van Gieson (c,g) and alcianblue (d,h). Adherent HUVECs are pointed by the arrows. **D)** The expression of PDGF by seeded was measured in supernatant by Luminex assay after 24, 48 and 72h of incubation. The data are expressed in pg/mL. $n \geq 3$, \$ $p < 0.01$ 48h, 72h Coated vs. 24h Uncoated; * $p < 0.01$ 72h Coated vs. 72h Uncoated.

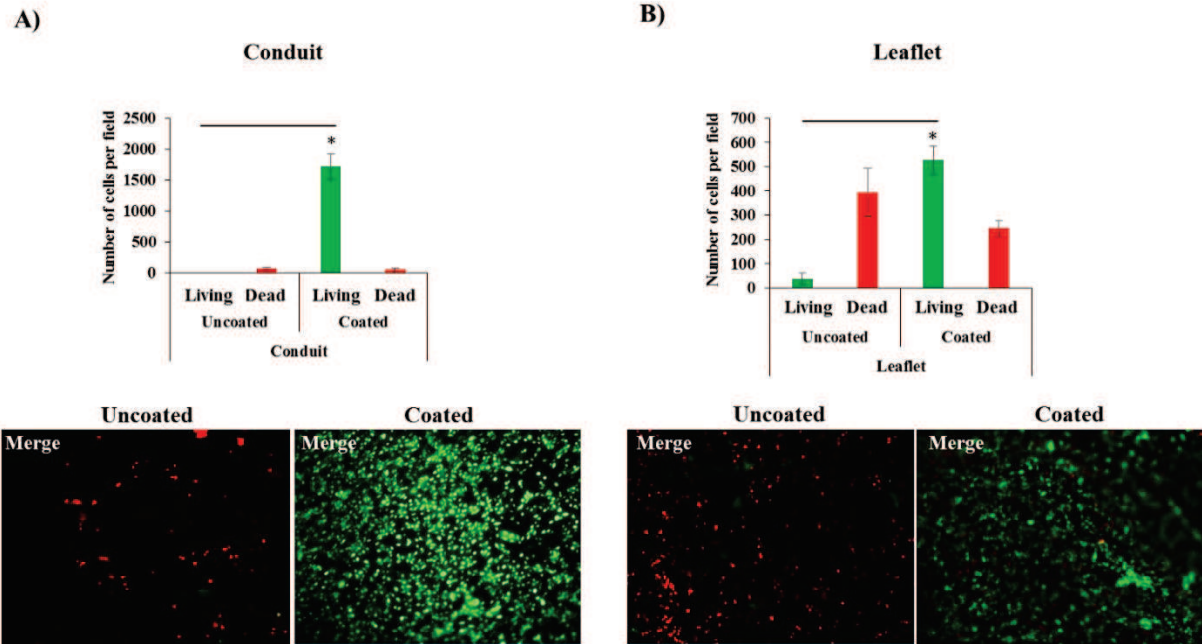
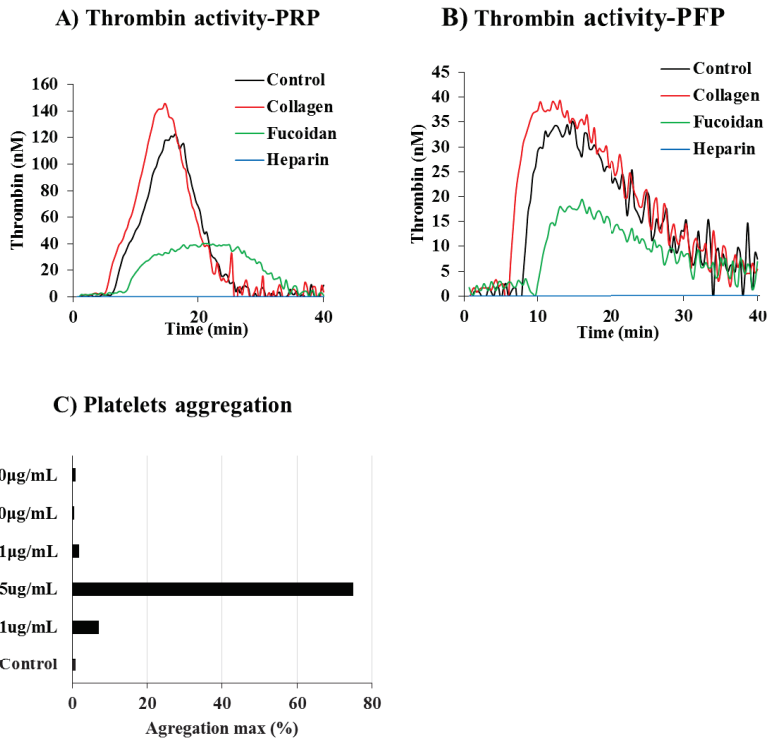
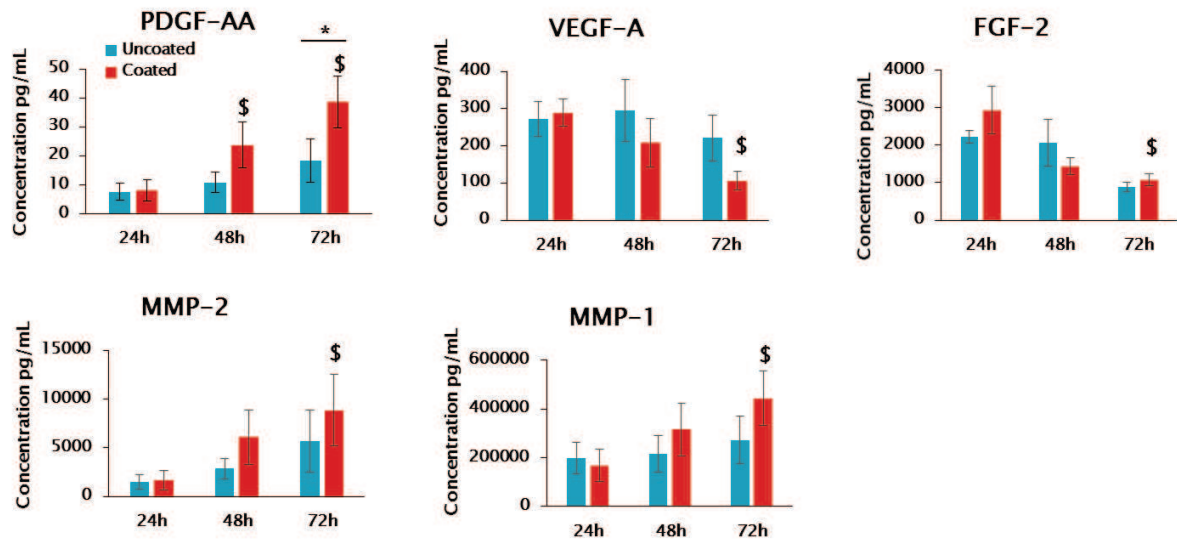


Figure 7. Cell seeding on whole valve scaffold in Bioreactor. The whole acellular pulmonary valves scaffolds uncoated or coated with the biofilm were installed inside the bioreactor suitable for cell seeding and culture. The cells were seeded and cultured with spinning condition. The cell viability (FDA for living cells in green; PI for dead cells in red) of adherent HUVECs to the luminal surface of the valves scaffolds was quantified 24h after seeding by fluorescent microscopy analysis. Top: The data are expressed in bars. Bottom: Merged pictures of the staining FDA/PI. **A)** Conduit. **B)** Leaflet. $n \geq 3$, * $p < 0.01$ Living Coated vs. Living Uncoated.



Supplementary figure 1. Thrombogenicity and coagulation of fucoidan *in vitro*.

The platelets were isolated from human blood by centrifugation series and the effect of collagen, fucoidan (MMWF) and heparin in suspension on the thrombin activation were measured in **A)** plasma rich platelet (PRP) and **B)** plasma free platelets (PFP). **C)** The aggregation of platelets in suspension under collagen (50 µg/mL), fucoidan (10 µg/mL) or heparin (10 µg/mL) influence was measured by using aggregometer and expressed in percentage of maximum aggregation.



Supplementary figure 2. Expression of cytokines in supernatant. The supernatant of HUVECs seeded and cultured on valve scaffold uncoated or coated with the biofilm of MMWF/VEGF was collected after 24, 48 and 72 h of incubation in static condition. The expression of PDGF-AA, VEGF-A, FGF-2, MMP-2 and MMP-1 was measured by Luminex assay. The results are expressed in concentration of cytokine in the medium (pg/mL) and presented in graphics.

Bibliography

Almodovar, J.; Mower, J.; Banerjee, A.; Sarkar, A. K.; Ehrhart, N. P. and Kipper, M. J. Chitosan-heparin polyelectrolyte multilayers on cortisol bone: periosteum-mimetic, cytophilic, anticacterial coatings. *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 609–618.

Alsoufi, B.; Manlihot, C.; McCrindle B.; Canver C.; Sallehuddin, A.; Al-Oufi, S.; Joufan, M.; Al-Halees, Z. Aortic and mitral valve replacement in children: is there any role for biologic and bioprosthetic substitutes?. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery.* **2009**, *36*, 84-90.

Barrilleaux, B.; Phinney, D.; Prockop, D.; O'Connor, K. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 3007–3019.

Berteau, O.; Mulloy, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology.* **2003**, 29R-40R.

Colliec-Jouault, S.; Millet, J.; Helley, D.; Sinquin, C. and Fischer, A.M. Effect of low molecular weight fucoidan on experimental arterial thrombosis in the rabbit and rat. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* **2003**, *1*(5):1114-1115.

Correia, C. R.; Sher, P.; Reis, R.L. and Mano, J.F. Liquified chitosan-alginate multilayer capsules incorporating poly(L-lactic acid) microparticles as cell carrier. *Soft Matter.* **2013**, *9*, 2125–2130.

Costa, R. R. and Mano, J. F. Polyelectrolyte multilayered assemblies in biomedical technologies. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3453– 3479.

Crouzier, T.; Boudou, T.; and Picart, C. Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2010**, *15*, 417–426.

Cumashi, A.; Ushakova, N.; Preobrazhenskaya, M.; D’Incecco, A.; Piccoli, A.; Totani, L.; Tinari, N.; Morozevich, G.E.; Berman, A.E.; Bilan, M.I.; et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology.* **2007**, *17*, 541–552.

Cuomo, F.; Lopez, F.; Ceglie, A.; Maiuro, L.; Miguel, M.G. and Lindman, B. *Soft Matter.* **2012**, *8*, 4415–4420.

Deux, J. F.; Meddahi-Pellé, A.; Le Blanche, A. F.; Feldman, L. J.; Collic-Jouault, S.; Brée, F.; Boudghène, F.; Michel, J. B.; Letourneur, D. Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia in rabbit iliac artery in-stent restenosis model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 1604–1609.

Gašior, J.; Sacha, J.; Jeleń, P.; Zieliński, J.; Przybylski, J. Heart Rate and Respiratory Rate Influence on Heart Rate Variability Repeatability: Effects of the Correction for the Prevailing Heart Rate. *Frontiers in Physiology.* **2016**, *7*, 356.

Guyomard, A.; Muller, G. and Glinel, K. Buildup of multilayers based on amphiphilic polyelectrolytes. *Macromolecules.* **2005**, *38*, 5737–5742.

Hammermeister, K.; Sethi, G.; Henderson, W.; Grover, F.; Oprian, C.; Rahimtoola, S. Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial. *J Am Coll Cardiol.* **2000**, *36*, 1152–8.

Harpa, M.; Movileanu, I.; Sierad, L.; Cotoi, H.; Suci, H.; Sircuta, C.; Preda, T.; Nistor, D.; Branzaniuc, K.; Deac, R.; Dandel, M.; Gurzu, S.; Harceaga, L.; Olah, P.; Simionescu, A.; Simionescu, D. Pulmonary heart valve replacement using stabilized acellular xenogeneic scaffolds; effects of seeding with autologous stem cells. *Rev Rom Med Lab.* **2016**, *23*, 415–429.

Hegen, A.; Blois, A.; Tiron, C.; Hellesøy, M.; Micklem, D.; Nör, J.; Akslen, L.; Lorens, J. Efficient in vivo Vascularization of Tissue Engineering Scaffolds. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2011**, *4*, 52–62.

Henaine, R.; Roubertie, F.; Vergnat, M.; Ninet, J. Valve replacement in children: A challenge for a whole life. *Archives of Cardiovascular Diseases.* **2012**, *105*, 517-528.10.

Hlawaty, H.; Suffee, N.; Sutton, A.; Oudar, O.; Haddad, O.; Ollivier, V.; Laguillier-morizot, C.; Gattegno, L.; Letourneur, D.; Charnaux, N. Low molecular weight fucoidan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2 expression. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 233–243.

Ho, T. T. M.; Bremmel, K. E.; Krakowska, M.; Striger, D. N.; Thierry, B.; Beattie, D. A. Tuning polyelectrolyte multilayer structure by exploiting natural variation in fucoidan chemistry. *Soft Matter.* **2015**, *11*, 2110–2124.

Hsu, B. B.; Hagerman, S. R.; Jamieson, K.; Veselinovic, J.; O'Neill, N.; Holler, E.; Ljubimova, J. Y. and Hammond, P. T. Multilayer films assembled from naturally-derived materials for controlled protein release. *Biomacromolecules*. **2014**, *15*, 2049–2057.

Hung, L.; Rahimtoola, S.; Prosthetic Heart Valves and Pregnancy. *Circulation*. **2003**, *107*, 1240 – 1246.

Kerdjoudj, H.; Berthelemy, N.; Boulmedais, F.; Stoltz, J.-F.; Menu, P. and Voegel, J. C. *Soft Matter*. **2010**, *6*, 3722–3734.

Lichtenberg, A.; Tudorache, I.; Cebotari, S.; Ringes-Lichtenberg, S.; Sturz, G.; Hoeffler, K.; Hurscheler, C.; Brandes, G.; Hilfiker, A.; Haverich, A. In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions. *Biomaterials*. **2006**, *27*, 4221–4229.8.

Lundin, M.; Solaqa, F.; Thormann, E.; Macakova, L. and Blomberg, E. *Langmuir*, **2011**, *27*, 7537–7548.

Marinval, N.; Saboural, P.; Haddad, O.; Maire, M.; Bassand, K.; Geinguenaud, F.; Djaker, N.; Ben Akrouit, K.; De La Chappelle M.L.; Robert, R.; Oudar, O.; Guyot, E.; Laguillier-Morizot, C.; Sutton, A.; Chauvierre, C.; Chaubet, F.; Charnaux, N. and Hlawaty, H. Identification of a pro-angiogenic potential of a low molecular weight highly sulfated fraction of fucoidan from *ascophyllum nodosom*. *Mar drugs*. **2016**, *10*(10)185.

Mauray, S.; de Raucourt, E.; Chaubet, F.; Maïga-Revel, O.; Sternberg, C.; Fischer, A.M. Comparative anticoagulant activity and influence on thrombin generation of dextran derivatives and of a fucoidan fraction. *J. Biomater. Sci. Polym.* **1998**, *9*, 373–387.

Millet, J.; Jouault S.C.; Mauray, S.; Theveniaux, J.; Sternberg, C.; Boisson-Vidal, C. and Fischer, A.M. Antithrombotic and anticoagulant activities of a low molecular weight fucoidan. *Thromb Haemost.* **1999**, *81*:391-395.

Neuenschwander, S.; Hoerstrup, S.; Heart valve tissue engineering; *Transplant Immunology*. **2004**. *12*, 359–365.

Neufel, G.; Cohen, T.; Gengrinovitch, S.; Poltorak, Z.; Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*. **1999**, *13*, 9-22. 1.

Purnama, A.; Aid-launais, R.; Haddad, O.; Maire, M.; Letourneur, D.; le Visage, C. Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2013**, *2*, 187–197.

Puvimanasinghe, J.; Steyerberg, E.; Takkenberg, J.; Eijkemans, M.; Herwerden, L.; Bogers, A.; Habbema, J.; Prognosis After Aortic Valve Replacement With a Bioprosthesis Predictions Based on Meta-Analysis and Microsimulation. *Circulation*. **2001**, *103*, 1535-1541.

Quinn, J. F.; Pas, S. J.; Quinn, A.; Yap, H. P.; Suzuki, R.; Tuomisto, F.; Shekibi, B. S.; Mardel, J. I.; Hill, A. J. and Caruso, F., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19808–19819.

Rahimtoola, S. Choice of Prosthetic Heart Valve in Adults. *J Am Coll Cardiol*. **2010**, *55*, 2413-2426.22.

Richard, B.; Bouton, M. C.; Loyau, S.; Lavigne, D.; Letourneur, D.; Jandort-Perrus, M.; Arocas, V. Modulation of protease nexin-1 activity by polysaccharides. *Thromb Haemost.* **2006**, *95*(2): 229-35.

Saha N., Monge C., Dulong V., Picart C. and Glinel K., *Biomacromolecules*, **2013**, *14*, 520–528.

Sales, V.; Mettler, B.; Engelmayer, G.; Aikawa, E.; Bischoff, J.; Martin, D.; Exarhopoulos, A.; Moses, M.; Schoen, F.; Sacks, M.; Mayer, J. Endothelial progenitor cells as a sole source for ex vivo seeding of tissue-engineered heart valves. *Tissue Eng. A*. **2010**, *16*, 257–267.

Serizawa, T.; Yamaguchi, M. and Akashi, M. *Biomacromolecules*. **2002**, *3*, 724–731.

Shen, L.; Chaudouet, P.; Ji, J. and Picart, C. pH-amplified multilayer films based on hyaluronan: influence of HA molecular weight and concentration on film growth and stability. *Biomacromolecules*. **2011**, *12*, 1322–1331.

Sheng, P. X.; Ting, Y.-P.; Chen, J. P. and Hong, L. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *275*, 131–141.

Silva, T. H.; Alves, A.; Ferreira, B. M.; Oliveira, J. M.; Reys, L. L.; Ferreira, R. F.; et al. Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest. *Int Mater Rev*. **2012**; *57*: 276-306.

Stamm, C.; Khosravi, A.; Grabow, N.; Schmohl, K.; Treckmann, N.; Drechsel, A.; Nan, M.; Schmitz, K.; Haubold, A.; Steinhoff, G. Biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering, *Ann. Thorac. Surg.* **2004**, *78*, 2084–2092.

Thierry, B.; Winnik, F. M.; Merhi, Y.; Silver, J. and Tabrizian, M. *Biomacromolecules*, **2003**, *4*, 1564–1571.

Thorlacius, H.; Vollmar, B.; Seyfert, U.T.; Vestweber, D.; Menger, M.D. The polysaccharide fucoidan inhibits microvascular thrombus formation independently from P- and L-selectin function in vivo. *Eur. J. Clin. Invest.* **2000**, *30*, 804–810.

Usprech, J.; Chen, W.; Li, K.; Simmons, C.; Heart valve regeneration: The need for systems approaches. *WIREs Syst Biol Med.* **2016**, *8*, 169–182.

Vongpatanasin, W.; Hillis, D.; Lange, R. Characteristics of prosthetic valves. *N Engl J Med.* **1996**, *335*, 6, 407-416.

Weng, Y.; Chen, J.; Tu, Q.; Li, Q.; Maitz, M.; Huang, N. Biomimetic modification of metallic cardiovascular biomaterials: from function mimicking to endothelialization in vivo. *Interface Focus.* **2012**, *2*, 356–365.

Weymann, A.; Schmack, B.; Okada, T.; Soós, P.; Istók, R.; Radovits, T.; Straub, B.; Barnucz, E.; Loganathan, S.; Pätzold, I.; Chaimow, N.; Schies, C.; Korkmaz, S.; Tochtermann, U.; Karck, M.; Szabó, G. Reendothelialization of Human Heart Valve Neoscaffolds Using Umbilical Cord-Derived Endothelial Cells. *Circ. J.* **2013**, *77*, 207–216.11.

Wilczek, P.; Major, R.; Lipinska, L.; Lackner, J.; Mzyk, A. Thrombogenicity and biocompatibility studies of reduced graphene oxide modified acellular pulmonary valve tissue. *Mater. Sci. Eng. C.* **2015**, *53*, 310–321.3.

Yang, M.; Lin, Y. H.; Shi, W. P.; Shi, H. C.; Gu, Y. J.; Shu, Y. S. Surface heparin treatment of the decellularized porcine heart valve: Effect on tissue calcification. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2015**, 1–6.

Ye, C.; Wang, Y.; Su, H.; Yang P, Huang, N.; F Maitz, M.; Zhao, A.; Construction of a fucoidan/laminin functional multilayer to direction vascular cell fate and promotion hemocompatibility. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* **2016**, *1*, 236-42. 64.

Ye, X.; Wang, H.; Zhou, J.; Li, H.; Liu, J.; Wang, Z.; Chen, A.; Zhao, Q. The Effect of Heparin-VEGF Multilayer on the Biocompatibility of Decellularized Aortic Valve with Platelet and Endothelial Progenitor Cells. *Plos One.* **2013**, *8*(1):e54622.

Zhou, J.; Wang, B.; Tong, W.; Maltseva, E.; Zhang, G.; Krastev, R.; Gao, C.; Mohwald, H. and Shen, J. *Colloids Surf. B.* **2008**, *62*,250–257.

Discussion et perspectives du chapitre II

Les chirurgies de remplacement de valves cardiaques sont les méthodes couramment acceptées pour traiter les patients atteints de formes graves de valvulopathies. Le remplacement peut être effectué par une prothèse mécanique ou biologique, cependant chaque méthode est encore perfectible. L'utilisation de valves mécaniques peut générer des forces de cisaillement causant une activation plaquettaire et un risque élevé de coagulation conduisant à une embolisation. Par conséquent, les patients qui ont subi la pose d'une valve cardiaque mécanique nécessitent la prise d'une thérapie anticoagulante à long terme en utilisant des anti-vitamines K. Ces molécules anticoagulantes augmentent le risque de complications hémorragiques [Hammermeister, 1993; Puvimanasinghe, 2001]. Par exemple, le risque de saignements chez un patient de 60 ans induit par l'implantation d'une valve mécanique est de 41%, tandis que l'implantation d'une bioprothèse de valves réduit le risque à 12% [Geldorp Van, 2009]. De plus, le risque de saignement augmente avec l'âge. Chez les patients âgés de plus de 60 ans, portant une valve mécanique et recevant un traitement anticoagulant, le risque de saignement est 7 fois plus élevé que pour les patients plus jeunes [Rahimtoola, 2010]. L'utilisation de valves mécaniques pose également le risque de complications liées à la prise continue de traitement anticoagulant, par exemple dans le cas d'une chirurgie ou d'une grossesse [Hung, 2003]. L'utilisation de valves d'origine biologique réduit le risque d'évènements thrombotiques, bien qu'elles présentent une durabilité plus faible causée par une dégénération.

Le processus de la dégénération structurelle des valves est encore mal compris. Dans un certain nombre de patients, la dégénération structurelle de la bioprothèse commence 5 ans après l'implantation et progresse rapidement. Les données montrent qu'en dépit d'avancées significatives dans le domaine de remplacement chirurgical des valves cardiaques malades, les méthodes actuelles de préparation de prothèses de valves biologiques ont plusieurs limites.

Pour cette raison, les méthodes utilisant des procédés d'ingénierie tissulaire sont de plus en plus utilisées dans leur préparation.

Ces méthodes utilisent un tissu matriciel acellulaire qui peut êtreensemencé *ex vivo* par des cellules autologues du patient [**Sales, 2010; Barrilleaux, 2006**] ou *in vivo* [**Hegen, 2011**]. Pour la réussite de la stratégie d'ingénierie tissulaire dans l'application clinique, le support tissulaire doit fournir un micro-environnement non thrombogène et biocompatible. Cependant, au cours du processus de d'acellularisation, les structures de collagène hautement thrombogènes sont exposés [**Stamm, 2004**]. Ceci peut conduire à une activation ou une adhérence plaquettaire. Une des stratégies pour limiter la cascade d'activation est le revêtement du support tissulaire par une monocouche de cellules endothéliales qui forment une strate naturelle protégeant de l'activation des plaquettes.

Le processus d'acellularisation peut causer des changements dans la matrice extracellulaire, limitant l'ensemencement et les capacités de croissance cellulaires. L'endothélialisation *ex vivo* consiste à obtenir des cellules autologues du patient, et l'implantation de la bioprosthèse. Une autre stratégie prévoit l'utilisation de supports tissulaires acellulaires nonensemencés et implantés *in vivo*. Le support doit être protégé contre la formation de caillot et contre les évènements thrombotiques. Ceci pourrait être particulièrement important dans le cas de valves humaines ou de greffes vasculaires, en raison du manque d'adhérence, de survie et de croissance des cellules endothéliales au support, même plusieurs années après l'implantation [**Weng, 2011**].

Les méthodes permettant d'améliorer l'hémocompatibilité *in vivo* incluent la modification de la surface du support tissulaire. Les polysaccharides sulfatés naturels tels que le fucoïdane génèrent des attentes élevées. Le fucoïdane présente divers effets biologiques, parmi lesquels des activités anti-coagulantes, anti-inflammatoires et anti-thrombotiques, mais présente aussi des capacités à intégrer des matrices poreuses, en améliorant la rétention des facteurs de croissance et la cellularisation de la matrice.

Le fucoïdane de petit poids moléculaire (LMWF) possède un potentiel anti-thrombotique artériel chez les animaux plus important que l'héparine de bas poids moléculaire (LMWH), en inhibant la croissance du thrombus artériel et avec un effet hémorragique plus faible que LMWH [**Millet, 1999; Colliec-Jouault, 2003**].

Nous avons précédemment démontré le potentiel thérapeutique de LMWF dans la diminution de la formation de complexes cellulaires de la protéase nexine 1 (PN-1) et de la thrombine / PN-1 et dans l'augmentation de l'activité antithrombine de l'AP-1 [Richard, 2006]. Nos travaux ont également mis en évidence qu'un fucoïdane de moyen poids moléculaire (MMWF) était plus intéressant que LMWF lorsqu'il est associé à une matrice biodégradable pour retenir le VEGF et induire une néovascularisation *in vivo* [Purnama, 2015]. Le fucoïdane, étant antithrombotique et potentiellement pro-angiogénique, peut constituer un agent naturel intéressant pour induire l'adhésion et la colonisation des cellules endothéliales pour la régénération des valves porcines acellularisées.

Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que MMWF pourrait avoir des activités anti-thrombotiques, pas d'impact sur la calcification et améliorer l'adhérence et la viabilité des cellules endothéliales lors de la régénération des bioprothèses valves pulmonaires porcines acellulaires.

Développement de PEMs à base de polysaccharides sulfatés pour l'ingénierie tissulaire: une nouvelle tendance pour la médecine régénérative

Les films de polyélectrolytes en multicouches (PEM) sont décrits dans la littérature scientifique comme des revêtements de « matière molle » fonctionnels pour une application de surface ou en capsule [Kerdjoudj, 2010; Costa et Mano, 2014; Tracey, 2015]. Les PEMs obtenus à partir de polysaccharides appartiennent à un sous-groupe de ces biomatériaux pouvant fournir des avantages plus spécifiques pour l'application en ingénierie tissulaire [Crouzier, 2010], en particulier dans le domaine de la libération contrôlée de molécules bioactives [Costa et Mano, 2014; Hsu, 2014] et pour développer des interactions avec des protéines matricielles [Thierry, 2003] et l'attachement des cellules [Almodóvar, 2013; Saha, 2013]. L'acide hyaluronique est le polysaccharide le plus couramment utilisé comme un polyanion dans la construction de PEMs à base de polysaccharides.

D'autres polysaccharides ont été également utilisés pour former des PEMs tels que l'alginate [**Correia, 2013; Cuomo, 2012**], l'héparine [**Lundin, 2011; Ye, 2013**], le carboxyméthylcellulose [**Guyomard, 2005**], le dextrane sulfaté [**Serizawa 2002**] et le fucoïdane [**Tracey, 2015; Xiaofeng, 2013**].

Ces films de polymères sont capables de moduler les propriétés et la structure de la multicouche. Selon une paire de polyanion-polycation donnée, les paramètres biochimiques peuvent varier tels que l'épaisseur, la teneur en eau et la stabilité conditionnés par le procédé utilisé pour leur formation (concentration en sel, la quantité et l'identité des ions et le pH) [**Shen, 2011; Quinn, 2012; Zhou, 2008**]. Les fucoïdanes sont définis en tant que polyélectrolytes forts avec un pKa mesuré situé entre 1,0 et 2,5 [**Sheng, 2004**] et à un pH de 6, la molécule est susceptible d'être complètement chargée.

Les fucoïdanes ont une structure chimique hétérogène en fonction de leurs origines et de leurs méthodes d'extraction et de purification [**Berteau et Mulloy, 2003; Silva, 2012**] qui peuvent modifier leurs propriétés une fois assemblés dans le PEM. Cependant, la variation de la composition des fucoïdanes n'affecte pas leur capacité à former des PEMs avec une structure en alternance de polycation et de polyanion [**Tracey, 2015**]. Par ailleurs, le type de fucoïdane et sa composition sont des paramètres importants qui peuvent faire varier les propriétés du PEM en fonction du type d'application. Les fucoïdanes ayant une forte teneur en groupements acétyle vont produire des couches de PEM plus minces, plus denses et plus lisses par rapport à des fucoïdanes plus homogènes. Il a par ailleurs été démontré que la présence de ces groupements acétyle peut augmenter le nombre d'interactions avec des molécules polycationiques en ajoutant des liaisons hydrogènes intramoléculaires comme illustré par un PEM de fucoïdane/chitosane [**Tracey, 2015**]. La taille et le taux de sulfatation du fucoïdane entrent également en jeu pour définir les caractéristiques chimiques des PEMs.

Dans notre travail, nous avons choisi l'utilisation d'une fraction de fucoïdane de moyen poids moléculaire (MMWF) extraite de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* avec une teneur élevée en sulfate (29%), et en fucose (36%) et contenant une faible dose d'acide uronique (14%), comme il a été décrit dans notre précédente étude [**Marinval, 2016**].

Nous avons pensé que ces caractéristiques chimiques permettraient d'optimiser la quantité de sites d'interaction présentés par la population moléculaire moyenne retrouvée dans cette fraction de fucoïdane, essentielle pour générer des interactions électrostatiques multiples entre les fibres de la matrice et le VEGF dans la constitution du PEM.

Taux de calcification des valves recouvertes du PEM

Des expériences sur l'influence des polysaccharides sulfatés dans le processus de calcification des valves cardiaques dans l'ingénierie tissulaire sont peu explorées étant donné l'approche récente de ces études. Récemment, Yang *et al.* ont effectué des études sur le potentiel de calcification *in vivo* de supports de valves pulmonaires porcines acellularisées et modifiées (fixation au glutaraldéhyde) et recouvertes d'héparine (Sigma), dans un modèle d'explants intramusculaire introduits chez le lapin [Yang, 2015]. Les auteurs ont observé une légère diminution de la calcification et en ont conclu que cet effet a été induit par les propriétés de l'héparine.

Propriétés antithrombotiques et anticoagulantes des supports de valves recouverts du PEM

Nous avons évalué les effets du MMWF sur la thrombogénicité et la coagulation dans deux modèles, sur des valves *ex vivo* recouvertes du film de MMWF/VEGF et cultivées en flux dans un bioréacteur [Wilczek, 2012 ; 2015] et sous forme soluble *in vitro* dans du plasma riche en plaquette (PRP) et dans un plasma exempt de plaquettes (PFP). Les propriétés antithrombotiques de fucoïdane étaient attendues, car largement étudiées [Mauray, 1998; Cumashi, 2007; Thorlacius, 2000], et nous avons confirmé ces effets dans des essais *in vitro* par l'inhibition de la génération de thrombine (Calibrated automated thrombinogram) en PRP et en PFP, et par l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (agrégométrie) en PRP (données supplémentaires).

Nos résultats attestent que le PEM à base fucoïdane appliqué sur les supports de valves acellulaires, restaure le potentiel antithrombotique basal.

Ces données étant vérifiées par une forte diminution de l'activation et de l'adhésion des plaquettes à la paroi interne des valves recouvertes, de façon comparable à la valve native. L'utilisation de MMWF pour l'ingénierie tissulaire de valves acellulaires peut être un outil performant pour générer des bioprothèses non-thrombogéniques et compatible pour une application clinique.

Le PEM de fucoïdane/VEGF modifie les propriétés adhésives des cellules endothéliales humaines permettant leur « homing » et leur prolifération.

L'utilisation de l'ingénierie tissulaire pour la modification et la régénération de valves cardiaques acellularisées a déjà montré des résultats probants lors de transplantations. La xélogreffe de valves pulmonaires porcines acellulaires a été installée dans le cœur de moutons suivis pendant 6 mois par Harpa *et al.* Ici, les auteurs ont montré les difficultés de l'utilisation de cellules souches autologues adipeuses pour améliorer la régénération de la bioprothèse. Cependant, ils ont démontré le potentiel prometteur de supports de valve cardiaque acellulaire qu'ils considèrent comme fiables, stables, non immunogènes, non thrombogènes et non calcifiants avec d'excellentes capacités hémodynamiques [Harpa, 2015]. La méthode d'acellularisation compte dans les propriétés biomécaniques des supports de valve et nous avons choisi dans notre étude, d'utiliser la méthode enzymatique en conformité avec les précédentes études qui ont montré une meilleure élimination des cellules natives de la valve pulmonaire porcine [Wilczek, 2010].

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que l'application du PEM MMWF/VEGF sur les valves acellulaires a augmenté l'adhérence, la viabilité et le potentiel prolifératif des HUVECs. Le support de valve recouvert de PEM de MMWF/VEGF demeure une matrice poreuse capable de permettre la migration et la prolifération cellulaire pour générer une matrice recellularisée. Dans notre approche, nous avons choisi d'utiliser les HUVECs pour démontrer que ce modèle cellulaire pouvait être utilisé comme preuve de concept pour recoloniser les bioprothèses de valves acellulaires et former une couche capable de protéger contre l'activation plaquettaire.

Dans une étude complémentaire, ces supports de valves cardiaques pourraient être utilisés pour des expériences de transplantation dans un modèle animal afin de vérifier le niveau de recrutement des cellules progénitrices dans le but d'améliorer le processus de régénération. Les PEMs de fucoïdane/VEGF constituent un support poreux qui peut être conçu de façon à permettre la migration des cellules à travers l'espace libre situé entre le PEM et les fibres de la matrice et induire leur prolifération pour rétablir un support entièrement recellularisé. Cependant, nous pensons que d'autres explorations devraient être réalisées pour évaluer la capacité de cellules souches humaines ou cellules progénitrices (mésenchymateuses, endocardioocyte ou progéniteurs endothéliaux) des supports de valves, en fonction de leurs différenciation et de prolifération [Ye, 2013; Weymann, 2013]. Cette étude pourrait être réalisée en parallèle de la transplantation des prothèses de valves cardiaques conçue pour les modèles animaux (porcine, bovine ou moutons) pour mesurer plus en détails les propriétés régénératives de la bioprothèse et évaluer son potentiel pour l'application clinique.

Il serait également intéressant d'améliorer la recellularisation du support de valve en culture dans un état dynamique, que d'autres études ont pu réaliser dans différentes conditions [Lichtenberg 2006], avec l'utilisation du système de bioréacteur qui a démontré et validé notre procédure d'ensemencement en rotation. Lichtenberg *et al.* ont produit des valves ovines cardiaques acellulaires faiblement modifiées par l'utilisation d'une méthode de détergent et ont observé la repopulation par de cellules endothéliales autologues agencées en monocouche après 7 jours de culture dans des conditions dynamiques sous un flux pulsatile ayant un débit allant jusqu'à 2 litres/min.

Modulation de la matrice acellulaire des valves recouvertes du PEM et les effets potentiels sur les propriétés mécaniques et régénératrices

Nous avons mesuré les propriétés élastiques des valves recouvertes de MMWF/VEGF par des mesures réalisées sous contraintes mécaniques.

Nos résultats ont montré que les résistances biomécaniques des valves recouvertes du PEM n'ont pas été modifiées comparativement aux valves non recouvertes dans notre série d'expériences. Cela suggère que l'application du PEM n'a pas induit de changement majeur dans l'organisation matricielle et les propriétés biomécaniques des valves acellularisées.

En perspective, nous proposons de mesurer le remodelage de la matrice après la culture à long terme de cellules à potentiel régénératif, en parallèle avec des tests de la résistance biomécanique des supports de valves couverts du PEM fucoïdane/VEGF et recellularisés.

Conclusions

En résumé, les résultats de cette étude ont démontré que le film de polyélectrolytes en multicouche (PEM) constitué de l'association du fucoïdane et de VEGF peut être utilisé comme une preuve de concept pour régénérer les prothèses de valves cardiaques acellulaires. L'application du PEM sur les valves acellularisées a montré déployer un effet protecteur du film contre la thrombose *in vitro* (condition dynamique en bioréacteur), n'a pas eu d'incidence sur le processus de calcification *in vitro* (condition statique), et a également permis l'augmentation de l'adhérence, la viabilité et de la prolifération de cellules endothéliales humainesensemencées sur les supports de valves en condition statique. Les cellules endothéliales s'étalent à la surface des valves recouvertes et conservent leur phénotype endothéliale notamment mis en évidence par la sécrétion de du facteur de croissance PDGF. D'autre part, nous avons observé le même effet avec une augmentation des propriétés adhésives et de la viabilité des cellules endothéliales sur les supports de valves acellulaires cultivées dans des bioréacteurs en condition dynamique. Ces résultats prometteurs mettent en évidence les capacités régénératives *ex vivo* accrues de bioprothèses de valves cardiaques acellularisées d'origine porcine recouvertes de PEM de fucoïdane/VEGF, ouvrant la voie à d'autres études fonctionnelles plus poussées.

Perspectives

Les perspectives de cette étude vont dans le sens de la poursuite de travaux sur les propriétés régénératives des bio-prothèses de valves cardiaques recouvertes du film de fucoïdane/VEGF. En perspective, il est projeté de réaliser des cultures dynamiques en flux des prothèses recellularisées dans un bioréacteur. Des mesures du potentiel régénératif en faisant varier les contraintes dynamiques comme le shear stress sont envisagées. L'étude du remodelage matriciel cellulaire à long terme par la mesure de l'impact de la prolifération des cellulesensemencées sur la matrice tissulaire et l'analyse de leur morphologie et de leur sécrétome est également envisagée.

Enfin, ces données seront confrontées à une étude fonctionnelle des valves par l'implantation des bio-prothèses dans un modèle animal qui pourrait être le mouton ou le porc où le potentiel régénératif et fonctionnel serait évalué.

Partie 3 : Conclusion générale, bibliographie et travaux annexes

Conclusion et perspectives générales

Les études menées dans cette thèse ont mis en évidence plusieurs propriétés des fucoïdanes rassemblées dans la conclusion générale suivante.

Il a été démontré en premier lieu que le LMWF utilisé à 10 µg/mL en suspension permet d'induire des processus pro-angiogéniques *in vitro*, de façon plus importante que le MMWF. De plus, les GAGs endogènes des cellules endothéliales ont montré avoir une importance dans le potentiel de ces effets pro-angiogéniques induits par le LMWF.

Le travail entrepris dans cette thèse sur l'étude des activités pro-angiogéniques des fucoïdanes bruts et fractionnés, mettent en lumière la nécessité de corréler des études structurales des fucoïdanes employés pour optimiser les effets thérapeutiques. La diversité des fucoïdanes et leur facilité d'accès en font des outils malléables pouvant être utilisés pour développer des biothérapies que ce soit dans le domaine vasculaire ou pour d'autres applications en médecine régénérative. Une excellente connaissance des propriétés et des caractéristiques physiques et chimiques de ces polysaccharides sulfatés ne pourra qu'être indispensable à toute recherche d'effets biologique spécifique.

En deuxième lieu, l'étude de l'application en surface d'un film de PEM basé sur une association de fucoïdane/VEGF, a montré qu'il peut être un outil prometteur pour développer des bio-prothèses de valves cardiaques. Le film a par ailleurs permis de conserver des propriétés anti-thrombotiques et une absence de calcification des valves biologiques porcines acellularisées par digestion enzymatique. L'emploi du film fucoïdane/VEGF sur les valves acellulaires a également permis d'améliorer l'adhérence et la viabilité de cellules endothéliales humainesensemencées et cultivées à leur surface en condition statique et dynamique.

Les études focalisées sur l'utilisation de polysaccharides sulfatés comme support de biomatériaux sont en progrès. Les recherches actuelles sont nombreuses et les applications multiples, comme le développement de bioprothèses de valves cardiaques.

Le fucoïdane est un excellent candidat de composition anionique pour la formulation et l'application de film de polyélectrolyte couplé à un facteur de croissance ou un principe actif. Il permet la rétention et la délivrance progressive de molécules à activité biologiques, mais confère également, comme illustré dans cette thèse, des propriétés antithrombotiques nécessaires à une application vasculaire, et des propriétés adhésives qui augmentent l'adhérence des cellules à un tissu modifié comme les valves cardiaques acellularisées, et *de facto* favorisent les processus de régénération tissulaire.

En conclusion générale, la connaissance des fucoïdanes par l'emploi d'une méthodologie de caractérisation au niveau de leur structure, composition, concentration, affinités aux molécules bioactives (CK/FC) et par l'étude de leurs mécanismes d'action, est nécessaire pour la recherche d'effets biologiques spécifiques pour une application thérapeutique.

Bibliographies

Ale, M. T.; Meyer, A. S. Fucoidans from brown seaweeds: an update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *RSC Advances*. **2013**, 3(22): 8131.

Ale, M. T.; Mikkelsen, J.D.; Meyer, A. S. Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Marine Drugs*. **2011**, 9(10): 2106–2130.

Alexopoulou, A. N.; Multhaupt, H. A.; Couchman, J. R. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, 39, 505–528.

Almodovar, J.; Mower, J.; Banerjee, A.; Sarkar, A. K.; Ehrhart, N. P. and Kipper, M. J. Chitosan-heparin polyelectrolyte multilayers on cortisol bone: periosteum-mimetic, cytophilic, anticacterial coatings. *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, 110, 609–618.

Aloisi, M., Schiaffino, S. Growth of elementary blood vessels in diffusion chambers: electron microscopy of capillary morphogenesis. *Virchows Arch B Cell Pathol.* **1971**, 8: 328–341.

Alsoufi, B.; Manlhiot, C.; McCrindle B.; Canver C.; Sallehuddin, A.; Al-Oufi, S.; Joufan, M.; Al-Halees, Z. Aortic and mitral valve replacement in children: is there any role for biologic and bioprosthetic substitutes?. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. **2009**, 36, 84-90.

Aplin, A. E.; Short, S. M.; Juliano, R. L. Anchorage-dependent regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade by growth factors is supported by a variety of integrin alpha chains. *J Biol Chem.* **1999**, 274: 31223–31228.

Assoian, R. K. Anchorage-dependent cell cycle progression. *J Cell Biol.* **1997**, 136: 1–4.

Assoian, R. K. and Schwartz, M. A. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev.* **2001**, *11*: 48–53.

Ausprunk, D. H.; Folkman, J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res.* **1977**, *14*: 53–65.

Bach, A. D.; Beier, J. P.; Stern-Staeter, J.; Horch, R. E., Skeletal muscle tissue engineering. *J. Cell. Mol. Med.* **2004**, *8*, 413-422.

Bachelet, L.; Bertholon, I.; Lavigne, D.; Vassy, R.; Jandrot-Perrus, M.; Chaubet, F.; Letourneur, D. Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2009**, *1790*, 141–146.

Balaji, S., King, A., Crombleholme, T.M., and Keswani, S.G. (). The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Adv. Wound Care.* **2013**, *2*, 283–295.

Barbosa, I.; Morin, C.; Garcia, S.; Duchesnay, A.; Oudghir, M.; Jenniskens, G.; Miao, H.; Guimond, S.; Carpentier, G.; Cebrian, J.; et al. A synthetic glycosaminoglycan mimetic (RGTA) modifies natural glycosaminoglycan species during myogenesis. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 253–264.

Barrilleaux, B.; Phinney, D.; Prockop, D.; O'Connor, K. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 3007–3019.

Barritault D. and Caruelle J. P. Regenerating agents (RGTA): a new therapeutic approach. *Ann Pharm Fr.* **2006**. *64*(2): 135-44.

Bass, M. D.; Williamson, R. C.; Nunan, R. D.; Humphries, J. D.; Byron, A.; Morgan, M. R.; Martin, P.; Humphries, M. J. A Syndecan-4 Hair Trigger Initiates Wound Healing through Caveolin- and RhoG-Regulated Integrin Endocytosis. *Dev. Cell.* **2011**, *21*, 681–693.

Beattie, D. A.; Beaussart, A.; Mierczynska-Vasilev, A.; Harmer, S. L.; Thierry, B.; Puskar, L. and Tobin, M., *Langmuir*. **2012**, 28, 1683–1688.

Belting M. Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *Trends Biochem Sci*. **2003**, 28:145–151

Berteau, O.; Mulloy, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*. **2003**, 29R-40R.

Bilan, M. I.; Grachev, A. A.; Shashkov, A. S.; Kelly, M.; Sanderson, C. J.; Nifantiev, N. E.; et al. Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*. *Carbohydrate Research*. **2010**, 345(14): 2038–2047.

Bilan, M. I.; Grachev, A. A.; Ustuzhanina, N. E.; Shashkov, A. S.; Nifantiev, N. E.; Usov, A. I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens*. *Carbohydr. Res*. **2002**, 337, 719–730.

Bilan, M. I.; Usov, A. I. Structural Analysis of Fucoidans. *Natural Product Communications*. **2008**, 3(10):1639–1648.

Blanquaert F, Barritault D, C. Effects of heparin-like polymers associated with growth factors on osteoblast proliferation and phenotypic expression. *J. Biomed. Mater Res* **1999**, 44, 63–72.

Bodine-Fowler, S., Skeletal muscle regeneration after injury: an overview. *J Voice*, **1994**, 8(1):p. 53-62.

Boisson-Vidal, C.; Collic-jouault, S.; Fischer, A. M. Therapeutic Potential of Fucoidans in Ischemic Diseases. *Mar. Med. Glycomics*. **2013**.

Boisson-Vidal, C.; Zemani, F.; Calliguri, G.; Galy-Fauroux, I.; Collic-Jouault, S.; Helley, D.; Fischer, A.-M.; Caligiuri, G.; Galy-Fauroux, I.; Collic-Jouault, S.; Helley, D.; Fischer, A.-M. Neoangiogenesis induced by progenitor endothelial cells: effect of fucoidan from marine algae. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem*. **2007**, 5, 67–77.

Bongaerts, J. H. H.; Cooper-White, J. J. and Stokes J. R., *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 1287–1294.

Borden, M.; Attawia, M.; Khan, Y.; Laurencin, C. T. Tissue engineered microsphere-based matrices for bone repair: design and evaluation. *Biomaterials*. **2002**, *23*:551-9.

Bouvard, C.; Galy-Fauroux, I.; Grelac, F.; Carpentier, W.; Lokajczyk, A.; Gandrille, S.; Collic-Jouault, S.; Fischer, A.-M.; Helley, D. Low-Molecular-Weight Fucoidan Induces Endothelial Cell Migration via the PI3K/AKT Pathway and Modulates the Transcription of Genes Involved in Angiogenesis. *Mar. Drugs*. **2015**, *13*, 7446–7462.

Brennan, T. V.; Lin, L.; Brandstadter, J. D.; Rendell, V. R.; Dredge, K.; Huang, X.; Yang, Y. Heparan sulfate mimetic PG545-mediated antilymphoma effects require TLR9-dependent NK cell activation. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 207–219.

Brown, A.; Robinson, C. J.; Gallagher, J. T.; Blundell, T. L. Cooperative heparin-mediated oligomerization of fibroblast growth factor-1 (FGF1) precedes recruitment of FGFR2 to ternary complexes. *Biophys. J.* **2013**, *104*, 1720–1730.2.

Carpentier, A. From valvular xenograft to valvular bioprosthesis (1965–1977). *Med Instrum.* **1977**, *11*: 98 –101.

Castellot, J.J.; Wong, K.; Herman, B.; Hoover, R.L.; Albertini, D.F.; Wright, T.C.; Caleb, B.L.; Karnovsky, M.J. Binding and internalization of heparin by vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* **1985**, *124*, 13–20.

Casu, B.; Naggi, A.; Torri, G. Heparin-derived heparan sulfate mimics to modulate heparan sulfate-protein interaction in inflammation and cancer. *Matrix Biol.* **2010**, *29*, 442–452.

Chan, K. L. Is aortic stenosis a preventable disease? *J. Am. Coll. Cardiol.* **2003**, *42*: 593–599.

Chappell, D.; Dörfler, N.; Jacob, M.; Rehm, M.; Welsch, U.; Conzen, P.; Becker, B. F. Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion. *Shock*. **2010**, *34*, 133–139.

Chappell, D.; Hofmann-Kiefer, K.; Jacob, M.; Rehm, M.; Briegel, J.; Welsch, U.; Conzen, P.; Becker, B. F. TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol.* **2009**, *104*: 78-89.

Chappell, D.; Jacob, M.; Hofmann-Kiefer, K.; Bruegger, D.; Rehm, M.; Conzen, P.; Becker, B. F. Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology.* **2007**, *107*: 776-784,

Chaubet, F.; Chevolut, L.; Jozefonvicz, J.; Durand, P.; Boisson-Vidal, C. Relationships between chemical characteristics and anticoagulant activity of low molecular weight fucans from marine algae. *Bioactive carbohydrate polymers. Dordrecht; Boston: Kluwer Academic Publishers.* **2000**, 313–358.

Chen, M. C.; Hsu, W. L.; Hwang, P. A.; Chou, T. C. Low Molecular Weight Fucoidan Inhibits Tumor Angiogenesis through Downregulation of HIF-1/VEGF Signaling under Hypoxia. *Mar. Drugs.* **2015**, *13*, 4436–51.

Chevalier, F.; Arnaud, D.; Henault, E.; Guillevic, O.; Sineriz, F.; Ponsen, A. C.; Papy-Garcia, D.; Barritault, D.; Letourneur, D.; Uzan, G.; Meddahi-Pellé, A.; Hlawaty, H.; Albanese, P. A fine structural modification of glycosaminoglycans is correlated with the progression of muscle regeneration after ischaemia: Towards a matrix-based therapy? *Eur. Cells Mater.* **2015**, *30*, 51–68.2.

Chevolut, L.; Foucault, A.; Chaubet, F.; Kervarec, N.; Siquin, C.; Fisher, A. M.; Boisson-Vidal, C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: Relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr. Res.* **1999**, *319*, 154–165.

Chevolut, L.; Mulloy, B.; Ratiskol, J.; Foucault, A.; Collic-Jouault, S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydr. Res.* **2001**, *330*, 529–535.

Chizhov, A. O.; Dell, A.; Morris, H. R.; Haslam, S. M.; McDowell, R. A.; Shashkov, A. S.; et al. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydrate Research.* **1999**, *320*, (1-2) :108–119.

Cho, Y.; Cho, E.J.; Lee, J.H.; Yu, S.J.; Kim, Y.J.; Kim, C.Y.; Yoon, J.H. Fucoidan-induced ID-1 suppression inhibits the in vitro and in vivo invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 607–616.

Chollet, L.; Saboural, P.; Chauvierre, C.; Villemin, J. N.; Letourneur, D.; Chaubet, F. Fucoidans in Nanomedicine : Fucoidans in Nanomedicine. *Marine drugs.* **2016**.

Chothia, C. and Jones E. Y. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem.* **1997**. *66*: p. 823-62.

Colliec-Jouault, S.; Millet, J.; Helley, D.; Siquin, C. and Fischer, A.M. Effect of low molecular weight fucoidan on experimental arterial thrombosis in the rabbit and rat. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* **2003**, *1(5)*:1114-1115.

Cooper, R.; Dragar, C.; Elliot, K.; Fitton, J. H.; Godwin, J. and Thompson, K., *BMC Complementary Altern. Med.*, **2002**, *2*, 11.

Correia, C. R.; Sher, P.; Reis, R.L. and Mano, J.F. Liquified chitosan-alginate multilayer capsules incorporating poly(L-lactic acid) microparticles as cell carrier. *Soft Matter.* **2013**, *9*, 2125–2130.

Correlo, V. M.; Boesel, L. F.; Pinho, E.; Costa-Pinto, A. R.; Alves, da Silva M. L.; Bhattacharya, M.; *et al.* Melt-based compression-molded scaffolds from chitosan-polyester blends and composites: Morphology and mechanical properties. *J Biomed Mater Res A.* **2009**; *91*:489-504.

Costa, R. R. and Mano, J. F. Polyelectrolyte multilayered assemblies in biomedical technologies. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3453– 3479.

Couchman, J. R. Transmembrane Signaling Proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 89–114.

Crouzier, T.; Boudou, T.; and Picart, C. Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2010**, *15*, 417–426.

Cumashi, A.; Ushakova, N.; Preobrazhenskaya, M.; D’Incecco, A.; Piccoli, A.; Totani, L.; Tinari, N.; Morozevich, G.E.; Berman, A.E.; Bilan, M.I.; *et al.* A comparative study

of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*.**2007**, *17*, 541–552.

Cunha, L.; Grenha, A. Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. *Mar. Drugs*.**2016**, *14*, 42.

Cuomo, F.; Lopez, F.; Ceglie, A.; Maiuro, L.; Miguel, M.G. and Lindman, B. *Soft Matter*, **2012**, *8*, 4415–4420.

Da Costa, D. S.; Pires, R. A.; Frias, A. M.; Reis, R. L.; Pashkuleva, I. Sulfonic groups induce formation of filopodia in mesenchymal stem cells. *J Mater Chem*. **2012**, *22* : 7172-8.

Davis, G. E. and Senger, D. R. *Endothelial Extracellular Matrix*. **2005**, *97*, 1093–1107.

Davis, G. E.; Camarillo, C.W. An alpha 2 beta 1 integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three- dimensional collagen matrix. *Exp Cell Res*. **1996**, *224*: 39–51.

Davis, G.E.; Bayless, K.J. An integrin and Rho GTPase-dependent pinocytic vacuole mechanism controls capillary lumen formation in collagen and fibrin matrices. *Microcirculation*. **2003**, *10*: 27–44.

Davis, G.E.; Bayless, K.J.; Mavila, A. Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices. *Anat Rec*. **2002**, *268*: 252–275.

Dejana, E.; Languino, L. R.; Polentarutti, N.; Balconi, G.; Ryckewaert, J. J.; Larrieu, M. J.; Donati, M. B.; Mantovani, A.; Marguerie, G. Interaction between fibrinogen and cultured endothelial cells. Induction of migration and specific binding. *J Clin Invest*. **1985**, *75*: 11–18.

Desgranges P, Barbaud C, Caruelle JP, Barritault D, Gautron J. A substituted dextran enhances muscle fiber survival and regeneration in ischemic and denervated rat EDL muscle. *FASEB J*. **1999**, *13*(6):761-6.

Desgranges P., Caruelle J.P., Carpentier G., Barritault D., Tardieu M. Beneficial use of fibroblast growth factor 2 and RGTA, a new family of heparan mimics, for endothelialization of PET prostheses. *J Biomed Mater Res.* **2001**, 58(1):1-9.

Desgranges, P.; Barritault, D.; Caruelle, J.P.; Tardieu, M. Transmural endothelialization of vascular prostheses is regulated in vitro by Fibroblast Growth Factor 2 and heparan-like molecule. *Int J Artif Organs.* **1997**, 20(10):589-98.

Deux, J. F.; Meddahi-Pellé, A.; Le Blanche, A. F.; Feldman, L. J.; Collic-Jouault, S.; Brée, F.; Boudghène, F.; Michel, J. B.; Letourneur, D. Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia in rabbit iliac artery in-stent restenosis model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, 22, 1604–1609.

Drake, C. J.; Brandt, S. J.; Trusk, T. C.; Little, C. D. TAL1SCL is expressed in endothelial progenitor cells/angioblasts and defines a dorsal-to-ventral gradient of vasculogenesis. *Dev Biol.* **1997**, 192: 17–30.

Drake, C. J.; Little, C. D. VEGF and vascular fusion: implications for normal and pathological vessels. *J Histochem Cytochem.* **1999**, 47: 1351–1355.

Du, D.; McKean, S.; Kelman, J. A.; Laschinger, J.; Johnson, C.; Warnock, R.; Worrall, C. M.; Sedrakyan, A.; Encinosa, W.; MaCurdy, T. E.; Izurieta, *et al.* J. Early Mortality After Aortic Valve Replacement With Mechanical Prosthetic vs Bioprosthetic Valves Among Medicare Beneficiaries. *JAMA Intern. Med.* **2014**, 174, 1788.

Duarte, A. R. C.; Mano, J. F.; Reis, R. L. Perspectives on: Supercritical Fluid Technology for 3D Tissue Engineering Scaffold Applications. *J Bioact Compat Polym.* **2009**, 24: 385-400.

Duarte, A. R. C.; Mano, J. F.; Reis, R. L. Supercritical fluids in biomedical and tissue engineering applications: a review. *Int Mater Rev.* **2009**, 54: 214-22.

Durand, E.; Helley, D.; Al Haj Zen, A.; Dujols, C.; Bruneval, P.; Collic-Jouault, S.; Fischer, A. M.; Lafont, A. Effect of low molecular weight fucoidan and low molecular weight heparin in a rabbit model of arterial thrombosis. *J. Vasc. Res.* **2008**, 45, 529–537.

Elfenbein, A. and Simons, M. Syndecan-4 signaling at a glance. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 3799–804.

Elfenbein, A.; Lanahan, A.; Zhou, T. X.; Yamasaki, A.; Tkachenko, E.; Matsuda, M.; Simons, M. Syndecan 4 regulates FGFR1 signaling in endothelial cells by directing macropinocytosis. *Sci. Signal.* **2012**, *5*, (223):ra36.

Fan, T. C.; Chang, H. T.; Chen, I. W.; Wang, H. Y.; Chang, M. D. A heparan sulfate-facilitated and raft-dependent macropinocytosis of eosinophil cationic protein. *Traffic.* **2007**, *8*: 1778–1795.

Fang, F.; Orend, G.; Watanabe, N.; Hunter, T.; Ruoslahti, E. Dependence of cyclin E-CDK2 kinase activity on cell anchorage. *Science.* **1996**, *271*: 499–502.

Favretto, M. E.; Wallbrecher, R.; Schmidt, S.; Van De Putte, R.; Brock, R. Glycosaminoglycans in the cellular uptake of drug delivery vectors - Bystanders or active players? *J. Control. Release.* **2014**, *180*, 81–90.

Fermas, S.; Gonnet, F.; Sutton, A.; Charnaux, N.; Mulloy, B.; Du, Y.; Baleux, F.; Daniel, R. Sulfated oligosaccharides (heparin and fucoidan) binding and dimerization of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL 12) are coupled as evidenced by affinity CE-MS analysis. *Glycobiology.* **2008**, *18*, 1054–1064.

Fitton, J. H. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Mar. Drugs.* **2011**, *9*, 1731–1760.

Fondard, O.; Detaint, D.; Lung, B.; Choqueux, C.; Adle-Biassette, H.; Jarraya, M.; Hvass, U.; Couetil, J. P.; Henin, D.; Michel, J. B.; Vahanian, A.; Jacob, M. P. Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: The role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur. Heart J.* **2005**, *26*, 1333–1341.

Frantz, C.; Stewart, K. M.; Weaver, V. M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 4195–4200.

Friand, V.; Haddad, O.; Papy-Garcia, D.; Hlawaty, H.; Vassy, R.; Hamma-Kourbali, Y.; Perret, G.-Y.; Courty, J.; Baleux, F.; Oudar, O.; et al. Glycosaminoglycan mimetics inhibit SDF-1/CXCL12-mediated migration and invasion of human hepatoma cells. *Glycobiology.* **2009**, *19*, 1511–1524.

Fuki, I. V., Meyer, M. E. and Williams, K. J. Transmembrane and cytoplasmic domains of syndecan mediate a multi-step endocytic pathway involving detergent-insoluble membrane rafts. *Biochem. J.* **2000**, 351, 607-612.

Gąsior, J.; Sacha, J.; Jeleń, P.; Zieliński, J.; Przybylski, J. Heart Rate and Respiratory Rate Influence on Heart Rate Variability Repeatability: Effects of the Correction for the Prevailing Heart Rate. *Frontiers in Physiology.* **2016**, 7, 356.

Giancotti, F. G.; Ruoslahti, E. Integrin signaling. *Science.* **1999**, 285: 1028–1032.

Gomes, M. E.; Holtorf, H. L.; Reis, R. L.; Mikos, A. G. Influence of the porosity of starch-based fiber mesh scaffolds on the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured in a flow perfusion bioreactor. *Tissue Eng.* **2006**; 12: 801-9.

Gomes, M. E.; Ribeiro, A.S.; Malafaya, P.B.; Reis, R. L.; Cunha, A. M. A new approach based on injection moulding to produce biodegradable starch-based polymeric scaffolds: morphology, mechanical and degradation behaviour. *Biomaterials.* **2001**; 22: 883-9.

Gonzalez-Lavin, L.; Ross, D. Homograft aortic valve replacement. A five-year experience at the National Heart Hospital, London. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **1970**, 60:1–12.

Goodger, S. J.; Robinson, C. J.; Murphy, K. J.; Gasiunas, N.; Harmer, N. J.; Blundell, T. L.; Pye, D. A.; Gallagher, J. T. Evidence that heparin saccharides promote FGF2 mitogenesis through two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 13001–13008.2.

Gurvan, M.; Tonon, T.; Scornet, D.; Cock, J. M.; Kloareg, B. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insight into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytol.* **2010**, 188, 82–97.

Guyomard, A.; Muller, G. and Glinel, K. Buildup of multilayers based on amphiphilic polyelectrolytes. *Macromolecules*, **2005**, 38, 5737–5742.

Haddad, O.; Guyot, E.; Marival, N.; Chevalier, F.; Maillard, L.; Gadi, L.; Laguillier-Morizot, C.; Oudar, O.; Sutton, A.; Charnaux, N.; Hlawaty, H. Heparanase and Syndecan-4 Are Involved in Low Molecular Weight Fucoidan-Induced Angiogenesis. *Mar. Drugs*. **2015**, *13*, 6588–6608.

Hamel, D. J.; Sielaff, I.; Proudfoot, a. E. I.; Handel, T. M. Chapter 4 Interactions of Chemokines with Glycosaminoglycans; *1st ed.; c2009, Elsevier Inc.* **2009**; Vol. 461.

Hammermeister, K.; Sethi, G.; Henderson, W.; Grover, F.; Oprian, C.; Rahimtoola, S. A comparison of outcomes in men 11 years after heart-valve replacement with a mechanical valve or bioprosthesis. Veterans Affairs Cooperative Study on Valvular Heart Disease. *N Engl J Med*. **1993**, *328*(18):1289-96.

Hammersen, F., et al., The ultrastructure of microvessels and their contents following ischemia and reperfusion. *Prog Appl Microcirc.*, **1989**, *13*: p. 1-26.

Han, Y. P.; Tuan, T. L.; Wu, H.; Hughes, M.; Garner, W. L. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 131–139.3.

Handel, T. M.; Johnson, Z.; Crown, S. E.; Lau, E. K. and Proudfoot, A. E. Regulation of protein function by glycosaminoglycans—as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 385–410.

Harpa, M.; Movileanu, I.; Sierad, L.; Cotoi, H.; Suci, H.; Sircuta, C.; Preda, T.; Nistor, D.; Branzaniuc, K.; Deac, R.; *et al.* Pulmonary heart valve replacement using stabilized acellular xenogeneic scaffolds; effects of seeding with autologous stem cells. *Rev Rom Med Lab.* **2016**, *23*, 415–429

He, W.; Yong, T.; Teo, W. E.; Ma, Z. W.; Ramakrishna, S., Fabrication and endothelialization of collagen-blended biodegradable polymer nanofibers: Potential vascular graft for blood vessel tissue engineering. *Tissue Eng.* **2005**, *11*, 1574-1588.

Hegen, A.; Blois, A.; Tiron, C.; Hellesøy, M.; Micklem, D.; Nör, J.; Akslen, L.; Lorens, J. Efficient in vivo Vascularization of Tissue Engineering Scaffolds. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2011**, *4*, 52–62.

Heissig, B.; Hattori, K.; Friedrich, M.; Rafii, S.; Werb, Z. Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases. *Curr Opin Hematol.* **2003**, *10*:136–141

Henaine, R.; Roubertie, F.; Vergnat, M.; Ninet, J. Valve replacement in children: A challenge for a whole life. *Archives of Cardiovascular Diseases.* **2012**, *105*, 517-528.10.

Henry, C. B.; Duling, B. R. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2000**, *279*: 2815-2823,.

Henry, T.D., Annex, B.H., McKendall, G.R., Azrin, M.A., Lopez, J.J., Giordano, F.J., Shah, P.K., Willerson, J.T., Benza, R.L., Berman, D.S., et al.. The VIVA Trial Vascular Endothelial Growth Factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation.* **2003**, *107*, 1359–1365.

Hertig, A. T. Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contrib Embryol.* **1935**, *25*, 39-81.

Heymann, D.; Ruiz-Velasco, C.; Chesneau, J.; Ratiskol, J.; Siquin, C.; Collic-Jouault, S. Anti-Metastatic Properties of a Marine Bacterial Exopolysaccharide-Based Derivative Designed to Mimic Glycosaminoglycans. *Molecules.* **2016**, *4*;21(3):309.

Hintze, V.; Miron, A.; Möller, S.; Schnabelrauch, M.; Heinemann, S.; Worch, H.; et al. Artificial extracellular matrices of collagen and sulphated hyaluronan enhance the differentiation of human mesenchymal stem cells in the presence of dexamethasone. *J Tissue Eng Regen Med.* **2012**, In press; PMID:22718572.

Hlawaty, H.; Suffee, N.; Sutton, A.; Oudar, O.; Haddad, O.; Ollivier, V.; Laguillier-morizot, C.; Gattegno, L.; Letourneur, D.; Charnaux, N. Low molecular weight fucoidan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2 expression. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 233–243.

Ho, T. T. M.; Bremmel, K. E.; Krakowska, M.; Striger, D. N.; Thierry, B.; Beattie, D. A. Tuning polyelectrolyte multilayer structure by exploiting natural variation in fucoidan chemistry. *Soft Matter.* **2015**, *11*, 2110–2124.

Holtkamp, A. D.; Kelly, S.; Ulber, R.; Lang, S. Fucoidans and fucoidanases-focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 1–11.

Hsu, B. B.; Hagerman, S. R.; Jamieson, K.; Veselinovic, J.; O'Neill, N.; Holler, E.; Ljubimova, J. Y. and Hammond, P. T. Multilayer films assembled from naturally-derived materials for controlled protein release. *Biomacromolecules.* **2014**, *15*, 2049–2057.

Hung, L.; Rahimtoola, S.; Prosthetic Heart Valves and Pregnancy. *Circulation.* **2003**, *107*, 1240 – 1246.

Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* **2000**; *21*:2529-43.

Hynes, R. O.; Naba, A. Overview of the Matrisome-An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2012**. *4*: a004903.

Ikeda, Y.; Charef, S.; Ouidja, M.O.; Barbier-Chassefière, V.; Sineriz, F.; Duchesnay, A.; Narasimprakash, H.; Martelly, I.; Kern, P.; Barritault, D.; et al. Synthesis and biological activities of a library of glycosaminoglycans mimetic oligosaccharides. *Biomaterials.* **2011**, *32*, 769–776.

Indest, T.; Laine, J.; Kleinschek, K. S. and Zemljic, L. F., *Colloids Surf. A.* **2010**, *360*, 210–219.

Iozzo, R. V.; Sanderson, R. D. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* **2011**, *15*, 1013–1031.

Iozzo, R.V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* **1998**, *67*: p. 609-52.

Ishida, Y.; Kimura, A.; Kuninaka, Y.; Inui, M.; Matsushima, K.; Mukaida, N.; Kondo, T. Pivotal role of the CCL5 / CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. **2012**, *122*, 711–721.

lung, B.; Baron, G.; Butchart, E. G.; Delahaye, F.; Gohlke-Barwolf, C.; Levang, O. W.; Tornos, P.; Vanoverschelde, J. L.; Vermeer, F.; Boersma, E.; Ravaud, P.; Vahanian, A. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J.* **2003**, *24*:1231–1243.

Jamieson, W. R.; Munro, A. I.; Miyagishima, R. T.; Grunkemeier, G. L.; Burr, L. H.; Lichtenstein, S. V.; Tyers, G. F. *Eur J Cardiothorac Surg.* **1998**, *13*(2) :151-9.

Kagan, H. M. and Li, W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J. Cell. Biochem.* **2003**, *88*, 660–672.

Keeley, E. C.; Moorman, J. R.; Liu, L.; Gimple, L. W.; Lipson, L. C.; Ragosta, M.; Taylor, A. M.; Lake, D. E.; Burdick, M. D.; Mehrad, B.; *et al.* Plasma Chemokine Levels Are Associated with the Presence and Extent of Angiographic Coronary Collaterals in Chronic Ischemic Heart Disease. *PLoS ONE.* **2011**, *6*, e21174.

Kentish J. C. Smooth muscle and the cardiovascular and lymphatic systems. Stranding S, ed. *Gray's Anatomy: The anatomical basis of clinical practice. 40th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier.* **2008**, 127-144.

Kerdjoudj, H.; Berthelemy, N.; Boulmedais, F.; Stoltz, J.-F.; Menu, P. and Voegel, J. C. *Soft Matter.* **2010**, *6*, 3722–3734.

Kim, B. S.; Park, J. Y.; Kang, H. J.; Kim, H. J.; Lee, J. Fucoidan/FGF-2 induces angiogenesis through JNK- and p38-mediated activation of AKT/MMP-2 signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *450*, 1333–1338.

Kim, Y. M.; Jang, J. W.; Lee, O. H.; Yeon, J.; Choi, E. Y.; Kim, K. W.; Lee, S. T.; Kwon, Y. G. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase 2. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 5410–5413.

Klemm, M.F.; Van Helden, D. F. and Luff; S. E. *J Comp Neurol.* **1993**, *334*, 159-67.

Knelson, E. H.; Nee, J. C.; Blobel, G. C. Heparan sulfate signaling in cancer. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 277–288.

Kylin, H. The biochemistry of seaweed. Hoppe Seylers. *Z Physiol Chem.* **1913**, 83: 171-97.

Lake, A. C.; Vassy, R.; Di Benedetto, M.; Lavigne, D.; Le Visage, C.; Perret, G. Y.; Letourneur, D. Low molecular weight fucoidan increases VEGF165-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF165 binding to VEGFR-2 and NRP1. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 37844–37852.

Lambaerts, K.; Wilcox-adelman, S. A; Zimmermann, P. The signalling mechanisms of syndecan heparan sulphate proteoglycans. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, 21, 662–669.

Langer, R. and Vacanti J. P. *Tissue. Eng Sci.* **1993**; 260: 920- 6.

Laurent, S.; Boutouryie, P.; Lacolley, P. Structural and genetic basis of arterial stiffness. *Hypertension.* **2005**. 45: 1050-1055.

Lee, H.; Chang, K. W.; Yang, H. Y.; Lin, P. W.; Chen, S. U.; Huang, Y. L. MT1-MMP regulates MMP-2 expression and angiogenesis-related functions in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, 437, 232–238.2.

Lee, K., Silva, E.A., and Mooney, D.J. (). Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J. R. Soc. Interface.* **2011**, 8, 153–170.

Levenberg, S.; Rouwkema, J.; Macdonald, M.; Garfein, E. S.; Kohane, D. S.; Darland, D. C.; Marini, R.; van Blitterswijk, C. A.; Mulligan, R. C.; D'Amore, P. A.; Langer, R., Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 879-884.

Lévy, B.; Silvestre, J. S. Angiogenèse et anti-angiogenèse - Angiogenèse post-ischémique: aspects expérimentaux, perspectives thérapeutiques. *Wolters Kluwer Health, Ed.; Lippincott. Servier.* **2009**, 34-47.

Li, B.; Lu, F.; Wei, X.; Zhao, R. Fucoidan : Structure and Bioactivity. *Molecules.* **2008**, 13(8) :1671–1695.

Li, L.; Wan, T.; Wan, M.; Liu, B.; Cheng, R.; Zhang, R. The effect of the size of fluorescent dextran on its endocytic pathway. *Cell Biol. Int.* **2015**, 39, 531–539.

Lichtenberg, A.; Tudorache, I.; Cebotari, S.; Ringes-Lichtenberg, S.; Sturz, G.; Hoeffler, K.; Hurscheler, C.; Brandes, G.; Hilfiker, A.; Haverich, A. In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions. *Biomaterials*. **2006**, *27*, 4221–4229.8.

Lindroos, M.; Kupari, M.; Heikkila, J.; Tilvis, R. Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample. *J Am Coll Cardiol*. **1993**, *21*, 1220–1225.

Lu, Y.T., P.G. Hellewell, and T.W. Evans, Ischemia-reperfusion lung injury: contribution of ischemia, neutrophils, and hydrostatic pressure. *Am J Physiol*, **1997**, *273*(1 Pt 1): p. L46-54.

Lundin, M.; Solaqa, F.; Thormann, E.; Macakova, L. and Blomberg, E. *Langmuir*, **2011**, *27*, 7537–7548.

Luyt, C.; Ho-tin-noe, B.; Collic-jouault, S.; E, A. M.; Jacob, M.; Osborne-pellegrin, M.; Guezennec, J.; Louedec, L.; Herv, E.; Letourneur, D.; Michel, J. Low-Molecular-Weight Fucoidan Promotes Therapeutic Revascularization in a Rat Model of Critical Hindlimb Ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *305*, 24–30.

Makkar, R. R.; Smith, R. R.; Cheng, K.; Malliaras, K.; Thomson, L. E. J.; Berman, D.; Czer, L. S. C.; Marbán, L.; Mendizabal, A.; Johnston, P. V.; *et al.* Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): A prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. **2012**, *379*, 895–904.

Malafaya, P. B.; Silva, G. A.; Reis, R. L. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliv Rev*. **2007**, *59*: 207e33.

Malafaya, P. P.; Pedro, A. J.; Peterbauer, A.; Gabriel, C.; Redl, H.; Reis, R. L. Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. **2005**, *16*: 1077-85.

Marastoni, S.; Ligresti, G.; Lorenzon, E.; Colombatti, A.; Mongiat, M. Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connect. Tissue Res*. **2008**, *49*, 203–206.

Marechal X, Favory R, Joulin O, Montaigne D, Hassoun S, Decoster B, Zerimech F, Nevriere R: Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Shock*. **2008**, 29: 572-576,.

Marinval, N.; Saboural, P.; Haddad, O.; Maire, M.; Bassand, K.; Geinguenaud, F.; Djaker, N.; Ben Akrou, K.; De La Chappelle M.L.; Robert, R.; Oudar, O.; Guyot, E.; Laguillier-Morizot, C.; Sutton, A.; Chauvierre, C.; Chaubet, F.; Charnaux, N. and Hlawaty, H. Identification of a pro-angiogenic potential of a low molecular weight highly sulfated fraction of fucoidan from *ascophyllum nodosom*. *Mar drugs*. **2016**, 10(10)185.

Martinez-Lemus, L. A. The dynamic structure of arterioles. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. **2012**, 110, 5–11.

Martino, M. M.; Tortelli, F.; Mochizuki, M.; Traub, S.; Ben-David, D.; Kuhn, G. A.; Müller, R.; Livne, E.; Eming, S. A.; and Hubbell, J. A. Engineering the Growth Factor Microenvironment with Fibronectin Domains to Promote Wound and Bone Tissue Healing. *Sci. Transl. Med*. **2011**, 3, 100ra89–ra100ra89.

Martins, A. M.; Santos, M. I.; Azevedo, H. S.; Malafaya, P. B.; Reis, R. L. Natural origin scaffolds with in situ pore forming capability for bone tissue engineering applications. *Acta Biomater*. **2008**, 4: 1637-45.

Martins, A.; Chung, S.; Pedro, A. J.; Sousa, R. A.; Marques, A. P.; Reis, R. L.; *et al*. Hierarchical starch-based fibrous scaffold for bone tissue engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med*. **2009**, 3: 37-42.

Matou, S.; Helley, D.; Chabut, D.; Bros, A.; Fischer, A. Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro. *Thromb. Res*. **2002**, 106, 213–221.

Mauray, S.; de Raucourt, E.; Chaubet, F.; Maïga-Revel, O.; Sternberg, C.; Fischer, A.M. Comparative anticoagulant activity and influence on thrombin generation of dextran derivatives and of a fucoidan fraction. *J. Biomater. Sci. Polym*. **1998**, 9, 373–387.

McNeely, W. H. Fucoïdan In: Whistler RL, Be Miller JM, eds. *Industrial Gums*. New York: Academic press. **1959**, 117-21.

Meddahi, A.; Benoit, J.; Ayoub, N.; Sézeur, A.; Barritault, D. Heparin-like polymers derived from dextran enhance colonic anastomosis resistance to leakage. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *31*, 293–297.

Meddahi-Pellé, A.; Alexakis, C.; Papy-garcia, D.; Caruelle, J.-P.; Barritault, D. Heparin-like polymer improved healing of gastric and colic ulceration. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *60*, 497–501.

Meddahi-Pellé, A.; Bataille, I.; Subra, P.; Letourneur, D. Biomatériaux vasculaires: Du génie biologique et médical au génie tissulaire. *Medecine/Sciences.* **2004**, *20*, 679–684.

Melina, G.; De Robertis, F.; Gaer, J. A.; Amrani, M.; Khaghani, A., Yacoub, M. H. Mid-term pattern of survival, hemodynamic performance and rate of complications after Medtronic freestyle versus homograft full aortic root replacement: results from a prospective randomized trial. *J Heart Valve Dis.* **2004**, *13*: 972–975; discussion 975–976.

Meredith, J. E.; Schwartz, M. A. Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends Cell Biol.* **1997**, *7*: 146–150.

Meyer, K.; Hobby, G. L.; Chaffee, E.; Dawson, M. H. The hydrolysis of hyaluronic acid by bacterial enzymes. *J. Exp. Med.* **1940**, *71* (2): 137–46.

Mikos, A. G.; Bao, Y.; Cima, L. G.; Ingber, D. E.; Vacanti, J. P.; Langer, R. Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *J Biomed Mater Res.* **1993**, *27*: 183-9.

Mikos, A. G.; Sarakinos, G.; Leite, S. M.; Vacanti, J. P.; Langer, R. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials.* **1993**, *14*: 323-30.

Mikos, A. G.; Thorsen, A. J.; Czerwonka, L. A.; Bao, Y.; Langer, R.; Winslow, D. N.; et al. Preparation and Characterization of Poly(L-Lactic Acid) Foams. *Polymer (Guildf)* **1994**, *35*: 1068-77.

Millet, J.; Jouault S.C.; Mauray, S.; Theveniaux, J.; Sternberg, C.; Boisson-Vidal, C. and Fischer, A.M. Antithrombotic and anticoagulant activities of a low molecular weight fucoidan. *Thromb Haemost.* **1999**, *81*: 391-395.

Miranda, E. S.; Silva, T. H.; Reis, R. L.; Mano, J. F. Nanostructured natural-based polyelectrolyte multilayers to agglomerate chitosan particles into scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* **2011**; *17*: 2663-74.

Mithieux, S. M. and Weiss A. S., Elastin. *Adv Protein Chem*, **2005**. *70*: p. 437-61.

Mizuno, M.; Nishitani, Y.; Tanoue, T.; Matoba, Y.; Ojima, T.; Hashimoto, T.; Kanazawa, K. Quantification and localization of fucoidan in *Laminaria japonica* using a novel antibody. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 335–338.

Mooney, D. J.; Baldwin, D. F.; Suh, N. P.; Vacanti, J. P.; Langer, R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials.* **1996**; *17*: 1417-22.

Moore, J. and Thibeault S. Insights into the role of elastin in vocal fold health and disease. *J Voice.* **2012**, *26*(3): p. 269-75.

Morya, V. K.; Kim, J.; Kim, E.K. Algal fucoidan: structural and size-dependent bioactivities and their perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **2012**, *93*(1): 71–82.

Mourao, P. Use of Sulfated Fucans as Anticoagulant and Antithrombotic Agents: Future Perspectives. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 967–981.

Mulloy, B.; Rider, C. C. Cytokines and proteoglycans: an introductory overview. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 409–13.

Muona, K., Mäkinen, K., Hedman, M., Manninen, H., and Ylä-Herttuala, S. (). 10-year safety follow-up in patients with local VEGF gene transfer to ischemic lower limb. *Gene Ther.* **2012**, *19*, 392–395.

Myllyharju, J. and Kivirikko K.I., Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* **2004**, *20*(1): p. 33-43.

Naik, R.J.; Sharma, R.; Nisakar, D.; Purohit, G.; Ganguli, M. Exogenous chondroitin sulfate glycosaminoglycan associate with arginine-rich peptide-DNA complexes to alter their intracellular processing and gene delivery efficiency. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2015**, *1848*, 1053–1064.

Nakamura, S.; Nambu, M.; Ishizuka, T.; Hattori, H.; Kanatani, Y.; Takase, B.; Kishimoto, S.; Amano, Y.; Aoki, H.; Kiyosawa, T.; et al. Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex-hydrogel on in vitro and in vivo vascularization. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* **2008**, *85*, 619–627.

Nakase, I.; Tadokoro, A.; Kawabata, N.; Takeuchi, T.; Katoh, H.; Hiramoto, K.; Negishi, M.; Nomizu, M.; Sugiura, Y.; Futaki, S. Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry.* **2007**, *46*: 492–501.

Nardella, A.; Chaubet, F.; Boisson-Vidal, C.; Blondin, C.; Durand, P.; Jozefonvicz, J. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr. Res.* **1996**, *289*, 201–208.

Neuenschwander, S.; Hoerstrup, S.; Heart valve tissue engineering; *Transplant Immunology.* **2004**. *12*, 359–365.

Neufel, G.; Cohen, T.; Gengrinovitch, S.; Poltorak, Z.; Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal.* **1999**, *13*, 9-22. 1.

Nieuwdrop, M.; Meuwese, M. C.; Vink, H.; Hoekstra, J. B.; Kastelein, J. J.; Stroes, E. S. The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Curr Opin Lipidol.* **2005**, *16*: 507-511.

Nishi, K.; Saigo, K. Cellular internalization of green fluorescent protein fused with herpes simplex virus protein VP22 via a lipid raft-mediated endocytic pathway independent of caveolae and Rho family GTPases but dependent on dynamin and Arf6. *J Biol Chem.* **2007**, *282*: 27503–27517.

- Nishino, T.; Fukuda, A.; Nagumo, T.; Fujihara, M.; Kaji, E. Inhibition of the generation of thrombin and factor Xa by a fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Thromb. Res.* **1999**, *96*, 37–49.
- Nishino, T.; Nishioka, C.; Ura, H.; Nagumo, T. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *fucus vesiculosus* fucoidan. *Carbohydrate Research.* **1994**, *255*: 213–224.
- Nkomo, V.; Gardin, J.; Skelton, T.; Gottdiener, J.; Scott, C.; Enriquez-Sarano, M.; Burden of valvular heart diseases: apopuation-basedstudy. *Lancet.* **2006**, *368*: 1005-1011.
- Norgren, L.; Hiatt, W. R.; Dormandy, J. A.; *et al.*, Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg*, **2007**, *33* Suppl 1: p. S1-75.
- Novo, S.; Coppola G. and Milio G. Critical limb ischemia: definition and natural history. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, **2004**, *4*(3): p. 219-25.
- O'Brien, M. F.; Gardner, M. A.; Garlick, R. B.; Davison, M. B.; Thomson, H. L.; Burstow, D. J. The CryoLife-O'Brien stentless aortic porcine xenograft valve. *J Card Surg.* **1998**, *13*:376 –385.
- Ohkawara, B.; Glinka, A.; Niehrs, C. Rspo3 Binds Syndecan 4 and Induces Wnt/PCP Signaling via Clathrin-Mediated Endocytosis to Promote Morphogenesis. *Dev. Cell.* **2011**, *20*, 303–314.
- Oliveira, J. M.; Silva, S. S.; Mano, J. F.; Reis, R. L. Innovative technique for the preparation of porous bilayer hydro- xyapatite/chitosan scaffolds for osteochondral applications. *Key Eng Mater.* **2006**, *309-311*:927-30.
- Papy-Garcia, D.; Christophe, M.; Huynh, M. B.; Fernando, S.; Ludmilla, S.; Sepulveda-Diaz, J. E.; Raisman-Vozari, R. Glycosaminoglycans, protein aggregation and neurodegeneration. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2011**, *12*, 258–268.
- Park, K. M. and Gerecht, S. Harnessing developmental processes for vascular engineering and regeneration. *Development.* **2014**, *141*, 2760–2769.

Patankar, M. S.; Oehninger, S.; Barnett, T.; Williams, R. L.; Clark, G. F. A Revised Structure for Fucoidan May Explain Some of Its Biological Activities *. *J. Biol. Chem.* **1993**, 21770–21776.

Pavinatto, F. J.; Caseli, L. and Oliveira, O. N., *Biomacromolecules*. **2010**, 11, 1897–1908.

Payne, C.K.; Jones, S.A.; Chen, C.; Zhuang, X. Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic*. **2007**, 8: 389–401.

Pepper M. S. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2001**, 21: 1104–1117.

Percival, E. and Ross, A. G. The isolation and purification of fucoidin from brown seaweeds. *J Chem Soc.* **1950**, 717–720.

Pereira, L.; Amado, A.M.; Critchley, A.T.; van de Velde, F.; Ribeiro-Claro, P.J.A. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocoll.* **2009**, 23, 1903–1909.

Peysseon, F.; Ricard-Blum, S. Heparin-protein interactions: From affinity and kinetics to biological roles. Application to an interaction network regulating angiogenesis. *Matrix Biol.* **2014**, 35, 73–81.

Pibarot, P.; Dumesnil, J. G. Prosthetic Heart Valves. *Circulation*. **2009**, 119.

Pomin, V.H. Fucanomics and galactanomics: Current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. *Biochimica et Biophysica Acta.* **2012**, 1820(12): 1971–1979.

Prockop, D. L.; Sieron, A. L.; Li, S.W. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. *Matrix Biol.* **1998**, 16, 399–408.

Prokoph, S., Chavakis, E., Levental, K.R., Zieris, A., Freudenberg, U., Dimmeler, S., and Werner, C. (). Sustained delivery of SDF-1 α from heparin-based hydrogels to attract circulating pro-angiogenic cells. *Biomaterials*. **2012**, 33, 4792–4800.

Puppi, D.; Piras, A. M.; Chiellini, F.; Chiellini, E.; Martins, A.; Leonor, I. B.; *et al.* Optimized electro- and wet- spinning techniques for the production of polymeric fibrous scaffolds loaded with bisphosphonate and hydroxyapatite. *J Tissue Eng Regen Med.* **2011**, 5: 253-63.

Purnama, A.; Aid-launais, R.; Haddad, O.; Maire, M.; Letourneur, D.; le Visage, C. Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2013**, 2, 187–197.

Puvaneswary, S.; Talebian, S.; Balaji, H.; Raman, M.; Mehrali, M.; Muhammad, A.; Hayaty, N.; Abu, B.; Kamarul, T. Fabrication and in vitro biological activity of α -TCP-Chitosan-Fucoidan composite for bone tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 134, 799–807.

Puvimanasinghe, J.; Steyerberg, E.; Takkenberg, J.; Eijkemans, M.; Herwerden, L.; Bogers, A.; Habbema, J.; Prognosis After Aortic Valve Replacement With a Bioprosthesis Predictions Based on Meta-Analysis and Microsimulation. *Circulation.* **2001**, 103, 1535-1541.

Pye, D. A.; Vives, R. R.; Turnbull, J. E.; Hyde, P.; Gallagher, J. T. Heparan Sulfate Oligosaccharides Require 6- O -Sulfation for Promotion of Basic Fibroblast Growth Factor Mitogenic Activity . *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 22936–22942.

Qiu, X.; Amarasekara, A.; Doctor, V. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of fucoidan. *Carbohydr. Polym.* **2006**, 63, 224–228.

Quinn, J. F.; Pas, S. J.; Quinn, A.; Yap, H. P.; Suzuki, R.; Tuomisto, F.; Shekibi, B. S.; Mardel, J. I.; Hill, A. J. and Caruso, F., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 19808–19819.

Rahbarghazi, R., Nassiri, S.M., Ahmadi, S.H., Mohammadi, E., Rabbani, S., Araghi, A., and Hosseinkhani, H. Dynamic induction of pro-angiogenic milieu after transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* **2014**, 173, 453–466.

Rahimtoola, S. Choice of Prosthetic Heart Valve in Adults. *J Am Coll Cardiol.* **2010**, 55, 2413-2426.22.

Ramier Julien, « Structures fibreuses tridimensionnelles de biopolymères pour l'ingénierie tissulaire » *Thèse de doctorat en chimie et science des matériaux, sous la direction du Professeur Estelle Renard et du Docteur Daniel Grande*, Université Paris Est, **2012**, 226p.

Rederstorff, E.; Weiss, P.; Sourice, S.; Pilet, P.; Xie, F.; Siquin, C.; Collic-Jouault, S.; Guicheux, J.; Laïb, S. An in vitro study of two GAG-like marine polysaccharides incorporated into injectable hydrogels for bone and cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* **2011**, 7(5):2119-30.

Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, Chappell D, Stoeckelhuber M, Welsch U, Reichart B, et al.: Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation.* **2007**, 116:1896Y1906.

Reys, L. L.; Silva, S. S.; Oliveira, J. M.; Frias, A. M.; Mano, J. F.; Silva, T. H.; *et al.* Valorization of Chitosan from Squid Pens and Further Use on the Development of Scaffolds for Biomedical Applications. *Int J Artif Organs.* **2011**, 34:704.

Ribatti, D., and Djonov, V. Intussusceptive microvascular growth in tumors. *Cancer Lett.* **2012**, 316, 126–131.

Richard, B.; Bouton, M. C.; Loyau, S.; Lavigne, D.; Letourneur, D.; Jandort-Perrus, M.; Arocas, V. Modulation of protease nexin-1 activity by polysaccharides. *Thromb Haemost.* **2006**, 95(2):229-35.

Riou, D.; Collic-Jouault, S.; Pinczon du Sel, D.; Bosch, S.; Siavoshian, S.; Le Bert, V.; Tomasoni, C.; Siquin, C.; Durand, P.; Roussakis, C. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from ascophyllum nodosum against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. *Anticancer Res.* **1996**, 16(3A):1213-8.

Robinson, C. J.; Mulloy, B.; Gallagher, J. T.; Stringer, S. E. VEGF165-binding sites within heparan sulfate encompass two highly sulfated domains and can be liberated by K5 lyase. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 1731–1740.

Roger, O.; Collic-Jouault, S.; Ratiskol, J.; Siquin, C.; Guezennec, J.; Fischer, a. M.; Chevotot, L. Polysaccharide labelling: Impact on structural and biological properties. *Carbohydr. Polym.* **2002**, *50*, 273–278.

Rosenbloom, J.; Abrams, W. R.; Mecham, R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J.* **1993**, *7*(13):1208-18.

Rouet, V., Hamma-Kourbali, Y., Petit, E., Panagopoulou, P., Katsoris, P., Barritault, D., Caruelle, J.-P., and Courty, J. (). A Synthetic Glycosaminoglycan Mimetic Binds Vascular Endothelial Growth Factor and Modulates Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 32792–32800.

Rouzet, F.; Bachelet-Violette, L.; Alsac, J.-M.; Suzuki, M.; Meulemans, A.; Louedec, L.; Petiet, A.; Jandrot-Perrus, M.; Chaubet, F.; Michel, J.-B.; Le Guludec, D.; Letourneur, D. Radiolabeled fucoidan as a p-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 1433–1440.

Rundhaug, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis Angiogenesis Review Series. *J. Cell. Mol. Med.* **2005**, *9*, 267–285.

Ruscher, K., et al., Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett*, **1998**, *254*(2): p.117-20.

Saboural, P.; Chaubet, F.; Rouzet, F.; Al-Shoukr, F.; Azzouna, R. Ben; Bouchemal, N.; Picton, L.; Louedec, L.; Maire, M.; Rolland, L.; Potier, G.; Le Guludec, D.; Letourneur, D.; Chauvierre, C. Purification of a Low Molecular Weight Fucoidan for SPECT Molecular Imaging of Myocardial Infarction. *Mar. Drugs.* **2014**, 4851–4867.

Saha N., Monge C., Dulong V., Picart C. and Glinel K., *Biomacromolecules.* **2013**, *14*, 520–528.

Salbach, J.; Rachner, T. D.; Rauner, M.; Hempel, U.; Anderegg, U.; Franz, S.; *et al.* Regenerative potential of glycosaminoglycans for skin and bone. *J Mol Med (Berl).* **2012**, *90*:625-35.

Sales, V.; Mettler, B.; Engelmayr, G.; Aikawa, E.; Bischoff, J.; Martin, D.;

Exarhopoulos, A.; Moses, M.; Schoen, F.; Sacks, M.; Mayer, J. Endothelial progenitor cells as a sole source for ex vivo seeding of tissue-engineered heart valves. *Tissue Eng. A*. **2010**, *16* 257–267.

Salgado, A. J.; Sousa, R. A.; Oliveira, J. T.; Silva, N.; Neves, N. M.; Reis, R. L.; *et al.* Novel tissue engineering 3D scaffolds for spinal cord injury based on starch/polycaprolactone blends: Development and preliminary assessment of their biological performance. *Tissue Eng.* **2007**, *13*:1736-7.

Sanada, F.; Taniyama, Y.; Azuma, J.; Yuka, I.-I.; Kanbara, Y.; Iwabayashi, M.; Rakugi, H.; Morishita, R. Therapeutic Angiogenesis by Gene Therapy for Critical Limb Ischemia: Choice of Biological Agent. *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.* **2014**, *14*, 32–39.

Schoen, F. J.; Levy, R. J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg.* **2005**, *79*:1072–1080.

Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia. *Circulation.* **1991**, *84*(4 Suppl): p. IV1-26.

Seeger, R. and Krebs, E. G. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **1995**, *9*: 726–735.

Sekkal, M.; Legrand, P. A spectroscopic investigation of the carrageenans and agar in the 1500–100 cm⁻¹ spectral range. *Spectrochim. Acta.* **1993**, *49*, 209–221.

Senger, D. R.; Ledbetter, S. R.; Claffey, K. P.; Papadopoulos-Sergiou, A.; Peruzzi, C. A.; Detmar, M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol.* **1996**, *149*:293–305.

Senger, D. R.; Perruzzi, C. A.; Streit, M.; Kotliansky, V.E.; de Fougères, A. R.; Detmar, M. The α 1 β 1 and α 2 β 1 integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am J Pathol.* **2002**, *160*:195–204.

Senni, K.; Pereira, J.; Gueniche, F.; Delbarre-Ladrat, C.; Siquin, C.; Ratiskol, J.; Godeau, G.; Fischer, A. M.; Helley, D.; Collic-Jouault, S. Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. *Mar Drugs*. **2011**, 9(9):1664-81.

Serizawa, T.; Yamaguchi, M. and Akashi, M. *Biomacromolecules*. **2002**, 3, 724–731.

Shammas, N.W., Epidemiology, classification, and modifiable risk factors of peripheralarterial disease. *Vasc Health Risk Manag*. **2007**, 3(2): p. 229-34.

Shen, L.; Chaudouet, P.; Ji, J. and Picart, C. pH-amplified multilayer films based on hyaluronan: influence of HA molecular weight and concentration on film growth and stability. *Biomacromolecules*. **2011**, 12, 1322–1331.

Sheng, P. X.; Ting, Y.-P.; Chen, J. P. and Hong, L. *J. Colloid Interface Sci*. **2004**, 275, 131–141.

Shimamura, M., Nakagami, H., Taniyama, Y., and Morishita, R. Gene therapy for peripheral arterial disease. *Expert Opin. Biol. Ther*. **2014**, 1–10.

Short, S. M.; Talbott, G. A.; Juliano, R. L. Integrin-mediated signaling events in human endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell*. **1998**, 9: 1969–1980.

Silva, S. S.; Santos, T. C.; Cerqueira, M. T.; Marques, A. P.; Reys, L. L.; Silva, T. H.; et al. The use of ionic liquids in the processing of chitosan/silk hydrogels for biomedical applications. *Green Chem*. **2012**, 14:1463-70.

Silva, T. H.; Alves, A.; Ferreira, B. M.; Oliveira, J. M.; Reys, L. L.; Ferreira, R. F.; et al. Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest. *Int Mater Rev*. **2012**; 57:276-306.

Simon Davis, D. A. and Parish, C. R. Heparan Sulfate: A Ubiquitous Glycosaminoglycan with Multiple Roles in Immunity. *Front. Immunol*. **2013**, 4.

Soeda, S.; Kozako, T.; Iwata, K.; Shimeno, H. 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*. **2000**, 1497, 127–134.

Song, M.; Jang, H.; Lee, J.; Kim, J. H.; Kim, S. H.; Sun, K. and Park, Y. Regeneration of chronic myocardial infarction by injectable hydrogels containing stem cell homing factor SDF-1 and angiogenic peptide Ac-SDKP. *Biomaterials*. **2014**, *35*, 2436–2445.

Springer GF, Wurzel HA, McNeal GM Jr, Ansell NJ, Doughty MF. Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidin. *Proc Soc Exp Biol Med*. **1957** Feb; *94*(2): 404-9.

Stamm, C.; Khosravi, A.; Grabow, N.; Schmohl, K.; Treckmann, N.; Drechsel, A.; Nan, M.; Schmitz, K.; Haubold, A.; Steinhoff, G. Biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering, *Ann. Thorac. Surg*. **2004**, *78*, 2084–2092.

Stenmark, K. R.; Yeager, M. E.; El Kasmi, K. C.; Nozik-Grayck, E.; Gerasimovskaya, E. V.; Li, M.; Riddle, S. R.; Frid, M. G. The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu. Rev. Physiol*. **2013**, *75*, 23–47.

Sternlicht, M.D. and Werb, Z., How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **2001**, *17*: p. 463-516.

Stringer, S. E. The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis. *Biochem Soc Trans*. **2006**, *34*, 451–453.

Suffee, N.; Hlawaty, H.; Meddahi-Pelle, a.; Maillard, L.; Louedec, L.; Haddad, O.; Martin, L.; Laguillier, C.; Richard, B.; Oudar, O.; Letourneur, D.; Charnaux, N.; Sutton, A.; RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. *Angiogenesis*. **2012**, *15*, 727–744.

Sutton, A.; Friand, V.; Papy-Garcia, D.; Dagouassat, M.; Martin, L.; Vassy, R.; Haddad, O.; Sainte-Catherine, O.; Kraemer, M.; Saffar, L.; et al. Glycosaminoglycans and their synthetic mimetics inhibit RANTES-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Mol. Cancer Ther*. **2007**, *6*, 2948–2958.

Suzuki, M.; Bachelet-Violette, L.; Rouzet, F.; Beilvert, A.; Autret, G.; Maire, M.; Menager, C.; Louedec, L.; Choqueux, C.; Saboural, P.; et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with fucoidan for molecular MRI of intraluminal thrombus. **2014**, *10*, 73–87.

Synytsya, A.; Choi, D.J.; Pohl, R.; Na, Y.S.; Capek, P.; Lattová, E.; Taubner, T.; Choi, J.W.; Lee, C.W.; Park, J.K.; et al. Structural Features and Anti-coagulant Activity of the Sulphated Polysaccharide SPS-CF from a Green Alga *Capsosiphon fulvescens*. *Mar. Biotechnol.* **2015**, *17*, 718–735.

Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell.* **2006**. *126*(4): p. 663–76.

Takahashi, M. Retinal Cell Therapy Using iPS Cells. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* **2016**, *120*(3): 210-24; discussion 225.

Teng, H.; Yang, Y.; Wei, H.; Liu, Z.; Liu, Z.; Ma, Y.; Gao, Z.; Hou, L.; Zou, X. Fucoidan Suppresses Hypoxia-Induced Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis in Mouse Hepatocarcinoma. *Mar. Drugs.* **2015**, *13*, 3514–3530.

Thierry, B.; Winnik, F. M.; Merhi, Y.; Silver, J. and Tabrizian, M. *Biomacromolecules*, **2003**, *4*, 1564–1571.

Thorlacius, H.; Vollmar, B.; Seyfert, U.T.; Vestweber, D.; Menger, M.D. The polysaccharide fucoidan inhibits microvascular thrombus formation independently from P- and L-selectin function in vivo. *Eur. J. Clin. Invest.* **2000**, *30*, 804–810.

Tillman, J.; Ullm, A.; Madihally, S. V. Three-dimensional cell colonization in a sulfate rich environment. *Biomaterials.* **2006**, *27*: 5618e26.

Tkachenko, E. and Simons, M. Clustering induces redistribution of syndecan-4 core protein into raft membrane domains. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 19946–19951.

Tkachenko, E.; Lutgens, E.; Stan, R.-V.; Simons, M. Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 3189–3199.

Tkachenko, E.; Rhodes, J. M.; Simons, M. Syndecans: New kids on the signaling block. *Circ. Res.* **2005**, *96*, 488–500.

Urbich, C.; Dimmeler, S. Endothelial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology. *Circ. Res.* **2004**, *95*, 343–353.

Usov, A. I.; Smirnova, G. P.; Bilan, M. I.; Shashkov, A. S. Polysaccharides of algae. 53. Brown alga *Laminaria saccharina* (L.) Lam. as a source of fucoidan. *Bioorganicheskaya Khimiya.* **1998**, *24*(6): 437–445.

Usov, A.I.; Bilan, M. I. Fucoidans - sulfated polysaccharides of brown algae. *Russian Chemical Reviews.* **2009**, *78*(8): 785–799.

Usprech, J.; Chen, W.; Li, K.; Simmons, C.; Heart valve regeneration: The need for systems approaches. *WIREs Syst Biol Med.* **2016**, *8*, 169–182.

Ustyuzhanina, N. E.; Bilan, M. I.; Ushakova, N. A.; Usov, A. I.; Kiselevskiy, M. V.; Nifantiev, N. E. Fucoidans : pro- or antiangiogenic agents ?. *Glycobiology.* **2014**, *24*, 1265–74.

Ustyuzhanina, N. E.; Ushakova, N. A.; Zyuzina, K. A.; Bilan, M. I.; Elizarova, A. L.; Somonova, O. V.; Madzhuga, A. V.; Krylov, V. B.; Preobrazhenskaya, M. E.; Usov, A. I.; et al. Influence of fucoidans on hemostatic system. *Mar. Drugs.* **2013**, *11*, 2444–2458.

Van Wijk, X. M.; Thijssen, V. L.; Lawrence, R.; Van Den Broek, S. A.; Dona, M.; Naidu, N.; Oosterhof, A.; Van De Westerlo, E. M.; Kusters, L. J.; Khaled, Y.; et al. Interfering with UDP-GlcNAc metabolism and heparan sulfate expression using a sugar analogue reduces angiogenesis. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2331–2338.

Vera, J.; Castro, J.; Gonzales, A.; Moenne, A. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Mar Drugs.* **2011**, *9*: 2514-25.

Vernon, R. B.; Sage, E. H. Between molecules and morphology: Extra- cellular matrix and creation of vascular form. *Am J Pathol.* **1995**, *147*: 873–883.

Verzija, N.; Degroot, J.; Thorpe, S. R.; Bank, R. A.; Shaw, J. N.; Lyons, T. J.; Bijlsma, J. W. J.; Lefeber, F. P. J. G.; Baynes, J. W.; Tekoppele, J. M. Effect of Collagen Turnover on the Accumulation of Advanced Glycation End Products. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 39027–39031.

- Vesely, I. Heart valve tissue engineering. *Circ. Res.* **2005**, *97*, 743–755.
- Vinals, F.; Pouyssegur, J. Confluence of vascular endothelial cells induces cell cycle exit by inhibiting p42/p44 mitogen-activated protein kinase activity. *Mol Cell Biol.* **1999**, *19*: 2763–2772.
- Von der Mark, K.; Park, J.; Bauer, S.; Schmuki, P. Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* **2009**, *339*:131e53Y.
- Vongpatanasin, W.; Hillis, D.; Lange, R. Characteristics of prosthetic valves. *N Engl J Med.* **1996**, *335*, 6, 407-416.
- Wagenseil, J. E. and Mecham, R. P. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Natl. Inst. Heal.* **2009**, *89*, 957–989.
- Wary, K. K.; Mainiero, F.; Isakoff, S. J.; Marcantonio, E. E.; Giancotti, F.G. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell.* **1996**, *87*:733–743.
- Weng, Y.; Chen, J.; Tu, Q.; Li, Q.; Maitz, M.; Huang, N. Biomimetic modification of metallic cardiovascular biomaterials: from function mimicking to endothelialization in vivo. *Interface Focus.* **2012**, *2*, 356–365.
- Weymann, A.; Schmack, B.; Okada, T.; Soós, P.; Istók, R.; Radovits, T.; Straub, B.; Barnucz, E.; Loganathan, S.; Pätzold, I.; *et al.* Reendothelialization of Human Heart Valve Neoscaffolds Using Umbilical Cord-Derived Endothelial Cells. *Circ. J.* **2013**, *77*, 207–216.11.
- Wight, T. N.; Toole, B. P.; Hascall, V. C. The Extracellular Matrix: an Overview - Hyaluronan and the Aggregating Proteoglycans; Mecham, R. P., Ed.; *Springer-Verlag Heidelberg.* **2011**; Vol. 1.
- Wilczek, K.; Chodor, P.; Walas, R.; Krason, M.; Przybylski, R.; Niklewski, T.; Glowacki, J.; Nadzikiewicz, P.; Kowalik, V.; Motyka, M.; Laborde, J.C. and Zembala, M. *Kardiol Polish.* **2010**, *68*, (8) :980-4.

Wilczek, P.; Major, R.; Lipinska, L.; Lackner, J.; Mzyk, A. Thrombogenicity and biocompatibility studies of reduced graphene oxide modified acellular pulmonary valve tissue. *Mater. Sci. Eng. C*. **2015**, 53, 310–321.3.

Wilczek, P.; Zembala, M.; Cichon, T.; Smolarczyk, R.; Szala, S and Zembala, M. Scaffold construction for effective transfer of cardiac stem cells to the damaged heart. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska*. **2012**, ISSN: 1731-5530. EISSN: 1897-4252.

Wu, B.; Liu, G.; Zhang, G. and Craig, V. S. J. Stiff chains inhibit and flexible chains promote protein adsorption to polyelectrolyte-multilayers. *Soft Matter*, **2014**, 10, 3806–3816.

Yan, L. P.; Oliveira, J. M.; Oliveira, A. L.; Caridade, S. G.; Mano J. F.; Reis, R. L. Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications. *Acta Biomater*. **2012**, 8: 289-301.

Yang, M.; Lin, Y. H.; Shi, W. P.; Shi, H. C.; Gu, Y. J.; Shu, Y. S. Surface heparin treatment of the decellularized porcine heart valve: Effect on tissue calcification. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater*. **2015**, 1–6.

Ye, C.; Wang, Y.; Su, H.; Yang P, Huang, N.; F Maitz, M.; Zhao, A.; Construction of a fucoidan/laminin functional multilayer to direct vascular cell fate and promote hemocompatibility. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. **2016**, 1, 236-42. 64.

Ye, X.; Wang, H.; Zhou, J.; Li, H.; Liu, J.; Wang, Z.; Chen, A.; Zhao, Q. The Effect of Heparin-VEGF Multilayer on the Biocompatibility of Decellularized Aortic Valve with Platelet and Endothelial Progenitor Cells. *Plos One*. **2013**, 8(1):e54622.

Yoo, J.; Jeong, M. J.; Cho, H. J.; Oh, E. S.; Han, M. Y. Dynamin II interacts with syndecan-4, a regulator of focal adhesion and stress-fiber formation. *Biochem Biophys Res Commun*. **2005**, 328:424–431.

Yurchenco, P. D.; Lu, P.; Takai, K.; Weaver, V. M.; Hynes, R. O.; Naba, A.; Huttenlocher, A.; Horwitz, A. R.; Geiger, B.; Yamada, K. M.; *et al.* Basement Membranes : Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. **2011**, 1–28.

Zakhem, E.; Raghavan, S.; Gilmont, R. R.; Bitar, K. N., Chitosan-based scaffolds for the support of smooth muscle constructs in intestinal tissue engineering. *Biomaterials* **2012**, *33*, 4810-4817.

Zemani, F.; Benisvy, D.; Galy-Fauroux, I.; Lokajczyk, A.; Collic-Jouault, S.; Uzan, G.; Fischer, A. M.; Boisson-Vidal, C. Low-molecular-weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 1167–1175.2.

Zhou J., Wang B., Tong W., Maltseva E., Zhang G., Krastev R., Gao C., Mohwald H. and Shen J., *Colloids Surf. B.* **2008**, *62*,250–257.

Zhou, J.; Wang, B.; Tong, W.; Maltseva, E.; Zhang, G.; Krastev, R.; Gao, C.; Mohwald, H. and Shen, J. *Colloids Surf. B.* **2008**, *62*,250–257.

Zhu, X.; Ohtsubo, M.; Bohmer, R. M.; Roberts, J. M.; Assoian, R. K. Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol.* **1996**, *133*:391–403.

Ziarek, J. J.; Veldkamp, C. T.; Zhang, F.; Murray, N. J.; Kartz, A.; Liang, X.; Su, J.; John, E.; Linhardt, R. J.; Brian, F. Heparin Oligosaccharides Inhibit Chemokine (CXC Motif) Ligand 12 (CXCL12) Cardioprotection by Binding Orthogonal to the Dimerization Interface , Promoting Oligomerization, and Competing with the Chemokine (CXC Motif) Receptor 4. *J. Biol. Chem.* **2013**, *12*.

Zilla, P.; Brink, J.; Human, P.; Bezuidenhout, D. Prosthetic heart valves: catering for the few. *Biomaterials.* **2008**; *29*: 385–406.

Zimmermann, P.; Zhang, Z.; Degeest, G.; Mortier E.; Leenaerts I.; Coomans C.; Schulz, J.; N'Kuli, F.; Courtoy, P. J.; David, G. Syndecan recycling is controlled by syntenin-PIP2 interaction and Arf6. *Dev Cell.* **2005**, *9*: 377–388.

Zykwinska, A.; Marquis, M.; Sinquin, C.; Cuenot, S.; Collic-Jouault, S. Assembly of HE800 exopolysaccharide produced by a deep-sea hydrothermal bacterium into microgels for protein delivery applications. *Carbohydr Polym.* **2016**, *20*; 142:213-21.

Communications

Communications affichées et commentées

Journée Biologie Interface, 29/04/2014 - Université paris 13, Bobigny (FR).

Poster Biologie Interface: Effet pro-angiogénique du fucoïdane: Rôles des chimiokines et de leurs récepteurs protéoglycanniques.

Auteurs: Nicolas Marinval, Pierre Saboural, Oualid Haddad, Didier Letourneur, Nathalie Charnaux, Hanna Hlawaty.

Journée de l'Institut Interdisciplinaire en Sciences Expérimentales (IISE), 06/11/2014 - Université paris 13, Villetaneuse (FR).

Poster IISE: Angiogenesis potentialized by highly sulfated fucoidan: role of the chemokines and the proteoglycans.

Auteurs: Nicolas Marinval, Pierre Saboural, Oualid Haddad, Didier Letourneur, Nathalie Charnaux, Hanna Hlawaty.

Journée de l'école doctorale Galilée, 20/05/2015 - Université paris 13, Villetaneuse (FR).

Poster EAS: Characterization of the proangiogenic potential by highly sulfated fucoidan: role of the chemokines and the glycosaminoglycans.

Auteurs: N. Marinval, P. Saboural, K. Bassand, O. Haddad, M. Maire, F. Chaubet, C. Chauvière, A. Sutton, N. Charnaux, H. Hlawaty

The 83rd European Atherosclerosis Society (EAS) Congress, 22-25/03/2015 - The Scottish Exhibition and Conference Center, Glasgow (UK).

Poster EAS: Characterization of the proangiogenic potential by highly sulfated fucoidan: role of the chemokines and the glycosaminoglycans.

Auteurs: Nicolas Marinval, Pierre Saboural, Oualid Haddad, Didier Letourneur, Nathalie Charnaux, Hanna Hlawaty.

11e Congrès de la Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose (NSFA), 25-27/06/2015 - Centre des Congrès, Biarritz (FR).

Poster NSFA: Characterization of the proangiogenic potential of highly sulfated fucoidan: role of the chemokines and the glycosaminoglycans.

Auteurs: N. Marinval, P. Saboural, K. Bassand, O. Haddad, M. Maire, F. Chaubet, C. Chauvière, A. Sutton, N. Charnaux, H. Hlawaty

6e Congrès de la Société Française d'Angiogenèse (SFA), 24-25/09/2015 - Collège de France, Paris (FR).

Poster SFA: Characterization of the proangiogenic potential of highly sulfated fucoidan: role of the chemokines and the glycosaminoglycans.

Auteurs: N. Marinval, P. Saboural, K. Bassand, O. Haddad, M. Maire, F. Chaubet, C. Chauvière, A. Sutton, N. Charnaux, H. Hlawaty.

Communications orales

12e Congrès de la Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose (NSFA), 15-18/06/2016 - Centre des Congrès, Biarritz (FR).

Oral: Pro-angiogenic action of low molecular weight fucoidan in endothelial damaged-glycocalyx cell model: a promising natural therapeutic tool for ischemia treatment.

Auteurs: N. Marinval, P. Saboural, O. Haddad, M. Maire, K. Bassand, C. Chauvière, F. Chaubet, N. Charnaux, H. Hlawaty

15th Biennial Meeting of the International Society for Applied Cardiovascular Biology (ISACB), 4-11/09/2016 - Banff Center, (Canada)

Oral: Regeneration of acellularized porcine pulmonary valve in presence of fucoidan and VEGF: biological prosthesis construction ready for transplantation.

Auteurs: Nicolas Marinval, Malgorzata Morenc, Nathalie Charnaux, Piotr Wilczek, Hanna Hlawaty.

Travaux annexes

Collaborations et publications annexes

Lors de mes activités de recherche ayant cours pendant ma thèse, j'ai été amené à travailler en collaboration sur différents thèmes de recherche.

Le premier travail de recherche portait sur le potentiel thérapeutique d'un outil de vaccination biocompatible construit sur une base d'anticorps dirigé spécifiquement contre le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dans le développement de l'arthrite rhumatoïde et la progression synoviale. Il a été réalisé en collaboration avec le laboratoire L'objectif de l'étude était de vérifier si la vaccination de modèle animaux (souris immunosupprimées) améliore l'arthrite induite par le collagène. (Collagen-Induced arthritis ou CIA).

Les anticorps anti-VEGF ont été construits avec des hétérodimères de la cytokine VEGF (ou un dérivé du peptide) lié à une protéine de charge Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH). Deux types de vaccins ont été générés et testés dans deux séries expérimentales de CIA. Dans la première, un kinoid de VEGF murin (VEGF-K) obtenu par conjugaison du VEGF-A avec la protéine KLH, a été testé. Pour le second, deux peptides dérivés de VEGF-A ont été sélectionnés pour produire les hétérodimères (Vpep1-K et Vpep2-K). Les souris DBA/1 ont été utilisées et immunisées avec VEGF-K, Vpep1 ou Vpep2 avant l'induction de CIA. Des scores cliniques et histologiques du développement de l'arthrite, la titration des anticorps anti VEGF-K, Vpep1, Vpep2 capable de neutraliser le VEGF ont été déterminées. J'ai participé à la mise évidence que VEGF-K et Vpep1-K ont significativement amélioré le score clinique de l'arthrose et réduit l'inflammation synoviale. VEGF-K a significativement réduit la vascularisation synoviale.

Aucun vaccin utilisé ont réduit la réponse d'anticorps anti-collagène chez les souris. VEGF-K et Vpep1-K ont tous les deux induits de façon persistante la haute titration d'anticorps anti-VEGF capable d'inhiber la bioactivité de VEGF-A.

Le deuxième projet portait sur l'évaluation d'un polymère biodégradable et biocompatible capable de délivrer des agents thérapeutiques pour une application sur un stent dans un contexte de resténose artérielle en prévenant le risque de thrombose artérielle.

Poly([R,S]-3,3-diméthylmalique acide) (PDMMLA) est un nouveau polymère contenant des acides carboxyliques et un groupement fonctionnel intégré à la chaîne polymérique. Cette particularité lui confère une plasticité chimique et customisable afin de moduler sa dégradation selon la volonté. Ce polymère a été préparé pour développer une nouvelle forme de recouvrement exhibant différents groupements chimiques dans sa structure et des produits de dégradation non toxiques. J'ai participé aux études de la dégradation hydrolytique du PDMMLAs dans des conditions physiologiques jusqu'à 6 mois.

Les facteurs importants qui influencent la dégradation cinétique de polymères tels que le poids moléculaire, la nature et la stabilité des groupements fonctionnels, la nature des enzymes biologiques, le pH et la température ont été étudiés dans le but de comprendre le comportement de l'hydrolyse des PDMMLAs. Le développement de biomatériaux permettant le recouvrement de stents en contact direct avec la paroi endothéliale lors de l'athéro-thrombose, leur biocompatibilité est nécessaire pour la réparation de la paroi artérielle afin d'inhiber les processus multiples de la resténose artérielle après la pose d'un stent. Ces propriétés ont été évaluées en utilisant un modèle cellulaire de cellules endothéliales.

Targeting VEGF-A with a vaccine decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis

Luca Semerano^{1,2,3} · Emilie Duvallet^{1,2} · Nadia Belmellat^{1,2} · Nicolas Marival^{2,4} · Nicolas Schall⁵ · Maëlle Monteil^{2,6} · Géraldine Grouard-Vogel⁷ · Emilie Bernier⁷ · Marc Lecouvey^{2,6} · Hanna Hlawaty^{2,4} · Sylviane Muller⁵ · Marie-Christophe Boissier^{1,2,3} · Eric Assier^{1,2}

Received: 2 March 2015 / Accepted: 16 September 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract

Objectives Inflammation and angiogenesis are two tightly linked processes in arthritis, and therapeutic targeting of pro-angiogenic factors may contribute to control joint inflammation and synovitis progression. In this work, we explored whether vaccination against vascular endothelial growth factor (VEGF) ameliorates collagen-induced arthritis (CIA).

Methods Anti-VEGF vaccines were heterocomplexes consisting of the entire VEGF cytokine (or a VEGF-derived peptide) linked to the carrier protein keyhole limpet hemocyanin (KLH). Two kinds of vaccines were

separately tested in two independent experiments of CIA. In the first, we tested a kinoid of the murine cytokine VEGF (VEGF-K), obtained by conjugating VEGF-A to KLH. For the second, we selected two VEGF-A-derived peptide sequences to produce heterocomplexes (Vpep1-K and Vpep2-K). DBA/1 mice were immunized with either VEGF-K, Vpep1-K, or Vpep2-K, before CIA induction. Clinical and histological scores of arthritis, anti-VEGF, anti-Vpep Ab titers, and anti-VEGF Abs neutralizing capacity were determined.

Results Both VEGF-K and Vpep1-K significantly ameliorated clinical arthritis scores and reduced synovial inflammation and joint destruction at histology. VEGF-K significantly reduced synovial vascularization. None of the vaccines reduced anti-collagen Ab response in mice. Both VEGF-K and Vpep1-K induced persistently high titers of anti-VEGF Abs capable of inhibiting VEGF-A bioactivity.

Luca Semerano and Emilie Duvallet have contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10456-015-9487-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Marie-Christophe Boissier
marie-christophe.boissier@avc.aphp.fr

Luca Semerano
luca.semerano@avc.aphp.fr

Emilie Duvallet
duvallet.emilie@gmail.com

Nadia Belmellat
belmellat.nadia@univ-paris13.fr

Nicolas Marival
nmarival@yahoo.fr

Nicolas Schall
N.Schall@ibmc-cnrs.unistra.fr

Maëlle Monteil
maelle.monteil@univ-paris13.fr

Géraldine Grouard-Vogel
gvogel@neovacs.com

Emilie Bernier
ebernier@neovacs.com

Marc Lecouvey
marc.lecouvey@univ-paris13.fr

Hanna Hlawaty
h.hlawaty@smbh.univ-paris13.fr

Sylviane Muller
s.muller@ibmc-cnrs.unistra.fr

Eric Assier
eric.assier@univ-paris13.fr

¹ Inserm UMR 1125, Sorbonne Paris Cité - Université Paris 13, 74, rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France

² Sorbonne Paris Cité - Université Paris 13, 74 rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny, France

Conclusion Vaccination against the pro-angiogenic factor VEGF-A leads to the production of anti-VEGF polyclonal Abs and has a significant anti-inflammatory effect in CIA. Restraining Ab response to a single peptide sequence (Vpep1) with a peptide vaccine effectively protects immunized mice from joint inflammation and destruction.

Keywords VEGF · Peptides · Vaccines · Inflammation · Arthritis

Introduction

Angiogenesis is a key process in rheumatoid arthritis (RA) pathophysiology [1, 2]. The formation of new vessels from preexisting ones allows the delivery of oxygen, nutrients, and the influx of inflammatory cells in the developing synovial pannus. In RA, inflammation and angiogenesis are two closely related processes. Many inflammatory mediators exert significant pro-angiogenic action [3–5], while pro-angiogenic factors, as vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietins, up-regulate several pro-inflammatory pathways leading to leukocytes recruitment, infiltration, and secretion of inflammatory mediators [6]. Selective targeting of pro-inflammatory cytokines, or of cells involved in their productions, gave unprecedented results in RA management [7]. Conversely, angiogenesis-targeting treatments only held intriguing preclinical results in arthritis models. Human VEGF-A gene encodes multiple isoforms composed of 121, 145, 165, 189, and 206 amino acids, with overlapping functions due to differential binding to the three different VEGF receptors and co-receptors like neuropilins [8]. VEGF-165 is considered the major player in both physiological and pathological angiogenesis [9]. Experimental evidence supports the notion that VEGF might be endowed with a pro-inflammatory activity in arthritis. Hence, VEGF/VEGF-R system blockade may prove useful for arthritis treatment. VEGF-A and VEGF-R are expressed during collagen-induced arthritis (CIA), and their levels correlate with disease severity and histological

scores of synovial vascularization [10, 11]. VEGF gene transfer aggravates, while anti-VEGF antiserum could delay synovitis onset in mice CIA [10, 12]. Similar results were obtained with anti-VEGF-R1 antibodies in K/BxN mice spontaneous arthritis model [13].

Active anti-cytokine immunization is a potential alternative strategy to monoclonal antibodies (mAbs) to block cytokines involved in disease processes [14]. The aim is to induce the endogenous production of polyclonal anti-cytokine Abs. We have contributed to the development of active anti-TNF vaccination from proof of concept to clinical trial in RA [14–16]. The vaccine is called kinoid of TNF (TNF-K) and is a heterocomplex of the cytokine conjugated to a carrier protein, the keyhole limpet hemocyanin (KLH). Kinoids lead to rupture of tolerance of quiescent cytokine-specific B cells, thereby inducing a polyclonal anti-cytokine Ab response. In principle, kinoids may be obtained from any cytokine of interest.

Bevacizumab is an anti-human VEGF-A monoclonal antibody used for treating several metastatic and non-metastatic solid cancers [17]. A previous report showed that the kinoid of human VEGF-A was as effective as bevacizumab for suppressing tumor angiogenesis and metastases in implanted solid human tumors in mice with severe combined immunodeficiency [18]. Conversely, the potential role of anti-VEGF active immunization in RA is hitherto unexplored.

Here, we report the protective effect on CIA of active immunization targeting VEGF in two sets of experiments. In the first, we elicited an anti-VEGF Ab response by immunizing mice with the kinoid of the entire murine VEGF-A molecule (VEGF-K). In the second, we first identified, inside the VEGF-A molecule, two peptide sequences potentially relevant for VEGF biological activity (Vpep1 and Vpep2). We then immunized the mice with the two distinct peptide vaccines obtained by conjugation of each peptide to KLH in the corresponding heterocomplexes (Vpep1-K and Vpep2-K, respectively). We could show that both immunization strategies induced anti-VEGF Ab response and decreased joint inflammation and destruction in CIA.

Materials and methods

Selection of the peptide derivatives of mouse VEGF-A

The two peptides were chosen in the sequence of the murine VEGF-164 isoform. Murine VEGF-164 shares 90 % identity and 93 % homology with its human counterpart VEGF-165 [19]. VEGF-165 has been recognized as the most potent stimulators of angiogenesis. The choice of Vpep1 (SRCECRPKKDRTPEN, position 98–113) was

³ Service de Rhumatologie, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP) Groupe hospitalier Avicenne - Jean Verdier – René Muret, 125 rue de Stalingrad, 93000 Bobigny, France

⁴ Inserm UMR 1148, 74 rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny, France

⁵ CNRS, Immunopathologie et chimie thérapeutique/ Laboratory of excellence Medalis, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67000 Strasbourg, France

⁶ CNRS UMR 7244, 74 rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny, France

⁷ Néovacs SA, 14 Impasse Reille, 75014 Paris, France

based in part on previous publications that describe the competitive inhibition of VEGF activity of a large peptide defined in the human VEGF-165 sequence (position 111–165) [20]. Vpep1 was chosen upstream of this sequence at the limit of exon 5. This sequence is common to both VEGF-188 and VEGF-120 isoforms. The choice of the small peptide Vpep2 (RCDKPRR, position 158–164) is based on the previous work on the use of a peptide homologous with anti-angiogenic properties [21]. Moreover, the tridimensional structure of murine VEGF-164 was recently described by Parker and co-workers [19, 22] who confirmed the essential role of the arginine residue 164 for VEGF binding to its co-receptor neuropilin-1 (NP1) [23].

Peptide synthesis

Peptides were synthesized using a classical Fmoc (*N*-[9-fluorenyl] methoxycarbonyl) solid-phase chemistry and purified by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). Peptides homogeneity was checked by analytical HPLC, and their identity assessed by LC/MS on a Finnigan LCQ Advantage Max system (Thermo Fischer Scientific). Peptides' purity was higher than 90 %.

Vaccines preparation

Murine VEGF-A was purchased from Peprotech (Neuilly-sur-Seine, France), and KLH was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Conjugation of VEGF to KLH to prepare VEGF-K was previously described [18]. Peptide vaccines were prepared as follows: Briefly, the peptides and maleimide-activated KLH (ThermoScientific, 77605) in phosphate-buffered saline (PBS) were incubated for 2 h at room temperature while maintaining the pH at 6.8 (molar ratio of peptide/KLH = 400:1). Cysteine was then added for 1 h at room temperature to neutralize remaining reactive maleimide groups on KLH (molar ratio of cysteine/KLH = 1:1). The cysteine residue in C-5 position of Vpep1 was changed during the synthesis for a serine residue (SRCESRPKDKRTKPEN) to ensure specific coupling of KLH to C-3 cysteine residue. The resulting heterocomplex was named Vpep1-K (Vpep1-KLH). Vpep2-K (Vpep2-KLH) is the result of Vpep2 coupling to KLH via the cysteine residue in position 2. The heterocomplexes (Vpep1-K and Vpep2-K) were then dialyzed through a 10-kD membrane against PBS, pH 7.4, to remove the peptides in excess and free cysteine.

Anti-VEGF Ab titers and VEGF-R binding assays

Serum anti-VEGF Ab titer was assessed by ELISA. Briefly, microtitration plates were precoated with recombinant

murine VEGF-A (Peprotech, 450-32) and subsequently mice sera (1/500 starting dilution) were incubated in the plates. Anti-VEGF IgGs were detected by a rabbit anti-mouse IgG (H + L) linked to horseradish peroxidase (Zymed, 61-6520), revealed after incubation with its OPD substrate (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and read at 490 nm.

Inhibition of VEGF-A binding to VEGF-R2 by serum of VEGF-K-immunized mice was also tested by ELISA, using precoated plates with 50 ng of VEGF-R2 per well (R&D systems). Plates were incubated with hyperimmune sera (1/100 starting dilution) and VEGF. VEGF binding was detected by an anti-mouse VEGF Ab linked to Biotin (R&D systems, BAF493), revealed by streptavidin-HRP (Southern Biotech, 7100-05) and OPD substrate (Sigma-Aldrich) and read at 490 nm. The neutralizing activity is expressed as the reciprocal of the highest serum dilution giving 50 percent inhibition of VEGF-A binding to VEGF-R2.

VEGF bioassay

VEGF-A activity was assessed by HUVEC proliferation assay. HUVEC cells (5×10^3) were seeded in as described elsewhere [24]. Cell proliferation was measured by [3 H]thymidine incorporation. The neutralizing titer is expressed as the reciprocal of the highest serum dilution that neutralizes 50 % of VEGF-A activity, calculated from duplicate measurements.

Anti-VEGF-A-derived peptides assay

Polyvinyl plates (Falcon 3912, Oxnard, CA) were coated overnight at 37 °C with Vpep1 or Vpep2 peptides (2 μM) in 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6). After washing plates and saturation with PBS containing 0.05 % (v/v) Tween (PBS-T) and 1 % (w/v) BSA (PBS-T-BSA), mouse sera diluted 1:2000 in PBS-T were added to coated plates for 1 h. After washing plates, horseradish peroxidase-coupled goat anti-mouse IgG (1:20,000 in PBS; Jackson Immuno Research) was added to plates for 30 min at 37 °C. The peroxidase substrate H₂O₂ and the chromogen 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB) were then added for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding HCl 1 M, and absorbance was measured at 450 nm.

Mice

For each experiment, 40–48 DBA/1 (haplotype H-2q) male mice, susceptible to CIA, were purchased from R. Janvier Laboratory (Le Genest Saint-Isle, France). They were aged between 4 to 6 and housed 1 week before the beginning of the study. After weighing, mice were distributed in treatment groups and bred in mixed cages.

Collagen-induced arthritis

Arthritis was induced in DBA/1 mice by using a 1:1 emulsion of bovine type II collagen (CIIb, 50 µg/mice) and Complete Freund Adjuvant (CFA, Difco, France) on day 0 (total volume injected in the tail 100 µL). A boost was given on day 21 by using 100 µL of a 1:1 emulsion of CIIb (50 µg/mice) and Incomplete Freund Adjuvant (IFA, Difco, France). Arthritis onset occurs around 30–35 days after the first collagen injection [25].

Assessment of experimental arthritis

Mice were monitored for evidence of arthritis in their four paws using a blind procedure (16). For each mouse, the clinical severity of arthritis was scored (0, normal; 1, erythema; 2, swelling; 3, deformity; and 4, ankylosis) in 10 joints or group of joints: three joints of the two hind limbs (toes, tarsus, and ankle) and two joints of the two forelimbs (digits, wrist). The maximum score reached for each of the 10 joints was 4, so the individual maximum arthritis clinical score on a given day was 40. The mean arthritic score on each days of clinical observation was calculated for each group of treatment and is represented in Fig. 3a, b.

Mouse anti-collagen type II antibody ELISA

Serum anti-collagen type II Ab production was assessed by ELISA. Anti-CII total IgGs were evaluated in the first study (whole VEGF vaccine study), whereas IgG1 and IgG2a isotypes of anti-CII Ab were evaluated in the second study (VEGF peptides study). After CIIb adsorption on microtitration plates, mice sera (1/1000 dilution) were incubated on coated plates. Anti-CIIb IgGs were detected by either a goat anti-mouse IgG linked to alkaline phosphatase, or a goat anti-mouse IgG1 or IgG2a linked to alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), revealed after incubation with its PNP substrate and read at 405 nm. Sera of severely arthritic mice from previous experiments were used as positive controls.

Histological assessment of arthritis

In both sets of experiments, two limbs (right forelimbs and left hind limbs or vice versa in different single experiments) were collected, fixed, decalcified, dehydrated, and set in paraffin blocks. Slides of 7 µm thickness were stained with hematoxylin and eosin before microscopic observation (optical microscope). At least four serial sections were cut from each paw to ensure extensive evaluation of the arthritic joints. Each joint was evaluated at 40× magnification. At least ten fields per section were

evaluated. In each joint, two parameters were separately assessed using a four-point scale (0–3, where 0 indicated a normal joint and 3 maximally severe arthritis).

The first parameter was inflammation as reflected by synovial membrane thickness (synovial proliferation) and inflammatory cells infiltration. Inflammation was scored as follows: 0: no synovial proliferation and no inflammatory cells infiltration; 1: limited or absent synovial proliferation with inflammatory cells infiltrating ≤5 % of synovial membrane; 2: synovial proliferation with inflammatory cells infiltrating between 5 and 50 % of synovial membrane; 3: massive synovial proliferation with inflammatory cells infiltrating >50 % of synovial membrane. The second parameter was joint destruction (bone erosions, cartilage thickness, and cartilage unevenness). Joint destruction was quantified as follows: 0: no bone erosions, smooth cartilage surface with conserved thickness; 1: the presence of cartilage erosion or unevenness, or thinning involving ≤50 % of cartilage surface with absent or single bone erosion; 2: multiple cartilage erosions or cartilage thinning involving >50 % of cartilage surface, and/or >1 bone erosions involving ≤50 % of articular surface; 3: complete derangement of articular structure. For prevalence determinations, histological inflammation or destruction was defined as an inflammation or destruction score ≥0.5.

Assessment of synovial vascularization

Endothelial cells inside the synovium were detected using *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* Lectine I (GSL 1-isolectin B4) immunohistochemical staining with the streptavidin–biotin peroxidase complex method. Knee joint slides were deparaffinized in xylene and dehydrated through serially diluted ethanol solutions down to distilled water. After blocking endogenous peroxidase activity in blocking solutions for 1 h, the slides were pretreated with blocking serum and then incubated with GSL 1-isolectin B4 (20 µg/mL) for 1 h at room temperature. Then, the slides were incubated with goat antibody to GSL 1-isolectin B4 (10 µg/mL) for 1 h, washed, and incubated with biotinylated rabbit anti-goat immunoglobulins (4 µg/mL) for 30 min in moist chamber at room temperature. The samples were incubated with streptavidin–peroxidase for 10 min using diaminobenzidine tetrahydrochloride as the chromogen. Between each step, the slides were washed three times for 5 min with TBS. They were counterstained by incubation with hemalun for 40 s and mounted with glycerol. All reagents were obtained from Dako (Trappes, France) apart from GSL-1 and antibody against GSL-1, which were obtained from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). For each mouse, three non-serial sections from each knee were studied. Vessel quantification was performed in real time on each section at ×400

magnification with a Zeiss Observer D1 microscope equipped with a motorized stage connected to Histolab software (Microvision, Les Ulis, France), which allows direct morphometric analysis on histological sections. Any GSL-1 stained group of cells with or without a lumen (in the latter case with a diameter $\geq 4 \mu\text{m}$) was considered as an individual vessel. Moreover, any group of cells with a lumen containing red blood cells was considered as a vessel, independent of GSL-1 staining. Conversely, single GSL-1-stained disperse cells were not counted as vessels. Synovial vascular density was calculated as follows: First, the average surface of normal synovium was calculated from several sections of non-arthritic joints. This allowed to calculate an average rectangular area of 153,376 square micrometers (0.150 mm^2), corresponding to a third of normal synovial surface. For each joint section, this rectangular area was placed in the middle of the synovium, and each vessel falling within this area was counted. The number of vessels was divided by the area of the rectangle.

Treatments

Anti-VEGF (entire cytokine) immunization

Immunizations were performed with the kinoid of murine VEGF-A (VEGF-K) emulsified at a 1:1 volume ratio in IFA (Difco, France). Immunized mice ($n = 10$) received 5 VEGF-K intramuscular injections ($17.5 \mu\text{g}$ then $8.5 \mu\text{g}$) at days -40 , -33 , -12 , 9 , and 48 of the experiment (Fig. 3a). Emulsions were prepared in 15-mL sterile polypropylene tubes (Greiner) just before the injections ($100 \mu\text{L}/\text{mice}$).

As negative control, mice received a 1:1 emulsion of either KLH ($8.75 \mu\text{g}$ then $4.4 \mu\text{g}/\text{IFA}$) or PBS/IFA. KLH and PBS were administered on the same time schedule as VEGF-K or Vpep-Ks in the entire cytokine (Fig. 3a) and in the peptide vaccine (Fig. 3b) experiments, respectively.

Anti-VEGF-derived peptides immunization

Mice received 5 intramuscular injections ($100 \mu\text{L}$) at days -36 , -22 , -8 , 7 , and 37 with KLH-coupled peptides (Vpep1-K or Vpep2-K, $100 \mu\text{g}/\text{mouse}$), or negative control preparations ($50 \mu\text{g}$ KLH or PBS/mouse) emulsified in IFA, on the same time schedule.

Statistical analysis

Data distribution was preliminarily checked by the Kolmogorov–Smirnov test. According to data distribution, values are expressed as mean and standard deviation or median and interquartile range, unless otherwise specified. According to data distribution and number of comparison groups, a parametric (ANOVA) or nonparametric

(Kruskal–Wallis) test was used. Serial measurements of clinical scores were analyzed considering the area under the curve (AUC) for each subject as a summary measure; these measures were then analyzed as raw data for inter-group comparison (ANOVA). Difference in arthritis onset was calculated with ANOVA. For each mouse, the arithmetic mean of histological scores of inflammation and destruction of the two analyzed limbs was calculated and used as raw measure for inter-group comparison (Kruskal–Wallis). Post hoc comparisons were performed with the appropriate test according to data distribution (Student–Newman–Keuls for parametric data, corrected Mann–Whitney test for nonparametric data). Pearson’s correlation was used to correlate histological scores and the AUC of clinical scores for each mouse.

For individual Ab titers, the AUC was calculated and used as a summary measure for Ab response comparison. All statistical analyses were performed with MedCalc software version 10.4 (MedCalc Software bvba, Belgium).

Results

Induction of specific anti-VEGF-A antibody response

Anti-VEGF-A immunization

VEGF-K triggered an Ab response to VEGF-A in immunized mice, while no anti-VEGF-A response was detectable in other groups (Fig. 1a). The geometric mean of anti-VEGF Ab titer (expressed as the reciprocal of the serum dilution) calculated from value distribution in each individual mouse was $19,939 \pm 8122$.

Hyperimmune sera drawn at kill inhibited the proliferation of HUVEC in culture, with serum IC₅₀ ranging from 1/250 to 1/2500 from 6 out of 10 VEGF-K-immunized mice (Fig. 1b). The anti-VEGF neutralizing capacity of the hyperimmune sera was further confirmed by blockade of the binding of VEGF to its VEGF-R-2, as assessed by ELISA (Fig. 1c). The geometric mean of inhibiting titer calculated from value distribution in each individual mouse was 808 ± 599 .

Anti-VEGF-A-derived peptides immunization

Immunization with VEGF-A-derived peptides induced peptide-specific Ab response (Fig. 2). As expected, the Abs induced by a specific peptide did not cross-react with the other peptide (i.e., Abs against the peptide Vpep1 do not recognize Vpep 2 and inversely, Fig. 2a, b).

We then evaluated the capacity of peptide vaccines to induce an Ab response capable of recognizing the entire

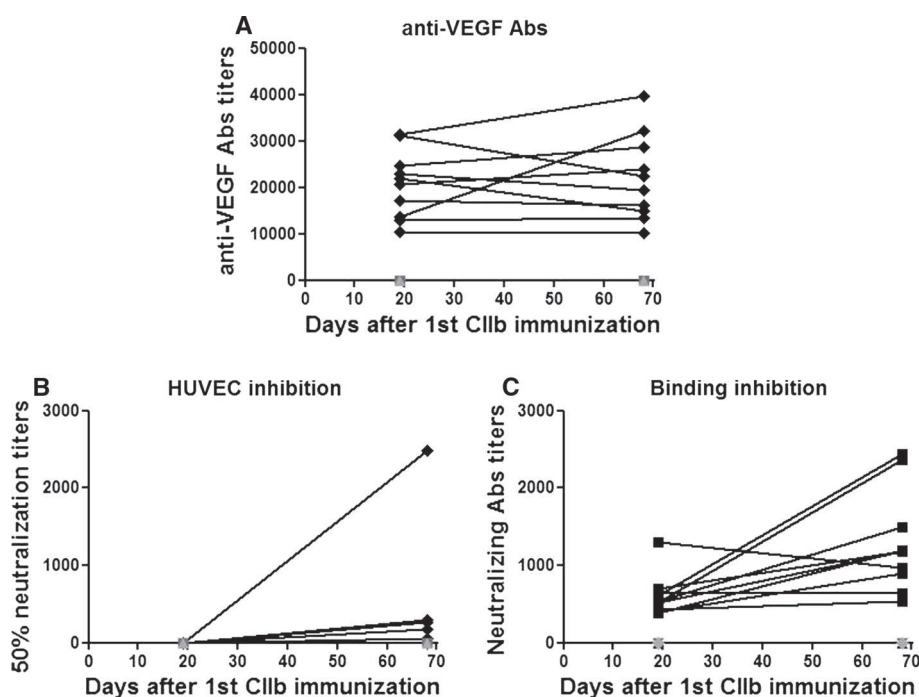


Fig. 1 Induction of anti-VEGF Ab response by VEGF-K immunization. As a result from blood draws at day 19 and 68 (see “Materials and methods”), only VEGF-K-treated mice produced persistently high titers of anti-VEGF Abs, while no anti-VEGF Ab response was detected in the other groups (Kruskal–Wallis test with subsequent post hoc comparisons on the AUC of Ab titers for each individual animal). In **a** Ab titers variations in individual mice are reported

(black diamonds). In **b** HUVEC inhibiting anti-VEGF titers distribution and variation (black diamonds) are shown. In **c** receptor inhibiting anti-VEGF Ab titers distribution and variations are shown. Only VEGF-K (black diamonds) shows inhibiting capacity on HUVEC proliferation. Conversely, PBS (light-gray triangles) and KLH (dark-gray squares) exerted no inhibition

cytokine VEGF-A, in order to block its activity. As shown in Fig. 2c, immune sera from both Vpep1-K- and Vpep2-K-immunized mice recognized the whole cytokine in a similar manner. Conversely, immune sera from KLH-immunized mice did not recognize the VEGF-A peptides (Vpep1 and Vpep2) or the entire cytokine. Additionally, hyperimmune sera drawn at kill from Vpep1-K-immunized mice inhibited murine VEGF-A bioactivity on HUVEC in culture. Sera from 10 out of 13 Vpep1-K-immunized mice exerted measurable inhibition on HUVEC viability after 24 h of culture (see supplementary material 1).

Effect of VEGF-A blockade with active immunization on arthritis

Anti-VEGF-A immunization (entire cytokine)

As expected, in negative control groups (KLH and PBS), arthritis rapidly developed after the second CIIb immunization. Conversely, VEGF-K treatment resulted in significantly lower clinical arthritis scores versus both controls ($p < 0.05$, Fig. 3a), with an increase in clinical scores at the end of the experiment. The global effect of VEGF-K immunization was then a right shift of clinical

score curves corresponding to a significantly delayed arthritis onset versus both control groups (34.1 ± 7.1 , 26.1 ± 4.7 , 24.1 ± 5.0 for VEGF-K, KLH, and PBS, respectively, $p < 0.05$) without reduced maximal clinical index (A_{max}). The weight of VEGF-K-treated mice was comparable to both negative controls all along the experiment, suggesting good tolerance of the treatment. These results were confirmed in a total of three independent experiments.

Anti-VEGF-A-derived peptides immunization

Vpep1-K-immunized mice had milder clinical scores of arthritis versus negative control groups ($p < 0.05$), whereas no protection was conferred by Vpep2-K (Fig. 3b). Vpep1-K group displayed delayed onset of clinical signs (34.2 ± 5.6 , 29.1 ± 3.1 , 29.7 ± 4.0 days, respectively, for Vpep1-K, KLH, and PBS, $p < 0.05$) and no lower A_{max} versus controls.

Effect on humoral immune response

In both sets of experiments, anti-CIIb antibodies were evaluated in each mouse’s sera by ELISA. The treatment

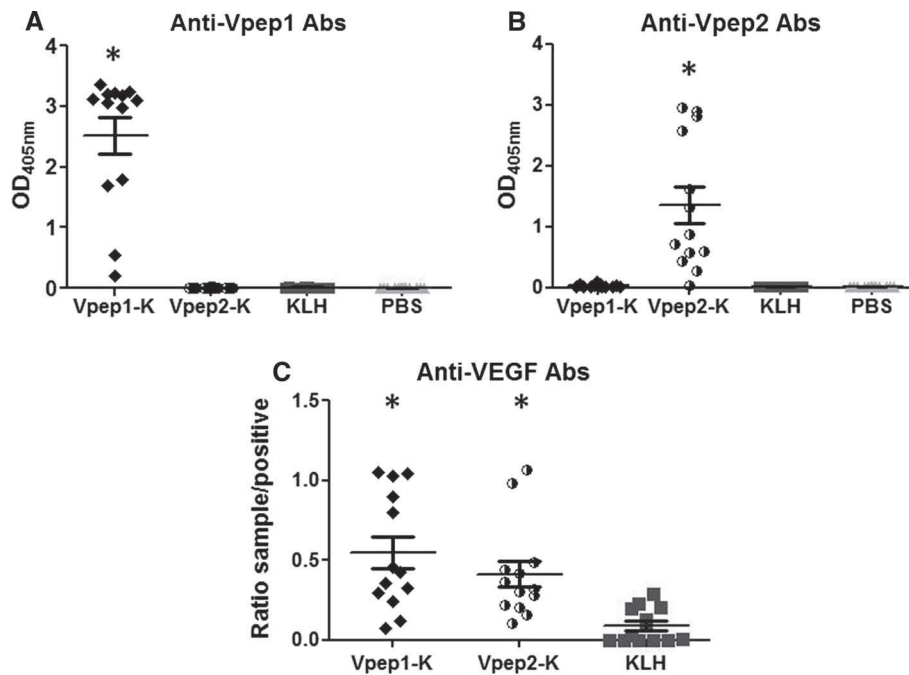


Fig. 2 Induction of peptide- or cytokine-specific Ab response in Vpep1-K- and Vpep2-K-immunized mice. Recognition of the immunizing peptides Vpep1 (a), Vpep2 (b), and of the whole VEGF-A cytokine by hyperimmune sera from Vpep1-K- and Vpep2-K-treated mice, as tested by ELISA (1/100 dilution). Vpep1 (a) and Vpep2 (b) are recognized only by hyperimmune sera from mice immunized with Vpep1-K and Vpep2-K, respectively. c Sera from both Vpep1-K- and Vpep2-K-immunized mice recognize the native VEGF-A

cytokine. Sera were obtained by cardiac puncture at kill. The ability for Abs contained in these sera to recognize the whole VEGF-A cytokine was evaluated by ELISA. Mice sera were diluted 1/100. Vpep1-K (black diamonds), Vpep2-K (black-and-white circles), KLH (black squares), PBS (light-gray triangles). * $p < 0.05$ versus KLH (Kruskal–Wallis test with subsequent post hoc comparisons on the AUC of Ab titers for each individual animal)

with either VEGF-K, Vpep1-K, or Vpep2-K did not alter either total IgG, or IgG1, or IgG2a anti-CIIb antibody levels (Fig. 4a–c, respectively), suggesting that early treatment of mice with anti-VEGF immunogens does not affect anti-CIIb Ab response.

Effect of anti-VEGF-A and anti-VEGF-A-derived peptides immunization on histological inflammation and destruction

At necropsy, histological scores of joint inflammation and destruction were attributed in a blind fashion for each mouse. In their respective set of experiments, mice immunized with VEGF-K and with Vpep1-K had significantly lower histological inflammation and destruction versus both controls (Fig. 5).

Mice immunized with VEGF-K showed lower inflammation (1.04 ± 0.17 , 1.80 ± 0.25 , 2.08 ± 0.20 for VEGF-K, KLH, and PBS, respectively, $p < 0.05$, Fig. 5a) and destruction scores (1.03 ± 0.18 , 1.77 ± 0.24 , 2.13 ± 0.22 for VEGF-K, KLH, and PBS, respectively, $p < 0.05$ Fig. 5b) versus controls. This experiment was independently repeated twice with similar results. Mice immunized with Vpep1-K showed significantly lower histological

inflammation (1.03 ± 0.25 , 1.97 ± 0.20 , 2.23 ± 0.20 for, respectively, Vpep1-K, KLH, and PBS, $p < 0.05$, Fig. 5c) and destruction (0.66 ± 0.17 , 1.45 ± 0.23 , 1.67 ± 0.19 for, respectively, Vpep1-K, KLH, and PBS, $p < 0.05$, Fig. 5d) versus both control groups. Representative examples are shown in Fig. 6.

In both sets of experiments, for each individual mice, destruction and inflammation scores showed good and significant correlation with the AUC of clinical scores ($r = 0.64$, $p < 0.01$ for inflammation-clinical scores AUC and $r = 0.60$, $p < 0.001$ for destruction-clinical AUC, respectively, for VEGF-K; $r = 0.70$, $p < 0.01$ for inflammation-clinical scores AUC and $r = 0.63$, $p < 0.05$ for destruction-clinical scores AUC for Vpep1-K, respectively).

Effect of anti-VEGF-A and anti-VEGF-A-derived peptides immunization on synovial vascularization

Mice immunized with VEGF-K showed significantly lower synovial vascular density versus both KLH and PBS ($p < 0.05$, Fig. 7a, and supplementary Fig. 2). Mice immunized with Vpep1-K had numerically less vessels per

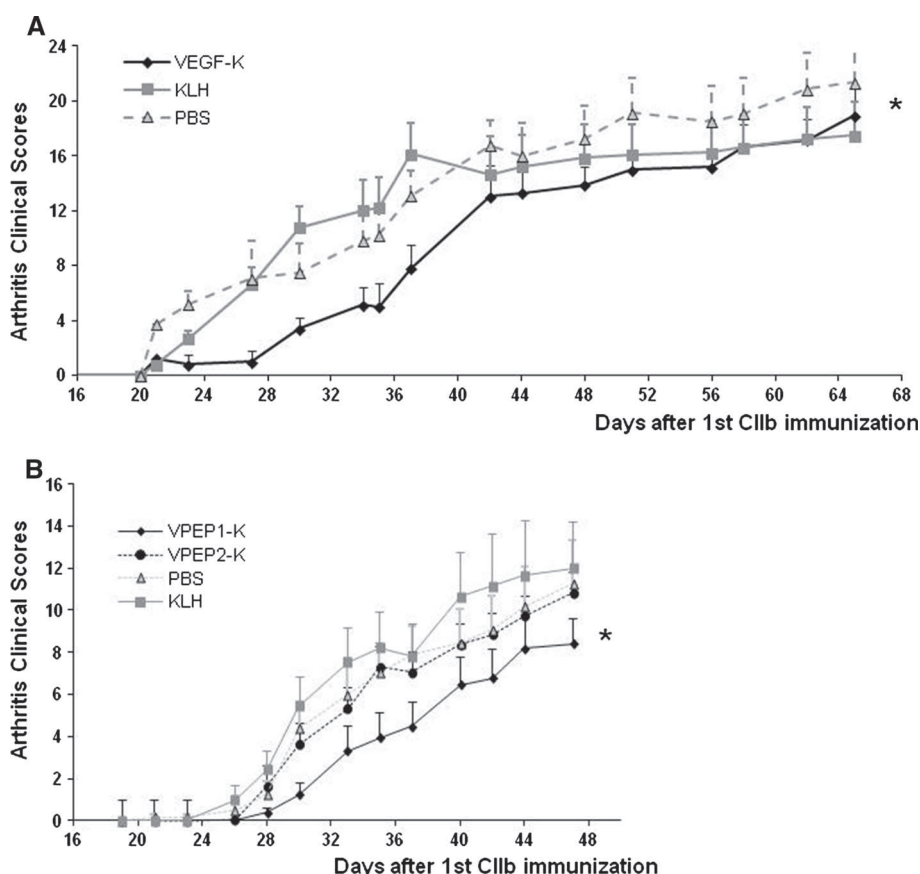


Fig. 3 Effect of active anti-VEGF-A immunization on clinical scores of CIA. Day 0 is considered the day of the first administration of CIIb. **a** Outlines the experimental design of the experiment with the kinoid of the entire VEGF cytokine (VEGF-K). Each treatment group comprised 10 mice. The experimental design of the experience with the peptide heterocomplexes (Vpep1-K and Vpep2-K) is outlined in **b**. Each treatment group comprised 12 mice. Compared to controls (PBS: gray triangles, gray dotted line; KLH gray squares, gray continuous line), immunization with VEGF-K (black diamonds, black

continuous line in **a**) or Vpep1-K (black diamonds, black continuous line in **b**) resulted in significantly lower arthritis scores. Vpep2-K group (black circles, black dotted line in **b**) did not differ from controls. The asterisk indicates a statistically significant difference in clinical scores between treatment groups on the whole duration of the experiments. The differences are calculated with ANOVA, with the area under the curve (AUC) of the clinical scores for each animal as raw value. $*p < 0.05$ versus both PBS and KLH

synovial surface versus Vpep2-K, KLH, and PBS, but this difference did not attain significance (Fig. 7b).

Discussion

Here, we demonstrate for the first time the anti-inflammatory effect of active immunization targeting VEGF-A in an experimental model of RA.

Mice immunization with either VEGF-K (the whole cytokine vaccine) or Vpep1-K (the peptide vaccine) induces anti-VEGF-A Abs production and results in delayed arthritis onset and lower articular inflammation and destruction versus controls.

Moreover, in each individual mouse, the AUC of clinical scores showed a good correlation with histological scores of both inflammation and destruction, which

supports the validity of these results, both at the group and at the individual level. Both the Ab response and clinical and histological results were consistent and reproducible across independent experiments.

Both VEGF-K and Vpep1-K immunization inhibited VEGF-A bioactivity. Only VEGF-K significantly reduced synovial vascularization. Vpep1-K also seemed to reduce synovial vessels density versus controls, but this difference did not reach significance, probably because in Vpep1-K experiments all mice developed less severe arthritis and had lower synovial vessels counts compared to the experiments with VEGF-K.

Both vaccines were well tolerated by animals, as reflected by mice weight and mortality rates, not different from controls. Anti-VEGF-A immunization may control histological inflammation and destruction probably in virtue of both an anti-angiogenic and an anti-

Fig. 4 Anti-collagen Ab production in vaccinated and control mice. In both the animals vaccinated with the entire cytokine vaccine (in **a** anti-CII total IgG) and in those vaccinated with the peptidic vaccine (in **b** IgG1 anti-CII; in **c** IgG2a anti-CII), the anti-CII Ab production did not differ from control mice (Kruskal–Wallis test with subsequent post hoc comparisons on the geometric mean of Ab titers for each individual animal). VEGF-K (black diamonds), Vpep1-K (black circles), Vpep2-K (black-and-white circles), KLH (black squares), and PBS (light-gray triangles)

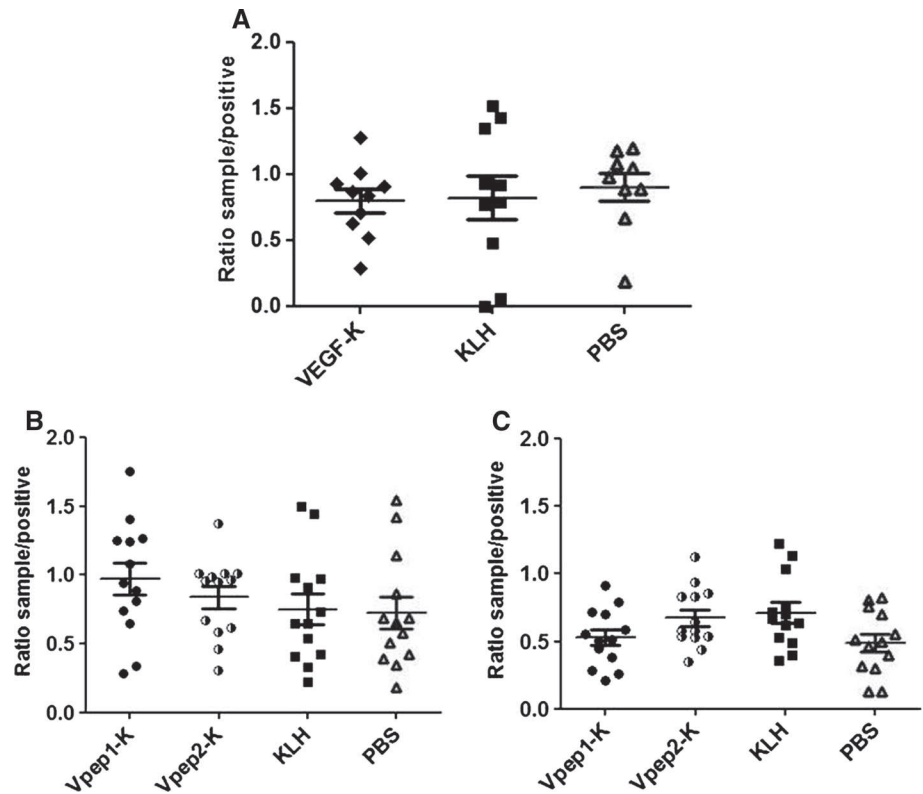
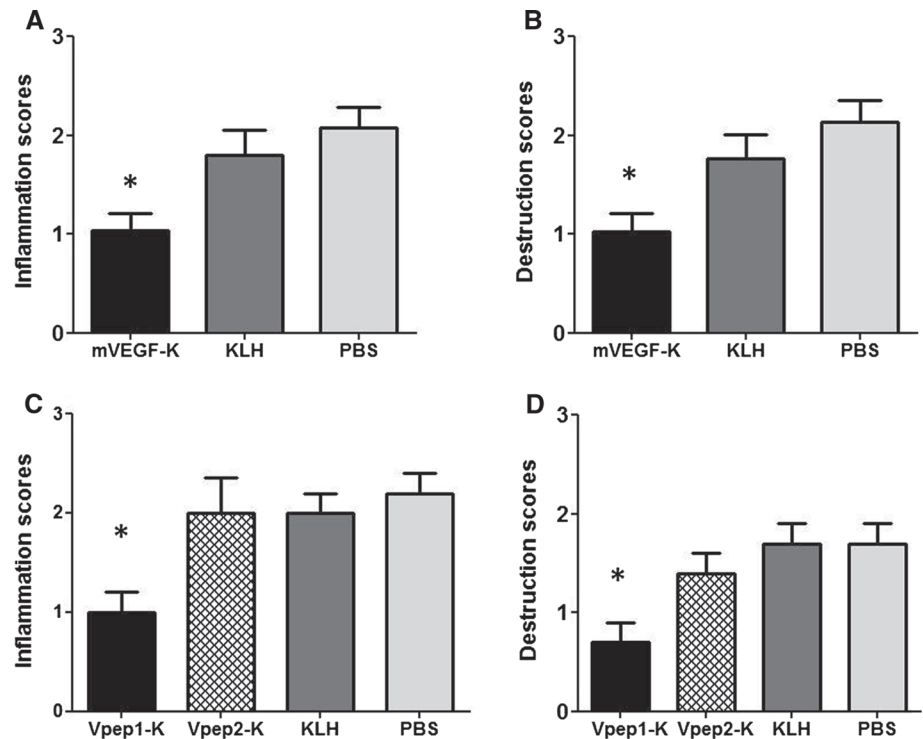


Fig. 5 Effect of active anti-VEGF-A immunization on histological scores of CIA. Both VEGF-K (black histograms **a**, **b**) and Vpep1-K (black histograms **c**, **d**) immunization resulted in significantly lower histological inflammation (**a**, **c**) and destruction (**b**, **d**) scores versus PBS (light-gray histograms) and KLH (dark-gray histograms). Vpep2-K group (black-and-white diamond pattern in **c**, **d**) did not differ from controls. * $p < 0.05$ versus both PBS and KLH (Kruskal–Wallis test with subsequent post hoc comparisons)



inflammatory effect. The pro-inflammatory role of VEGF-A is not completely characterized. VEGF-R1 is expressed in monocyte/macrophages [26] and on

dendritic cells [27]. Blockade of VEGF-R1 signaling was shown to reduce macrophage reaction to LPS and IL-6 secretion [26]. VEGF and VEGF-R are expressed during

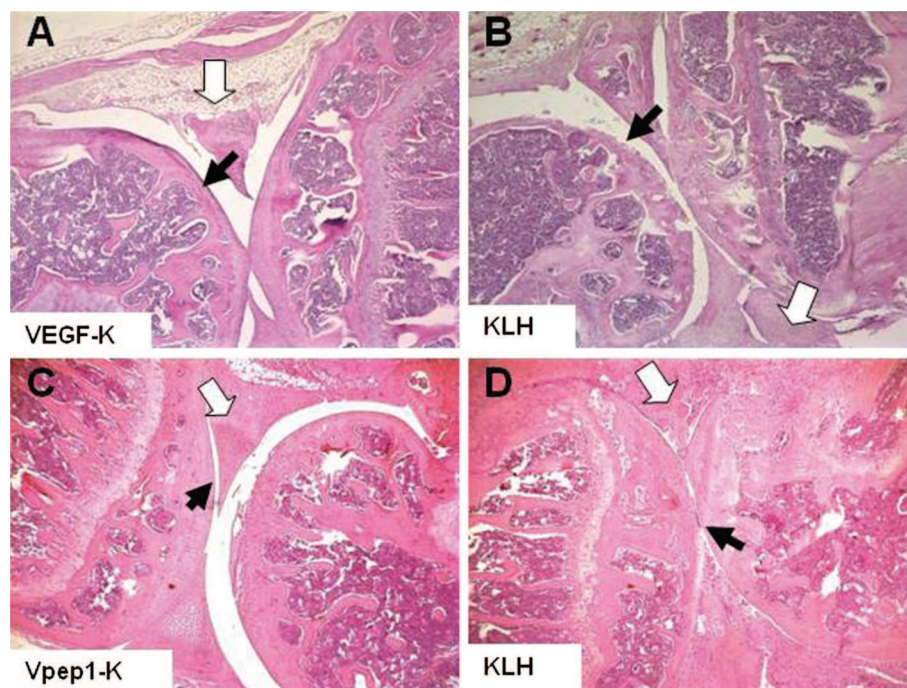


Fig. 6 Representative examples of histological sections from VEGF-K- (a), Vpep1-K- (c), and KLH-immunized mice (b, d). Each slide is a representative of the mean histological score of the corresponding group (VEGF-K, Vpep1-K, or KLH). Compared to control KLH group, both immunizations treatments (a, c) resulted in low or absent inflammatory synovitis (white arrow) and preserved articular surface

(black arrow). Conversely, in KLH-treated control mice (b, d), inflammatory synovitis (white arrow) is testified by the important leukocyte infiltration in the synovium. Structural joint damage, confirmed by joint space narrowing (d, black arrow) and cartilage and bone defects (b, d, black arrows), can be seen

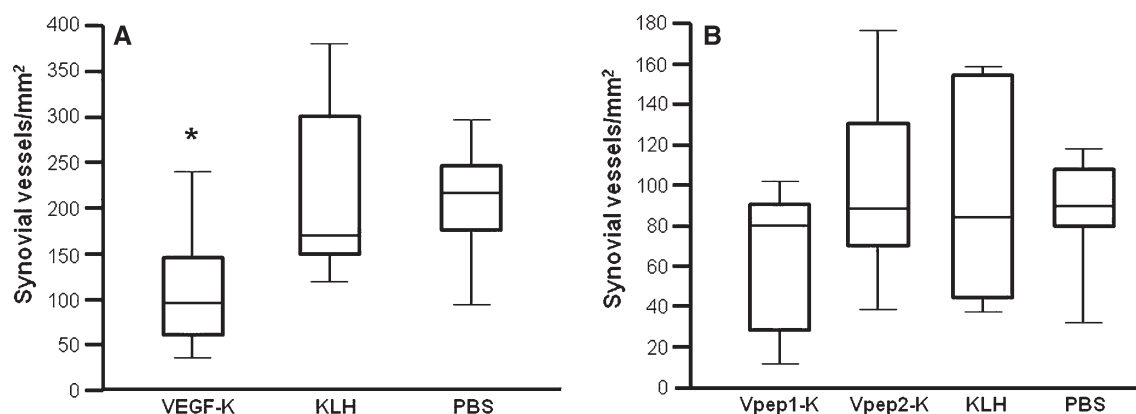


Fig. 7 Effect of anti-VEGF-A vaccines on synovial vascularization (expressed as total number of synovial vessels per square mm). Box and whiskers boxes display median and range values of synovial vessel counts for each treatment group. a VEGF-K immunization resulted in significantly lower synovial vascularization versus both

KLH and PBS ($*p < 0.05$ vs. KLH and PBS, Kruskal–Wallis test with subsequent post hoc comparisons). b Vpep1-K-immunized mice had numerically less synovial vessels versus Vpep2-K-immunized or control mice, but this difference did not reach significance

CIA, and their levels correlate with disease severity and histological scores of synovial vascularization [11]. Moreover, VEGF-A gene transfer aggravates CIA [10], whereas the disease was effectively attenuated by prophylactic administration of anti-murine VEGF rabbit antiserum [12]. Moreover, the interaction of VEGF-A

with its co-receptor NP-1 protects rheumatoid fibroblast-like synoviocytes from apoptosis and may therefore contribute to synovial pannus proliferation with an angiogenesis-independent mechanism [28]. All these elements plead in favor of potential usefulness of VEGF-A blockade in arthritis.

On the other side, it has been shown that VEGF-A might be essential to mediate regulatory T cells (Tregs) infiltration inside the tumor mass [29] via engagement of NP-1, which is highly expressed by Tregs [30]. Blockade of VEGF/VEGF-R2 signaling pathway reduces Tregs proportions and proliferation in both tumor-bearing mice and in patients with metastatic colorectal cancer [31].

In RA, Tregs function might be impaired [32]. Effective anti-TNF [33–36] and anti-IL-6R treatment [37] are associated with the restoration of Tregs function, which might be one of the mechanisms underlying the long-term efficacy of biological treatments in RA. Hence, limiting Tregs proliferation and homing into target tissues by VEGF/VEGF-R2 blockade might be a potential drawback of anti-VEGF-A strategy in RA, which deserves further investigation.

Additional drawbacks of VEGF-A inhibition, as suggested from clinical experience with bevacizumab [38], reside in potentially increased risk of hypertension, proteinuria, left ventricular dysfunction, and thromboembolic events, which should further induce to ponder the benefit/risk ratio of this therapeutic approach in arthritis.

VEGF-K immunization induced high titers of anti-VEGF-A Abs in immunized mice, while no anti-VEGF Ab response was detectable in control groups. Hyperimmune sera from VEGF-K-immunized mice were capable of inhibiting VEGF-A linking to its high-affinity VEGF-R2 and of inhibiting HUVEC proliferation. The average affinity of VEGF-K-induced polyclonal Abs has been reported to be in the 10^{-9} order of magnitude [18]. Hence, polyclonal anti-VEGF Abs can efficiently compete VEGF-A binding to VEGF-R2 (whose K_d is equal to 10^{-11}) only when high tissue Ab concentrations are achieved, which results in global high Ab avidity. The therapeutic action of vaccination-induced Abs might then rely on two factors: the capability to localize the immune response to the sites of inflammation and the wide anti-cytokine Ab repertoire (i.e., clonality) [39]. But the clonality of the Ab response can potentially be restrained to critical molecular domains for cytokine function. This can be achieved with the technique of peptide vaccination. Our group previously reported the protection from septic shock and in CIA using peptide immunogens derived from TNF- α and IL-1 β , respectively [40, 41]. More recently, an anti-IL-23-derived p19-specific peptide was used to produce a heterocomplex that was effective in CIA [42].

In the present work, we aimed at blocking VEGF with VEGF-derived peptides. Vpep1 was selected in the plasmin cleavage site of VEGF-164, a site common to two other isoforms of VEGF (120 and 188). Vpep2 was selected in VEGF-164 C-terminal domain, in a sequence described as a NP-1 binding site [19, 22, 23]. Both peptide vaccines induced an efficient Ab response capable of both

recognizing the KLH-linked specific peptide and the entire VEGF-A molecule. Nevertheless, only Vpep1-K immunization protected mice from arthritis.

Both Vpep1 and Vpep2 were selected within crucial domains for VEGF function, and both peptide vaccines induced Abs capable of recognizing VEGF. The reason why only one peptide led to a positive effect on arthritis might be due to differences in the induced Ab repertoire. Notably, Vpep1 sequence is longer than Vpep2's (16 vs 5 amino acids), which may result in wider polyclonality possibly higher avidity of the immune sera.

Compared to the whole cytokine-kinoid strategy, peptide immunization strategy shows some practical advantages, like lower costs, while in the meantime it seems to offer interesting perspectives. Peptide immunization might allow to restrain the immune response to a selected site in the molecule of interest. Moreover, it might potentially allow to target different peptides from different molecules involved in the pathological process of interest. In a recent report, passive immunotherapy with double anti-angiogenic protein (DAAP), a chimeric decoy receptor which can bind both VEGF-A and angiopoietins, had greater effect than either VEGF-A or angiopoietin blockade in CIA [43]. In the same work, the association of DAAP and anti-TNF was more effective in CIA than either strategy alone. The added value of anti-angiogenic treatments to anti-TNF is extremely relevant. Data from previous pivotal studies indirectly show that the effect size of TNF blockade on CIA outweighs that of anti-VEGF treatments [44]. Even our group could show dramatic inhibition of CIA with an anti-murine TNF monoclonal Ab [45], while in the present work arthritis was only moderately affected. Nevertheless, anti-angiogenic treatments, even if not sufficiently potent *per se*, may exert a synergistic effect in association with treatments that target pro-inflammatory pathways.

Active immunotherapy might then provide the possibility to target multiple pathological processes at the same time, e.g., by immunizing the host with heterocomplexes derived from two (or more) key pro-angiogenic and pro-inflammatory molecules.

The study has several limitations. A major limitation lays in the lack of reference murine VEGF inhibitor as positive control. Bevacizumab, an antihuman VEGF-165 monoclonal antibody, has been reported to ameliorate CIA in the rat [46] and to induce cartilage repair in a rabbit model of osteoarthritis [47]. Nevertheless, bevacizumab seems to have a very weak interaction with mouse VEGF [48] and was therefore not the pertinent control for murine CIA. Choi and co-workers [49] reported the effectiveness of intra-articular anti-VEGF-RI monoclonal Ab administration in murine CIA, but this approach was not systemic and did not target the VEGF molecule directly. Finally, Yoo et al. [50] inhibited murine CIA with a hexapeptide

that blocked the interaction between VEGF and its receptors. Nevertheless, this peptide convincingly inhibited the interaction of human VEGF-165 with its receptor resulting in HUVEC proliferation and inhibition of VEGF-dependent production of TNF and IL-6 from human PBMC. Nevertheless, the interaction of the hexapeptide with murine VEGF was not tested.

Another limitation of our study is the absence of experiments showing that serum transfer from vaccinated mice protects recipient animals from CIA. Nevertheless, our group had already provided evidence that serum transfer from mice vaccinated with the same anti-VEGF vaccine protected recipient animals from tumor growth [18]. Moreover, we also demonstrated that serum transfer from mice vaccinated against TNF alpha protects mice from arthritis [14]. For these reasons, we considered that the proof of concept of serum transfer had already been acquired.

Several potential disadvantages of the active immunization strategy versus passive immunotherapy have been evoked by the scientific community. The most feared downside would be the induction of permanent immunity against the target cytokine resulting in permanent inhibition of cytokine activity. These downsides have been explored by our group in particular concerning anti-TNF vaccination [14, 51]. We showed that anti-TNF vaccination with TNF kinoid induced a transient anti-TNF Ab response in recipient mice and human [52]. No autoreactive TNF-recognizing T cells were induced. The administration of high doses of TNF to vaccinated mice was not capable of eliciting a novel anti-TNF Ab response, which could be induced only by a boost dose of vaccine. In conclusion, targeting cytokines involved in angiogenesis could be a promising strategy in the treatment of chronic inflammation.

Acknowledgments This research was funded in part by the French Centre National de la Recherche Scientifique and the Laboratory of Excellence Medalis (ANR-10-LABX-0034), Initiative of Excellence (IdEx), Strasbourg University. Pathophysiology, targets, and therapies of rheumatoid arthritis laboratory received grants from University of Paris 13, Agence Nationale de la Recherche (ANR CYTOVAC project) and Inserm (ITMOs IHP and CMN). VEGF kinoid (VEGF-K) was produced by NéoVacs SA (France). We thank Sonia Varela (animal facilities, Paris13 University) and Philippe Haumont for their technical contributions. Special thanks to Delphine Lemeiter, Roxane Hervé, and Matthieu Ribon for their invaluable help with synovial vascularization study. This work is dedicated to the memory of Anna Starzec.

Ethical approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Paris 13 (ethical approval ID: Ce5/2010/036).

Authors' contributions L.S. participated in acquisition and interpretation of experimental data, performed statistical analysis, drafted and revised the manuscript. E.D. participated in peptide design, carried out mice immunization, evaluation of clinical arthritis, carried out immunoassay, and helped to draft the manuscript. N.B. carried out mice immunization and evaluation of clinical arthritis. N.M. carried out HUVEC inhibition with sera from peptide immunization. N.S. carried out the synthesis and coupling of peptide vaccines and performed peptide immunoassay. M.M. participated in the design and synthesis of peptide vaccines. G.G.V. conceived a part of the study, participated in the coordination and analysis of the data, and helped to draft the manuscript. EB carried out coupling of VEGF kinoid, immunoassay, and receptor binding inhibition assay. ML participated in the coordination of peptide design and synthesis. H.L. participated in the coordination and analysis of HUVEC inhibition and synovial vascularization. S.M. participated in the design, synthesis and coupling of peptide vaccines, analysis of the data and helped to draft the manuscript. M.C.B. conceived of the study, analysis of the data and helped to draft the manuscript. E.A. conceived of the study, participated in the coordination of the study, analysis of the data and helped to draft the manuscript.

Compliance with ethical standards

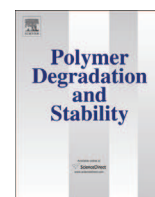
Conflict of interest Kinoid technology is patented by NéoVacs SA, and Vpep1 sequence is patented by University of Paris 13. G.G.V. and E.B. are employees of NéoVacs SA. M.C.B. is a member of the scientific board of NéoVacs SA. L.S., E.D., N.B., N.M., N.S., M.M., M.L., H.L., S.M., and E.A. have no competing interests to declare.

References

- Hirohata S, Sakakibara J (1999) Angiogenesis as a possible elusive triggering factor in rheumatoid arthritis. *Lancet* 353:1331
- Mansson B, Carey D, Alini M et al (1995) Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. *J Clin Invest* 95:1071–1077
- Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN (1991) Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 34:1125–1132
- Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA (1993) Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis* 52:232–234
- Miossec P (2003) Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis Rheum* 48:594–601
- Semerano L, Clavel G, Assier E, Denys A, Boissier MC (2011) Blood vessels, a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine* 78:118–123
- Kremer JM, Blanco R, Brzosko M et al (2011) Tocilizumab inhibits structural joint damage in rheumatoid arthritis patients with inadequate responses to methotrexate: results from the double-blind treatment phase of a randomized placebo-controlled trial of tocilizumab safety and prevention of structural joint damage at one year. *Arthritis Rheum* 63:609–621
- Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI (2007) Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis* 38:258–268

9. Shibuya M (2006) Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 9:225
10. Clavel G, Valvason C, Yamaoka K et al (2006) Relationship between angiogenesis and inflammation in experimental arthritis. *Eur Cytokine Netw* 17:202
11. Clavel G, Marchiol-Fournigault C, Renault G et al (2008) Ultrasound and Doppler micro-imaging in a model of rheumatoid arthritis in mice. *Ann Rheum Dis* 67:1765–1772
12. Lu J, Kasama T, Kobayashi K et al (2000) Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 164:5922–5927
13. De Bandt M, Ben Mahdi MH, Ollivier V et al (2003) Blockade of vascular endothelial growth factor receptor I (VEGF-RI), but not VEGF-RII, suppresses joint destruction in the K/BxN model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 171:4853–4859
14. Le Buanec H, Delavallée L, Bessis N et al (2006) TNF α kinoid vaccination-induced neutralizing antibodies to TNF α protect mice from autologous TNF α -driven chronic and acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19442–19447
15. Delavallée L, Le Buanec H, Bessis N et al (2008) Early and long-lasting protection from arthritis in tumour necrosis factor α (TNF α) transgenic mice vaccinated against TNF α . *Ann Rheum Dis* 67:1332–1338
16. Semerano L, Biton J, Delavallée L et al (2013) Protection from articular damage by passive or active anti-tumour necrosis factor (TNF)- α immunotherapy in human TNF- α transgenic mice depends on anti-TNF- α antibody levels. *Clin Exp Immunol* 172:54–62
17. Amit L, Ben-Aharon I, Vidal L, Leibovici L, Stemmer SM (2013) The impact of Bevacizumab (Avastin) on survival in metastatic solid tumors—a meta-analysis and systematic review. *PLoS One* 8:e51780
18. Rad FH, Le Buanec H, Paturance S et al (2007) VEGF kinoid vaccine, a therapeutic approach against tumor angiogenesis and metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:2837–2842
19. Muller YA, Christinger HW, Keyt BA, de Vos AM (1997) The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure* 5:1325–1328
20. Kong JS, Yoo SA, Kim JW et al (2010) Anti-neuropilin-1 peptide inhibition of synoviocyte survival, angiogenesis, and experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 62:179
21. Starzec A, Vassy R, Martin A et al (2006) Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sci* 79:2370–2371
22. Iyer S, Leonidas DD, Swaminathan GJ et al (2001) The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem* 276:12153–12161
23. Parker MW, Xu P, Li X, Vander Kooi CW (2012) Structural basis for selective vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) binding to neuropilin-1. *J Biol Chem* 287:11082–11089
24. Soker S, Gollamudi-Payne S, Fidler H, Charnahelli H, Klagsbrun M (1997) Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J Biol Chem* 272:31582–31588
25. Miellot A, Zhu R, Diem S et al (2005) Activation of invariant NK T cells protects against experimental rheumatoid arthritis by an IL-10-dependent pathway. *Eur J Immunol* 35:3704–3713
26. Murakami M, Iwai S, Hiratsuka S et al (2006) Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood* 108:1849–1856
27. Nam EH, Park SR, Kim PH (2010) TGF- β 1 induces mouse dendritic cells to express VEGF and its receptor (Flt-1) under hypoxic conditions. *Exp Mol Med* 42:606–613
28. Kim WU, Kang SS, Yoo SA et al (2006) Interaction of vascular endothelial growth factor 165 with neuropilin-1 protects rheumatoid synoviocytes from apoptotic death by regulating Bcl-2 expression and Bax translocation. *J Immunol* 177:5727–5735
29. Terme M, Tartour E, Taieb J (2013) VEGFA/VEGFR2-targeted therapies prevent the VEGFA-induced proliferation of regulatory T cells in cancer. *Oncoimmunology* 2:e25156
30. Hansen W, Hutzler M, Abel S et al (2013) Neuropilin 1 deficiency on CD4 + Foxp3 + regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J Exp Med* 209:2001–2006
31. Terme M, Pernot S, Marcheteau E et al (2013) VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res* 73:539–539
32. Boissier MC, Assier E, Biton J et al (2009) Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 76:10–14
33. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR (2007) Anti-TNF- α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- β . *J Exp Med* 204:33–39
34. Biton J, Semerano L, Delavallée L et al (2011) Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis. *J Immunol* 186:3899
35. Biton J, Boissier MC, Bessis N (2012) TNF α : activator or inhibitor of regulatory T cells? *Joint Bone Spine* 79:119–123
36. Nie H, Zheng Y, Li R et al (2013) Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 19:322–328
37. Thiolat A, Semerano L, Pers YM et al (2014) Interleukin-6 receptor blockade enhances CD39 + regulatory T cell development in rheumatoid arthritis and in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol* 66:273–283
38. Cortes J, Calvo V, Ramirez-Merino N et al (2012) Adverse events risk associated with bevacizumab addition to breast cancer chemotherapy: a meta-analysis. *Ann Oncol* 23:1130–1137
39. Zagury D, Burny A, Gallo RC (2001) Toward a new generation of vaccines: the anti-cytokine therapeutic vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8024–8029
40. Bertin-Maghit SM, Capini CJ, Bessis N et al (2005) Improvement of collagen-induced arthritis by active immunization against murine IL-1 β peptides designed by molecular modelling. *Vaccine* 23:4228–4235
41. Capini CJ, Bertin-Maghit SM, Bessis N et al (2004) Active immunization against murine TNF α peptides in mice: generation of endogenous antibodies cross-reacting with the native cytokine and in vivo protection. *Vaccine* 22:3144–3153
42. Ratsimandresy RA, Duvallet E, Assier E et al (2011) Active immunization against IL-23p19 improves experimental arthritis. *Vaccine* 29:9329–9336
43. Hah YS, Koh YJ, Lim HS et al (2013) Double-antiangiogenic protein DAAP targeting vascular endothelial growth factor A and angiopoietins attenuates collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 15:R85
44. Williams RO, Feldmann M, Maini RN (1992) Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9784
45. Saitenberg-Kermanac'h N, Corrado A, Lemeiter D et al (2004) TNF- α antibodies and osteoprotegerin decrease systemic bone loss associated with inflammation through distinct mechanisms in collagen-induced arthritis. *Bone* 35:1200–1207
46. Wang Y, Da G, Li H et al (2013) Avastin exhibits therapeutic effects on collagen-induced arthritis in rat model. *Inflammation* 36:1460–1467
47. Nagai T, Sato M, Kutsuna T et al (2010) Intravenous administration of anti-vascular endothelial growth factor humanized monoclonal antibody bevacizumab improves articular cartilage repair. *Arthritis Res Ther* 12:R178

48. Yu L, Wu X, Cheng Z et al (2008) Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:522–527
49. Choi ST, Kim JH, Seok JY et al (2009) Therapeutic effect of anti-vascular endothelial growth factor receptor I antibody in the established collagen-induced arthritis mouse model. *Clin Rheumatol* 28:333–337
50. Yoo SA, Bae DG, Ryoo JW et al (2005) Arginine-rich anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) hexapeptide inhibits collagen-induced arthritis and VEGF-stimulated productions of TNF-alpha and IL-6 by human monocytes. *J Immunol* 174:5846–5855
51. Delavallée L, Semerano L, Assier E et al (2009) Active immunization to tumor necrosis factor-alpha is effective in treating chronic established inflammatory disease: a long-term study in a transgenic model of arthritis. *Arthritis Res Ther* 11:R195
52. Durez P, Vandepapeliere P, Miranda P et al (2014) Therapeutic vaccination with TNF-kinoid in TNF antagonist-resistant rheumatoid arthritis: a phase II randomized, controlled clinical trial. *PLoS One* 9:e113465



Poly((*R,S*)-3,3-dimethylmalic acid) derivatives as a promising cardiovascular metallic stent coating: Biodegradation and biocompatibility of the hydrolysis products in human endothelial cells



R. Belibel ^a, N. Marinval ^b, H. Hlawaty ^b, C. Barbaud ^{a,*}

^a INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, Villetaneuse, F-93430, France

^b Inserm U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Groupe Biothérapies et Glycoconjugués, Bobigny, F-93430, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2016

Received in revised form

2 June 2016

Accepted 11 June 2016

Available online 16 June 2016

Keywords:

Biodegradable (poly([*R,S*]-3,3-dimethylmalic acid))

Biocompatible

Hydrolytic degradation

Degradation profiles

Cytotoxicity

Human endothelial cells

ABSTRACT

In-stent restenosis is currently treated with drug eluting stents based on biodegradable polymers which can deliver a therapeutic agent and be degraded in a few months preventing the risk of thrombosis. Poly([*R,S*]-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLA) is a new and original biodegradable and biocompatible polymer which contains a carboxylic acid functional group in its side chain. This gives it the particularity to be chemically modified and custom-synthesized to meet an adequate degradation time. It was prepared in order to develop new coating exhibiting different groups in its side chain and give natural and non-toxic primary products after a complete degradation. Herein we present the study of hydrolytic degradation of PDMMLAs under physiological conditions for a 6-month period. The most important factors that influence the kinetic degradation of polymers (molecular weight, nature and stability of functional groups, natural biological enzymes, pH and temperature) were studied in order to understand the behavior of PDMMLAs hydrolysis. It has been shown that the different PDMMLA polymers were degraded according to a bulk or erosion-surface profiles. Therefore, a hydrophilic loaded side chain, high temperature, high pH and the presence of specific enzyme accelerated the degradation rate of PDMMLAs with an erosion-surface profile. Since these new biomaterials as promising coating-stent will be in direct contact with the arterial wall, their biocompatibility was evaluated in this study in human vascular endothelial cells which are essential for the repair of the arterial wall to inhibit multiple processes leading to in-stent restenosis. The products of long-term degradation of PDMMLA polymers were non-cytotoxic.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the last decade, synthetic biodegradable polyesters were widely used in the biomedical field [1–4]. They can be tailored by chemical modification to meet the requirements of some applications unlike natural ones. Indeed, the chemical modification of biomaterial adjusts on the one hand, the mechanical and biological properties of biomaterial and, on the other hand, the grafting of drug and the control of polymer kinetic degradation and drug-release. Among the family of synthetic and biodegradable polymers, we are interested in side-chain-functionalized polymers,

especially poly(malic acid) (PMLA) [5] and [6]. Therefore, it is the most frequently used synthetic polyester which can be chemically modified through to the presence of acidic function in its side chain. In addition, it is known for its water-solubility, good biocompatibility, non-cytotoxicity, non-immunogenic properties, stability in the bloodstream and human cells affinity [5,7–12]. A variety of PMLA derivatives were prepared through the synthesis of a large family of monomers (malolactonates) or by copolymerization with other biodegradable polyesters such as poly(L-lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL). These copolymers have been mainly used in tissue engineering, as drug delivery systems and as vascular prostheses [13].

Currently, biodegradable polyesters-coated stents with these polyesters are the essential cardiovascular implants used in

* Corresponding author.

E-mail address: barbaud@univ-paris13.fr (C. Barbaud).

modern medicine to treat the intra-stent restenosis. This pathology is the result of endothelium damage and the proliferation and migration of vascular wall cells, smooth muscle cells (SMCs), after stent implantation. This is also associated with thrombotic risk. Therefore, polymer-coating should initially favor the re-endothelialization, minimize SEM cells migration and avoid the late thrombosis [14] and [15]. For this reason, synthetic and functional biodegradable polyesters before mentioned are the promising family which displays high relevance to satisfy the requirements of this cardiovascular application. In contrast, they have not proven themselves. This is mainly associated to their hydrophobicity and their slow degradation rate. Indeed, PLA which is the most used synthetic polymer as a cardiovascular implant, it displays a limited cell response and poor interaction with body tissue and fluids, poor hydrophilicity, slow degradation and poor ductility (higher glass temperature) which requires its copolymerization to improve its properties (PLGA [16] and [17], PLMA [10,11,18–20]).

The development of the appropriate biomaterial which has good mechanical properties, accelerates re-endothelialization, delivers a drug and degrades completely is the challenge of scientific and medical research in the last decade. To this end, poly([R,S]-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLA) derivatives which are part of the PMLA family will be prepared for an eventual use as stent-coating. They can be custom-synthesized to meet an adequate degradation time. In addition, its structural design was chosen to give natural and non-toxic primary products after a complete degradation. The hydrolysis of amorphous PDMMLAs gave the corresponding [R,S]-3,3-dimethylmalic acid (diacid). Indeed, the final product of hydrolytic degradation of chiral PDMMLA ((R)-3,3-dimethylmalic acid) is a natural and non-toxic product that enters the biosynthetic pathway of pantothenate. This metabolite present in the synthesis of Coenzyme A gives ketovaline by enzymatic oxidative reaction catalyzed by β,β -dimethyldehydrogenase (EC.1.1.1.84) [21] and [22]. (Fig. 1). Therefore, it was noted that these polymers are bioassimilable.

Functional groups in the side-chain of PDMMLA systems are the alcohol group (–OH), carboxylic acid group (–H) and hexylic group (–He), incorporated during the polymer synthesis. The degree of these groups may be adapted to modify hydrophilic/hydrophobic balance and thus changes the degradation rate, solubility and mechanical and biological properties. First, –OH and –COOH groups provide the neutral and the acid hydrophilic character, respectively. They allow also the chemical modification of polymer. Moreover, –OH functions were often used for its opsonization phenomenon, and their excellent blood compatibility and resistance to thrombus formation [23] and carboxylic groups for its favor cell attachment and proliferation. Then, the hexyl group provides hydrophobic

character for PDMMLA polymers.

If the systems studied in this work are used as a stent-coating, they will be in contact with the physiological medium. The study of their degradation *in vivo* is a very important point to understand their kinetic of degradation and the controlled release of drugs once grafted. We report in this work their degradation *in vitro* to screen the candidate polyesters. On the one hand, *in vitro* degradation of a series of PDMMLA homopolymers and statistical copolymers with different hydrophobic/hydrophilic groups in their side-chain was performed in phosphate buffer under physiological conditions. The effect of pH, temperature, specific enzymes and molecular weight of polymers on the degradation rate was evaluated. These materials will be in direct contact with the artery wall containing endothelial cells that repair and regenerate the treated artery wall and thus accelerate reendothelialization. On the second hand, the biocompatibility of degradation products was investigated on human vascular endothelial cells (HUVEC) using two methods: MTT assay and Live/Dead cytotoxicity assay kit. The objective of the present investigation was therefore to understand the degradation way and time of different polymers and finally select the appropriate and best candidate biomaterial.

2. Material and methods

2.1. Polymer synthesis and characterizations

Amorphous PLA ($M_n = 20\,000$ g/mol) was purchased from Sigma Aldrich (France). Anhydrous tetrahydrofuran (THF) was distilled on sodium-benzophenone. In all other cases, the commercially available chemicals were purchased from Sigma Aldrich (France) and employed as received. All reactions, with anhydrous organic solvents were performed under nitrogen atmosphere. Synthetic and amorphous PDMMLAs were prepared in anhydrous THF solution by ROP of racemic β -lactones monomers using the previously reported procedure using tetraethylammonium benzoate as initiator [24] and [25]. The monomers were synthesized according to the literature procedure as well with different functional groups to bring the hydrophilic (acidic or neutral) and hydrophobic characters for polymers. In this study, 3 homopolymers and 3 statistical copolymers having different functional groups in their side chains were prepared. The synthetic homopolymers have different characters: acid hydrophilic (PDMMLA–H), neutral hydrophilic (PDMMLA–OH (HP–OH)) and hydrophobic (PDMMLA–He). At the same time, the copolymers were synthesized with different acidic hydrophilic/hydrophobic percentages: PDMMLAH10-co-He90, PDMMLAH20-co-He80 and PDMMLAH30-co-He70. The polymers with 0, 10, 20, 30 and 100% of acidic groups were named as 0/100, 10/90, 20/80, 30/70 and 100/0,

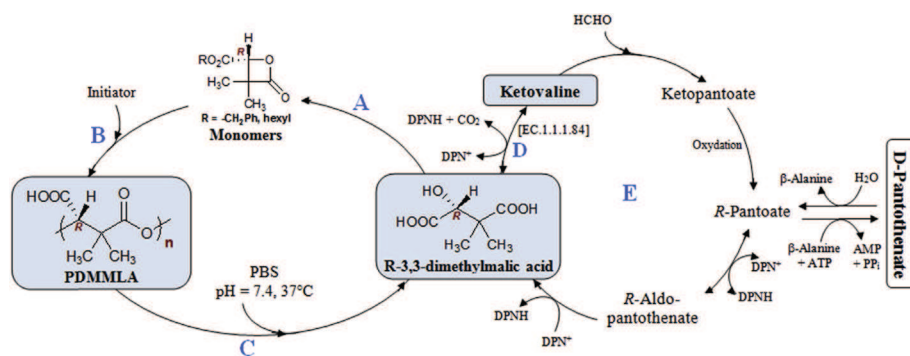


Fig. 1. (A) Synthesis of monomers. (B) Synthesis of PDMMLAs with Ring Opening Polymerization (ROP). (C) PDMMLAs hydrolytic degradation to R-3,3-dimethylmalic acid. (D) Enzymatic oxidative reaction catalyzed by “EC.1.1.1.84” of R-3,3-dimethylmalic acid to give ketovaline. (E) Degradation cycle of pantothenate.

respectively. Theoretical molecular weights of different polymers can be determined by molar ratio of monomer to initiator $[M]/[A]$. For all homopolymers and copolymers (0/100, 10/90, 20/80, 30/70, 100/0 and HP–OH), the initiator was used with 10^{-2} equiv per mol monomer to obtain theoretical molecular weights ranges between 22 000 and 30 000 (Table 1). Besides, for the three copolymers with high molecular weight (10/90_{hMw}, 20/80_{hMw} and 30/70_{hMw}), the initiator was used with 10^{-3} equiv per mol monomer to obtain theoretical molecular weights ranges between 220 000 and 300 000 (Table 1).

The different polymers were characterized by FTIR spectroscopy analysis which showed the ester characteristic band of different polyesters around 1750 cm^{-1} and the disappearance of the lactone band around 1840 cm^{-1} of different β -lactones monomers. FTIR spectra were recorded on AVATAR 370 TF-IR Thermo Nicolet spectrometer using Nicolet OMNI-Sampler ATR Smart Accessory (Ge, DTGS). Absorption bands are given in cm^{-1} . Then, the ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy was used to confirm the chemical structure of all PDMMLAs and the co-monomers relative contents (10, 20 and 30%) of copolymers. This latter percentage was obtained by ^1H NMR using the integration ratio between the peak which corresponds to $-\text{CH}_2-\text{O}-$ hexyl and that corresponds to $-\text{CH}_2-\text{O}-$ benzyl [26].

2.2. In vitro polymers hydrolytic degradation

2.2.1. Polymer films preparation and degradation assay

The degradation assays were conducted on polymers films. Firstly, to obtain polymer films, the PDMMLAs were dissolved in acetone and PLA in chloroform. The polymer solution was then deposited on glass slides pre-weighed (Objekträger, $10 \times 25.53\text{ mm}$, 0.99 mm thick, MENZEL-GLASER, Braunschweig, Germany). After the evaporation of solvent at room temperature, glass slides were dried at $37\text{ }^\circ\text{C}$ overnight in a vacuum oven. Secondly, the polymer slides were immersed in the glass vials containing PBS with a polymer concentration of 4 mg/mL (the mass of polymers ranges between 60 and 100 mg). PBS was prepared by mixing Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaOH and HCl with different concentrations that quantified according to the desired PBS-pH in distilled water. The sample vials were sealed in order to avoid the PBS evaporation. The degradation study was carried out for a period of 8 or 24 weeks at different conditions: temperatures (25, 37 and $50\text{ }^\circ\text{C}$), pH (5, 7.4 and 9), molecular weight (using polymers having different molecular weight) and enzymes (absence/presence of different enzymes: esterase and α -amylase). Esterase from porcine liver and α -amylase from porcine pancreas (Sigma Aldrich France) were used with a concentration of 1 mg per 0.4 g of polymer [27].

The degraded samples remaining on the glass slides were washed with distilled water, dried in vacuum oven at $37\text{ }^\circ\text{C}$ and weighed. However, degraded samples contained in PBS were isolated after lyophilization. They were redissolved in THF, dried under vacuum to obtain the degraded products mass. The recovered degradation products were dissolved in THF for the measurement of their molecular weight.

2.2.2. Molecular weights determination

The absolute average molecular weights and molecular weight distributions were determined at room temperature by coupling online a high performance size exclusion chromatograph (HPSEC), a multi-angle laser light scattering detector (MALLS), a viscometer and a differential refractive index (dRI) detector. THF, used as carrier, was filtered through a $0.1\text{ }\mu\text{m}$ filter unit (Millipore, Billerica, USA), carefully degassed (DGU-20A3R Shimadzu, Kyoto, Japan), and eluted at a 0.5 mL/min flow rate (LC10Ai Shimadzu, Kyoto, Japan). $100\text{ }\mu\text{L}$ of a $0.2\text{ }\mu\text{m}$ -filtered sample solution (at about 20 mg/mL) were injected with an automatic injector (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto, Japan). The column packing was a polystyrene-divinylbenzene gel. The MALLS photometer, a miniDawn TREOS from Wyatt Technology Inc. (Santa Barbara, CA, USA) was provided with a fused silica cell and a Ga-As laser ($\lambda = 665.8\text{ nm}$). The whole collected data: light scattering (LS), dRI were analyzed using the Astra v6.0.6 software package. Molar mass were obtained with the Zimm order 1 method. The concentration of each eluted fraction was determined with dRI (RID10A Shimadzu, Kyoto, Japan) according to the measured values of dn/dc (0.05 mL/g) [28]. In all cases, molecular weights $M_w(t)$ in degradation time (t) were plotted as a function of $M_w(0)$ which correspond to the molecular weights before degradation assays ($M_w(t)/M_w(0)$). Therefore, for all polymers, high molecular weights with a very good molar mass distribution value (D) which close to unity was observed. Theoretical molecular weights can be determined by molar ratio of monomer to initiator $[M]/[A]$. The molecular weight of commercial amorphous PLA was found different than indicated (Table 1).

2.3. Cytotoxicity of polyesters and degradation products

The degradation products of polymers from four different times were tested for cell viability and cytotoxicity with Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, N° CRL-1730, ATCC, LGC Molsheim, France) using two methods, MTT assay and Live/Dead cytotoxicity assay kit. HUVEC cells were cultured in Endothelial Cell Basal Media 2 (ECBM2, PromoCell, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum, epidermal growth factor (EGF, 5.0 ng/mL),

Table 1
Characterization of different homopolymers and copolymers.

Polymers		Characterization of polyesters			
		M_{nTh} (g/mol) ^b	M_n (g/mol) ^b	M_w (g/mol) ^b	D^b
Homopolyesters	PLA ^a	20 000	12 800	13 040	1.018
	0/100	23 400	16 900	16 960	1.003
	100/0	22 800	29 390	30 120	1.024
	HP–OH	29 200	19 950	20 840	1.044
Copolyesters	10/90	22 860	17 950	18 700	1.041
	20/80	22 920	17 100	17 400	1.017
	30/70	22 980	17 510	18 100	1.033
	10/90 _{hMw}	228 600	148 060	153 800	1.038
	20/80 _{hMw}	229 200	214 420	231 800	1.081
	30/70 _{hMw}	229 800	354 460	364 800	1.029
Diacid	228	1480	1500	1.006	

M_{nTh} = theoretical M_n .

^a Commercial amorphous PLA.

^b Calculated from ^1H NMR results.

hydrocortisone (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), VEGF (0.5 ng/mL), basic fibroblast growth factor (bFGF, 10 ng/mL), insulin like growth factor (R3IGF-1, 20 ng/mL), ascorbic acid (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), heparin (22.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), antibiotics (1% penicillin-streptomycin, from PAA Laboratories, Pasching, Austria). HUVEC cells were seeded using ECBM2 complete media and incubated at 37 °C in 5% CO_2 for 24 h to obtain adherent and proliferating cells. Cells were divided two times per week at a sub cultivation ratio of 1:3.

For MTT assay, HUVEC cells were seeded at a density of 10 000 cells/well on a 96 well tissue culture plate. Then, the cells were washed with the PBS (1 \times) and treated with 100 μL of polyester degradation products for 24 h, 48 h and 72 h. Controls were incubated with ECBM2 complete media for 24 h, 48 h and 72 h. At the end of the treatment, the cells were washed with PBS (1 \times) and MTT assay was performed: where MTT dye ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), Daco, France) reduces only metabolically active cells to insoluble purple formazan dye crystals. The intensity of the purple formazan was measured directly in the wells at 595 nm using microplate reader. In addition, as a negative control, 100 μL of dimethylsulfoxide (DMSO) was added to controls-wells. Each experiment was performed in triplets for each concentration of every sample and repeated three times on different passage number on different days ($n = 3$) occupying the same duration for incubation. The average of all of the experiments has been shown as cell-viability percentage in comparison with the control experiment, while gold untreated controls were considered as 100% viable.

For Live/Dead test, HUVEC cells were seeded at a density of 8000 cells/well of a 6 well glass LabTek culture plate. 24 h later, the cells were incubated with 100 μL of polyester degradation products for 24 h. Controls were incubated with ECBM2 complete media, as described before. At the end of each exposure, cell culture media was aspirated and the Live/Dead stain added. HUVEC cells were incubated at 37 °C for 2 h. Cells were photographed using digital camera fixed on top of the fluorescence microscope (Nikon COOL PIX 8400, Japan). Then the number of the living and dead cells were counted from the images (pseudo-colored cells) with 30 cells counted for each sample. Two different samples for each product of degradation type were used. This was repeated three times on different cell passage on different days occupying the same duration for incubation (48 h and 72 h).

2.4. Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm standard deviation (SD) unless indicated otherwise and analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). In all cases, the degree of significance is indicated when appropriate (* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$).

3. Results and discussion

3.1. Change of the molecular weight

3.1.1. Degradation of homopolymers: effect of load and nature of functional side chain and biological enzymes

3.1.1.1. Effect of load and nature of functional side chain. In the first hand, the hydrolysis behavior of PDMMLA homopolymers was investigated to studying the effect of the functional groups in the side chain of PDMMLA polymers on the kinetic of their degradation. The homopolymer 100/0 has a hydrophilic character. It contained only repeating unit negatively charged ($-\text{COO}^-$) in aqueous medium at neutral pH. As a comparison, the homopolymer HP-OH has a neutral hydrophilic character; it contained uncharged functional groups ($-\text{OH}$). Moreover, homopolymer 0/100 has a hydrophobic character and uncharged side chain groups (hexyl). The molecular

weight loss measurements were performed over time in PBS at 37 °C in pH 7.4. The initial molecular weight ($M_w(0)$) of all tested homopolymers was listed in Table 1. Fig. 2 showed the molecular weight versus time of PLA, 0/100, 100/0 and HP-OH.

PLA was slowly degraded over time. Homopolymer 0/100 has a slower degradation rate owing to the hexylic side chain which is highly hydrophobic. The molecular weight loss of PLA and 0/100 after 180 days was 21 and 15%, respectively. However, the hydrophilic homopolymer 100/0 has the most rapid rate of degradation. 31% of molecular weight was quickly lost after 7 days. After, the molecular weight loss rate was slowly increased with time. It was, 43, 77 and 90% within the 2nd, 4th and 8th weeks, respectively. In comparison, it was found that the neutral hydrophilic homopolymer HP-OH has a slower molecular weight loss rate (Fig. 2). It has a rapid degradation rate in the first week which was slowed with the degradation time. The molecular weight loss was 28, 38, 46 and 65% within the 1st, 2nd, 4th and 6th months, respectively (Fig. 2).

Thus, the degradation time of all PDMMLA homopolymers were affected with the nature of the side chain of PDMMLA. It was now that the hydrolysis process begins with the penetration of water into the polymer chains, followed by cleavage of ester functions and dissolution of degradation products. In the case of the homopolymer 0/100 which is water-insoluble, the diffusion of water within the polymer structure was hard due to the presence of the hydrophobic hexylic side chain. On the contrary, the carboxylic acidic group of 100/0 and the alcohol group of HP-OH facilitated the diffusion of water molecules through their chains with their hydrophilic character and water-solubility of degradation products. Moreover, 100/0 has negatively charged groups at pH 7.4 which accelerated the hydrolytic degradation in comparison with HP-OH.

3.1.1.2. Effect of enzymes. To evaluate the effect of enzymes as a biological catalyst on the degradation rate of PDMMLAs, two enzymes were selected: esterase as a specific-enzyme which biologically hydrolyzes the ester groups, and α -amylase as a non-specific enzyme of ester groups [27] and [29].

In Fig. 3 were displayed the molecular weight loss profiles for PLA and different PDMMLA homopolymers hydrolysis in the absence or presence of these enzymes. The results showed that both selected enzymes have different abilities to hydrolyze various polymers. Indeed, all data proved that faster hydrolysis rate was observed in presence of esterase than that in presence of α -amylase.

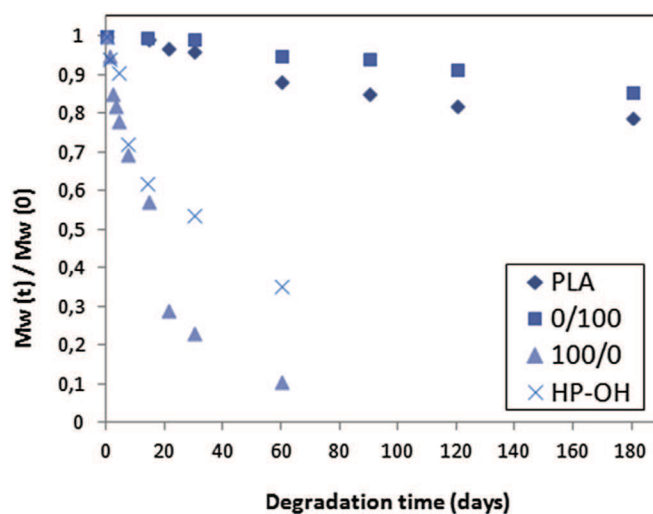


Fig. 2. Molecular molecular weight loss data for homopolymers (PLA, 0/100, 100/0 and HP-OH) in PBS at pH 7.4 and 37 °C.

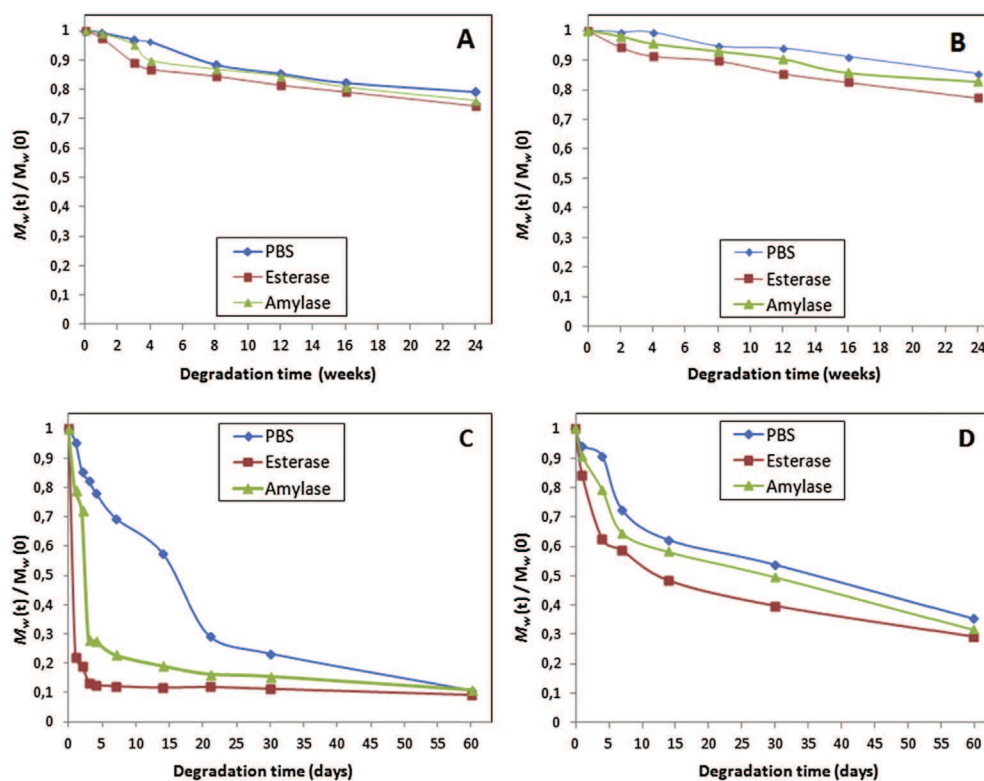


Fig. 3. *In vitro* degradation of (A) PLA, (B) 0/100, (C) 100/0 and (D) HP-OH at pH 7.4 and 37 °C in the absence or presence of enzymes (esterase and α -amylase).

For PLA (Fig. 3-A) and 0/100 (Fig. 3-B), a slightly larger difference of degradation profiles in the presence of enzymes was observed. The molecular weight loss of PLA after 6 months in the presence of esterase and α -amylase was 26 and 24%, respectively. For 0/100 in the same hydrolysis time, it was obtained with 33 and 18% in the presence of esterase and α -amylase, respectively.

For 100/0 (Fig. 3-C), a different powerful effect of enzymes was observed. The polymer lost very quickly the maximum of its weight in the first day in the presence of esterase (molecular weight loss 78%). Then, the hydrolysis rate increased slowly until a plateau value which was reached at the 4th day (molecular weight loss 88%). The same profile was observed in the presence of α -amylase but with a less degradation rate. There was a 90% of molecular weight loss after 6 days of esterase treatment, whereas the same results (90%) were reached after two months of incubation with α -amylase or control condition without any enzymatic activity.

The same behavior was observed with HP-OH sample (Fig. 3-D). After two months, HP-OH hydrolysis was not total. The molecular weight loss without enzyme, in the presence of esterase and α -amylase were 65%, 71% and 69%, respectively.

Summary, in the presence of esterase, PDMMLA homopolymers can be degraded faster than the other conditions (in the presence or absence of α -amylase). Therefore, selected esterase was involved in the ester bond hydrolysis of the studied homopolymers.

In addition to their degradation rate, the behavior of hydrolysis homopolymer was also studied. Because of the presence of the functional group in the side chains of PDMMLA polymers comparing with other aliphatic polyesters such as PLA [30], their degradation behavior may be different. This difference can be observed by the slow degradation of the polymer chains indicated by an increase of the retention time with a presence of a single peak, or with the presence of others peaks with a smaller molecular weight.

Fig. 4 presented the SEC-chromatograms as a function of retention time for different homopolymers before degradation (PLA, 0/100, 100/0 and HP-OH) and correspondent curves of two different hydrolysis times for each material degraded in presence of esterase (close to physiological conditions).

These results showed that all PDMMLA homopolymers was hydrolyzed with the formation of a second peak corresponding to small molecular weight and indicating a mixed degradation type in bulk and surface corrosion while the PLA degradation was rather in bulk. The ratio of this second peak increased with the decrease of the ratio of the first peak over time.

Fig. 5 illustrated the percentage of different peaks formed as a function of degradation time for all studied homopolymers. The PLA hydrolysis was indicated by a slight increase of the retention time with only one peak corresponding to the initial peak ($t = 0$) until the last degradation time ($t = 6$ months) where the appearance of a second peak was observed (Figs. 4A and 5A). Contrary, for 0/100, the degradation rate was obtained slower than PLA but the formation of a second and third peak was observed in the second week with a small percentage which slightly increased with time (Figs. 4B and 5B).

In addition, for 100/0 and HP-OH, the degradation behavior is different; it was indicated by the decrease of the molecular weight of the initial peak and the formation of a second peak in the same time. For 100/0, the formation of the peak corresponding to the smallest molecular weight (peak 3 with $M_w \sim 4000$ g/mol) was observed from the first day with high percentage (Figs. 4C and 5C). For HP-OH, the formation of this peak was increased less rapidly (Figs. 4D and 5D). This was explained by the more rapid degradation in surface of polymer accelerating their corrosion surface. This was due to the degradation process of polymer chains and therefore to the rate of penetration of water inside the polymer chains. In the event that the water molecules absorbed slowly inside of the

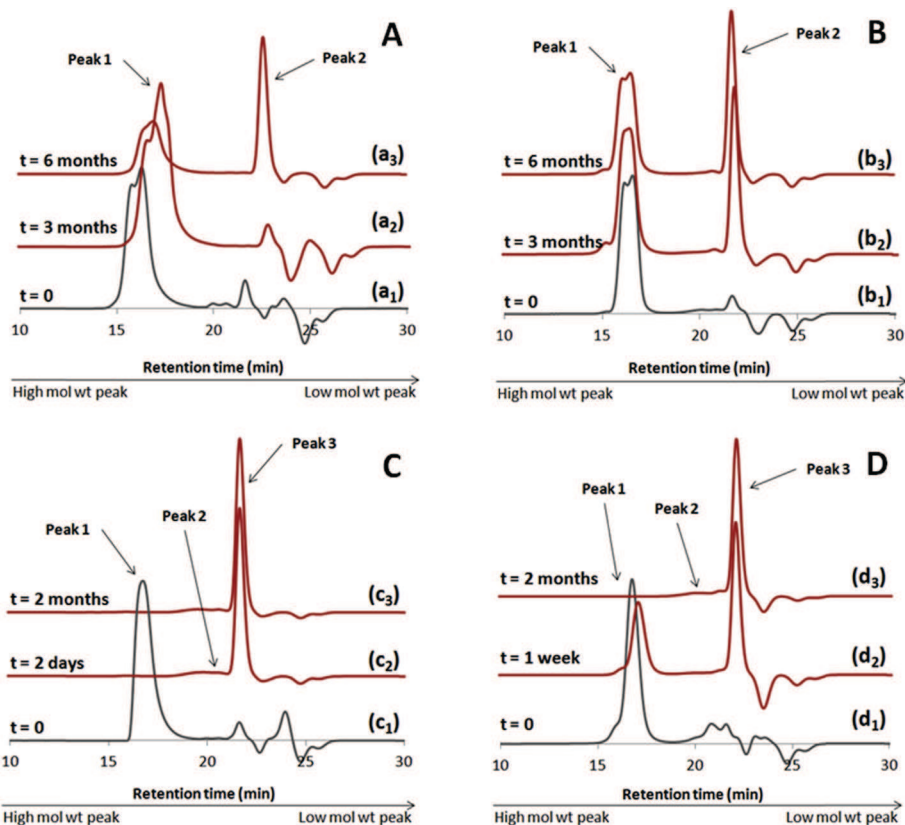


Fig. 4. SEC-chromatograms of undegraded and degraded homopolymers: (A) PLA, (B) 0/100, (C) 100/0 and (D) HP–OH. (pH 7.4 and 37 °C in the presence of esterase). (“ a_1) undegraded PLA, (a_2) degraded PLA within 3 months, (a_3) degraded PLA within 6 months, (b_1) undegraded 0/100, (b_2) degraded 0/100 within 3 months, (b_3) degraded 0/100 within 6 months, (c_1) undegraded 100/0, (c_2) degraded 100/0 within 3 months, (c_3) degraded 100/0 within 6 months, (d_1) undegraded HP–OH, (d_2) degraded HP–OH within 3 months, (d_3) degraded HP–OH within 6 months.

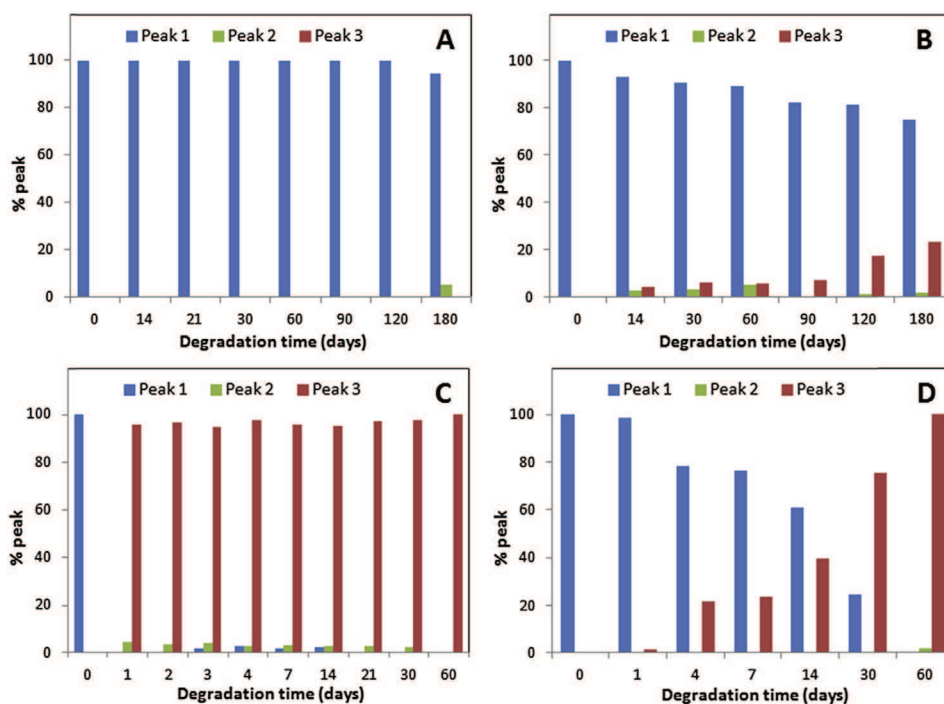


Fig. 5. Homopolymers fragmentation with the formation of several peaks possessing different molecular weight (A) PLA, (B) 0/100, (C) 100/0 and (D) HP–OH (pH 7.4 and 37 °C in the presence of esterase).

polymer, the macromolecular chains degradation would take place at the surface and so the rapidly apparition of peak 3 was observed (PDMMLA–H case). If the diffusion rate of water molecules is faster than the hydrolysis rate of the ester functions, the polymer will start to degrade inside with a bulk degradation profile (HP–OH case). Therefore, the apparition of peak 3 is delayed. In addition, the higher the ionic strength between polymers and environment, the lower the diffusion of water will be and thus their corrosion surface increased.

At pH 7.4, PDMMLA–H can be both in the form of protonated PDMMLA–H (–COOH) and deprotonated PDMMLA–H (–COO[−]). In this case, ionic interactions and hydrogen bonds with environment were observed. However, only hydrogen bonds were observed for HP–OH. Thus, the concentration of absorbed water was higher for HP–OH than PDMMLA–H which explained respectively the observed bulk and corrosion degradation profiles.

Consequently, with the last study (profile and rate) of the degradation of the different homopolymers (effect of side-chain, charge and hydrophily/hydrophoby), it can be concluded that the side chain of PDMMLAs polymers plays an important role to estimate the degradation rate. The presence of hexyl group slowed sharply the degradation time whereas a hydrophilic side chain accelerates the degradation rate. Moreover, the presence of a negative charge permitted the total degradation of the homopolymer in only a few days compared with a neutral hydrophilic group (OH) in the studied conditions (pH 7.4 and 37 °C). This can be explained by the rapid degradation in surface of material (surface erosion).

3.1.2. Degradation of copolymers: effect of hydrophilic/hydrophobic ratio and enzymes

In the second part of this work, three copolymers (10/90, 20/80 and 30/70) were synthesized in order to study their hydrolysis rate in a six-month period. These copolymers have carboxylic acid groups for their hydrophilic character (10, 20 and 30%) and hexylic groups for their hydrophobic character (90, 80 and 70%). The initial molecular weight ($M_w(0)$) of all tested copolymers was presented in Table 1.

Fig. 6 presented the molecular weight loss curves of different copolymers. In first, the degradation study was carried out in PBS at 37 °C in pH 7.4. As for the study presented before for the homopolymers degradation, the effect of enzymes (esterase and α -amylase) on the copolymers was performed. In a logical order, the loss of molecular weight increased with the increase of carboxylic acid groups. 10/90 copolymer has a predominantly hydrophobic character. Its degradation rate is slightly faster than 0/100 (Fig. 6A). It lost its weight with 20, 31 and 25% after 6 months of incubation without enzyme or in the presence of esterase and α -amylase, respectively. The addition of 10% of carboxylic acid groups (20/80) increased the molecular weight loss to 36, 59 and 43% after 6 months (respectively conditions in the same order) (Fig. 6B). For the more hydrophilic copolymer with 30% of hydrophilic groups, hydrolytic rate was very fast with a molecular weight loss of 62, 86 and 69% after 6 months (respectively conditions in the same order) (Fig. 6C).

As PBS degradation (without enzymes), α -amylase and esterase activities follow the same format as homopolymers. In the all cases (PBS, esterase and α -amylase), elution profile indicated two major peaks. This result suggested the fragmentation of the inside and the outside of polymer's structure. Figs. 6D and 7 showed, respectively, the comparison of kinetics polymers hydrolysis in the presence of esterase and the elution profiles of 30/70 copolymer and its degradation products over time in the absence/presence of esterase.

3.1.3. Degradation of high molecular weight (hM_w) copolymers: effect of hydrophilic/hydrophobic ratio, enzymes, pH and temperature

On the other hand, three copolymers having the same ratio of hydrophilic/hydrophobic groups than the above mentioned copolymers but different molecular weights were prepared (10/90 _{hM_w} , 20/80 _{hM_w} and 30/70 _{hM_w}). This is in the order to study the effect of molecular weight, enzymes, pH and temperature on the degradation nature and rate of the different copolymers.

3.1.3.1. Effect of molecular weight. To evaluate the effect of molecular weight, three systems were prepared with the same ratio of hydrophilic/hydrophobic groups with two different initial molecular weight ($M_{th} \sim 23\,000$ g/mol and 230 000 g/mol). The hydrolysis study was carried out in PBS at pH 7.4 and 37 °C. The molecular weights results were presented in Table 1.

Fig. 8A showed the molecular weight loss of 3 copolymers having high molecular weights as a function of degradation time. In a logical order, the degradation was faster with the material contained the highest ratio of hydrophilic side chain (30/70 _{hM_w}), then a medium degradation rate was observed with the material having the medium ratio of –COOH groups (20/80 _{hM_w}), and with that having the lowest ratio of –COOH (10/90 _{hM_w}), the degradation slowed further.

In addition, it is important to compare the rate of degradation of the material having (hM_w) and that having the lowest ones (lM_w). The comparison was illustrated in Fig. 9. Indeed, it was found that, the polymer having hM_w and only 10% of –COOH (10/90 _{hM_w}), had similar degradation profile as compared to 10/90 with lM_w . It was slightly faster degraded by a linear greater molecular weight loss than 10/90 over time ($\sim 3.5\%$).

When 10% of acidic groups were added to the side chain of the copolymer (20/80 _{hM_w}), it hydrolyzed with a double speed as compared to 10/90 _{hM_w} and a linear greater molecular weight loss as compared to its lM_w counterpart ($\sim 93\%$). Moreover, when the amount of acid is increased by another 10% (30/70 _{hM_w}), the copolymer lost its weight very quickly in the first month and then slowed after. As compared to 30/70, the molecular weight loss was greater up to 62 and 76% at the 4th and 6th months, respectively. In this degradation time, 30/70 _{hM_w} had an equivalent molecular weight to the initial molecular weight of 30/70.

The present analysis of the behavior of degraded materials is very important because it gave an idea of the cleavage under physiological conditions of copolymer chains which have different molecular weights. This suggested that in the presence of such systems (PDMMLA copolymers) having an average molecular weight ($M_{th} \sim 23\,000$), the molecular weight loss was found linear with $R^2 = 0.96, 0.95$ and 0.93 for 10/90, 20/80 and 30/70, respectively.

On the other hand, with hM_w ($M_{th} \sim 230\,000$), the linearity was decreased with the increase of acids percentage. $R^2 = 0.94$ and 0.93 were obtained for 10/90 and 20/80, which indicates linearity of degradation despite the slight weight loss. In contrast, with 30% of acid groups, the molecular weight loss was not linear ($R^2 = 0.69$). This can be interesting for the selection of such type of materials which having different molecular weight and hydrophilic/hydrophobic balance, and thus different hydrolysis profiles.

In conclusion, in the presence of high molecular weight, degradation behavior of the three copolymers (10/90 _{hM_w} , 20/80 _{hM_w} and 30/70 _{hM_w}) was not the same. The polymer can quickly hydrolyze losing its maximum weight in the first weeks for dividing into shorter chains. In addition, the degradation rate is similar to that on polymer with lower molecular weight (10/90, 20/80 and 30/70).

3.1.3.2. Effect of enzymes on hM_w copolymers degradation. To

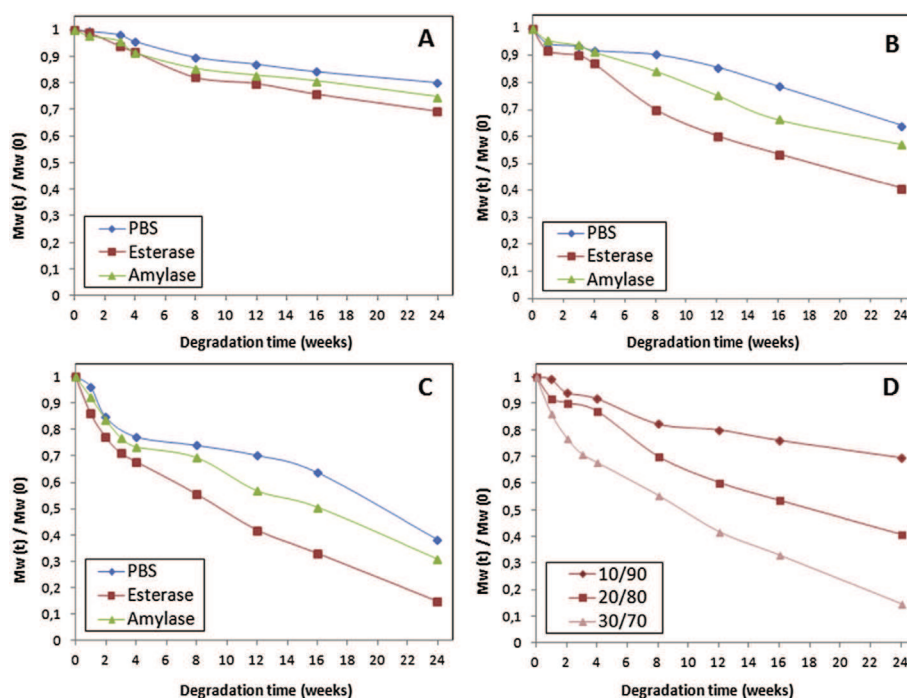


Fig. 6. Molecular weight loss of (A) 10/90, (B) 20/80, (C) 30/70 at pH 7.4 and 37 °C in the absence/presence of esterase and amylase and (D) molecular weight loss comparison of copolymers at pH 7.4 and 37 °C in the presence of esterase as a function of incubation time.

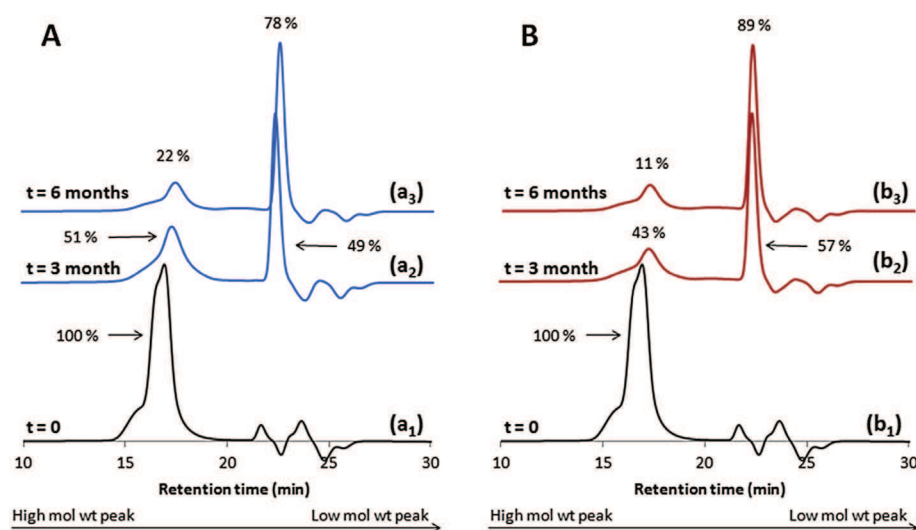


Fig. 7. SEC-chromatograms of undegraded and degraded 30/70 copolymer (A) in the absence of enzymes and (B) in the presence of esterase at pH 7.4 and 37 °C. "(a₁ and b₁) undegraded 30/70, (a₂ and b₂) degraded 30/70 within 1 month and (a₃ and b₃) degraded 30/70 within 6 months."

confirm precedent results obtained with low molecular weight (lMw) copolymers (10/90, 20/80 and 30/70) on the hydrolysis of high polymer chains, the hydrolysis of hMw copolymer 10/90_{hMw} was performed at pH 7.4 and 37 °C in the absence or presence of esterase and α -amylase. They were hydrolyzed with the same logic in the absence or presence of both enzymes (Fig. 8B).

3.1.3.3. Effect of pH. To evaluate the film polymers degradation, another parameter was studied on the 30/70_{hMw} films with varying pH of hydrolysis medium. 3 different solutions of PBS having different pH: 5, 7.4 and 9 were used (Fig. 8C).

PDMMLA copolymers have carboxylic acid groups in their side

chain which are capable of undergoing protonation/deprotonation depending on the environmental pH. At pH 5, copolymer has the slower degradation rate with a molecular weight loss of only 66% as compared to 86% at pH 7.4 in the 6th month. This effect was explained by the unionization of acidic groups at low pH, they are sufficiently protonated at pH 5, noted "the acid inhibitory effects". At pH 9 [31], the opposite behavior was observed. Indeed, 100% of molecular weight loss was observed in the sixth month. This was explained by the rapid degradation of film surfaces of copolymer which have in this time deprotonated groups ($-\text{COO}^-$). Hydrolytic rate of copolymer increased with the increase of medium pH. Thus the hydrolytic degradation of PDMMLA copolymers was pH-

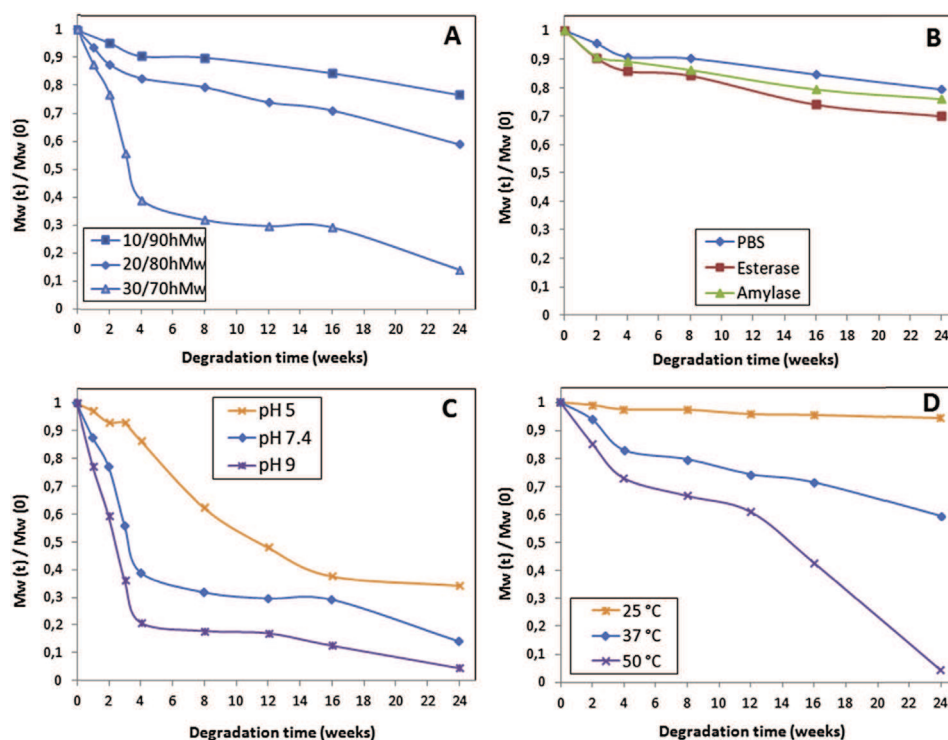


Fig. 8. Molecular molecular weight loss of hM_w copolymers: (A) hydrolysis in physiological conditions, (B) effect of enzymes on hM_w copolymers, (C) effect of pH and (D) effect of temperature.

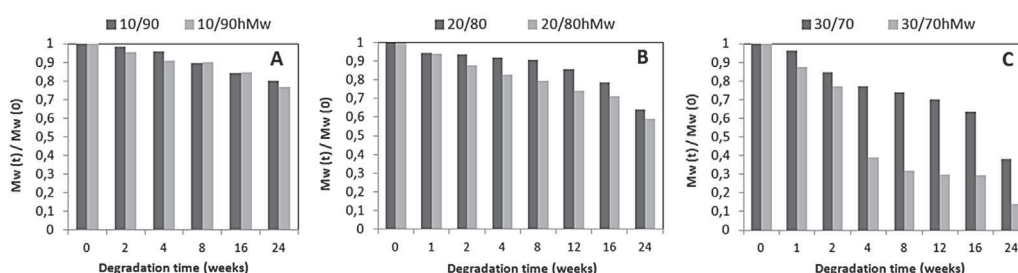


Fig. 9. Effect of molecular weight on molecular weight loss and degradation rate and profile of hM_w copolymers: (A) 10/90 and 10/90_{hMw} (B) 20/80 and 20/80_{hMw} and (C) 30/70 and 30/70_{hMw}.

sensitive. This result is in accordance with literature studies on the polyesters degradation such as PLA and PLGA [32] and [33].

Herein, we could conclude that in low pH, the hydrolysis has a bulk profile (diffusion of water molecules into polymer) in contrast of that in high pH which has an erosion-surface profile (degradation rate of polymer was faster than diffusion of water molecules). Moreover, at pH 7.4, hydrolysis has a mixed profile “bulk and surface erosion”. This was confirmed with the SEC-chromatograms as a function of time hydrolysis showed in Fig. 10A. For slower degradation rate (pH 5), one peak was observed (Fig. 10A (a₂)) with a fraction of 99% indicated a bulk degradation whereas only one *l*M_w peak was observed in the case of faster degradation (pH 9) with a fraction of 52% which indicated the corrosion-surface degradation (Fig. 10A (a₄)). A mixture of several peaks was observed in the case of pH 7.4 which indicated the mixed degradation profile in bulk and corrosion surface (Fig. 10A (a₃)).

3.1.3.4. Effect of temperature. To evaluate the effect of temperature on the degradation of PDMMLAs copolymers, the hydrolysis of 20/80_{hMw} copolymer was carried out in PBS at pH 7.4 at 3 different

temperatures: 25, 37 and 50 °C. Fig. 8D showed the hydrolysis profiles at different temperature. The results showed that, the molecular weight loss at 25 °C was very small over hydrolysis time; only 6% was observed as compared to 41% at 37 °C within 6 months. When the temperature was also increased by 13 °C (at 50 °C), the copolymer was completely degraded.

We concluded that PDMMLA copolymers degradation was temperature-dependent. Their degradation time was accelerated with the increase of temperature. These results could be explained by the hydrophilic/hydrophobic balance of copolymer which exhibited 20% hydrophilic groups in their side chains. This balance arranges in specific interactions between hydrophilic and hydrophobic functions at a critical temperature. With a change of this temperature, the arrangement between these groups changes again which can change the interaction of material with aqueous environment and so accelerate/decrease its degradation.

Fig. 10B showed the elution profiles of undegraded 20/80_{hMw} (b₁) and degradation products in the 6th month at 25 °C (b₂), 37 °C (b₃) and 50 °C (b₄). They have different profiles of degradation which formed only at 50 °C a peak corresponded to *l*M_w with a

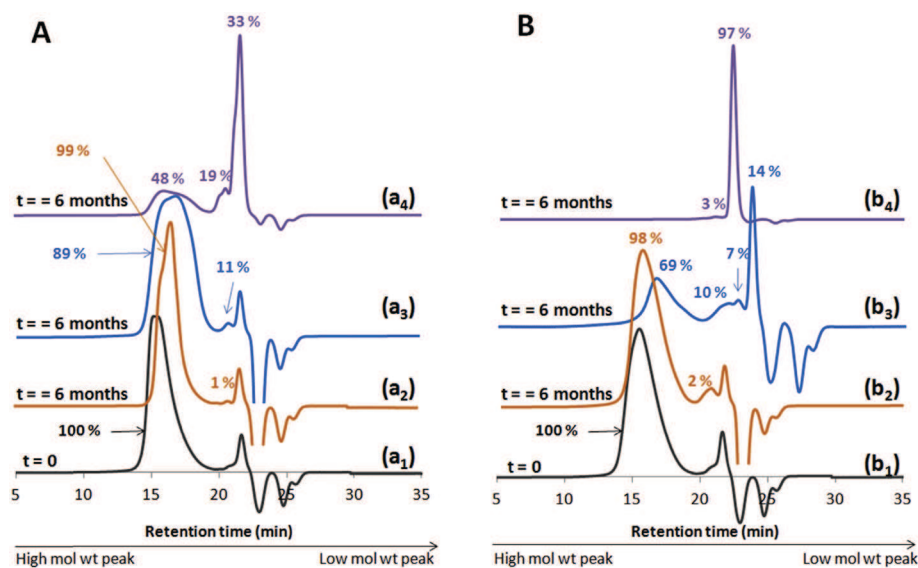


Fig. 10. Elution profiles of 30/70_{hMw} (A) and (B) 20/80_{hMw} within 6 months. “(a₁ and b₁) undegraded copolymers, (a₂ and b₂) degraded copolymers at pH 5 and 25 °C, respectively, (a₃ and b₃) degraded copolymers at pH 7.4 and 37 °C, respectively and (a₄ and b₄) degraded copolymers at pH 9 and 50 °C, respectively.

fraction of 97% in the end of degradation study (faster degradation rate). For both other films, this peak was not observed (slower degradation rate).

In summary, PDMMLAs having hydrophilic loaded side chain at pH 7.4 were degraded faster than those wearing a neutral hydrophilic side chain. A side chain which contained hexyl groups slowed degradation. In addition, the presence of a charged hydrophilic moiety allows degradation of the polymer faster than a neutral hydrophilic group. Moreover, high pH and temperature accelerated the degradation rate of PDMMLAs due to the deprotonation of carboxylic acid functions at pH 9 and the strong interaction of the polymer chains with in high temperature with the aqueous medium. In these cases, the surface of the degradation rate is higher than the rate of penetration of water within the polymer structure which caused surface erosion until a complete degradation. Additionally, the esterase is a biological enzyme that specifically hydrolyzes the ester functions in a physiological medium. Therefore, PDMMLAs degradation in the presence of esterase is significantly accelerated with all polymer types (homopolymers and copolymers with hMw and lMw).

This study was performed in the order to choose the copolymer appropriate to cover metallic stent. The rapidly degraded copolymer in conditions close to physiological environment (pH 7.4, 37 °C and in the presence of esterase as specific biological enzyme) was 30/70. It degraded with molecular weight loss of 15% within 6 months. The aim of this study was to performed the most interesting polymer which can be chosen as the coating stent material for an eventual custom designing of polymer with a therapeutic agent. For a final choice, these results will be compared with those of the physicochemical and biological properties of the surface (data not shown) of copolymer films studied in this work.

3.2. Cytotoxicity of polyesters and degradation products

PDMMLAs polymers were synthesized for eventual use as coating drug-eluting stents. Therefore, they will be in direct contact with blood and cells of vascular wall. They can bring a drug to a controlled and sustained release thanks to carboxylic acid functionalisable groups in their side chains. One of the possible cytotoxicity of biomaterials is the diffusion of toxic degradation

products in the biological medium. The cytotoxicity study on degradation products of PDMMLAs platform before bringing the drug is required. In this work, the viability of the degradation products over several months of different studied biomaterials was performed *in vitro* on human endothelial vein cells HUVECs.

The degradation products of 100/0 from 1 day to 1, 4 and 8 weeks were tested, while those of HP–OH were from 2 days to 2, 4 and 8 weeks. For 30/70 the degradation products were 1, 4, 12 and 24 weeks. For PLA, 10/90 and 20/80, the tested degradations products were from 2, 4, 12 and 24 weeks. Because the non-functionalized PDMMLA (100/0) is converted into diacid which is the final degradation product (Fig. 1), the viability of diacid was also conducted in the same conditions as the other samples. Also, this water-soluble product is a synthesis precursor of PDMMLA polymers (Fig. 1).

Consequently, Fig. 11 showed the viability test using MTT assay after HUVEC incubation in presence of the degradation products of PLA and PDMMLAs (100/0, HP–OH, 10/90, 20/80 and 30/70) and diacid. For all samples the proliferation cells was comparable to control which has 100% viability. So, no significant difference was observed between control and treated cells with all degradation products. Therefore, a significant difference was observed between treated cells 24 h and 72 h time with all degradation products (Fig. 11, (*p < 0.01; **p < 0.001; ***p < 0.0001).

In addition, Fig. 12 showed the viability results with Live/Dead test. For all samples, the percentage of non-viable cells was slightly increased by about 10% between the 2nd and 3rd days of incubation which is comparable to control.

In summary, the cells viability tests MTT and Live/Dead were revealed that the products of long-term degradation of PDMMLA polymers were non-cytotoxic.

4. Conclusion

The aim of the present study was to comprehensively evaluate the *in vitro* hydrolytic degradation of series of amorphous biodegradable and biocompatible polyesters (PDMMLAs). Three homopolymers and three copolymers were analyzed for this study. The homopolymers have been investigated to understand the PDMMLAs degradation behavior under physiological conditions

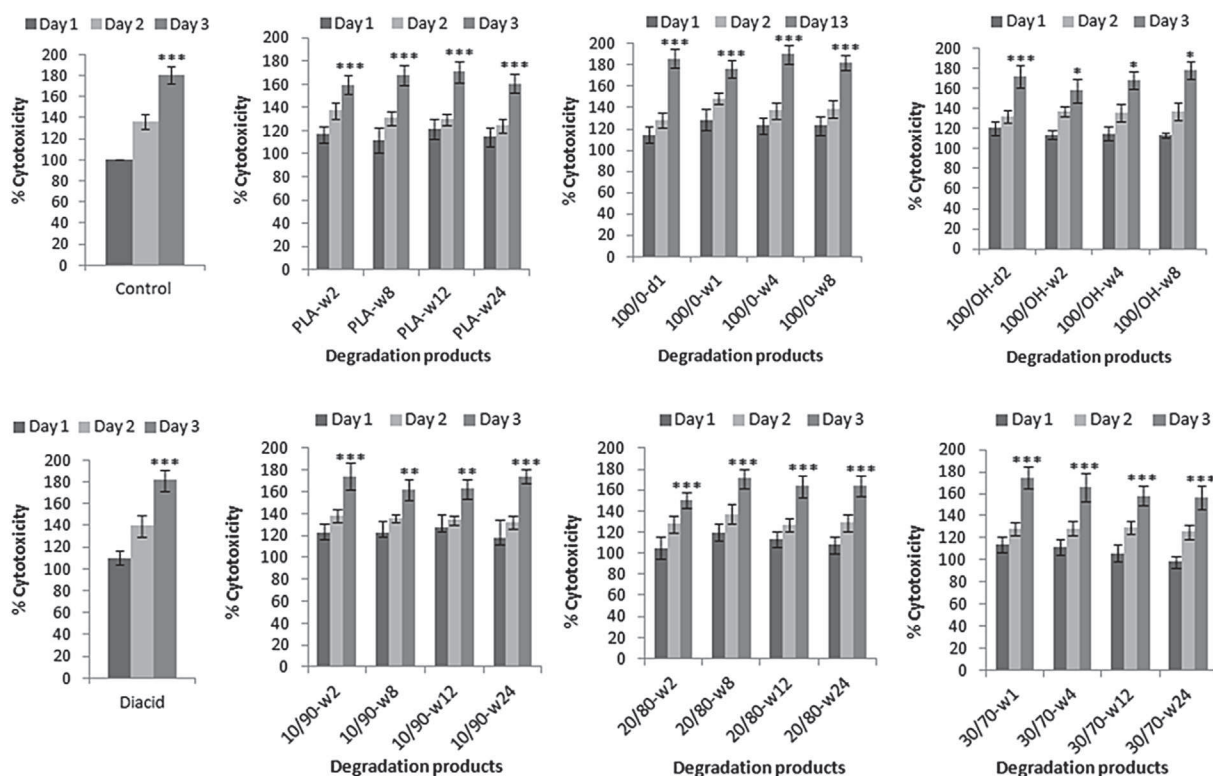


Fig. 11. Cytotoxicity of PLA and PDMMPLAs degradation products measured by MTT test. (“d” indicated “day” and “w” indicated “week”). Relative cell proliferation of HUVEC exposed for 24 h, 48 h and 72 h to all products of degradation. The values are represented as the mean value \pm SD ($n = 3$) where * denotes significant changes between treated cells 24 h and 72 h time with all degradation products. Here (* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$ (ANOVA).

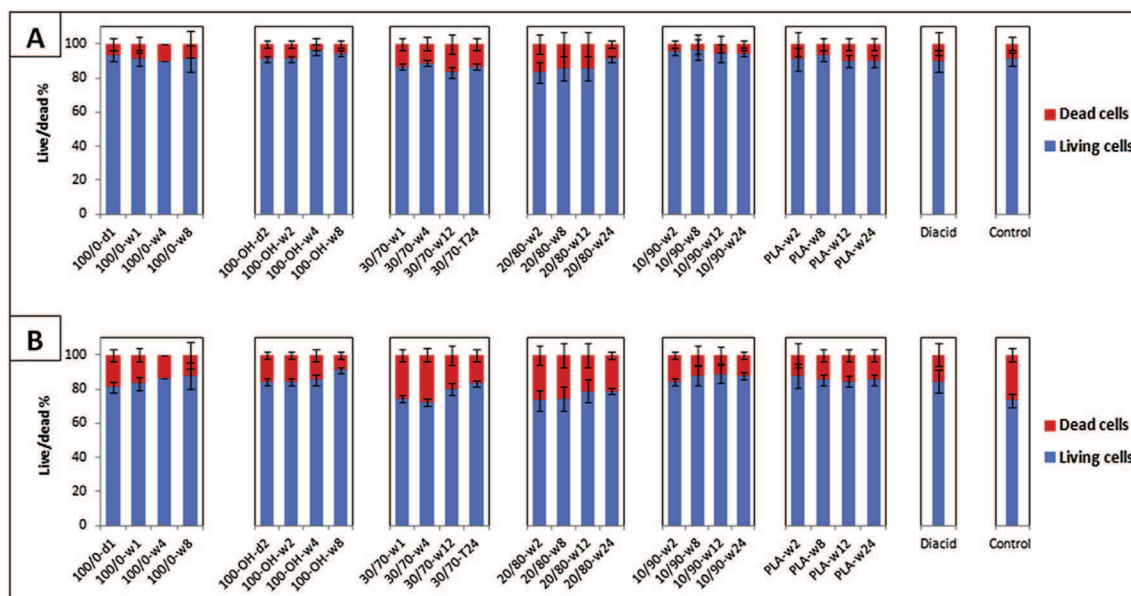


Fig. 12. Cytotoxicity of PLA and PDMMPLAs degradation products measured by Live and Dead test obtained after (A) 48 h and (B) 72 h of incubation with different polymer degradation products (“d” indicated “day” and “w” indicated “week”).

while the copolymers for their eventual use as a coating cardiovascular stent for the treatment of restenosis.

Firstly, several factors which are known to influence the rate of degradation were studied. All polymers showed the dependence of molecular weight loss and rate and profile of hydrolysis with chemical nature and charge of functional groups of polymers,

hydrophilic/hydrophobic balance, molecular weight, pH, temperature and biological enzymes. We can conclude that the presence of specific enzymes, high pH and temperature (pH 9 and 50 °C) and with low molecular weight of polymers accelerated significantly the degradation rate with the corrosion surface degradation type. Otherwise, at low pH and temperature (pH 5 and 25 °C), the

degradation speed is slow indicating a bulk degradation type while under physiological conditions (pH 7.4 and 37 °C) PDMMLAs degraded with a mixed profile.

Secondly, *in vitro* cytotoxicity study of the degradation products was performed in HUVECs cells. Taken together, all studied polymers exhibited a biocompatible response (without any cytotoxicity) which gives them a great potential for the promising use in cardiovascular field.

All these results, have allowed to choose the best material for possible drug grafting. The copolymer 30/70 was rapidly degraded comparing to 20/80 and 10/90. It was degraded within the 6th month, the recommended period for the degradation of the stent-coating after the drug release for the treatment of intra-stent restenosis. Also, the hydrolysis properties of PDMMLAs confer a particular quality compared to other polyesters described in the literature and used as stent-coating, particularly PLA. The interest in PDMMLA as promising coating-stent is even more important that the PLA with a hydrophobic character and slow degradation rate that can reach two years [34] and [35].

References

- [1] H.Y. Tian, Z.H. Tang, X.L. Zhuang, X.S. Chen, X.B. Jing, Biodegradable synthetic polymers: preparation, functionalization and biomedical application, *Prog. Polym. Sci.* 37 (2011) 237–280.
- [2] K. Fu, D.W. Pack, A.M. Klivanov, R. Langer, Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres, *Pharm. Res.* 17 (2000) 100–106.
- [3] R. De Santis, A. Russo, A. Gloria, U. D'Amora, T. Russo, S. Panseri, M. Sandri, A. Tampieri, M. Marcacci, V.A. Dediu, C.J. Wilde, L. Ambrosio, Towards the design of 3D fiber-deposited poly(epsilon-caprolactone)/iron-doped hydroxyapatite nanocomposite magnetic scaffolds for bone regeneration, *J. Biomed. Nanotechnol.* 11 (2015) 1236–1246.
- [4] Z.W. Huang, V. Laurent, G. Chetouani, J.Y. Ljubimov, E. Holler, T. Benvegna, P. Loyer, S. Cammas-Marion, New functional degradable and bio-compatible nanoparticles based on poly(malic acid) derivatives for site-specific anti-cancer drug delivery, *Int. J. Pharm.* 423 (2012) 84–92.
- [5] Y. Liu, W. Wang, J. Wang, Z. Yuan, S. Tang, M. Liu, H. Tang, HUVEC cell affinity evaluation and integrin-mediated mechanism study on PHSRN-modified polymer, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 84 (2011) 6–12.
- [6] J. Wang, C. Ni, Y. Zhang, M. Zhang, W. Li, B. Yao, L. Zhang, Preparation and pH controlled release of polyelectrolyte complex of poly(L-malic acid-co-D, L-lactic acid) and chitosan, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 115 (2014) 275–279.
- [7] J.Y. Ljubimova, J. Portilla-Arias, R. Patil, H. Ding, S. Inoue, J.L. Markman, A. Rekechenetskiy, B. Konda, P.R. Gangalum, A. Chesnokova, A.V. Ljubimov, K.L. Black, E. Holler, Toxicity and efficacy evaluation of multiple targeted poly(malic acid) conjugates for triple-negative breast cancer treatment, *J. Drug Target.* 21 (2013) 956–967.
- [8] H. Ding, G. Helguera, J.A. Rodriguez, J. Markman, R. Luria-Perez, P. Gangalum, J. Portilla-Arias, S. Inoue, T.R. Daniels-Wells, K. Black, E. Holler, M.L. Penichet, J.Y. Ljubimova, Poly(malic acid) nanobioconjugate for simultaneous immunostimulation and inhibition of tumor growth in HER2/neu-positive breast cancer, *J. Control. Release* 171 (2013) 322–329.
- [9] B.S. Lee, M. Vert, E. Holler, Water-soluble Aliphatic Polyesters: Poly(malic acid) s, *Biopolymers Online*. In: Doi YSA, editor. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 75–103.
- [10] Y. Liu, W. Wang, J. Wang, Y. Wang, Z. Yuan, S. Tang, M. Liu, H. Tang, Blood compatibility evaluation of poly(D,L-lactide-co-β-malic acid) modified with the GRGDS sequence, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 75 (2010) 370–376.
- [11] L. Wang, X. Jia, Y. Chen, Y. Che, Z. Yuan, Synthesis, degradability, and cell affinity of poly(DL-lactide-co-RS-hydroxyethyl-β-malolactonate), *J. Biomed. Mater. Res. A* 87A (2008) 459–469.
- [12] M. Mozafari, M. Gholipourmalekabadi, N.P.S. Chauhan, N. Jalali, S. Asgari, J.C. Caicedo, A. Hamlekhan, A.M. Urbanska, Synthesis and characterization of nanocrystalline forsterite coated poly(L-lactide-co-β-malic acid) scaffolds for bone tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng. C* 50 (2015) 117–123.
- [13] O. Coulembier, P. Degée, J.L. Hedrick, P. Dubois, From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: especially poly(β-malic acid) derivatives, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 723–747.
- [14] M. Haidopoulos, S. Turgeon, C. Sarra-Bournet, G. Laroche, D. Mantovani, Development of an optimized electrochemical process for subsequent coating of 316 stainless steel for stent applications, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 647–657.
- [15] X.W. Ng, Y. Huang, K.L. Liu, S.G. Lim, H.H. Chen, J.C. Burnett, F. Boey, Y. Chiang, S.S. Venkatraman, In vitro evaluation of cenderitide-eluting stent I—an antirestenosis and proendothelial approach, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 3631–3640.
- [16] P. McDonald, J. Lyons, L. Geever, C. Higginbotham, In vitro degradation and drug release from polymer blends based on poly(DL-lactide), poly(L-lactide-glycolide) and poly(ε-caprolactone), *J. Mater. Sci.* 45 (2009) 1284–1292.
- [17] S.-T. Schmitz-Hertzberg, W.C. Mak, K.K. Lai, C. Teller, F.F. Bier, Multifactorial design of poly(D,L-lactide-co-glycolic acid) capsules with various release properties for differently sized filling agents, *J. Appl. Polym. Sci.* 130 (2013) 4219–4228.
- [18] J. Qian, W. Xu, W. Zhang, X. Jin, Preparation and characterization of biomorphic poly(L-lactide-co-β-malic acid) scaffolds, *Mater. Lett.* 124 (2014) 313–317.
- [19] K.L. Lai, B. He, Z.W. Gu, Preparation and cell compatibility of functionalized biodegradable poly(DL-lactide-co-RS-β-malic acid), *Chin. J. Polym. Sci.* 26 (2008) 177–186.
- [20] Y. Zhang, C. Ni, G. Shi, J. Wang, M. Zhang, W. Li, The polyion complex nanoprodrug of doxorubicin (DOX) with poly(lactic acid-co-malic acid)-block-polyethylene glycol: preparation and drug controlled release, *Med. Chem. Res.* 24 (2015) 1189–1195.
- [21] C.T. Goodhue, E.E. Snell, The bacterial degradation of pantothenic acid. III. Enzymatic formation of aldopantoic acid, *Biochemistry* 5 (1966) 403–408.
- [22] V. Nurmikko, E. Salo, H. Hakola, K. Mäkinen, E.E. Snell, The bacterial degradation of pantothenic acid. II. Pantothenate hydrolase, *Biochemistry* 5 (1966) 399–402.
- [23] Y. Ikada, H. Iwata, F. Horii, T. Matsunaga, M. Taniguchi, M. Suzuki, W. Taki, S. Yamagata, Y. Yonekawa, H. Handa, Blood compatibility of hydrophilic polymers, *J. Biomed. Mater. Res.* 15 (1981) 697–718.
- [24] F. Ouhib, S. Randriamahefa, P. Guerin, C. Barbaud, Synthesis of new statistical and block co-polyesters by ROP of α,α,β-trisubstituted β-lactones and their characterizations, *Des. Monomers Polym.* 8 (2005) 25–35.
- [25] C. Barbaud, F. Faÿ, F. Abdillah, S. Randriamahefa, P. Guérin, Synthesis of new homopolyester and copolyesters by anionic ring-opening polymerization of α,α,β-trisubstituted β-lactones, *Macromol. Chem. Phys.* 205 (2004) 199–207.
- [26] R. Belibel, T. Avramoglou, A. Garcia, C. Barbaud, L. Mora, Effect of chemical heterogeneity of biodegradable polymers on surface energy: a static contact angle analysis of polyester model films, *Mater. Sci. Eng. C* 59 (2015) 998–1006.
- [27] A.M. Reed, D.K. Gilding, Biodegradable polymers for use in surgery-poly(ethylene oxide)/poly(ethylene terephthalate) (PEO/PET) copolymers: 2. In vitro degradation, *Polymer* 22 (1981) 499–504.
- [28] F.E. Kohn, J.W.A. Vandenberg, G. Vanderidder, J. Feijen, The ring-opening polymerization of D,L-lactide in the melt initiated with tetraphenyltin, *J. Appl. Polym. Sci.* 29 (1984) 4265–4277.
- [29] M.K. Ross, J.A. Crow, Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 21 (2007) 187–196.
- [30] Y. Qiao, X. Duan, L. Fan, W. Li, H. Wu, Y. Wang, Synthesis of controlled molecular weight poly(β-malic acid) and conjugation with HCPT as a polymeric drug carrier, *J. Polym. Res.* 21 (2014) 1. C7–397.
- [31] F. Unger, M. Wittmar, F. Morell, T. Kissel, Branched polyesters based on poly(vinyl-3-(dialkylamino)alkylcarbamate-co-vinyl acetate-co-vinyl alcohol)-graft-poly(D,L-lactide-co-glycolide): effects of polymer structure on in vitro degradation behaviour, *Biomaterials* 29 (2008) 2007–2014.
- [32] C.F. van Nostrum, T.F.J. Veldhuis, G.W. Bos, W.E. Hennink, Hydrolytic degradation of oligo(lactic acid): a kinetic and mechanistic study, *Polymer* 45 (2004) 6779–6787.
- [33] S. Li, H. Garreau, M. Vert, Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α-hydroxy acids) in aqueous media, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1 (1990) 198–206.
- [34] A.T. Nazre, S. Lin, Theoretical strength comparison of bioabsorbable (PLLA) plates and conventional stainless steel and titanium plates used in internal fracture fixation, in: *Clinical and Laboratory Performance of Bone Plates*, ASTM International, 1994.
- [35] J. Leng, A.K.-T. Lau, *Multifunctional Polymer Nanocomposites*, CRC Press, 2010.

Résumé

Fucoïdanes extraits de l'algue brune *Ascophyllum nodosum* : Effets pro-angiogéniques *in vitro* et régénération de valves pulmonaires acellularisées.

Les fucoïdanes sont des polysaccharides sulfatés d'origine marine portant des activités biologiques diverses et comparable au glycosaminoglycane (GAGs) endogènes. Leur utilisation comme agents thérapeutiques dans le traitement de maladies cardiovasculaires est envisagée. L'hétérogénéité structurale liée à leur diversité naturelle et aux méthodes d'extraction et de purification, induisent des variations dans leurs propriétés physico-chimiques et leurs effets biologiques. Le but de cette thèse est d'une part, d'établir étude structure-fonction de fucoïdanes extraits de l'algue *Ascophyllum nodosum* sur leurs effets pro-angiogéniques *in vitro* (migration et formation de réseau vasculaire en 2D par des cellules endothéliales humaines, HUVECs) et le rôle des GAGs endogènes ; et d'autre part, l'étude du potentiel régénératif d'un biofilm de fucoïdane/VEGF appliqué sur des prothèses de valves cardiaques porcines acellularisées. Dans notre première étude, nos résultats montrent que la fraction de fucoïdane de bas poids moléculaire (LMWF, 4900 g/mol) induit de effets pro-angiogéniques plus importants qu'une fraction de moyen poids moléculaire (MMWF, 26700 g/mol) sur les HUVECs. De plus, le LMWF garde un potentiel pro-angiogénique avec des cellules HUVECs n'exprimant pas de GAGs endogènes et peut être internalisé par une endocytose dépendante de la clathrine dans laquelle les GAGs seraient partiellement impliqués. Dans notre deuxième étude, nos analyses démontrent que l'application d'un biofilm de fucoïdane/VEGF sur des valves pulmonaires porcines acellularisées induit un potentiel antithrombotique et permet l'adhérence et la survie des HUVECs. Ces travaux suggèrent que ce procédé permettrait la ré-endothélialisation de valves acellulaires pour le développement de bioprothèses auto-régénératives.

Mots clefs : Fucoïdane; Glycosaminoglycane; Biothérapie cardiovasculaire; Cellules endothéliales; Prothèse de valve biologique; Ingénierie tissulaire.

Resume

Fucoidans extracted from brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: *in vitro* pro-angiogenic effects and regeneration of acellularized porcine pulmonary valves.

Fucoidans are marine sulfated polysaccharides carrying various biological activities comparable to endogenous glycosaminoglycans (GAGs). Their use as therapeutic agents in cardiovascular diseases treatment is considered. The structural heterogeneity linked to their natural diversity and to the extraction and purification methods induce variation in their physico-chemical properties and biological activities. The aim of this study is first to establish a structure-function study of fucoidans extracted from the seaweed *Ascophyllum nodosum* on their *in vitro* pro-angiogenic effects (cell migration and vascular network formation by human endothelial cells, HUVECs) and the role of the endogenous GAGs; and the study of the regenerative potential of the application of a biofilm of fucoidan/VEGF on acellular porcine heart valves. In the first part, our results show the the fractionated low molecular weight fucoidan (LMWF, 4900 g/mol) induces higher pro-angiogenic effects than medium molecular weight fucoidan (MMWF, 26700 g/mol) on HUVECs. LMWF kept a pro-angiogenic potential with GAG-free HUVECs and is mainly endocytosed in a clathrin-dependant pathway in which GAGs could be partially involved. In our second study, our data demonstrated that the application of the biofilm fucoidan/VEGF on acellular porcine pulmonary valves induce antithrombotic potential and allow the adhesion and survival of HUVECs. This work suggest that this method allows re-endothelialization of acellular heart valve and could be used to develop self-regenerative valve bioprosthesis.

Keywords: Fucoidan; Glycosaminoglycans; Cardiovascular biotherapy; Endothelial cells; Biological prosthesis; Tissue engineering.