



Etude des effets pro-angiogéniques du fucoïdane de bas poids moléculaire : implication des syndécannes et des enzymes impliquées dans la biosynthèse et la dégradation des héparanes sulfates

Oualid Haddad

► To cite this version:

Oualid Haddad. Etude des effets pro-angiogéniques du fucoïdane de bas poids moléculaire : implication des syndécannes et des enzymes impliquées dans la biosynthèse et la dégradation des héparanes sulfates. Santé. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCD078 . tel-02613302

HAL Id: tel-02613302

<https://theses.hal.science/tel-02613302>

Submitted on 20 May 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.

N° d'ordre :

Université Paris 13 – Léonard de Vinci
U.F.R. Sciences - Médecine - Biologie Humaine

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 13

Discipline : **Sciences de la vie et de la santé**

Présentée et soutenue publiquement par :

Qualid HADDAD

Le 4 décembre 2018

Etude des effets pro-angiogéniques du fucoïdane de bas poids
moléculaire : implication des syndécannes et des enzymes impliquées
dans la biosynthèse et la dégradation des héparanes sulfates.

École doctorale : Galilée ED 146

Unité de recherche : Inserm U1148 Laboratory for Vascular Translational Science

Groupe : Biothérapies et Glycoconjugués

Directrice de thèse : Pr CHARNAUX Nathalie

JURY

Dr ROUIS Mustapha
Pr ALBANESE Patricia
Pr LUTOMSKI Didier
Dr LAMIRAULT Guillaume
Pr CHARNAUX Nathalie
Dr HLAUWATY Hanna

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Directrice de thèse
Membre invité

Remerciements

Tout d'abord, je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté de juger mes travaux de recherche et plus particulièrement mes rapporteurs, le Pr Patricia Albanese et le Dr Mustapha Rouis, pour le temps passé à la lecture de mon manuscrit. Je remercie également le Dr Guillaume Lamirault et le Pr Didier Lutomski pour examiner mon travail de recherche.

Je remercie le Pr Nathalie Charnaux ma directrice de thèse qui m'a encouragé, fait confiance et donné l'opportunité de réaliser un doctorat en science. Je lui suis reconnaissant pour les conseils et la supervision de ma thèse.

Je remercie tout particulièrement mon encadrante de thèse, le Dr Hanna Hlawaty pour ses encouragements, ses conseils et son enthousiasme. Je lui suis reconnaissant pour son soutien tout au long de ma thèse.

Je tiens à remercier mes collègues de l'équipe de Bobigny, le Pr Olivier Oudar, le Dr Angela Sutton, le Dr Christelle Laguillier-Morizot et le Dr Erwan Guyot pour leurs soutiens et leurs conseils. Ainsi que Odile Sainte-Catherine et Naima Zaidi pour leur aide et la bonne humeur.

Je remercie tout les étudiants anciens et présents qui font vivre le laboratoire par leur joie et spontanéité. En particulier les doctorants actuels, Aména Butt, Hadjer Mamoune, Kévin Bassand et Nesrine Mouhoubi. Ainsi que le Dr Nicolas Marinval pour les travaux conjoints.

Je remercie nos retraités, Line Saffar qui m'a formé au poste que j'occupe actuellement et le Dr Roger Vassy qui m'a transmis tout son savoir-faire sur le BIAcore.

Je remercie tout les collaborateurs et toutes les personnes qui m'ont aidé au cours de ma thèse.

Je remercie ma famille et en particulier ma mère qui a consacré son temps à s'occuper de ma petite tornade, Lucie.

Enfin, je remercie ma femme qui m'a encouragé et épaulé tout au long de cette thèse, et qui n'aurait pas pu aboutir sans elle.

Sommaire

Avant-propos	4
Liste des illustrations	6
Abbreviations	7
INTRODUCTION	9
I. Glycosaminoglycannes.....	11
A. Structure.....	11
B. Fonctions des GAGs	12
C. Les chaînes HS	13
1. Biosynthèse.....	13
2. Catabolisme	14
II. Les protéoglycannes	15
A. PG extracellulaires	15
B. PG intracellulaire	17
C. PG membranaires	18
1. Les syndécannes	18
2. Rôle du syndécanne-4	19
III. Chimiokines et facteurs de croissance	20
A. Les facteurs de croissance.....	21
B. Les chimiokines.....	22
IV. Angiogenèse.....	23
A. Structure des vaisseaux sanguins.....	23
B. Formation de vaisseau	25
C. Angiogenèse physiologique.....	27
V. L'ischémie	31
A. Pathophysiologie tissulaire	31
B. Thérapies	32

VI.	Nouvelles thérapies : les mimétiques de GAGs.....	33
A.	Mimétiques synthétiques de GAGs	34
B.	Mimétiques naturels de GAGs.....	35
VII.	Le fucoïdane	36
A.	Fucoïdane - Composition et Taille.....	36
B.	Fucoïdane - Mimétique de GAG.....	37
C.	Travaux antérieurs du laboratoire.....	37
1.	LMWF et hyperplasie intinale	38
2.	Matrice 3D de fucoïdane et néovascularisation.....	39
VIII.	But de la thèse.....	42
	RESULTATS	43
	Article 1 : L'héparanase et le syndécanne-4 sont impliqués dans l'angiogenèse induite par le fucoïdane de bas poids moléculaire	44
	Article 2 : Identification d'un potentiel pro-angiogénique et d'un mécanisme d'internalisation cellulaire d'une fraction de fucoïdane de bas poids moléculaire et hautement sulfaté.	66
	DISCUSSION	88
	BIBLIOGRAPHIE.....	98
	ANNEXE.....	109

Avant-propos

L'Université Paris 13 m'a accueilli et formé tout au long de mon cursus Universitaire. À la fin de mes études, ne sachant pas si j'étais prêt à conduire une thèse, j'ai d'abord préféré m'orienter vers un Master à finalité professionnelle dans le but de devenir Ingénieur d'étude (IGE). Après l'obtention de mon Master en 2007, j'ai intégré le groupe "Biothérapie et Glycoconjugués" au sein de l'équipe 3 du laboratoire LVTS, INSERM U1448, sur le site de l'UFR SMBH, Université Paris 13 - campus de Bobigny.

Dès mon arrivé dans le laboratoire, j'ai préparé, puis réussi le concours d'IGE en 2009. Depuis cette date, j'occupe diverses fonctions de recherche mais également administratives. En effet, depuis ma prise de fonction, j'ai participé à de nombreuses publications m'ayant permis ainsi de développer mes compétences à la recherche scientifique. En tant qu'IGE, je transmets mes compétences techniques et je participe à la formation des étudiants que nous accueillons. Parallèlement à cela, je suis responsable d'un équipement qui est le BIAcore X100. Cette machine, reposant sur le principe de résonance plasmonique de surface, nous permet d'étudier l'affinité entre deux molécules. Grâce à cela, j'ai eu à de nombreuses reprises l'occasion de collaborer avec des laboratoires extérieurs à Paris13.

Depuis que je suis au laboratoire, je participe étroitement à l'élaboration de projets avec les Enseignants-Chercheurs mais également à toutes les réflexions scientifiques que nous avons durant nos échanges en réunion d'équipe.

En plus de mes responsabilités en tant qu'IGE, j'occupe des responsabilités collectives en étant l'Assistant de prévention du groupe de recherche mais également membre élu au Conseil de Gestion de l'UFR SMBH depuis 2015.

C'est en 2014, encouragé par la responsable du groupe, Nathalie CHARNAUX, que j'ai souhaité entamer un projet de recherche Doctoral. Grâce à mon statut de fonctionnaire, je n'ai pas eu l'obligation d'obtenir un financement propre pour la réalisation de cette thèse. Cependant, ma recherche doctorale s'est ajoutée à mes responsabilités et fonctions que j'avais déjà.

Après quelques temps d'adaptation et d'organisation, j'ai réussi à mener pleinement ces nouvelles fonctions. Durant la préparation de mon Doctorat (2014-2018) j'ai participé à l'élaboration et l'écriture de six publications scientifiques, dont deux vont être présenté dans ce manuscrit.

Liste des illustrations

	Page
Figure 1. Composition de la matrice extracellulaire	10
Figure 2. Tableau de la structure des différentes familles de GAGs	12
Figure 3. Synthèse des chaînes HS	13
Figure 4. Voie de synthèse et d'activation de l'héparanase.....	15
Figure 5. Présentation des différentes familles des GAGs selon leur localisation dans la cellule, la membrane cellulaire et dans la matrice extracellulaire.....	17
Figure 6. Structure de la famille des syndécannes.....	19
Figure 7. Structure des CC, CXC, CX3C et C-chimiokines.....	22
Figure 8. Schéma d'un vaisseau sanguin avec les cellules présentes dans les différentes tuniques de la paroi artérielle : intima, media et adventice.....	25
Figure 9. Schéma représentant les étapes de la vasculogenèse.....	26
Figure 10. Le processus d'artériogenèse.....	27
Figure 11. Représentation du mécanisme d'angiogenèse par invagination.....	28
Figure 12. Représentation des étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement....	30
Figure 13. Représentation des étapes d'évolution de l'athérosclérose avec la formation de la plaque d'athérome riche en lipides, macrophages et CML.....	32
Figure 14. Structure consensus du fucoïdane extrait de <i>Fucus evanescens</i> , de <i>Fucus vesiculosus</i> et d' <i>Ascophyllum nodosum</i>	36
Figure 15. Effet du fucoïdane sur l'hyperplasie intimale chez le rat	39
Figure 16. Cinétique de dosage du VEGF libéré dans le temps par les matrices de pullulane/dextrane contenant ou non les fucoidane, LMWF, MMWF et HMWF.....	40
Figure 17. Effet pro-angiogénique du MMWF et du VEGF dans un modèle d'implantation sous-cutané de matrice de pullulane/dextrane chez la souris	41

Abbreviations

ADAM:	A Desintegrin And Metalloproteinase
AH:	Acide Hyaluronique
AOMI:	Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs
AVC:	Accident Vasculaire Cerebral
CD44:	Cluster of Differenciation 44
CE:	Cellules Endothéliales
CML:	Cellules musculaires lisses
CS:	Chondroïtine sulfate
DII-4:	Delta-like ligand-4
DS:	Dermatane Sulfate
EXT1:	Exostosines 1
EXT2:	Exostosines 2
FGF-2:	Fibroblast Growth Factor 2
FGFR:	Récepteurs du FGF
GAG :	Glycosaminoglycannes
Gal:	Galactose
GalNAc:	N-acétylgalactosamine
GlcA:	acide D-glucuronique
GlcNAc:	N-acétylglucosamine
GPI:	Glycosylphosphatidylinositol
HBP:	Heparin-binding protein
Hep:	Héparine
HMWF:	High Molecular Weight Fucoïdan
HPLC:	Chromatographie de phase liquide à haute performance.
HPSE:	héparanase
HS:	Héparanes Sulfates
ICC:	Ischémie Critique Chronique des membres inférieurs
IdoA:	Acide L-iduronique
JAG-1:	Jagged-1
KS:	Kératanes Sulfates
LMWF:	Low molecular weight fucoïdan – Fucoïdane de petit poids moléculaire

LRR:	Leucine-Rich Repeat
MCP-1:	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEC:	Matrice Extracellulaire
MMP:	Matrix Metallo-protease – Metalloprotéase matricielle
MMP-2:	Métalloprotéases Matricielles 2
MMP-9:	Métalloprotéases Matricielles 9
MMWF:	Medium molecular weight fucoidan
NDST:	N-Déacétylase/N-Sulfotransférase
NRP:	Neuropiline
PDG:	Postsynaptic density 95, Disk large, Zona occludens-1
PDGF:	Platelet derived growth factor - facteur de croissance d'origine plaquettaire
PEC:	Progéniteurs Endothéliaux Circulants
PG:	Proteoglycannes
PKC- α :	Protéine Kinase C α
RANTES:	Regulated regulated upon activation normal t cell expressed and secreted
RCPG:	Récepteurs Couplés aux Protéines G
RGTA:	ReGeneraTing Agent
SDC:	Syndécannes
SDF-1:	Stromal cell-derived factor-1
SLRP:	Small Leucine-Rich Proteoglycans
Sulfs:	Sulfatases
TGF- β :	Transforming Growth Factor- β
TIMPs:	Tissue Inhibitor of MetalloProteinase
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

La matrice extracellulaire (MEC) constitue un espace situé entre les cellules. Elle est composée d'un ensemble complexe de molécules de tailles différentes formant une structure tridimensionnelle restant en contact étroit avec les cellules. Elle contribue à conférer aux vaisseaux sanguins une structure et des propriétés mécaniques de résistance aux forces physiques et mécaniques. La MEC joue aussi un rôle dans la régulation des fonctions cellulaires, la différenciation et la prolifération. Elle est principalement composée de trois grandes familles de molécules, des protéines fibreuses de structure, comme le collagène et l'élastine, des glycoprotéines, comme la fibronectine et la laminine et des polymères de glucides nommés glycosaminoglycannes (GAG) (Figure 1). Les GAGs peuvent être libres ou portés par des protéines pour former des protéoglycannes (PG) (Egeblad 2002). Certaines molécules de la MEC interagissent avec des récepteurs membranaires directement associés au cytosquelette, ces interactions aboutissent à la modulation de la morphologie des cellules, leur migration et leur survie (Brooke 2003). Les cellules sécrètent les composants de la MEC et aussi des protéases qui participent à sa dégradation. La MEC se renouvelle continuellement selon un équilibre stable entre formation et dégradation en conditions physiologiques.

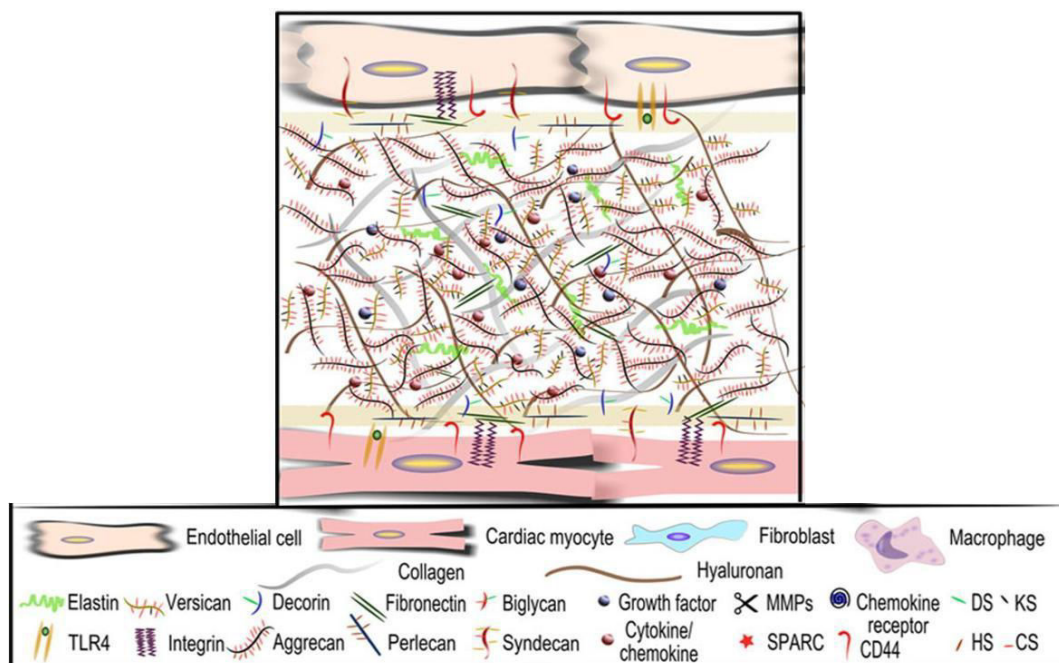


Figure 1. Composition de la matrice extracellulaire (Tan 2016).

I. Glycosaminoglycannes

A. Structure

Les GAGs sont de longues chaînes polysaccharidiques, généralement non ramifiées présentes dans la MEC, les tissus conjonctifs et à la surface des cellules, sous forme libre ou liées à la membrane cellulaire. Ils sont constitués par la répétition d'une unité disaccharidique. Dans la majorité des cas, cette unité disaccharidique est formée par l'association d'un acide uronique (acide D-glucuronique GlcA ou acide L-iduronique IdoA) et d'une osamine le plus souvent N-acétylée (N-acétylglucosamine GlcNAc, N-acétylgalactosamine GalNAc), excepté pour les kératanes sulfates pour lesquels l'unité disaccharidique correspond à l'association entre la GlcNAc et le galactose (Gal). Les chondroïtines sulfates (CS)/dermatanes sulfates (DS) sont constitués de répétition de N-acétylgalactosamine (GalNAc) et d'acide glucuronique (GlcA) ou iduronique (IdoA). Les héparines/héparanes sulfates (Hep/HS) sont composés d'une répétition de GlcNAc et de GlcA ou IdoA (Gandhi 2008). L'acide hyaluronique (AH) est lui constitué d'un dimère de base GlcNAc-GlcA. L'AH présente d'autres caractéristiques : il s'agit d'un GAG non sulfaté, dont les chaînes ne sont pas liées de façon covalente à un core protéique. Les autres GAGs peuvent, eux, être substitués par des groupements sulfates en nombre et position variables ce qui est résumé dans la figure 2. Du fait des groupements acides apportés par les acides uroniques et des groupements sulfates, les GAGs sont des molécules chargées négativement, ce qui leur confère des propriétés biologiques particulières. Par ailleurs, en s'associant à un core protéique, ils forment ce que l'on appelle un protéoglycanne.

<i>GAG</i>	<i>Disaccharide structure</i>	<i>Uronic acid</i>	<i>Hexosamine</i>	<i>Substitutions</i>
Hp/ HS		GlcA/IdoA	GlcN	X = SO ₃ ⁻ or H Y = Ac or SO ₃ ⁻
CS/DS		GlcA/IdoA	GalNAc	X = SO ₃ ⁻ or H
KS		Gal	GlcNAc	X = SO ₃ ⁻ or H

Figure 2. Tableau de la structure des différentes familles de GAGs (Ly 2010).

B. Fonctions des GAGs

Du fait de leurs charges négatives, les GAGs se lient à différentes molécules en formant des liaisons électrostatiques avec les cations et en s'associant à des molécules d'eau pour former des hydrogels.

Les GAGs peuvent s'associer à des protéines chargées positivement parmi lesquelles on retrouve un grand nombre de facteurs de croissance, comme le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et le Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2), des cytokines et des chimiokines, comme le Stromal Derived Factor 1 (SDF-1/CXCL12) ou le Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES/CCL5), ainsi qu'à des protéines d'adhérence comme la fibronectine.

La liaison de ces molécules avec les GAGs permet leur accumulation localement, leur confère une relative protection vis-à-vis de la protéolyse et peut aider à leur présentation aux récepteurs spécifiques.

A l'exception l'AH, la majorité des GAGs sont liés à une protéine membranaire appelée core protéique pour former les protéoglycannes (PG). Les PG peuvent être localisés dans la MEC sous forme libre ou liés à la membrane.

C. Les chaînes HS

1. Biosynthèse

Les chaînes HS sont généralement longues (de 50 à 200 unités saccharidiques) et non ramifiées. Elles sont polymérisées dans l'appareil de Golgi. La polymérisation des chaînes HS se fait à partir d'un tétrasaccharide xylose - galactose - galactose - acide glucuronique. Le xylose est lié par une liaison O-osidique sur une sérine et l'élongation de la chaîne HS se fait par additions successives d'acide D-glucuronique (GlcA) et de glucosamine *N*-acétylée (GlcNAc) en alternance. Cette synthèse se fait grâce aux enzymes Exostosines 1 et 2 (EXT1, EXT2).

Par la suite, une élongation de ces chaînes est effectuée par l'intermédiaire de différents types d'enzymes. Les *N*-déacétylases et *N*-sulfotransférases (NDST), substituent les groupements *N*-acétylés par des groupements *N*-sulfatés (Figure 3). L'épimérase C5 agit sur des résidus GlcA, générant des résidus IdoA conduisant à une épimérisation partielle de certains GlcA. Enfin les saccharides peuvent être sulfatés sur la position 2-O, 3-O ou 6-O par les sulfotransférases OST (Kreuger 2012, El Masri 2017).

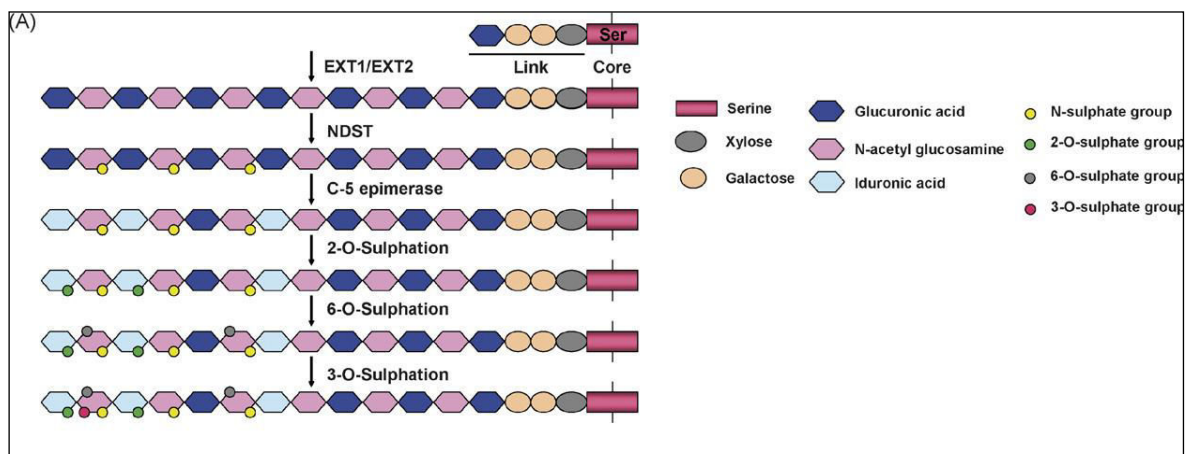


Figure 3. Synthèse des chaînes HS (Alexopoulou 2007).

2. Catabolisme

Les chaînes HS sont constamment renouvelées à la surface des cellules pour qu'elles puissent réagir aux modifications de l'environnement, leur demi-vie est d'environ 3 à 4 heures (Yanagishita 1984). Les chaînes HS peuvent être dégradées par une enzyme, l'héparanase (HPSE) qui est une endoglucuronidase qui clive les HS en fragments d'environ 20 unités saccharidiques. Ces fragments sont toujours fonctionnels, ils peuvent encore se fixer à leurs ligands. Les oligosaccharides issus des chaînes d'HS peuvent ensuite être dégradés en monosaccharides dans les lysosomes sous l'action de plusieurs exoenzymes (Kreuger 2012).

L'HPSE est synthétisée sous forme d'une pro-enzyme de 65 kDa (Figure 4) qui est sécrétée par la cellule. La pro-HPSE est clivée dans les lysosomes en 2 parties de 50 et 8 kDa qui forment un complexe non covalent (Bame 2001). L'activité de l'HPSE a longtemps été étudiée dans sa localisation intracellulaire. Les dernières recherches se focalisent sur son activité extracellulaire. L'HPSE extracellulaire est impliquée dans le remodelage de la MEC pendant l'inflammation, l'angiogenèse et la croissance tumorale (Vlodavsky 2006, Ihrcke 1998).

D'autres enzymes de type sulfatases, les Sulfs, interviennent dans l'inactivation des chaînes HS. Les Sulfs agissent au niveau extracellulaire, elles hydrolysent de façon spécifique les groupements 6-O-sulfates des chaînes HS. La perte des groupements 6-O-sulfates réduit fortement la capacité des chaînes HS à se lier aux facteurs de croissance et chimiokines (Ai 2003).

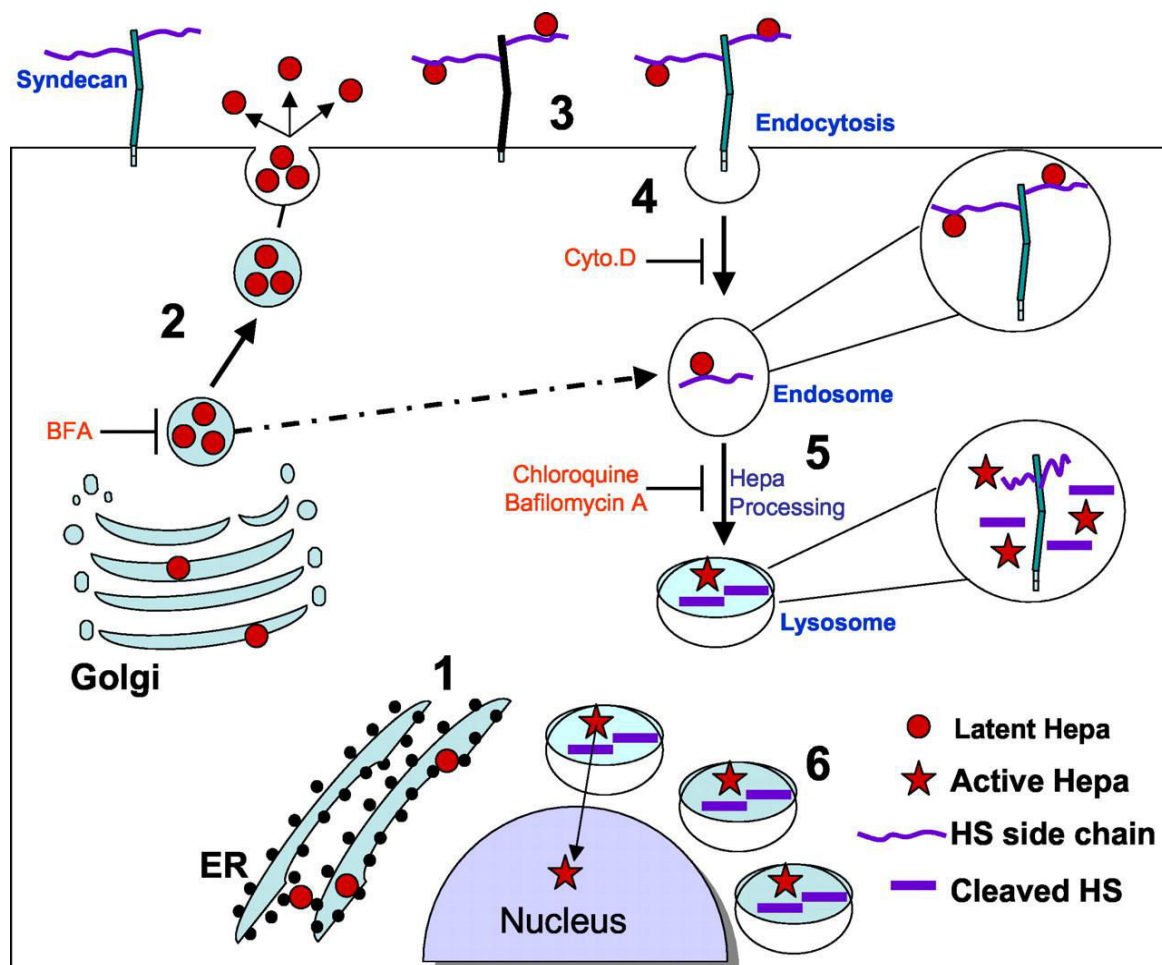


Figure 4. Voie de synthèse et d'activation de l'héparanase (Svetlana Gingis-Velitski 2004).

II. Les protéoglycannes

A. PG extracellulaires

On peut distinguer trois grandes familles de PG extracellulaires, deux se trouvent dans la MEC, les Hyalectannes et les Small Leucine-Rich Proteoglycans (SLRP) et la dernière famille est celle des PG de la membrane basale.

Dans la famille des hyalectannes, aussi appelé lecticanes, nous trouvons les aggrecannes, versicannes, neurocannes et brévicannes. Ils ont pour caractéristique commune d'avoir un domaine de liaison à l'AH en position N-terminale et aux lectines en position C-terminale.

L'aggrécanne possède quelques chaînes KS et peut avoir plus de cent chaînes CS, avec sa liaison à l'AH qui est le GAG le plus abondant, il forme des grands complexes multiprotéiques. L'aggrécanne se trouve principalement dans le cartilage. Grâce à ses chaînes CS, il forme un hydrogel qui renforce la structure tissulaire et confère un rôle dans la résistance mécanique à la compression (Roughley 2006).

La famille des SLRP comprend la décorine le biglycane et le lumicanne. Dans la partie centrale du core protéique il y a une région Leucine-Rich Repeat (LRR) qui permet la liaison avec des protéines.

La décorine possède une chaîne DS ou CS et se lie au collagène de type I par sa région LRR, c'est un régulateur de la fibrillogenèse (formation de la fibre de collagène). Elle peut aussi se lier au Facteur de Croissance Transformant β (Transforming Growth β Factor (TGF- β)) et au récepteur du facteur de croissance épidermal (EGFR) ce qui lui permet d'inhiber la croissance cellulaire (Kolb 2001).

Le perlécanne, l'agrine, les collagènes XV et XVIII sont des représentants de la famille des PG de la membrane basale (Figure 5). Ce sont des PG qui ont généralement des chaînes HS, leurs cores protéiques possèdent des domaines de liaison pour des intégrines ou pour des récepteurs membranaires.

Le perlécanne est abondant dans les membranes basales. Il possède 3 chaînes HS en partie N-terminale qui peuvent se fixer aux facteurs pro-angiogéniques, tels que VEGF, FGF et PDGF. Il module leurs effets en les concentrant et en les présentant à leurs récepteurs. La partie C-terminale peut être clivée par des protéases, libérant un fragment appelé endorépeline qui a des effets anti-angiogéniques en se liant à l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ (Iozzo 2011).

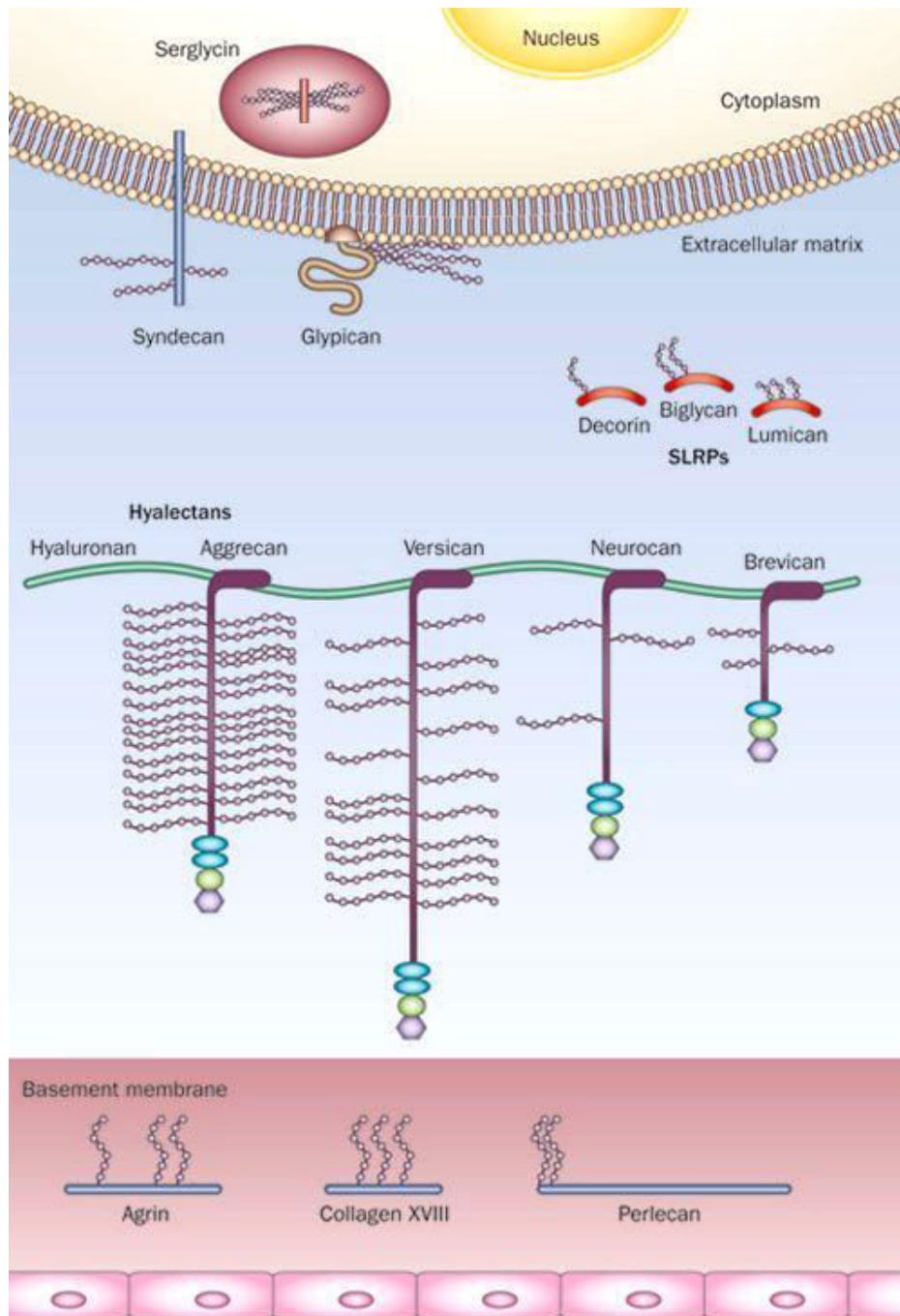


Figure 5. Présentation des différentes familles des GAGs selon leur localisation dans la cellule, la membrane cellulaire et dans la matrice extracellulaire (Edwards 2012).

B. PG intracellulaire

A ce jour il n'y a qu'un seul PG intracellulaire connu, la serglycine. Elle a été découverte dans les mastocytes où elle est présente dans les granules. Une autre caractéristique unique de la serglycine est qu'elle possède des chaînes d'héparine, ce qui lui permet de retenir plusieurs protéases et aussi d'autres composants des granules comme l'histamine. Le serglycine est présente dans d'autres cellules,

notamment les cellules musculaires lisses et endothéliales. Elle possède selon le type cellulaire des chaînes CS à la place des chaînes d'héparine. Dans les cellules endothéliales, elle se lie à la chimiokine GRO α /CXCL1, ce qui l'implique dans la prolifération et la réponse inflammatoire (Reine 2015).

C. PG membranaires

Les PG se trouvant sur la membrane de la cellule possèdent une partie protéique transmembranaire ou sont attachés au feuillet externe par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI).

La famille des glypicannes est la seule à avoir une ancre GPI, ils ont un ectodomaine globulaire et portent des chaînes HS. Parmi les autres PG membranaires il y a les neuropilines, le β -glycane, le CD44 et la famille des syndécannes (SDC).

1. Les syndécannes

La famille des SDCs comporte quatre membres, les SDC-1 et -3 possèdent des chaînes HS et CS, les SDC-2 et 4 ont exclusivement des chaînes HS. Les SDCs se différencient aussi par les types cellulaires qui les expriment. Le SDC-1 se trouve dans les cellules épithéliales, le SDC-2 est exprimé par les cellules mésenchymateuses et les tissus neuronaux, le SDC-3 est présent dans les tissus neuronaux et les cellules du tissu musculaire squelettique ; enfin le SDC-4 est exprimé de façon ubiquitaire.

En plus de la partie N-terminale extracellulaire portant les GAGs et la partie transmembranaire, il existe une courte partie intracytoplasmique C-terminale (Figure 6). Elle est divisée en trois régions, deux régions C1 et C2 conservées entre les différents SDCs, ainsi qu'une région variable V propre à chaque SDC (Bernfield 1992).

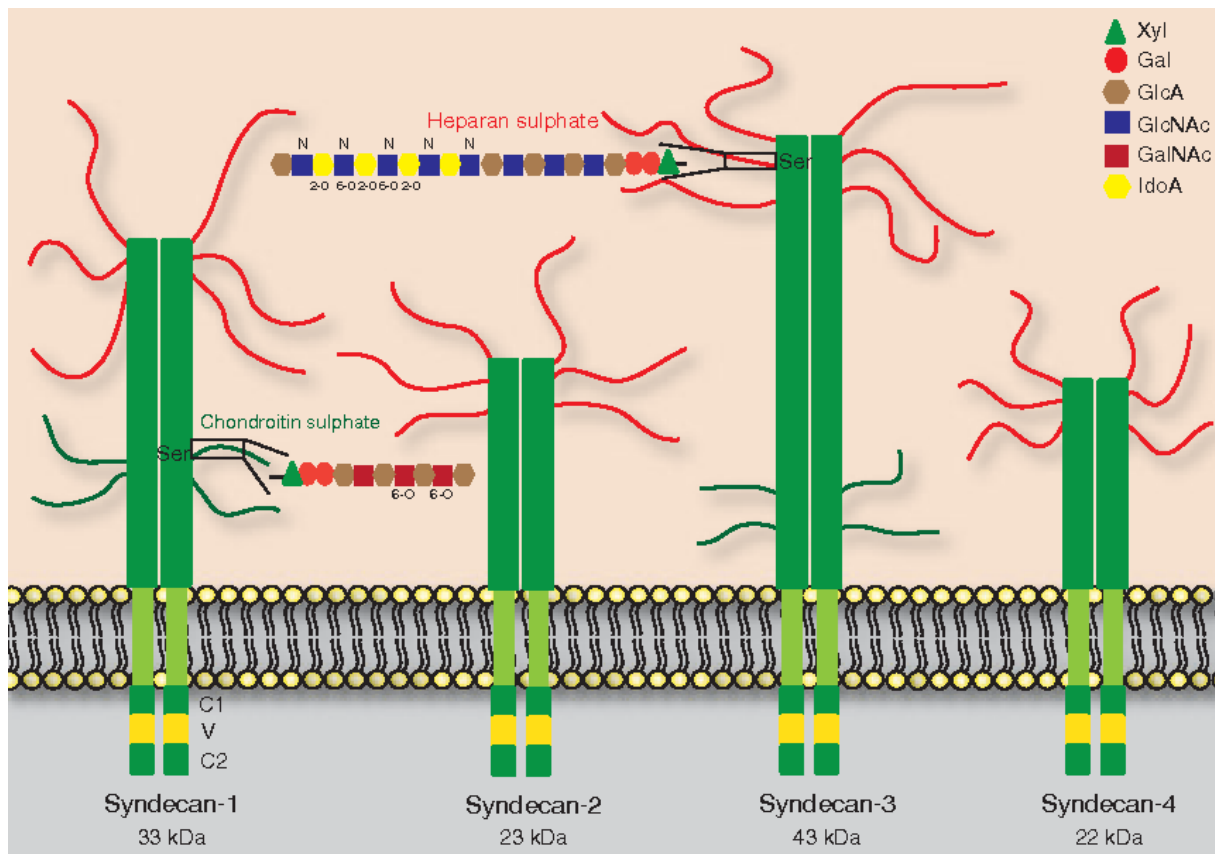


Figure 6. Structure de la famille des syndécannes (Manon-Jensen 2010).

La région C1 permet les interactions avec des molécules du cytosquelette grâce à la liaison avec la cortactine, l'eitrine, la kinase Src et la tubuline. Dans la région C2 se fixent des protéines à domaine PDZ (Postsynaptic density 95, Disk large, Zona occludens-1), comme la synténine ou la synbindine (Grootjans 1997). La région V du SDC-4 peut se lier au cytosquelette d'actine puisque qu'il possède un domaine de liaison à l' α -actinine. Il y a aussi dans la région V des sites de liaison à des protéines de signalisation comme le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) (Alexopoulou 2007).

2. Rôle du syndécanne-4

Les chaînes HS du SDC-4 lui permettent de fixer des facteurs de croissance ou des chimiokines pour les concentrer à la surface de la cellule et les présenter à leurs récepteurs membranaires. La fixation de ligand sur le SDC-4, comme le FGF-2, permet son oligomérisation. Il forme des homodimères à l'aide de sa partie transmembranaire et de la partie variable qui lie le phosphatidylinositol 4,5-

bisphosphate (PIP2), ce qui va ensuite induire l'activation de la protéine kinase C α (PKC- α) et ainsi activer la voie de signalisation intracellulaire associée (Horowitz 1998, Elfenbein 2013). De part sa capacité à émettre un signal intracellulaire, le SDC-4 peut être considéré comme un récepteur fonctionnel.

Le domaine extracellulaire du SDC-4 peut aussi se lier avec d'autres composants de la MEC, la fibronectine et la laminine et à des molécules d'adhérence, les intégrines ($\alpha 5 \beta 1$) (Carulli 2012). Son domaine intracellulaire interagit avec l' α -actinine du cytosquelette d'actine. Il est aussi impliqué dans la stabilisation des contacts focaux en activant des protéines qui interviennent dans le remodelage du cytosquelette (la Focal Adhesion Kinase, la vinculine, la paxilline) (Elfenbein 2013). Par ses caractéristiques, le SDC-4 joue un rôle important dans les phénomènes d'adhérence, de migration cellulaire, mais aussi dans les processus d'inflammation et d'angiogenèse. Les études récentes montrent qu'en réponse à l'inflammation, les cellules endothéliales surexpriment le SDC-4 afin de moduler la réponse inflammatoire (Vuong 2015). Dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez des souris diabétiques, la délivrance de SDC-4 exogène au niveau du tissu ischémié augmente l'angiogenèse (Das 2016).

En plus de l'HPSE qui dégrade les HS, l'ectodomaine du SDC peut être clivé (shedding) par des protéases, comme les métalloprotéases matricielles 2 et 9 (MMP-2, MMP-9), les "A disintegrin and metalloproteinases" (ADAM), la thrombine et la plasmine. Une fois que l'ectodomaine est clivé, il se retrouve dans la MEC où il va retenir ses ligands (facteurs de croissance, chimiokines) et créer un gradient de concentration dans la MEC (Manon-Jensen 2013).

III. Chimiokines et facteurs de croissance

Les GAGs portés par les PGs peuvent se fixer à des facteurs de croissance, des protéases, des cytokines et des chimiokines. Les groupements carboxyles et sulfates des chaînes GAGs étant chargés négativement interagissent avec les charges positives des acides aminés basiques tels que l'arginine, la lysine et l'histidine. Les chaînes HS se lient à des molécules comportant un domaine de

liaison à l'héparine, deux séquences consensus ont été décrites. La présence dans une protéine des séquences XBBXBX ou XBBBXXBX dans lesquelles B est un acide aminé basique permet la liaison de la protéine aux chaînes HS (Cardin 1989).

A. Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance, comme le VEGF et le FGF, possèdent un domaine de liaison à l'héparine, ils sont aussi nommés protéine liant l'héparine (heparin binding protein - HBP).

La famille des VEGF compte six membres. Ce sont des facteurs solubles qui forment des homodimères. Ils sont impliqués dans la formation de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Le VEGF-A est le plus représenté, il possède deux récepteurs membranaires de type tyrosine kinase, le VEGFR-1/Flt-1 et le VEGFR-2/KDR. Il peut aussi se lier à des corécepteurs, les neuropilines 1 et 2 (NRP), qui sont des PG avec des chaînes HS et CS. La NRP permet de présenter le VEGF à son récepteur et aussi d'augmenter l'affinité de liaison entre le VEGF et son récepteur. Le VEGF-A possède plusieurs isoformes issues d'épissages alternatifs (34- 45 KDa), les exons 6 et 7 possèdent un domaine de liaison à l'héparine, le site de liaison aux NRPs se trouve aussi sur l'exon 7. Le VEGF₁₆₅ est le VEGF-A le plus exprimé dans les cellules, le chiffre correspondant au nombre d'acides aminés. Le VEGF₁₁₁ est dépourvu des exons 5 à 7, il ne peut donc se lier ni aux NRPs ni aux GAGs (Delcombel 2013).

Concernant la famille des FGF, il y en a dix-huit au total qui sont exprimés chez l'homme (FGF-1 à 10 et FGF-16 à 23). Parmi eux les FGF-11 à 14, aussi appelés les facteurs homologues du FGF, ne se fixent pas aux récepteurs du FGF (FGFR). Ces récepteurs sont au nombre de cinq, les FGFR-1 à 4 sont les récepteurs canoniques des FGF. Ils possèdent neuf domaines tyrosine kinase qui permettent d'induire un signal intracellulaire (Beenken 2009). Le FGFR-5, aussi nommé FGFR-1, ne possède pas de domaine tyrosine kinase (Trueb 2011).

Le FGF-2 peut se lier directement à son récepteur. Dans ce cas la liaison ne déclenche pas de signalisation cellulaire. Pour que le FGFR initie un signal, la liaison

entre le FGF et l'HS est nécessaire. Ils forment ainsi un complexe avec le FGF-2, l'HS et le FGFR, obligatoire pour l'activation du FGFR (Rapraeger 1991). De plus, le FGF-2 peut se lier aux chaînes HS du SDC-4 et induire un signal intracellulaire (Elfenbein 2013). Le FGF-2 intervient dans l'angiogenèse, il permet l'expression du VEGF par les cellules endothéliales (Murakami 2008).

B. Les chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines chimioattractantes. Leur masse moléculaire varie entre 7 et 14 kDa. Un classement des chimiokines a été réalisé selon la présence de quatre cystéines conservées et du nombre d'acides aminés qui s'intercalent entre les deux premières cystéines en position N-terminale. Nous pouvons donc distinguer les CC, CXC, CX3C et les C-chimiokines, ces dernières n'ont que deux des quatre cystéines (Figure 7).

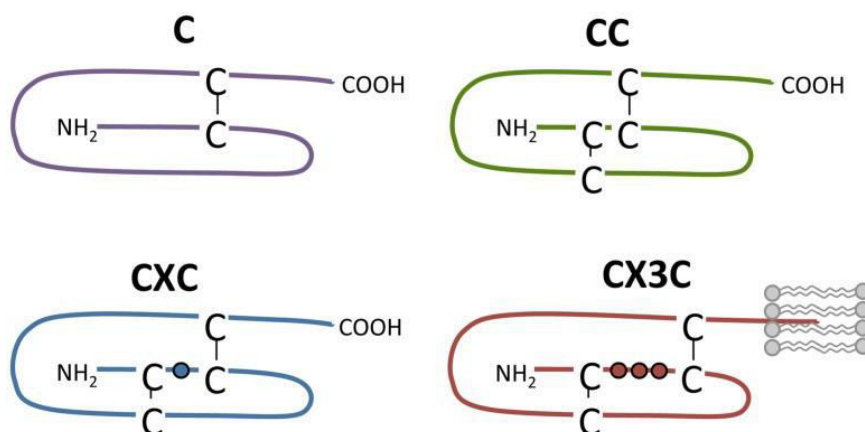


Figure 7. Structure des CC, CXC, CX3C et C-chimiokines (De Munnik 2015).

Dans la famille CX3C, il n'y a qu'un seul membre, la fractalkine/CX3CL1. La fractalkine possède un domaine mucine transmembranaire, c'est la seule chimiokine qui peut être membranaire. Quand elle est liée à la membrane, elle joue un rôle de molécule d'adhérence, le domaine mucine peut être clivé par les protéases ADAM 10 et 17. Une fois soluble, la fractalkine permet le recrutement des lymphocytes T et des monocytes (Zlotnik 2000).

Les chimiokines peuvent former des dimères ou des oligomères. Cette oligomérisation est facilitée par la liaison aux GAGs. Les formes monomériques sont

suffisantes pour se lier à leurs récepteurs et induire un signal. En revanche pour la plupart des chimiokines, l'oligomérisation est nécessaire pour le recrutement de cellules *in vivo* (Proudfoot 2003).

Les récepteurs canoniques des chimiokines sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires, composés d'un domaine N-terminal extracellulaire, trois boucles intracellulaires, trois boucles extracellulaires et une protéine Gα. Ces récepteurs peuvent être internalisés et dégradés pour désensibiliser les RCPG, entraînant avec eux les chimiokines et les corécepteurs (Pierce 2002).

Notre laboratoire a montré que la chimiokine Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES/CCL5) augmente la migration et l'invasion des cellules endothéliales *in vitro*. RANTES/CCL5 augmente aussi l'angiogenèse *in vivo*, dans un modèle sous-cutané chez le rat (Suffee 2012).

La chimiokine SDF-1/CXCL12 et son récepteur CXCR4 ont un rôle primordial dans le développement des vaisseaux sanguins au stade embryonnaire. Les souris SDF-1^{-/-} n'ont pas de recrutement de cellules souches hématopoïétiques, ce qui aboutit à des anomalies de formation des vaisseaux sanguins et au décès des souris (Tachibana 1998). Chez l'adulte, SDF-1/CXCL12 permet la mobilisation de progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) de la moelle osseuse vers le sang. Les PEC vont ensuite pouvoir se différencier en cellules endothéliales qui peuvent former des vaisseaux dans les tissus lésés ou ischémiés (De Falco 2004). Les PEC sont attirés sur ces sites par un gradient de chimiokines comme RANTES/CCL5 ou le Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/CCL2) (Ishida 2012, Hristov 2007).

IV. Angiogenèse

A. Structure des vaisseaux sanguins

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), le tout centré sur le cœur. Les vaisseaux sanguins transportent le sang

riche en nutriments et en gaz. Dans la circulation systémique, les artères apportent du dioxygène et des nutriments aux organes alors que les veines permettent l'évacuation du dioxyde de carbone et des déchets. Au niveau de la circulation pulmonaire, les transports de gaz sont inversés, le dioxyde de carbone se retrouve dans les artères et le dioxygène dans les veines.

La paroi des vaisseaux est constituée de trois tuniques, l'intima, la média et l'adventice.

L'intima est la tunique interne du vaisseau qui est en contact direct avec le sang. Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE). Les CE sont liées entre elles par des jonctions stables qui leur permettent de résister au flux sanguins qui entraîne des forces de cisaillement et une pression sur elles. A l'état physiologique, les CE forment une monocouche semi-perméable, qui ne laisse traverser dans le tissu que les nutriments. Dans les conditions pathologiques liées au développement de maladies vasculaires, telles que l'hyperplasie intimale et l'athérosclérose, les CE sont activées par une modification du flux sanguin ou un processus inflammatoire. L'endothélium perd sa fonction de barrière semi-perméable et permet le passage des cellules immunitaires (lymphocytes, monocytes...) du sang vers le tissu selon un processus appelé diapédèse (Martinez-Lemus, 2012).

La tunique centrale appelée média est composée d'une multicouche de péricytes pour les capillaires, et de cellules musculaires lisses (CML) pour les vaisseaux de plus gros diamètre. La MEC se retrouve entre les couches de cellules. Elle est composée d'une lame basale (collagène et fibronectine) et des lames élastiques (collagène et élastine). La présence des CML et de la MEC permet aux vaisseaux de résister au flux sanguin et à sa vasomotricité (Martinez-Lemus 2012).

L'adventice est la tunique externe de la paroi artérielle. Elle est constituée de cellules fibroblastiques. Dans les vaisseaux de gros calibre, l'adventice est irriguée par des capillaires nommés *vasa vasorum* (Figure 8). Ces derniers sont composés d'une monocouche de CE entourée par une lame basale et les fibroblastes. On retrouve aussi la présence dans l'adventice d'une innervation par le système parasympathique qui stimule les CML et régule les contractions du vaisseau (Gingras, 2009).

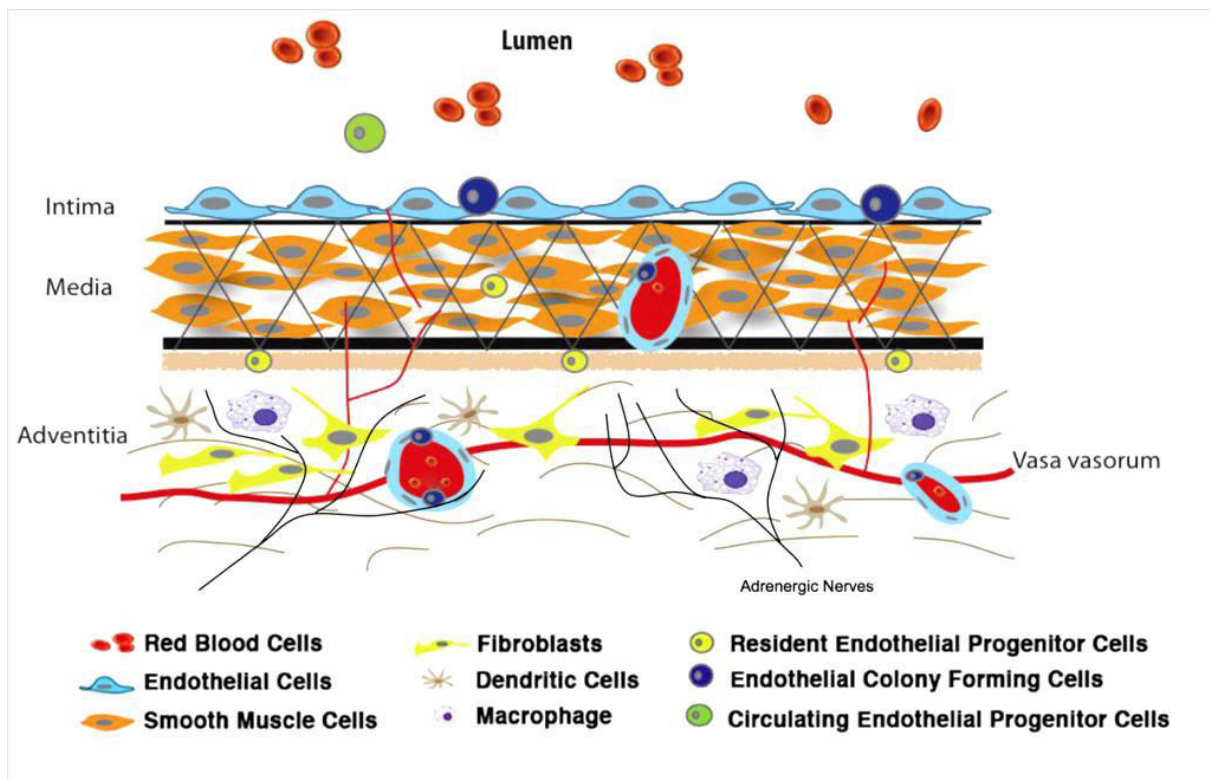


Figure 8. Schéma d'un vaisseau sanguin avec les cellules présentes dans les différentes tuniques de la paroi artérielle : intima, media et adventice (Stenmark 2013).

B. Formation de vaisseau

Il existe trois processus différents qui conduisent à la formation de vaisseaux sanguins : la vasculogenèse, l'artériogenèse et l'angiogenèse.

La vasculogenèse se déroule presque exclusivement durant le développement embryonnaire. La réalisation de vaisseaux par vasculogenèse prend naissance dans le mésoderme, dans lequel les cellules se différencient en hémangioblastes (Figure 9). Ces dernières vont par la suite se différencier en cellules hématopoïétiques (les précurseurs des cellules sanguines) ou en angioblastes. Les angioblastes sont des cellules souches endothéliales, dans lesquelles les voies de signalisation Sonic Hedgehog et Notch vont être activées sous l'effet du VEGF et du FGF-2. Ceci conduit à une différenciation des angioblastes en CE, et ainsi à la formation d'un plexus vasculaire. Pour devenir mature, ce plexus subit un remodelage et former un vaisseau sanguin suite au recrutement des péricytes (Patel-Hett 2011).

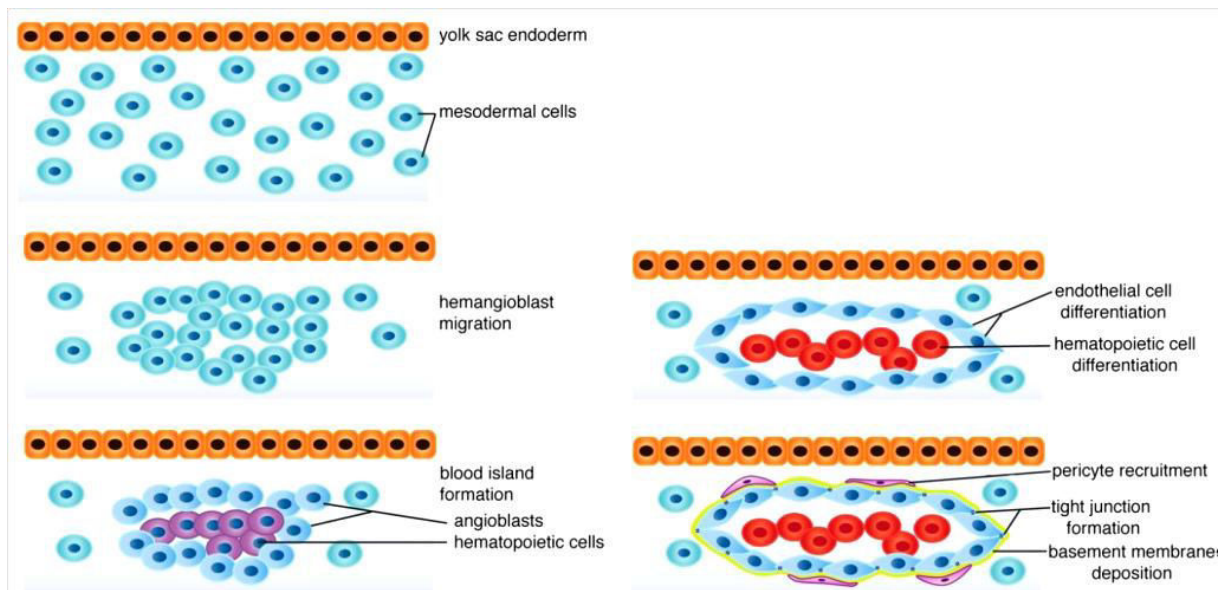


Figure 9. Schéma représentant les étapes de la vasculogenèse (Patel-Hett 2011).

L'artériogénèse est un processus qui permet à une artère d'augmenter son calibre. Lorsqu'il y a une obstruction dans une artère, le flux sanguin, par compensation, va devenir plus important dans les vaisseaux sanguins périphériques (artérioles) (Figure 10). Pour résister à cette augmentation du débit sanguin, l'artériole va devoir augmenter son diamètre et renforcer sa structure.

L'augmentation des forces de cisaillement, résultant d'une augmentation du flux sanguin, active les CE qui sécrètent des chimiokines, telle que MCP-1/CCL2, et des facteurs de croissance, tels que le FGF et le VEGF. Par la suite, MCP-1 attire les monocytes dans les zones lésées du tissu où ils vont se différencier en macrophages. Ces derniers sécrètent des MMPs qui favorisent la restructuration de la MEC. En parallèle, les facteurs de croissance permettent la prolifération des CE et des CML, augmentant la résistance mécanique du vaisseau. Tous ces mécanismes vont conduire à l'adaptation de l'artère qui devient capable de résister à la pression du nouveau flux sanguin qu'elle subit (Heil 2004).

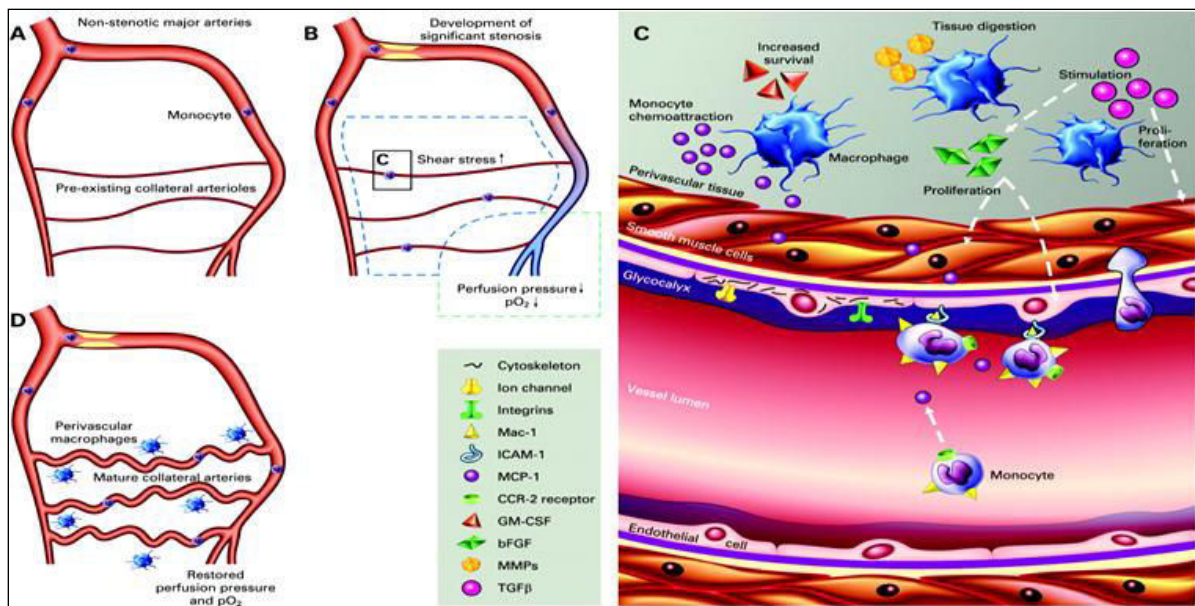


Figure 10. Le processus d'artériogénèse. Artère normale (a). La présence d'une plaque athérome obstrue l'artère et module le flux sanguin (b). L'endothélium est activé, entraînant un recrutement de monocytes et leurs différenciations en macrophages qui vont sécréter des facteurs induisant une maturation des artérioles préexistantes (c). Artères collatérales matures et revascularisation correcte de l'artère en aval de la plaque d'athérome (d) (Schirmer 2009).

Le troisième mécanisme de création de vaisseaux sanguins est appelé l'angiogénèse. Il s'agit de la formation d'un nouveau vaisseau à partir d'un vaisseau préexistant. Elle peut se faire de deux manières, par invagination et par bourgeonnement. L'angiogénèse physiologique intervient dans le développement embryonnaire, la réparation tissulaire, le cycle menstruel et la grossesse, elle permet l'irrigation des nouveaux tissus.

L'angiogénèse pathologique est impliquée dans le développement des cancers. En effet, les tumeurs favorisent le développement d'un réseau vasculaire leur permettant un afflux supplémentaire de nutriments pour survivre et croître.

C. Angiogénèse physiologique

Les CE sont les seules capables de former de nouveaux vaisseaux en présence de facteurs de croissance. Dans le processus d'angiogénèse, il existe un équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Si l'équilibre est rompu avec un excès de facteurs pro-angiogéniques, le mécanisme d'angiogénèse conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux est favorisé. Selon le phénomène déclenchant, l'angiogénèse pourra se faire par invagination, en cas d'une

perturbation du flux sanguin, ou par bourgeonnement dans les conditions hypoxiques ou inflammatoires (Styp-Rekowska 2011).

Le processus d'invagination concerne les capillaires (Figure 11). Suite à une modification du flux sanguin, l'endothélium s'active. L'endothélium activé va sécréter des chimiokines, des facteurs de croissance (VEGF, Platelet derived growth factor (PDGF)) et l'angiotensine. Le VEGF et PDGF permettent le recrutement des péricytes alors que le remodelage vasculaire sera facilité par l'angiotensine. Des cellules endothéliales localisées à des endroits opposés du vaisseau vont se rapprocher, jusqu'à se toucher. La lame basale va être dégradée par des protéases sécrétées par les fibroblastes afin de séparer les deux capillaires. Enfin, les péricytes et les fibroblastes vont sécréter du collagène pour consolider les nouveaux capillaires (Carmeliet 2011, Ribatti 2012).

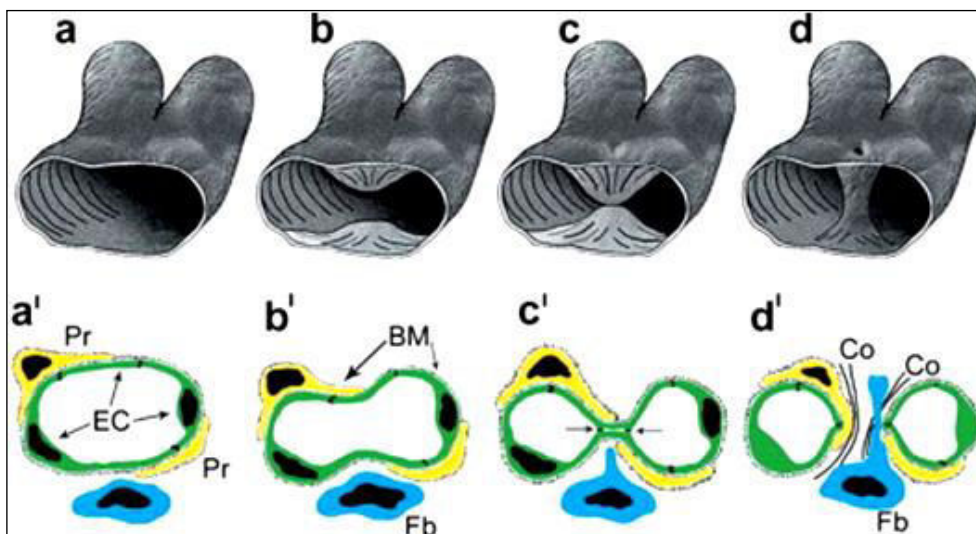


Figure 11. Représentation du mécanisme d'angiogenèse par invagination. En 3D (a-d) et en 2D (a'-d'). EC : cellules endothéliales, Pr : péricytes, Fb : fibroblastes, BM : membrane basale et Co : collagène (Ribatti 2012).

Le bourgeonnement est un processus beaucoup plus lent que l'invagination. Il intervient dans les zones d'ischémie ou d'inflammation dans lesquelles il y a une sécrétion de facteurs pro-angiogéniques. Il nécessite plusieurs étapes successives. Dans un premier temps les facteurs pro-angiogéniques activent l'endothélium qui va sécréter des protéases, comme les MMP-2 et MMP-9. Ces protéases vont digérer la MEC accentuant ainsi la libération de facteurs pro-angiogéniques qui étaient

maintenus au niveau de la MEC. L'un de ces facteurs, le VEGF, va induire la sécrétion d'angiotensine-2 dans les CE. L'angiotensine-2 déclenche le décollement des péricytes et des CML de la lame basale qui est en cours de dégradation par les protéases. C'est l'étape de déstabilisation (*destabilization*) (Babykutty 2012).

Une fois que la paroi du vaisseau est destructurée, les CE vont pouvoir migrer et proliférer pour former un nouveau vaisseau. Pour cela, elles vont acquérir deux nouveaux phénotypes différents. Un premier groupe de CE acquiert un phénotype correspondant aux cellules de "tête", ayant un potentiel de migration très important, les cellules seront attirées par un gradient de facteurs pro-angiogéniques et vont migrer grâce à leurs filopodes.

Le deuxième groupe de CE acquiert un phénotype de cellules de "tige". Elles sont peu migratoires mais très prolifératives, et sont positionnées derrière les cellules de tête. L'expression d'un des phénotypes va dépendre de l'état d'activation de la voie de signalisation juxtacrine (entre deux cellules adjacentes) Notch. Les cellules de tête sont attirées par le VEGF qui va induire l'expression du Delta-like ligand-4 (Dll-4) à la surface de ces cellules (Figure 12). Les cellules de tige, quant à elles, expriment le ligand transmembranaire Jagged-1 (JAG-1). Les deux ligands Dll-4 et JAG-1 ont le même récepteur Notch-1 qui est exprimé par les deux sous-populations de CE. Alors que Dll-4 va activer la voie de signalisation Notch, JAG-1 est un antagoniste, qui n'induit pas de signalisation. Dans le processus de bourgeonnement on observe une coopération croisée entre ces deux groupes de CE. JAG-1, qui est exprimé par des cellules de tige, va se lier au récepteur Notch-1 des cellules de tête, mais dans ce cas, cela ne va pas déclencher de signalisation dans les CE de tête. Ces cellules dans lesquelles la voie Notch n'est pas activée vont migrer grâce à la formation de filopodes. D'autre part, Dll-4 qui est exprimé par les cellules de tête, va se fixer sur le récepteur Notch-1 des cellules de tige et il va induire la voie de signalisation Notch. Ce dernier va inhiber la formation de filopodes et favoriser la prolifération des cellules de tige. C'est l'étape de bourgeonnement (*sprouting*) (Ribatti 2012, Tung 2012).

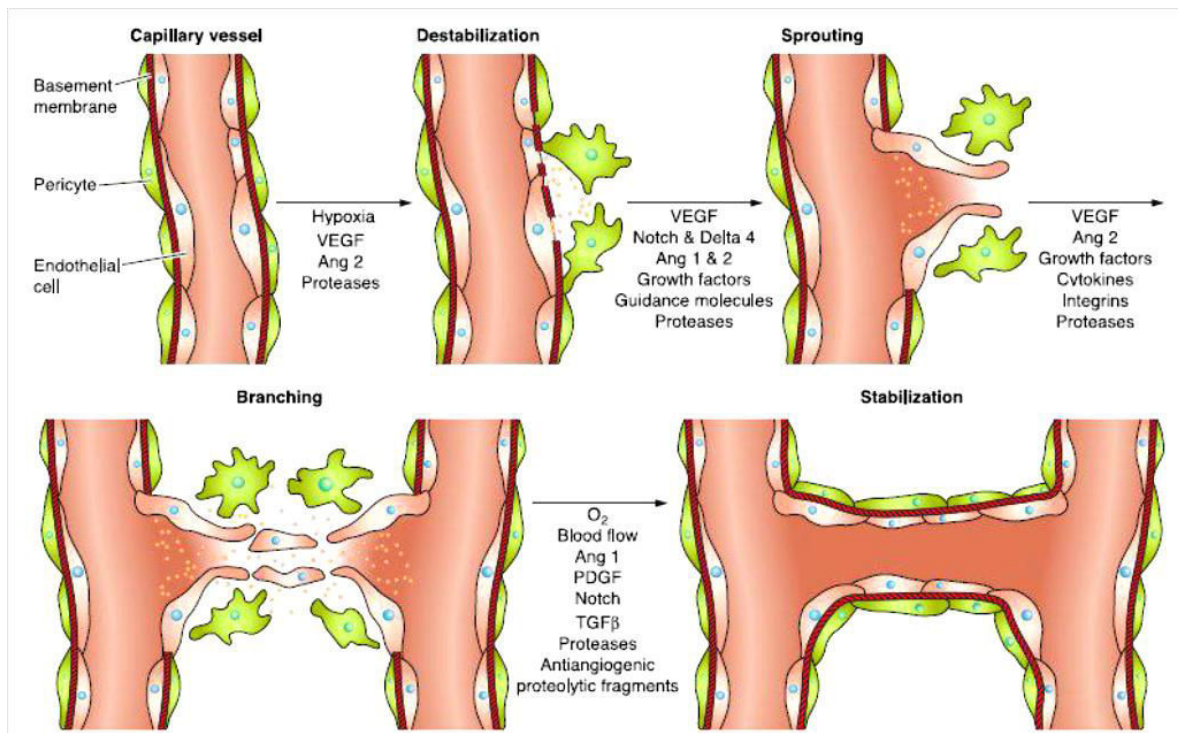


Figure 12. Représentation des étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement. Les étapes successives sont, la déstabilisation, le bourgeonnement, le raccordement et la stabilisation (Clapp 2009).

Dans un troisième temps, des cellules murales sont recrutées, elles sécrètent des facteurs de croissance (VEGF, angiopoïétine-1, TGF-β1, PDGF) qui sont impliqués dans la maturation du vaisseau. Elles sécrètent aussi des inhibiteurs de protéases, les Tissue Inhibitor of MetalloProteinase 2 et 3 (TIMPs), qui vont inhiber l'action des ADAMs et MMPs. C'est l'étape de "raccordement" (*branching*).

Les cellules murales vont se différencier en péricytes ou en CML. Les CE vont retrouver un phénotype normal et former une lumière grâce à la répulsion électrostatique entre deux cellules dont la membrane est riche en PGs chargés négativement. Le flux sanguin va ensuite provoquer un réarrangement du cytosquelette des CE ainsi que l'agrandissement de la lumière du vaisseau. C'est l'étape de stabilisation (*stabilization*) conduisant à la formation d'un nouveau vaisseau fonctionnel (Ribatti 2012, Potente 2011).

V. L'ischémie

A. Pathophysiologie tissulaire

L'ischémie se définit par la réduction de la lumière d'un vaisseau ou par la sténose, ce qui provoque dans les tissus et organes concernés, une diminution du flux sanguin et de la pression partielle en oxygène et une hypoxie locale.

La pathologie principale qui conduit au développement de l'ischémie est l'athérosclérose. La phase précoce de l'athérosclérose est appelée l'hyperplasie intimale. Elle se caractérise par la formation d'une néo-intima en dessous de l'endothélium suite au dysfonctionnement des CE. Suite à leur activation, les CE sont devenues perméables pour les cellules inflammatoires circulantes (lymphocytes, monocytes), qui s'infiltrant dans la paroi artérielle. Les CML quant à elles commencent à migrer de la media vers la néo-intima.

Dans la phase plus tardive, la néo-intima forme une plaque d'athérome qui va obstruer le conduit vasculaire et induire une ischémie en aval de la plaque. La plaque d'athérome se forme par l'accumulation des lipides, l'infiltration de macrophages et la prolifération de CML (Figure 13). Ces deux derniers types cellulaires se transforment en cellules spumeuses suite à une présence excessive de lipides dans les cellules. La plaque d'athérome est ensuite vascularisée par une néo-angiogenèse venant des *vasa vasorum*. Cette vascularisation fragilise la plaque qui peut se détacher ou se fragmenter, les débris formés étant responsables de l'obstruction d'un autre vaisseau de plus petit calibre plus loin dans la circulation sanguine. Lorsque cette obstruction a lieu dans le cœur, cela cause un infarctus du myocarde. Si l'obstruction se situe dans le cerveau cela crée un accident vasculaire cérébral (AVC) de type ischémique. L'athérosclérose et ses conséquences sont la première cause de mortalité dans le monde (Frueh 2013, Barquera 2015).

Il a été démontré que dans l'ischémie, l'expression des enzymes de la biosynthèse des GAGs est altérée ce qui modifie les motifs des chaînes HS et CS ainsi que leurs niveaux de sulfatation et leurs tailles (Chappel 2010).

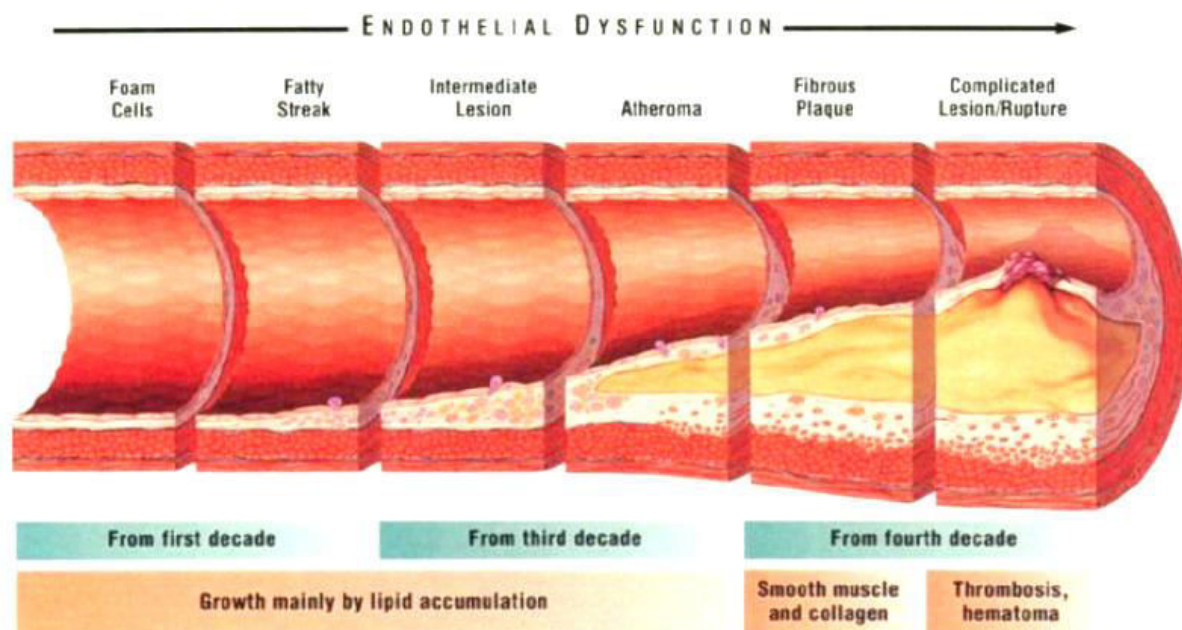


Figure 13. Représentation des étapes d'évolution de l'athérosclérose avec la formation de la plaque d'athérome riche en lipides, macrophages et CML (Pepine 1998).

L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) est une pathologie qui apparaît quand l'athérosclérose se développe au niveau des vaisseaux des membres inférieurs. Elle touche environ 10% de la population dans les pays développés et les facteurs de risque sont le diabète, l'hypertension artérielle et le tabagisme (Boccalon 2000). Cette pathologie évolue progressivement et elle reste souvent longtemps asymptomatique. Une aggravation possible de cette maladie est l'ischémie critique chronique des membres inférieurs (ICC). L'ICC augmente d'un facteur de dix le risque à un an de décès par infarctus du myocarde ou d'AVC et d'un facteur de cinquante le risque d'amputation du membre, comparé aux patients ayant simplement une AOMI (Norgren 2007).

B. Thérapies

Pour lutter contre l'ischémie, différentes thérapies pro-angiogéniques ont été développées.

Le traitement à base d'injections de facteurs pro-angiogéniques, comme des protéines recombinantes du VEGF ou du FGF, n'a pas fonctionné. Cet échec est sûrement dû à la faible biodisponibilité de ces facteurs de croissance puisqu'ils ont

une demi-vie inférieure à une heure (Zachary 2011, Stein 1995).

Pour augmenter la durée de présence de ces facteurs pro-angiogéniques dans l'organisme, l'application de la thérapie génique à long terme a été proposée. Des vecteurs plasmidiques codant pour le VEGF ou le FGF ont été administrés chez des patients ischémiques, mais là-encore les essais cliniques n'ont pas été concluants. L'inefficacité de ces vecteurs plasmidiques, liée au faible taux de leur transfert dans les cellules, a poussé les chercheurs à étudier les vecteurs viraux. L'adénovirus s'avérait être le meilleur candidat et a été le plus fréquemment utilisé. Cependant, bien que les traitements à base d'adénovirus aient été supportés par les patients, car aucune augmentation du risque de développement d'une autre pathologie liée au virus n'a été constatée, les effets bénéfiques pro-angiogéniques ne sont pas suffisamment établis. En effet, ces traitements n'entraînent pas d'amélioration sur le pronostic vital ou le risque d'amputation (Muona 2012, Yla-Herttuala 2013).

En parallèle de la thérapie génique une autre approche est développée pour le traitement de l'ischémie, il s'agit de la thérapie cellulaire s'appuyant sur l'utilisation des PEC. Ce sont les cellules précurseurs des CE qui se trouvent dans le sang et la moelle osseuse. Le principe final de cette thérapie est d'utiliser les cellules autologues. Pour cela, dans un premier temps la chimiokine SDF-1/CXCL12 peut être administrée chez le patient pour attirer les cellules progénitrices de la moelle vers le sang permettant ainsi d'enrichir le sang avec ces cellules (De Falco 2004). Ensuite, l'extraction des cellules progénitrices du patient peut être effectuée pour pouvoir les amplifier au laboratoire par culture *in vitro*. Enfin, la phase finale consiste à injecter les cellules progénitrices localement, dans la zone ischémisée, afin qu'elles puissent former de nouveaux vaisseaux (Balaji 2013). Plus récemment, les cellules souches mésenchymateuses ont été utilisées pour le traitement de l'ischémie dans un modèle d'infarctus chez le lapin. Elles ont été injectées directement dans le myocarde, il a été identifié qu'elles se sont différenciées en CE et CML, ce qui a permis la revascularisation de la zone ischémisée (Rahbarghazi 2014).

VI. Nouvelles thérapies : les mimétiques de GAGs

Les GAGs peuvent se lier à la plupart des facteurs de croissance et cytokines grâce aux interactions électrostatiques. Par cette liaison, ils jouent un rôle important

dans les processus de migration, d'invasion et de prolifération cellulaire nécessaires à l'angiogenèse. Dans une thérapie anti-tumorale des mimétiques de GAGs peuvent être utilisés pour entrer en compétition avec les GAGs endogènes et séquestrer les facteurs pro-angiogéniques en les empêchant de se fixer à leurs récepteurs respectifs (Brennan, 2016).

Les mimétiques de GAGs peuvent être incorporés dans des biomatériaux biodégradables en présence de facteurs pro-angiogéniques, tels que VEGF ou FGF-2. Le but est de lier les GAGs aux facteurs de croissance afin de les protéger de la protéolyse et de permettre leur libération locale contrôlée dans le temps suite à la dégradation progressive des biomatériaux (Ikeda 2011). De plus, la présence des mimétiques de GAGs dans les biomatériaux peut servir à la thérapie cellulaire (à base de cellules souches mésenchymateuses ou de PEC) comme un support qui peut aider au maintien des cellules ou favoriser leur survie et leur prolifération. La combinaison des différents composés permet de construire un outil thérapeutique performant contenant à la fois les facteurs pro-angiogéniques, les GAGs et les cellules pour traiter les ischémies.

Une autre utilisation des mimétiques de GAGs a été proposée pour la thérapie de remplacement des GAGs endogènes endommagés lors d'une lésion tissulaire ou d'une ischémie induite dans le membre inférieur de rat afin de favoriser la régénération du tissu musculaire (Chevalier 2015).

A. Mimétiques synthétiques de GAGs

Les ReGeneraTing Agent (RGTA) sont des polymères de dextran, dont les fonctions hydroxyles ont été substituées par des fonctions sulfates et carboxyméthyles. Ces polysaccharides font environ 80 kDa et leur structure leur permet de ne pas être la cible des glycanases endogènes. Les RGTA sont des mimétiques de GAGs grâce à leurs groupements sulfates qui leur permettent, comme les GAGs, de se lier aux facteurs de croissance et chimiokines (Friand 2009). Le RGTA OTR4120 a une forte affinité pour le VEGF avec un K_D de 2,2 nM alors que la liaison du VEGF avec l'héparine a un K_D de 15 nM. Cette affinité lui permet de potentialiser la liaison du VEGF avec le récepteur VEGFR-2 (Rouet 2005). Une étude clinique a été menée sur les ulcères de la jambe suite à une ischémie critique. Chez les patients qui ont reçu le traitement standard pour les ulcères, 50% d'entre eux ont été amputés ou sont décédés dans l'année, contre aucun patient décédé ou amputé

pour cause d'ulcère dans le groupe traité par les RGTA (Desgranges 2011).

Les mimétiques de GAG qui ne sont pas composés de saccharides, ont aussi été développés pour le traitement des cancers. Une étude a testé différents mimétiques non-saccharidiques sur des cellules cancéreuses du colon présentant des caractéristiques comparables à celles des cellules souches. Un de ces mimétiques, le G2.2, synthétisé à partir de flavonoïde avec un poids moléculaire de 1,2 KDa, inhibe la prolifération de ces cellules (Patel 2014).

B. Mimétiques naturels de GAGs

Beaucoup de polysaccharides naturels issus de différentes origines peuvent être utilisés comme des mimétiques de GAG.

Un polysaccharide extrait de la bactérie *Alteromonas infernus* qui vit dans l'océan au niveau des sources hydrothermales des profondeurs est étudié pour ses propriétés anti-tumorales. Le polysaccharide GY785EPS a été dépolymérisé et sulfaté pour obtenir des fractions de bas poids moléculaires, les OS-EPS. Il a été montré *in vitro* que ces OS-EPS, par leurs effets mimétiques des chaînes HS diminuaient la migration et l'invasion de cellules d'ostéosarcome qui sont des tumeurs de l'os. L'OS-EPS de 15 kDa inhibe la formation de métastases pulmonaires *in vivo* dans un modèle de souris (Heymann 2016).

L'embranchement des arthropodes auquel appartiennent les insectes et les crustacés ont pour une majorité un exosquelette constitué de chitine. Le chitosan est un polysaccharide issu d'une N-déacétylation de la chitine. Sa structure linéaire ressemble à celle des GAGs, il est composé d'une répétition de l'unité disaccharidique constituée de D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine (Khor 2003).

Le chitosan diminue l'athérosclérose dans un modèle de souris déficientes en apolipoprotéine E avec un régime alimentaire riche en lipides. De plus, il rend la plaque d'athérome plus stable en diminuant les lipides et la population de macrophages qui la composent (Yu 2015). Un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez le rat montre que l'injection d'un hydrogel contenant du chitosan et du FGF-2 augmente la vascularisation du tissu ischémié (Fujita 2007). Chez le lapin dont le cartilage est endommagé par perforation, le chitosan améliore le remodelage osseux et l'angiogenèse en empêchant la formation de cicatrice fibreuse (Mathieu

2013).

Dans la paroi des algues brunes se trouve un polysaccharide, le fucoïdane qui est aussi un mimétique de GAGs.

VII. Le fucoïdane

A. Fucoïdane - Composition et Taille

Les fucoïdanes sont des polysaccharides sulfatés naturels, extraits des algues brunes. Il existe une grande variété de fucoïdanes car ils sont synthétisés par différentes algues (*Ascophyllum nosodum*, *Fucus vesiculosus*,...). Ils sont généralement décrits comme étant composés majoritairement de L-fucose (Figure 14) (50 à 90%), de sulfates (35 à 45%) et d'acides uronique (<8%) (Chaubet 2000). Cependant il est aussi possible de détecter la présence d'autres monosaccharides, tels que le galactose, le mannose, le xylose et le glucose en proportions variables. La composition du fucoïdane varie au sein de ces espèces, mais d'autres facteurs peuvent en être la cause. Cela dépend aussi des méthodes d'extraction (température, temps de réaction, concentration des réactifs), du climat et de l'environnement des algues (Holtkamp 2009, Li 2008).

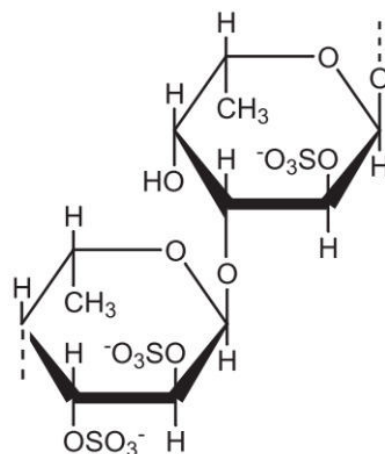


Figure 14. Structure consensus du fucoïdane extrait de *Fucus evanescens*, de *Fucus vesiculosus* et d'*Ascophyllum nodosum*. Disaccharide de L-fucopyranose avec une alternance de liaison $\alpha(1 \rightarrow 3)$ et $\alpha(1 \rightarrow 4)$ (Berteau 2003).

En plus de ces différentes compositions, la taille de la chaîne de fucoïdane peut varier. Le fucoïdane brut extrait de l'algue a un haut poids moléculaire (HMWF) (>100 kDa). Il est ensuite dépolymérisé pour obtenir un fucoïdane de moyen poids moléculaire (MMWF) (40 à 80 kDa) et de bas poids moléculaire (LMWF) (<25 kDa).

B. Fucoïdane - Mimétique de GAG

Par sa composition en disaccharide et la présence de groupements sulfates le fucoïdane peut avoir des effets similaires aux GAGs. Des études ont montré que le fucoïdane met en jeu des interactions électrostatiques avec des facteurs de croissance (VEGF, FGF-2) (Matou 2002, Lake 2006) et des chimiokines comme SDF-1/CXCL12 (Berteau 2003, Fermas 2008). Le fucoïdane se lie aussi à la P-Sélectine, une glycoprotéine qui est exprimée à la surface des CE activées (Rouzet 2011).

En fonction du type et de la taille du fucoïdane, il peut exercer des fonctions pro-angiogéniques en modifiant la balance des cytokines angiogéniques libres ou associées à la matrice. Plusieurs études ont montré les effets bénéfiques du fucoïdane sur les maladies cardiovasculaires dans des modèles animaux (Matou 2002, Boisson-Vidal 2007). Le fucoïdane avec le FGF-2 augmente le caractère pro-angiogénique des PEC, augmentant leur prolifération et leur capacité à former des réseaux vasculaires (Zemani 2005). Dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez le rat, le fucoïdane favorise la revascularisation (Luyt 2003). Il améliore aussi la régénération de l'endothélium dans un modèle d'hyperplasie intinale chez le lapin (Deux, 2002).

C. Travaux antérieurs du laboratoire

Ces dernières années nous avons utilisé dans le laboratoire des fucoïdanes de différentes sources pour réaliser du ciblage en imagerie médicale ou pour son effet pro-angiogénique. Le MMWF (39-57 kDa, *Fucus vesiculosus*) fourni par Sigma a servi de composant pour la mise au point de biomatériaux à base de pullulane/dextrane (Bonnard 2014, Puranama 2015), alors que des LMWF fournis

par Kraeber GMBH (8,1 kDa, *Fucus vesiculosus*) et Algue & Mer (4.9 kDa, *Ascophyllum nodosum*) ont été utilisés pour cibler l'endothélium lésé (Hlawaty 2011, Saboural 2014).

1. LMWF et hyperplasie intinale

Nous avons montré que le fucoïdane diminue l'hyperplasie intinale dans un modèle d'abrasion de la carotide chez le rat (Hlawaty 2011). L'hyperplasie intinale est une étape précoce de l'athérosclérose. Suite à la lésion de l'endothélium, les CML commencent par proliférer puis forment une néo-intima entre l'endothélium et la média. Le LMWF (8,1 kDa, *Fucus vesiculosus*) permet de réduire la formation de la néo-intima (Figure 15a) en diminuant la prolifération des CML (Figure 15b) et en favorisant la reconstruction de l'endothélium (figure 15c). Nous avons aussi montré dans cet article que le LMWF modulait l'expression de la MMP-2 par les CE et les CML.

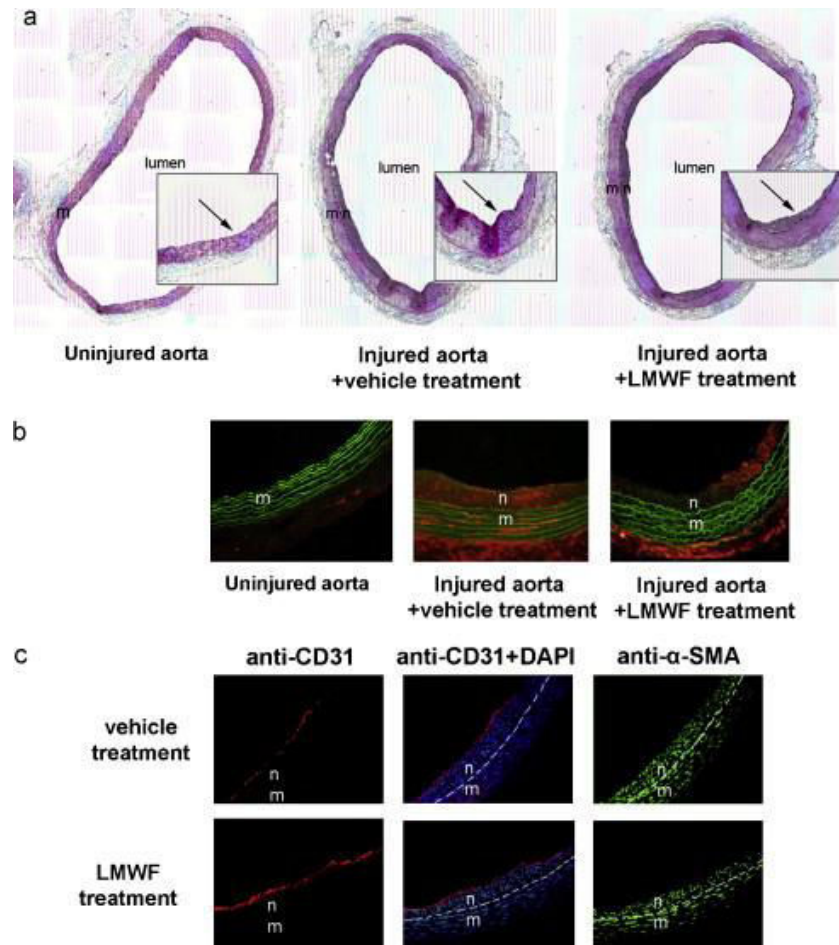


Figure 15. Effet du fucoïdane sur l'hyperplasie intimale chez le rat. Les artères abrasées sont traitées ou non avec le LMWF. A gauche nous avons les artères non abrasées, au centre les artères abrasées contrôles et à droite les artères abrasées traitées par le LMWF. (a) Coupes histologiques avec une coloration à l'hématoxyline/éosine. (b). Immunomarquage au PCNA (marqueur de la prolifération cellulaire) en rouge et autofluorescence des lames élastiques en vert. n, néo-intima ; m, média. (c) Les pointillés délimites la séparation entre la néo-intima et la média. Dapi (bleu), Immunomarquage avec le CD31 (rouge), marqueur des CE et l' α -SMA, marqueur des CML (Hlawaty 2011).

2. Matrice 3D de fucoïdane et néovascularisation

La fabrication d'une matrice biodégradable à base de pullulane/dextrane et de fucoïdane permet de contrôler la libération dans le temps de VEGF (Figure 16a) (Puranama 2015). La matrice contenant le MMWF permet une libération lente et progressive du VEGF dans le temps (500 pg en 72h), alors que la matrice "contrôle"

libère 2200 pg de VEGF en 24 h et cette libération s'estompe ensuite, tout le VEGF étant sorti de la matrice. Nous avons étudié par résonance plasmonique de surface l'affinité entre le MMWF et le VEGF et observé une association rapide et une dissociation lente entre les deux molécules. La liaison entre le MMWF et le VEGF est relativement stable dans le temps et présente une bonne affinité (K_D) de 1,1 nM (Figure 16b).

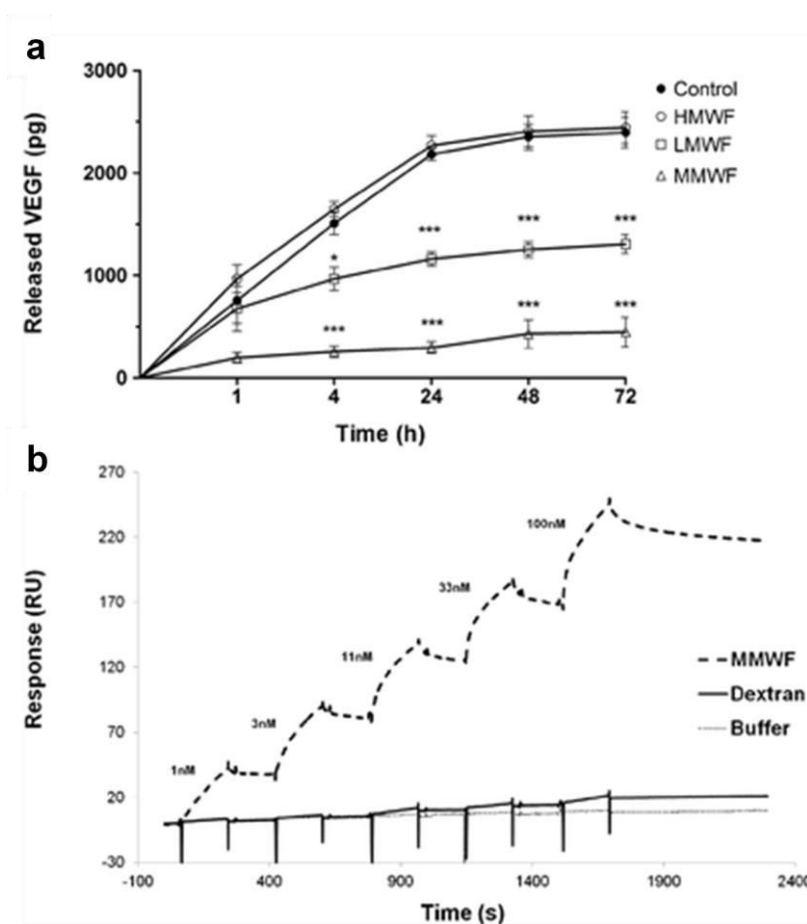


Figure 16. Cinétique de dosage du VEGF libéré dans le temps par les matrices de pullulane/dextrane contenant ou non les fucodane, LMWF, MMWF et HMWF (a). Courbes de liaison du fucoïdane avec le VEGF (b) (Purnama 2015).

Les matrices à base de pullulane/dextrane/fucoïdane ont été implantées en sous-cutané chez la souris. Après deux semaines, des coupes histologiques de peau ont été analysées avec une coloration à l'hématoxyline/éosine (Figure 17a). Les flèches désignent les vaisseaux sanguins. L'aire des vaisseaux sanguins a ensuite été calculée pour chaque condition (Figure 17b). Nous voyons que la matrice contenant

le MMWF augmente l'aire des vaisseaux en comparaison à la matrice "contrôle". Cette augmentation est potentialisée pour les matrices contenant le MMWF et le VEGF, l'addition des deux molécules permettant la formation de vaisseaux d'un calibre plus important et surtout fonctionnel comme l'atteste la présence d'érythrocytes à l'intérieur du vaisseau.

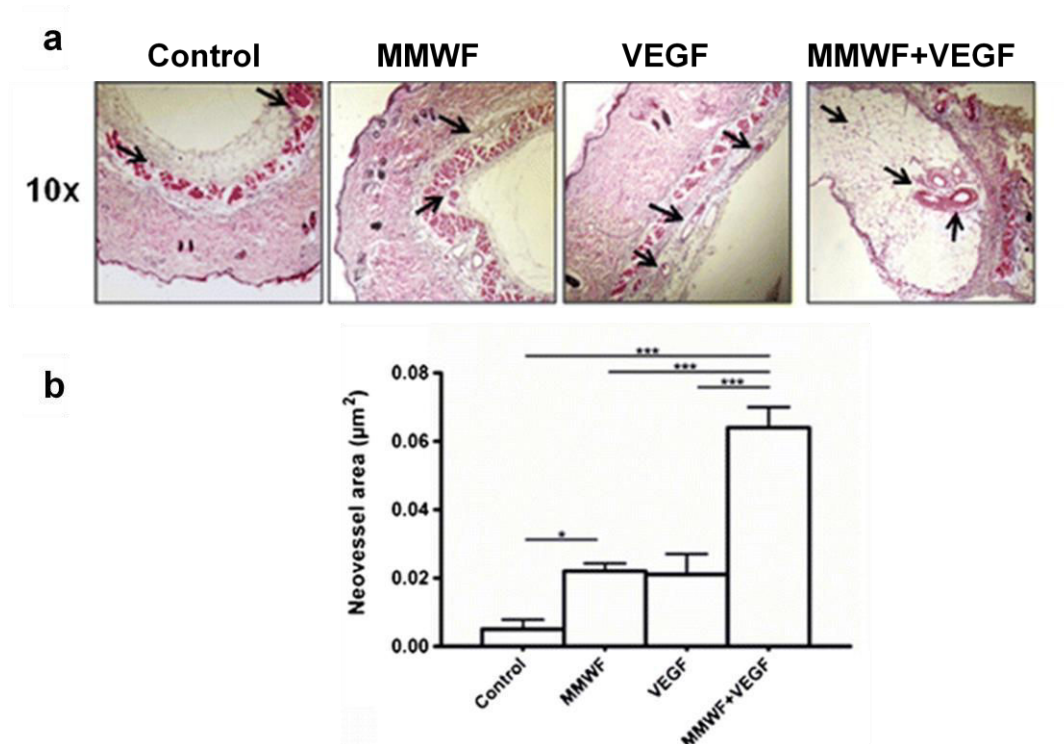


Figure 17. Effet pro-angiogénique du MMWF et du VEGF dans un modèle d'implantation sous-cutané de matrice de pullulane/dextrane chez la souris. Coupes histologiques de peau avec une coloration à l'hématoxyline/éosine. De gauche à droite, les matrices de pullulane/dextrane, pullulane/dextrane/MMWF, pullulane/dextrane avec du VEGF et pullulane/dextrane/MMWF avec du VEGF. Les flèches indiquent les vaisseaux sanguins (a). Quantification du nombre de vaisseaux dans les coupes histologiques de peau (b) (Purnama 2015)

VIII. But de la thèse

Le but de ma thèse est d'appréhender les modes d'action du fucoïdane dans ses effets pro-angiogéniques, en réalisant une étude sur l'action du fucoïdane de bas poids moléculaire sur des CE.

Suite à nos résultats antérieurs montrant que le fucoïdane (*Fucus vesiculosus*) modulait l'expression de la MMP-2, nous avons émis l'hypothèse que le fucoïdane pouvait moduler l'expression d'autres acteurs nécessaires à l'angiogénèse des CE, les SDCs et les chaînes HS qu'ils portent.

Nous avons donc étudié l'effet du fucoïdane sur l'expression des SDC-1, SDC-4 et de leurs chaînes GAGs. Nous avons aussi exploré si les SDC-1, SDC-4 et les chaînes HS étaient nécessaires à l'action du fucoïdane.

Dans un deuxième temps nous avons réalisé une étude structure/fonction d'un autre fucoïdane de bas poids moléculaire (*Ascophyllum nodosum*). Après la séparation des différentes tailles de molécules composant le fucoïdane brut, nous avons analysé les effets de ces fractions sur les CE *in vitro* et leurs affinités avec des facteurs pro-angiogéniques comme SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 et VEGF.

RESULTATS

Article 1 : L'héparanase et le syndécanne-4 sont impliqués dans l'angiogenèse induite par le fucoïdane de bas poids moléculaire

Il a été montré dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez le rat que le fucoïdane favorise la revascularisation et améliore aussi la régénération de l'endothélium dans un modèle d'hyperplasie intinale chez le lapin.

A l'intérieur de cet article publié dans "Marine Drugs" en 2015 nous avons étudié l'effet pro-angiogénique d'un LMWF de 8,1 kDa provenant de l'algue brune *Fucus vesiculosus*. Nous avons montré *in vitro*, que les mécanismes nécessaires à l'angiogenèse, tels que la migration et la formation de réseau des cellules endothéliales sont augmentés par ce LMWF.

Pour comprendre le potentiel pro-angiogénique du LMWF, nous avons orienté notre recherche sur des enzymes du métabolisme et catabolisme des chaînes HS, EXT-1, EXT-2, HPSE et sur des PG membranaires possédant des chaînes HS les SDC-1 et SDC-4.

Nous avons quantifié les chaînes HS et CS après le traitement par le LMWF de cellule endothéliale de la veine de cordon ombilical humain, HUVEC. La quantité de chaîne HS diminue en présence de LMWF ainsi que l'expression d'EXT-2 et du SDC-4. Au contraire l'expression de l'HPSE et du SDC-1 augmente.

L'utilisation d'ARN interférent nous a permis de voir lesquels étaient impliqués dans les effets pro-angiogénique du LMWF. L'induction de la formation de réseau d'angiogenèse est modulée par l'inhibition de l'expression d'EXT-2, de l'HPSE et du SDC-4, ces trois facteurs seraient donc 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 Marival 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.); nmarival@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 (VEGF₁₆₅)-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF₁₆₅ 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 µg/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 µg/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).

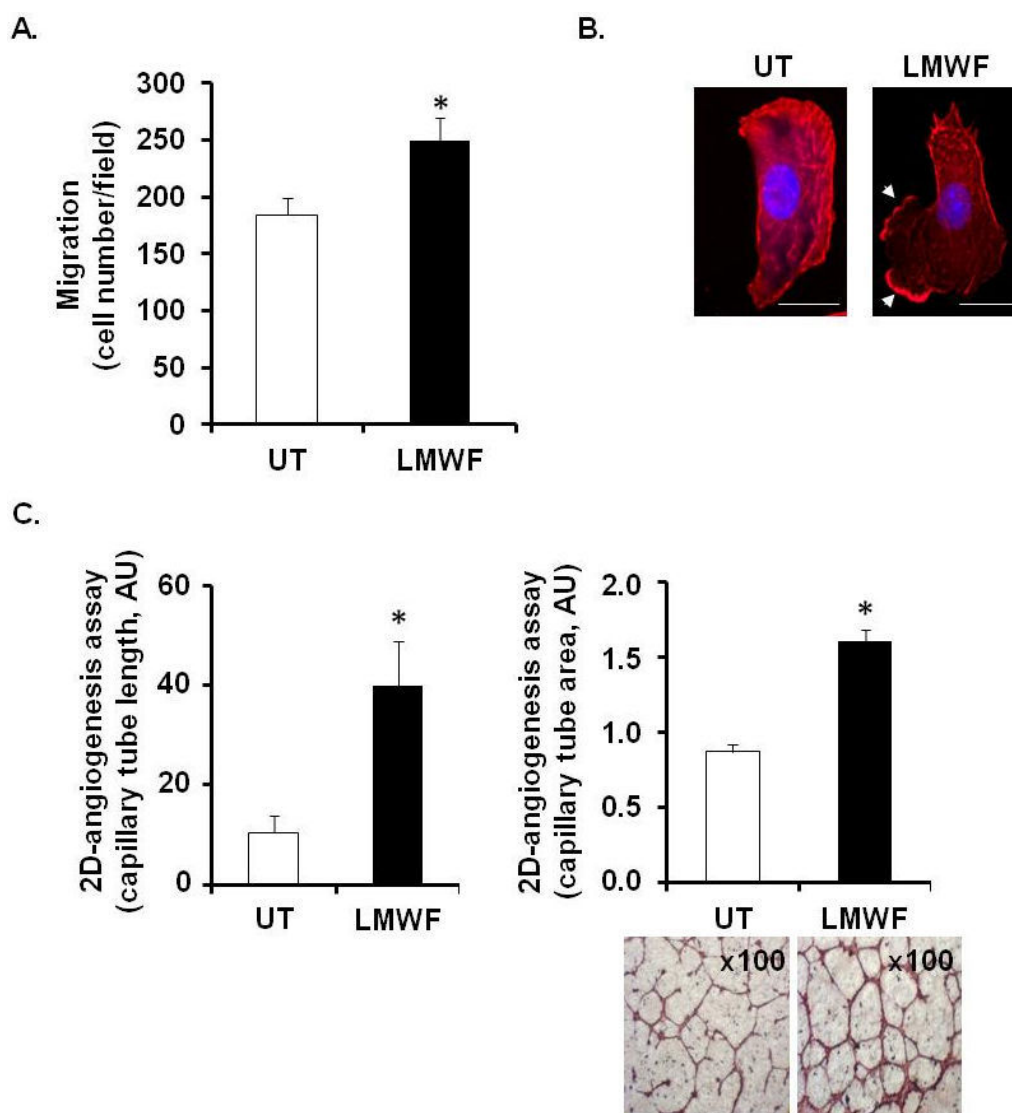


Figure 1. Effects of Low molecular weight fucoidan (LMWF) on endothelial cell abilities: migration and 2D-angiogenesis. Human vascular endothelial cells (HUVEC) were incubated with 10 µg/mL LMWF for 24 h and the migration (**A**), the lamellipodia formation (**B**) and the capillary tube formation (length and area) (**C**) were determined. (**A**) Migration chamber assay. HUVECs incubated with or without 10 µg/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 µg/mL LMWF. Lower right panel shows a representative image of capillary network, as photographed with phase contrast microscopy (magnification ×100). * $p < 0.05$ versus control untreated (UT) cells. A.U.: arbitrary unit.

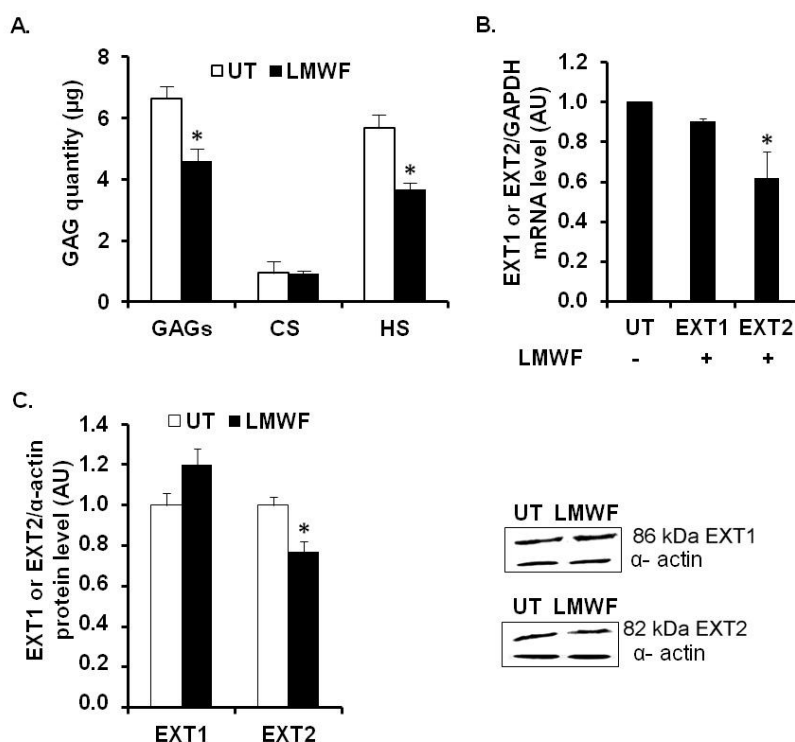


Figure 2. LMWF and glycosaminoglycan chain level in HUVECs. (A) Glycosaminoglycan quantification. HUVECs were incubated with 10 µg/mL LMWF for 24 h and the amount of total GAGs, CS and HS chains were determined in the supernatant according to a dimethyl-methylene blue (DMMB) assay; (B) Exostosin-1 and -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% $\pm$ 5% in the lysate of the LMWF-treated cells (Figure 4B). HPSE activity was slightly but significantly increased up to 20% $\pm$ 3% in the lysate of LMWF-treated cells (Figure 3C), whereas it was not detected in the respective conditioned medium.

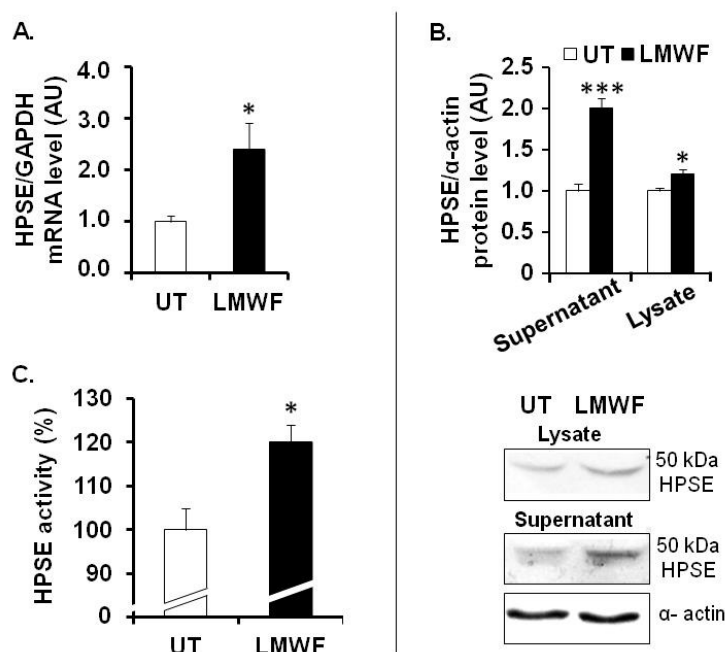


Figure 3. LMWF and heparanase in HUVECs. (A) *HPSE* mRNA levels were determined by real-time RT-PCR in cells treated with or without 10 μ g/mL LMWF; (B) HPSE protein levels were determined by western blot in the supernatant or in the lysate of cells treated with or without 10 μ g/mL LMWF. Lower panel 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% $\pm$ 12% ($p < 0.005$), whereas it decreased that of SDC-4 by 38% $\pm$ 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 shed 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.

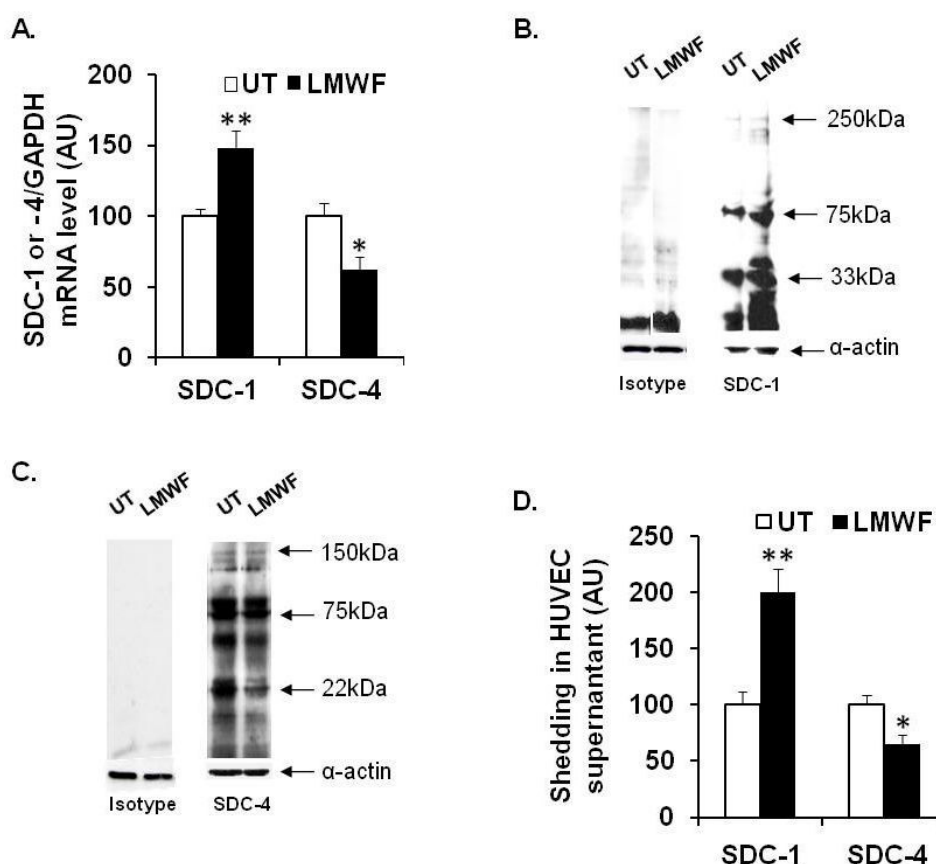


Figure 4. Effects of LMWF on the SDC expression in HUVECs. *SDC-1* and *SDC-4* mRNA or protein levels in endothelial cells treated or not with 10 μ g/mL LMWF were analyzed respectively by real time RT-PCR (A) or western blot (B,C). SDC-1 and SDC-4 ectodomains in the supernatant of cells treated with or without 10 μ 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*.

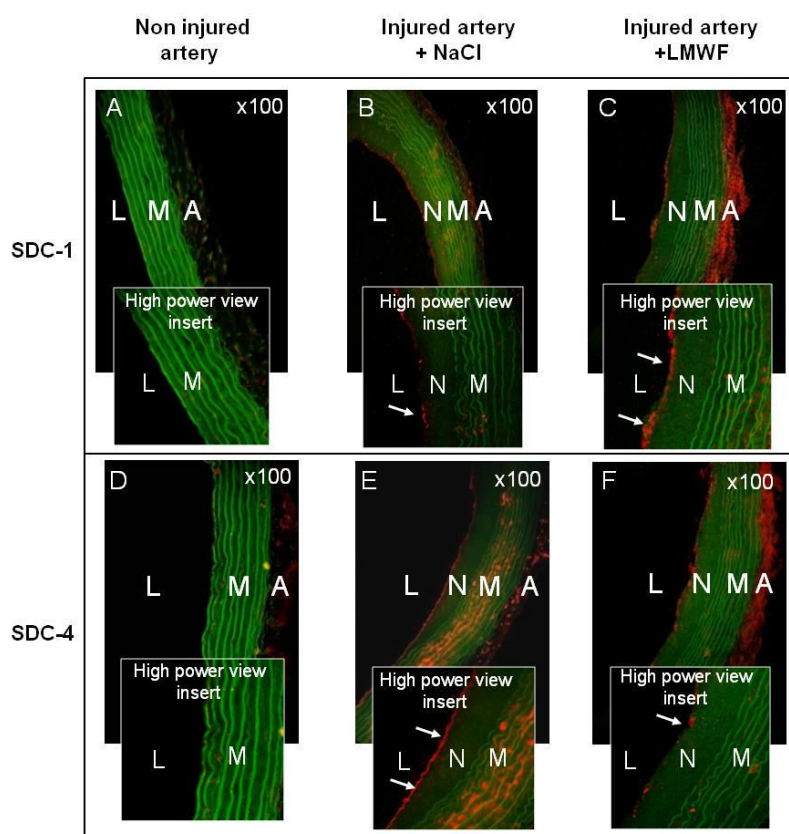


Figure 5. Effects of LMWF on the SDC distribution in rat balloon injured artery. SDC-1 and SDC-4 expressions were assessed using immunohistochemistry in rat model of intimal hyperplasia. (A) SDC-1 or (D) SDC-4 expressions in non injured arteries; (B) SDC-1 or (E) SDC-4 expressions in injured arteries 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).

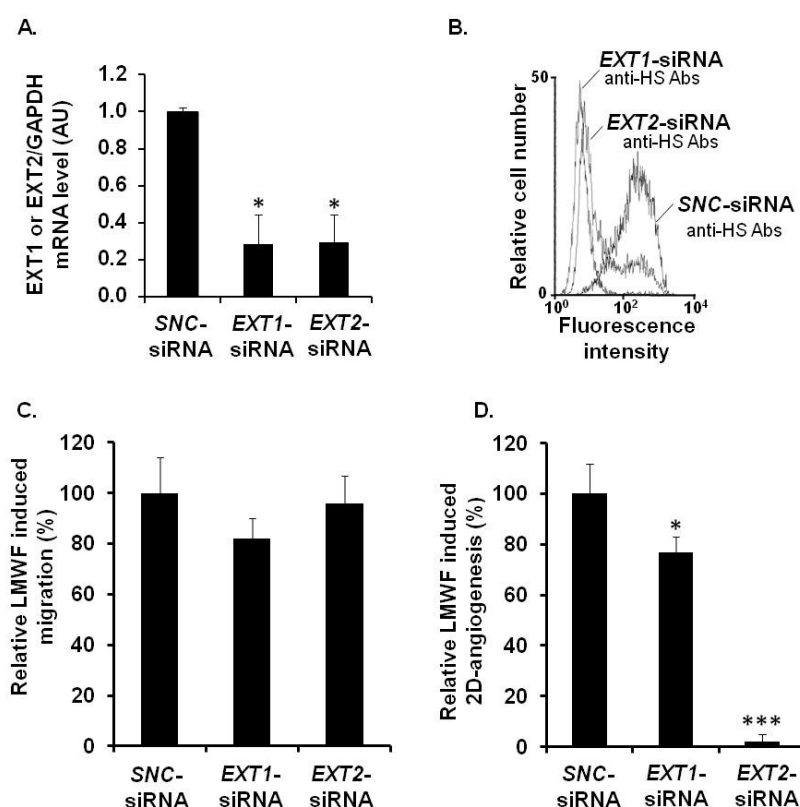


Figure 6. Assessment of EXT involvement in biological effects of LMWF in HUVECs. HUVECs were transfected with *EXT1*-siRNA or *EXT2*-siRNA or with *SNC*-siRNA control. (A) *EXT1* or *EXT2* mRNA levels were determined in *EXT1*-siRNA- or *EXT2*-siRNA- or *SNC*-siRNA-transfected control cell by real-time 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).

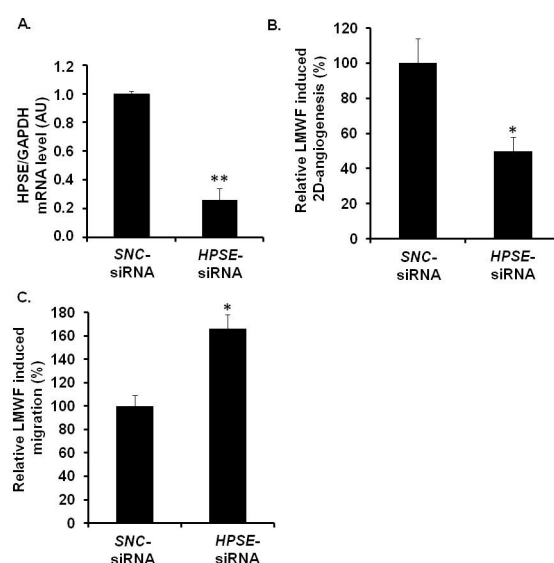


Figure 7. Assessment of *HPSE* involvement in biological effects of LMWF in HUVECs. HUVECs were transfected with *HPSE*-siRNA or *SNC*-siRNA control. (A) *HPSE* mRNA levels were determined in *HPSE*-siRNA- or *SNC*-siRNA-transfected cells by real-time RT-PCR. *HPSE* mRNA level normalized to *GAPDH* mRNA level in *SNC*-siRNA-transfected control cells was arbitrary set to 1; (B) 2D-angiogenesis was assayed in cells treated with or without 10 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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.

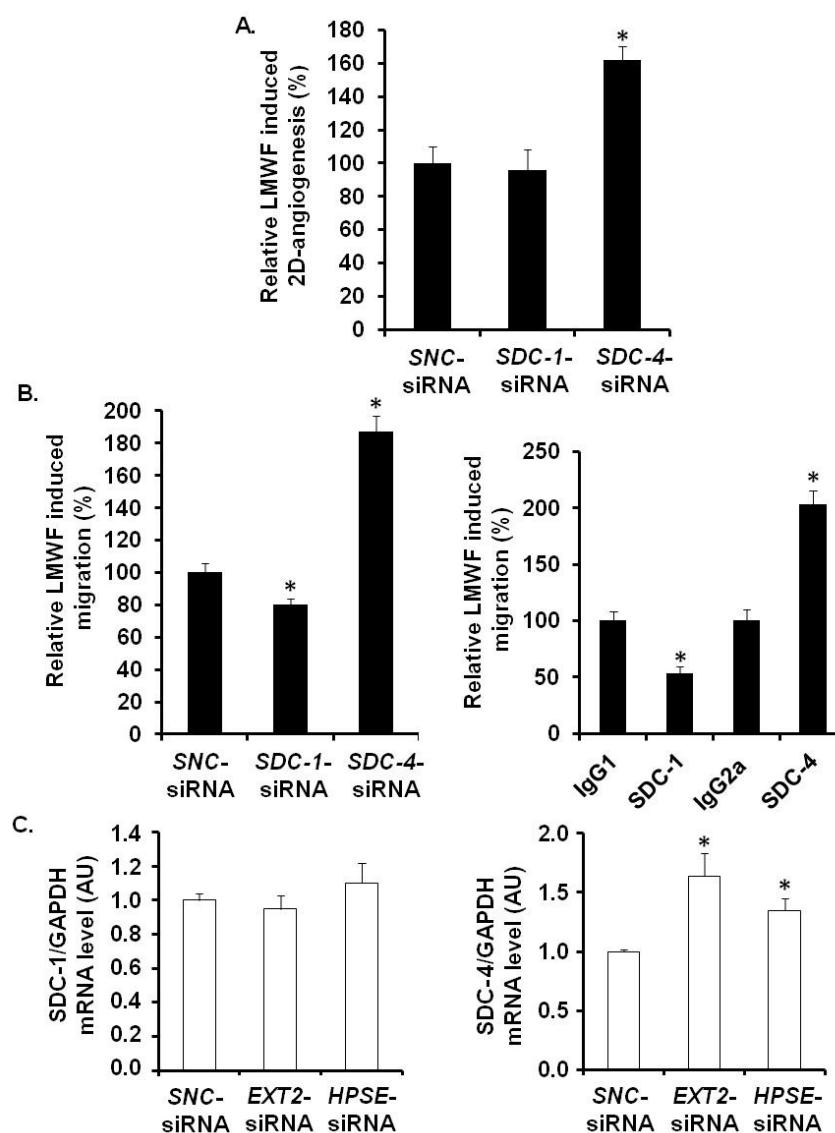


Figure 8. Assessment of SDC involvement in biological effects of LMWF in HUVECs. 2D-angiogenesis (A) and migration (B) assays were performed in *SDC-1*-siRNA- or *SDC-4*-siRNA- or *SNC*-siRNA-transfected control cells (B, left panel), or in cells treated with specific anti-SDC-1 or anti-SDC-4 antibodies (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 $\mu\text{g/mL}$; 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$. 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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- μ m-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- μ m-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- μ m-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 μ g/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. Vlodavsky, 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. Chevolot, 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.
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.

Article 2 : Identification d'un potentiel pro-angiogénique et d'un mécanisme d'internalisation cellulaire d'une fraction de fucoïdane de bas poids moléculaire et hautement sulfaté.

A l'intérieur de cet article publié dans "Marine Drugs" en 2016, la collaboration de notre laboratoire avec l'entreprise Algue & MerTM nous a permis d'étudier des autres fucoïdanes provenant d'*Ascophyllum nodosum*, l'un de haut poids moléculaire (HMWF) (26.6 KDa), et l'autre de moyen poids moléculaire (MMWF) (26.6 KDa). Nous avons émis l'hypothèse que l'expression des GAGs endogènes est altérée dans les maladies cardiovasculaires et nous avons montré que le LMWF pouvait modifier l'expression des chaînes HS en modifiant l'expression des syndécannes.

Des études ont également montré un lien entre les mimétiques de GAGs sulfatés de bas poids moléculaire et leur capacité à régénérer les tissus ischémiés. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que la taille et le niveau de sulfatation du fucoïdane pourraient avoir un effet sur la migration cellulaire et l'angiogenèse dans les cellules endothéliales humaines dont le glycocalyx est endommagé. Ainsi nous avons étudié la structure des fucoïdanes LMWF et MMWF extraits de l'algue *Ascophyllum nosodum* et leur effets *in vitro* dans la formation de réseaux vasculaires et la migration des cellules endothéliales humaines exprimant ou non des GAGs.

Dans cet article, nous avons montré par résonance plasmonique de surface (BIAcore) que le fucoïdane brut (ASPHY) et les produits fractionnés (MMWF et LMWF) ont une affinité aux HBP (VEGF, SDF-1 /CXCL12 et RANTES/CCL5) similaire à celle de l'héparine. Cependant, nous avons mis en évidence que le LMWF présentant un taux de sulfatation plus élevée par rapport au MMWF avait une plus grande affinité aux HBP.

L'étude de la migration des cellules HUVEC en chambre de Boyden montre que LMWF et ASPHY augmentent la migration de ces dernières comparativement aux cellules HUVEC non traitées ou traitées avec MMWF. L'analyse structurale du fucoïdane a montré que le fucoïdane brut ASPHY contient majoritairement des LMWF ce qui pourrait expliquer son effet pro-migratoire similaire à celui du LMWF. De façon similaire le LMWF a montré des effets pro-angiogéniques supérieurs à ceux observés par le MMWF dans un modèle de formation de réseaux vasculaires en 2D. En revanche, aucun effet n'a été observé pour ASPHY.

Par la suite nous avons étudié la localisation du LMWF au niveau cellulaire

par couplage de ce dernier à une molécule fluorescente (Alexa Fluor), ainsi nous avons pu observer que le LMWF pouvait être internalisé par endocytose dépendante de la clathrine.

En conclusion, ce travail ouvre la voie à l'utilisation du fucoïdane comme substitut des GAG dans le traitement de l'altération du glycocalyx.

Article

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

Nicolas Marinval ¹, Pierre Saboural ¹, Oualid Haddad ¹, Murielle Maire ¹, Kevin Bassand ¹, Frederic Geinguenaud ², Nadia Djaker ², Khadija Ben Akrou ², Marc Lamy de la Chapelle ², Romain Robert ¹, Olivier Oudar ¹, Erwan Guyot ^{1,3}, Christelle Laguillier-Morizot ^{1,3}, Angela Sutton ^{1,3}, Cedric Chauvierre ¹, Frederic Chaubet ¹, 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.); pierre.saboural@univ-paris13.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.oudar@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.); khadijabenakrou@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	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	Ip (M_w/M_n)
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 CH_2 and asymmetric bending vibration of CH_3 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 $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$. In Raman the β -glycosidic linkages between monosaccharide units was described at 890 cm^{-1} . The characteristic band for sulfated polysaccharides attributed to asymmetric $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ 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 $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ 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 $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ deformation of sulfates [19]. The FT-IR analysis in D_2O 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.

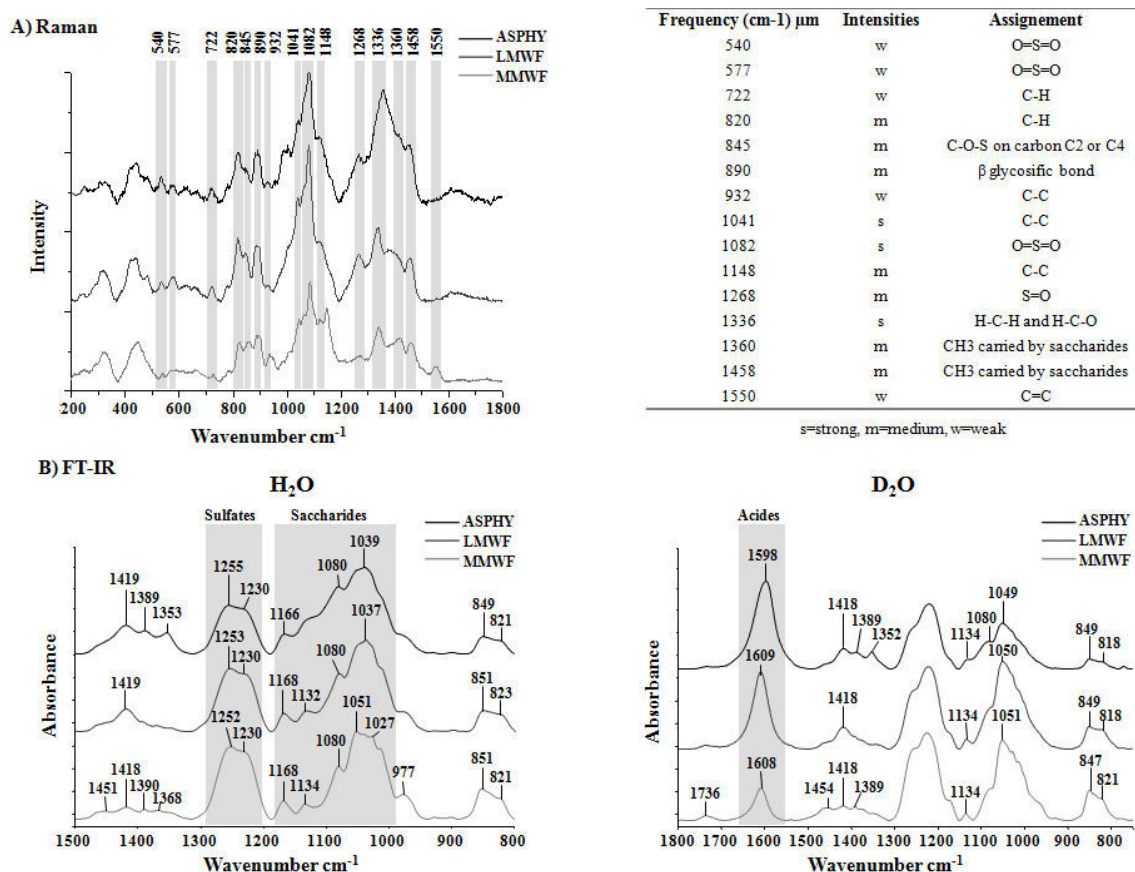


Figure 1. Raman and Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy analysis. Fucoidan spectra are represented in black for crude Ascophyscient (ASPHY), dark grey for the low molecular weight fucoidan (LMWF) and light grey for the medium molecular weight fucoidan (MMWF) for (A) Raman and (B) FT-IR (in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

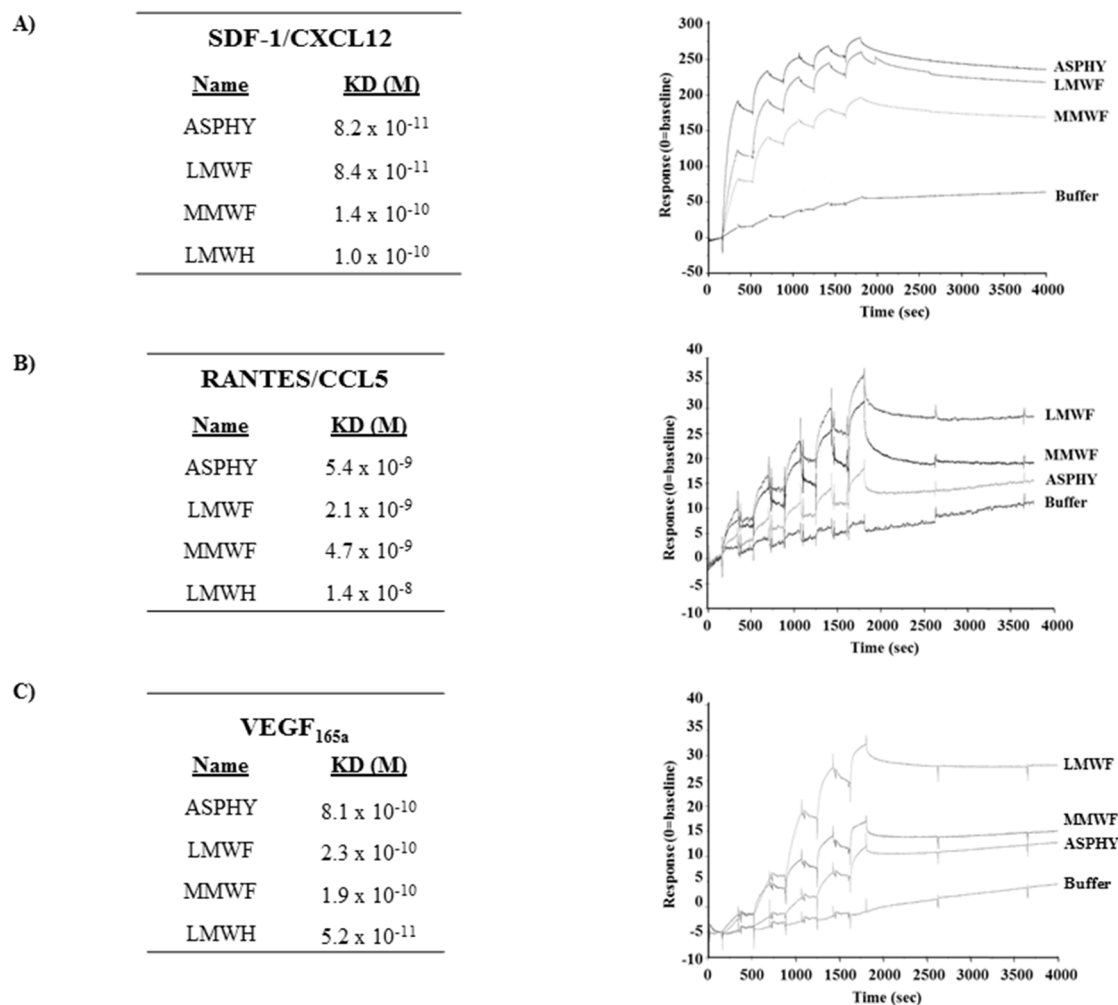


Figure 2. Affinity measurement of fucoidans to SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 and VEGF. The binding responses of ASPHY, MMWF, LMWF and low molecular weight heparin (LMWH) to SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 and VEGF were measured by Surface Plasmon Resonance. We immobilized biotinylated SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 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 $\mu\text{g/mL}$, 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 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3A,C). However, only the highest concentration of MMWF at 1000 $\mu\text{g/mL}$ increased the HUVEC viability (Figure 3B). At 10 $\mu\text{g/mL}$, 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 $\mu\text{g/mL}$ and up to 24 h of fucoidan treatment.

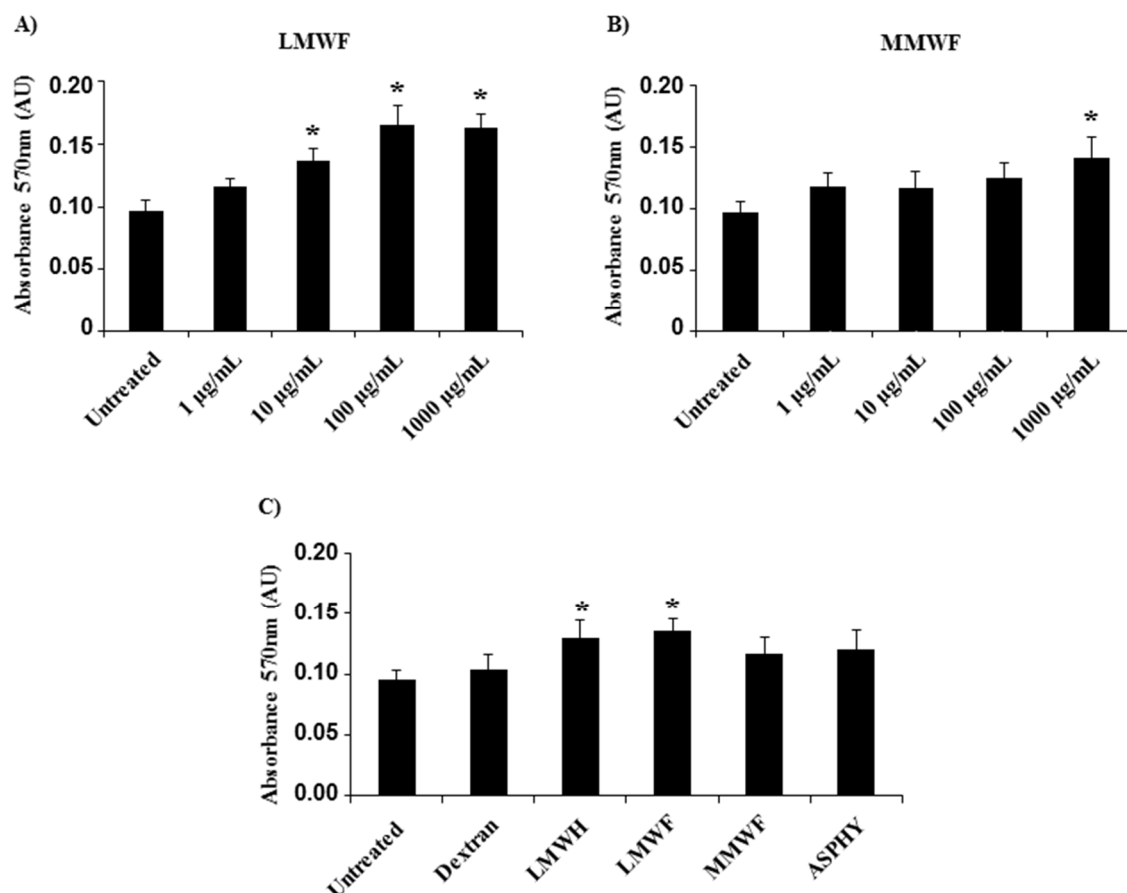


Figure 3. Effect of fucoidans on cell viability. The viability of HUVECs was analyzed by using MTT assay after fucoidan treatment for 24 h. The absorbance was read with a spectrophotometer (at 570 nm). HUVECs were incubated with (A) LMWF and (B) MMWF at increasing concentration (1, 10, 100, and 1000 $\mu\text{g/mL}$); (C) HUVECs were incubated 24 h with polysaccharides (dextran, LMWH, LMWF, MMWF and ASPHY) at 10 $\mu\text{g/mL}$. 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 $\mu\text{g/mL}$ 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).

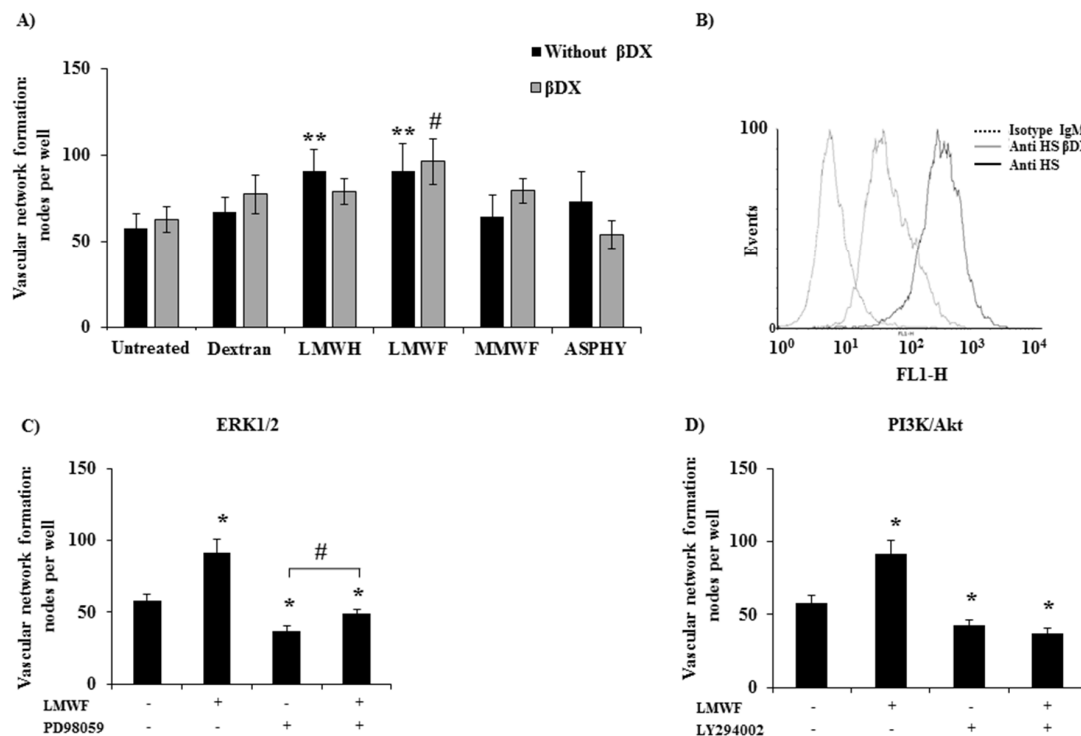


Figure 4. Pro-angiogenic potential of fucoidans on GAG-free HUVECs. (A) HUVECs pre-treated or not with βDX (4-Nitrophenyl-β-D-Xylopyranoside) were seeded on Matrigel and incubated with dextran, LMWH, LMWF, MMWF or ASPHY for 6 h. The cells were then stained with Hemalun Mayer's and photographed for analysis. Values are expressed in number of nodes per well. ** $p < 0.01$ LMWF or LMWH versus Untreated (all without βDX). # $p < 0.05$ LMWF versus Untreated (all with βDX); (B) Endogenous GAGs expression analyzed by flow cytometry on HUVECs pre-treated or not 48 h with βDX; (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 *Ascomyllum 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 (βDX) cell treatment for 48 h to inhibit GAG elongation. The efficiency of βDX 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).

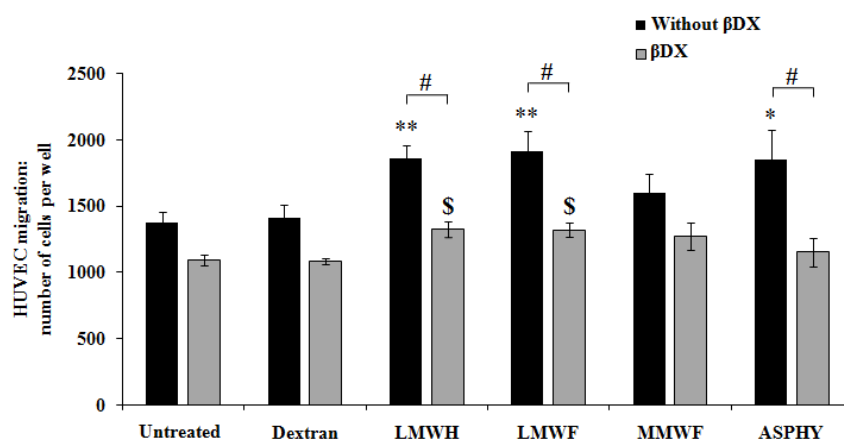


Figure 5. Pro-migratory potential of fucoidans on GAG-free HUVECs. HUVECs were seeded and incubated 24 h in the upper chamber with the polysaccharides dextran, LMWH, LMWF, MMWF or ASPHY at $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$. The basal migration was performed in complete medium with 12% FBS. In the aim to remove 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 changed 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 endogens 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.

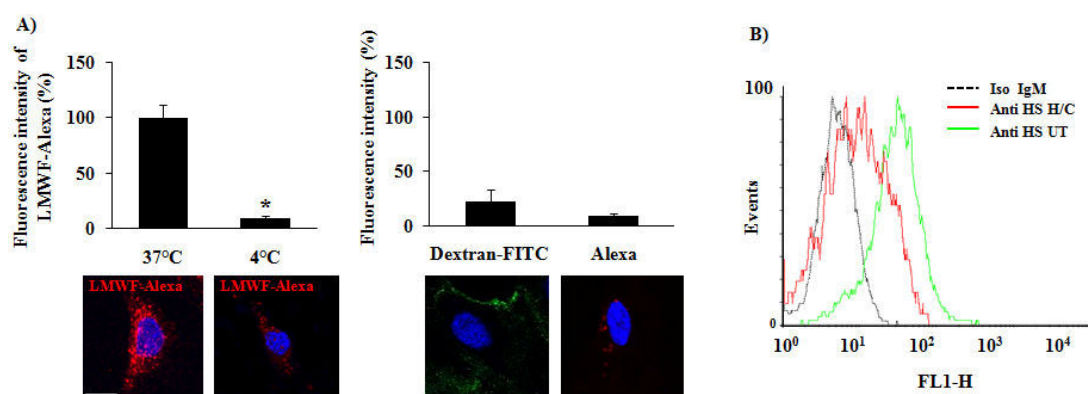


Figure 6. Cont.

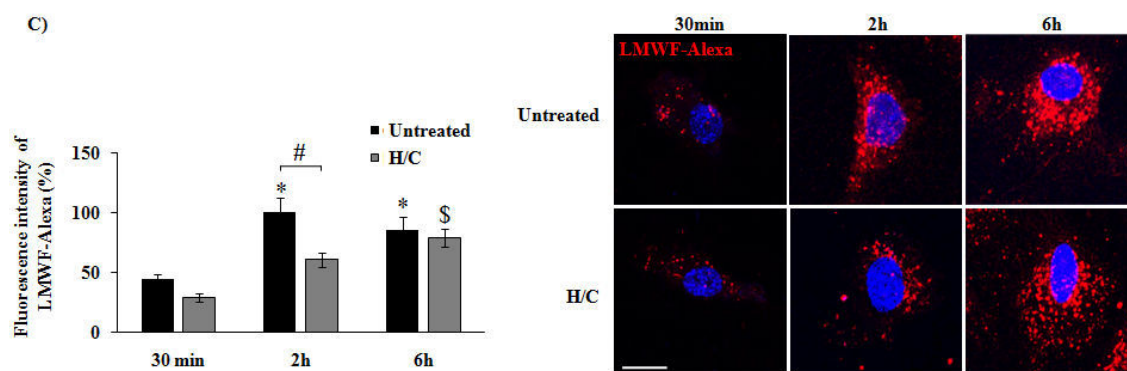


Figure 6. LMWF-Alexa localization in HUVECs by confocal microscopy. LMWF was previously coupled with the fluorophore Alexa Fluor 555. (A) LMWF-Alexa was added in HUVEC culture medium at 10 μg/mL during 2 h at 37 °C and 4 °C. Dextran-FITC and Alexa fluor alone (Alexa) were used as negative control. Pictures 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 °C versus 4 °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.

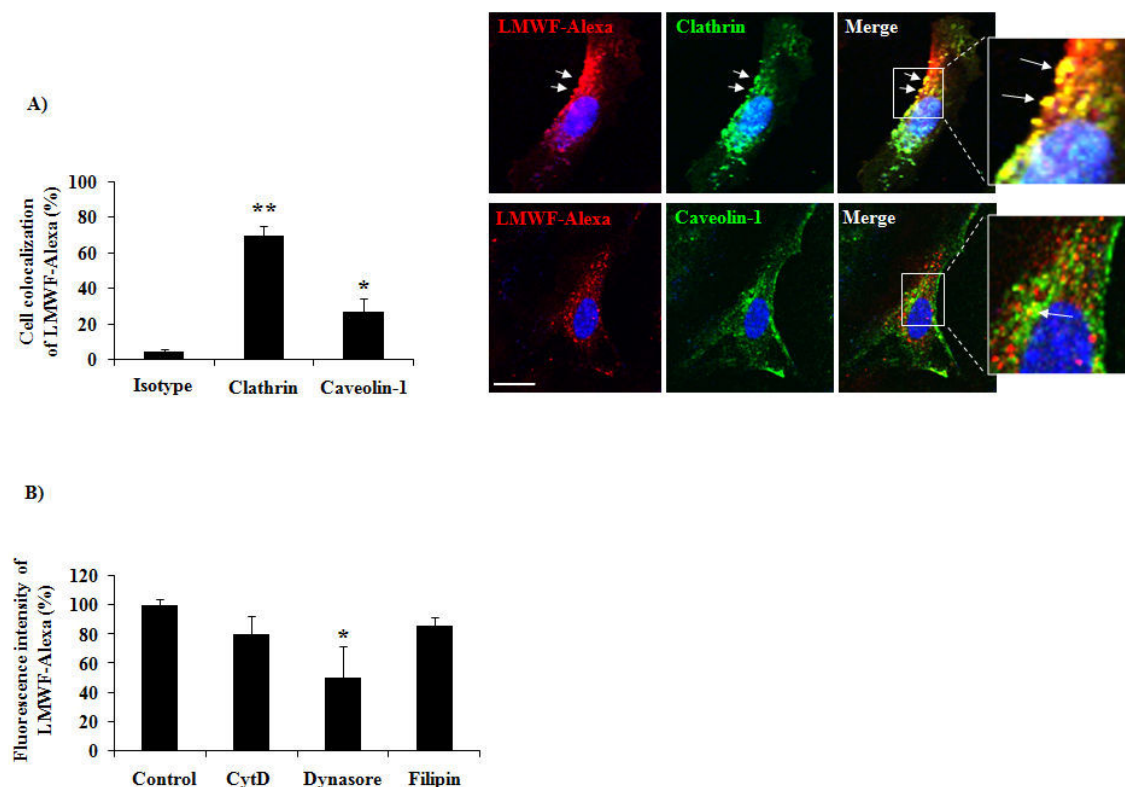


Figure 7. Internalization pathways of LMWF-Alexa in HUVECs analyzed by confocal microscopy. **(A)** HUVECs were incubated 2 h with LMWF-Alexa, fixed, permeabilized and the clathrin or caveolin-1 was revealed by immunofluorescence. A non-specific isotype of immunoglobulin was used as negative control (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 HPB 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 μ M in cell culture. PD98059 (Sigma-Aldrich) is an inhibitor of the MAPKK MEK1 and MEK2 signaling pathway and was used at 30 μ M 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 μ M 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 μ g/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 μ M in cell culture for 30 min.

4.3. Enzymes and Glycosaminoglycan Substitute

β DX (4-Nitrophenyl β -D-xylopyranoside, Sigma-Aldrich), a substitute of glycosaminoglycans (GAGs) was used as specific inhibitor of the GAG chain elongation. β DX 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 μ m-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. 1×10^4 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. Peysselon, 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.; Calliguri, 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.; 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. [[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. Invest.* **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.; 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.
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

➤ **Les fucoïdanes et leurs effets hétérogènes sur l'angiogenèse**

Au cours de ma thèse je me suis intéressé à l'implication des fucoïdanes dans le processus d'angiogenèse. Les fucoïdanes sont des polysaccharides sulfatés qui peuvent être obtenus à partir de différentes espèces marines, dont les plus répandues sont les algues brunes. Les fucoïdanes présentent des homologies structurales et fonctionnelles avec les glycosaminoglycanes (GAG) endogènes. Tous deux sont des polysaccharides sulfatés et forment des interactions avec les facteurs de croissance et les chimiokines, ce qui définit les fucoïdanes comme des mimétiques naturels de GAGs d'origine exogène. De nombreux travaux ont étudié les effets des fucoïdanes sur la formation des néo-vaisseaux et ils montrent les effets hétérogènes, pro- et anti-angiogénique. D'une part, les fucoïdanes peuvent promouvoir la revascularisation d'un tissu ischémié d'un membre inférieur chez le rat (Luyt 2003) et la ré-endothélialisation de la paroi artérielle dans le modèle d'hyperplasie intinale chez le lapin (Deux 2002). Par ailleurs, il a été montré que le fucoïdane pouvait interagir de manière électrostatique avec les facteurs de croissance (tels que FGF-2 et VEGF) (Matou 2002, Lake 2006) et aussi avec les chimiokines (comme SDF-1) (Berteau 2003, Fermas 2008) en favorisant l'angiogenèse. De plus, il a été mis en évidence que le fucoïdane peut favoriser le phénotype pro-angiogénique de progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) en présence de FGF-2 (Zemani 2005). Plus récemment, il a été montré que le fucoïdane de bas poids moléculaire (LMWF), extrait de l'algue *Laminaria japonica*, active les voies de signalisation JNK et p-38 en présence de FGF-2 (Kim 2014) et le LMWF provenant d'*Ascophyllum nodosum*, active la voie PI3K/AKT stimulant ainsi l'angiogenèse (Bouvard 2015).

D'autre part, un certain nombre de publications montrent un effet anti-angiogénique des fucoïdanes. Une étude a démontré qu'une sur-sulfatation du fucoïdane de haut poids moléculaire (HMWF) inhibe l'action du FGF-2 dans la formation de réseaux vasculaires *in vitro* (Soeda 2000). De plus, un LMWF isolé de *Sargassum hemiphyllum* (très riche en sulfates) présente des capacités anti-angiogéniques dans l'hypoxie tumorale en régulant négativement la voie PI3K/AKT (Chen, 2015). Ou encore, un fucoïdane extrait d'*Ascophyllum nodosum* présente des activités anti-tumorales et anti-prolifératives sur les cellules de carcinome broncho-pulmonaire (Riou 1996).

L'ensemble de ces différentes études mettent en lumière l'importance de la composition du fucoïdane sur ses capacités et son potentiel thérapeutique pour favoriser ou inhiber l'angiogenèse. Les différences entre les fucoïdanes (masse moléculaire, composition en fucose, acide uronique et degré de sulfatation) peuvent être responsables de leurs effets opposés dans les modèles *in vitro* et *in vivo*. Il est donc essentiel, avant de commencer les expériences avec les fucoïdanes, de choisir et de vérifier soigneusement le produit au niveau de sa pureté car parmi les nombreux fournisseurs des produits appelés "fucoïdane", très peu proposent des composés homogènes contenant une seule population de fucoïdane. Malheureusement, la majorité des produits existants, présente une hétérogénéité très importante et sont vendus comme LMWF, MMWF ou HMWF en indiquant seulement la taille moyenne du composé.

➤ **Choix du fucoïdane pro-angiogénique et sa caractérisation**

Dans la première publication, présentée dans mon manuscrit, nous avons travaillé avec le LMWF (8.1 kDa; fucose 35%, acide uronique 3%, sulfate 34%) extrait de *Fucus vesiculosus* et fournis par Kraeber GmbHTM. Puis, dans la deuxième publication nous avons travaillé avec le fucoïdane "Ascophyscient" extrait de *Ascophyllum nodosum* obtenu grâce à la collaboration avec la société Algues & MerTM. Le fucoïdane Ascophyscient (4.1 kDa, fucose 29%, acide uronique 27%, sulfate 25%) a été précédemment caractérisé par notre laboratoire (Saboural 2014). Il correspond à un mélange de diverses populations de fucoïdanes. Nous les avons séparé les populations de fucoïdane par leurs tailles et choisi deux fractions de fucoïdanes : LMWF (4.9 kDa, fucose 21%, acide uronique 18%, sulfate 23%) et MMWF (26.6 kDa, fucose 36%, acide uronique 14%, sulfate 29%). Nous avons analysé la composition et le taux de sulfatation afin d'explorer la relation structure/fonction du fucoïdane. Cette analyse est intéressante pour définir la probabilité d'interaction électrostatique des fucoïdanes chargés négativement, grâce notamment aux groupements sulfates, avec les facteurs de croissance et les chimiokines chargés positivement. Nos résultats montrent un taux de sulfatations de 1.55 pour le LMWF et de 1.14 pour le MMWF (Marinval 2016).

Puisque les fucoïdanes sont appelés, mimétiques des GAGs, une comparaison de leur activité structurale avec celle des GAGs exprimés par les

cellules humaines pourrait paraître judicieuse. Les études structure/fonction nous ont permis d'identifier les sites d'interactions des GAGs avec les facteurs de croissance, tels que le FGF-2 et le VEGF. Le positionnement des sulfates sur une N-glucosamine et en position 2-O des unités iduronate sur des chaînes héparanes sulfates (HS) est requis pour l'interaction des GAGs endogènes avec FGF-2, tandis que les résidus glucosamines sulfatés en position 6-O sont nécessaires pour l'activité mitogène du complexe GAGs/FGF-2 (Pye 1998, Goodger 2008). Plus particulièrement, le VEGF interagit préférentiellement avec les chaînes HS contenant deux résidus saccharidiques hautement sulfatés espacés de fragments moins sulfatés (Robinson 2006).

Concernant les fucoïdanes provenant d'*Ascophyllum nodosum*, nous avons effectué leur caractérisation physico-chimique à l'aide de la spectroscopie infrarouge (FT-IR) et Raman (Marinval 2016). Les résultats ont démontré que LMWF et le MMWF possédaient les bandes caractéristiques de liaison de type O=S=O. L'observation des bandes Raman (à 1268 cm^{-1}) a confirmé le taux de sulfatation pour LMWF (1.55). De même, les bandes Raman (à 845 cm^{-1}), pour LMWF et MMWF ont suggéré la présence de groupements sulfates aux positions -2 et -4, respectivement. Nos résultats sont en accords avec ceux présentés par Bilan *et al.* pour le fucoïdane extrait de *Fucus evanescens* (Bilan 2002).

Les spectres FT-IR ont mis en évidence la plus forte présence des groupements COO⁻ pour le LMWF que pour le MMWF, révélant une tendance comparable aux proportions d'acide uronique présentes dans les fucoïdanes (18% et 14% respectivement). De plus, les données spectroscopiques ont montré que les groupements sulfate et carboxyliques des fucoïdanes peuvent être corrélés à leur taux de sulfatation et teneur en acide uronique mesurés par des méthodes colorimétriques, validant ainsi les différentes techniques utilisées pour caractériser les fucoïdanes utilisés.

Après avoir caractérisé la structure des fucoïdanes, nous avons étudié leurs interactions avec les facteurs pro-angiogéniques (facteurs de croissance et chimiokines).

➤ **Interactions des fucoïdanes avec les facteurs pro-angiogéniques**

Précédemment, il a été démontré dans la littérature que la sulfatation de mimétiques de GAG joue un rôle important dans leur capacité à se lier à un facteur de croissance

(Ikeda 2011). Dans une étude précédente avec des mimétiques de GAGs synthétiques, les RGTA, nous avons obtenu une affinité de l'ordre du nM entre le SDF1/CXCL12 et les RGTA, comparable avec l'affinité de l'héparine pour SDF1/CXCL12 (Friand 2009). Il serait possible que les acides aminés présents dans le site de fixation de SDF-1/CXCL12 à l'héparine soient similaires à ceux qui interagissent avec ces mimétiques de GAGs. Concernant les fucoïdanes, ils pourraient interagir avec les facteurs de croissance et chimiokines avec des affinités différentes et cette différence pourrait être liée aux différents taux de sulfatation des fucoïdanes.

Dans cette optique nous avons analysé l'affinité des fucoïdanes aux heparin binding protein (HBP) telles que VEGF, SDF-1/CXL12 et RANTES/CCL5 à l'aide de résonance plasmonique de surface (BIAcore X100) (Marinval 2016). Pour cela, les SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 et VEGF₁₆₅ biotinylés ont été couplés à la surface d'une puce. Puis les fucoïdanes (LMWF et MMWF) ont été mis, grâce à un flux au contact des puces afin d'étudier leur interaction avec les HBPs et ainsi de caractériser leur association et dissociation. Nous avons pu montrer que le LMWF et le MMWF peuvent se fixer avec une haute affinité aux HBPs. Mais de façon surprenante, nous n'avons pas pu observer de différences significatives d'affinité entre les LMWF et MMWF (Marinval 2016). Cependant, nos résultats ont montré une tendance dans la différence d'affinité entre ces deux fractions de fucoïdanes, tous les deux hautement sulfatés (taux de sulfatation de 1.14 pour MMWF et 1.55 pour LMWF) et les chimiokines SDF-1/CXCL12 et RANTES/CCL5. LMWF présente un taux de sulfatation plus élevé et une affinité (K_D) relative plus élevée pour les deux HBPs, comparé au MMWF qui présente un taux de sulfatation et un K_D plus faibles. 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.

➤ ***Internalisation des fucoïdanes par les HUVEC***

Il a été montré dans la littérature que les GAGs endogènes qui sont associées à l'héparanase ou aux lipoprotéines peuvent être internalisés via la voie d'endocytose dépendante ou non de la clathrine (Gingis-Velitski 2004, Payne 2007),

tandis que les GAGs associés aux peptides peuvent être internalisés via la voie de la macropinocytose (Ram 2008).

De même, nous avons émis l'hypothèse que les fucoïdanes peuvent être internalisés par les cellules endothéliales (CE) via la voie d'endocytose. Pour explorer cette hypothèse nous avons utilisé le LMWF marqué par un fluorochrome, l'Alexafluor-555 (Marinval 2016). Nos résultats ont mis en évidence que le LMWF-Alexa a été internalisé en 2 h dans les HUVECs et s'est localisé dans la région périnucléaire. Ces observations sont en accord avec l'étude sur l'internalisation par endocytose de l'héparine marqué avec le fluorochrome 4-Fluorenyl-isothiocyanate (FITC) dans les CML (Castellot 1985). De plus, nous avons démontré que cette internalisation était dépendante de la température et médiée par la clathrine (Marinval 2016). Les voies d'internalisation des polysaccharides sulfatés sont encore relativement peu étudiées et pourraient donner des éléments de compréhension sur les interactions moléculaires et les voies de signalisation mises en jeu par les polysaccharides. En dehors des voies de signalisation les fucoïdanes pourraient éventuellement avoir d'autres rôles biologiques après leur internalisation dans la cellule. Récemment, une étude a montré que les GAGs exogènes solubles peuvent améliorer l'endocytose par leur association aux peptides et à l'ADN, puis les GAGs pourraient s'échapper de la voie endosomale lysosomale pour se localiser dans une région périnucléaire (Naik 2015). La localisation 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.

➤ ***Effet du fucoïdane sur l'angiogenèse in vitro***

Par la suite nous avons étudié le rôle des fucoïdanes dans l'angiogenèse *in vitro*. Nous avons choisi le modèle de CE humaines (HUVEC) qui ont été cultivées sur une matrice simplifiée (Matrigel) mimant l'environnement matriciel de l'endothélium. Pour avoir une étude complète de l'effet des fucoïdanes sur le processus d'angiogenèse, il est nécessaire d'analyser les différents effets biologiques en parallèle, tels que la viabilité et la migration des CE et les interactions entre elles conduisant à la formation des réseaux vasculaires.

Nous avons émis l'hypothèse que dans le processus d'angiogenèse le fucoïdane pourrait agir comme un intermédiaire entre les récepteurs et les chimiokines en

augmentant leur concentration à la surface cellulaire et en facilitant leur accès à leurs récepteurs respectifs. Cette interaction pourrait augmenter la formation de clusters de corécepteurs (PG) complexés avec les récepteurs membranaires et pourrait conduire à une amplification du signal et de la réponse cellulaire.

Cependant, il existe d'autres hypothèses qui proposent que 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 une déplétion/séquestration des HBPs et à l'inhibition de leurs effets. Ceci suggère que l'activité pro-angiogénique du LMWF n'est pas liée à sa capacité à se lier aux HBPs, mais est plus proche d'une activité propre (Boisson-Vidal 2007).

A l'inverse, le fucoïdane pourrait en l'absence de l'expression des GAGs dans un modèle de l'hyperplasie intinale, substituer leurs fonctions par un rôle préventif sur la dégradation du glycocalyx et finalement accélérer le processus de réendothélialisation (Deux 2002).

Nos résultats *in vitro* montrent que LMWF stimule la viabilité (Marinval 2016), la migration des HUVEC et la formation des réseaux vasculaires (Haddad 2015, Marinval 2016). Cependant l'effet du MMWF dans ce modèle a été moins important que celui du LMWF (Marinval, 2016). De plus, nous avons mis en évidence qu'en l'absence de GAGs endogènes, suite à l'action de 4-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranoside, le LMWF garde toujours un potentiel pro-angiogénique contrairement à l'héparine. Ces résultats suggèrent que les GAGs endogènes ne sont pas impliqués dans l'angiogénèse induite par LMWF.

Nous avons également démontré que le LMWF pouvait modifier l'expression des HS en modulant l'expression et l'activité de l'héparanase (HPSE), l'expression de l'exostosine-2 (EXT-2) et des syndécannes-1 et 4 (SDC-1, SDC-4) (Haddad, 2015). De plus, nous avons mis en évidence que les enzymes EXT-2 et HPSE, et que le SDC-4, sont impliqués dans l'effet pro-angiogénique du LMWF, puisque quand nous inhibons leurs expressions par des ARN interférents (small interfering RNA, siRNA), le pouvoir pro-angiogénique du fucoïdane est modulé négativement. Ainsi les enzymes du métabolisme (EXT-2) et du catabolisme (HPSE) interfèrent avec l'activité biologique du fucoïdane suggérant que les chaînes HS seraient donc impliquées dans l'action du fucoïdane (Haddad, 2015).

Une relation inverse entre l'expression de l'EXT-1 et celle de l'HPSE a été mise en évidence dans des modèles de cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses qui ont un taux élevé d'EXT-1, expriment faiblement l'HPSE, et au contraire les cellules qui ont un taux faible d'EXT-1, expriment fortement l'HPSE (Wang 2013). De plus l'inhibition de l'expression d'EXT-1 par siRNA conduit à l'augmentation de l'expression de l'HPSE et du potentiel métastatique des cellules (Wang 2013). Dans notre étude nous avons démontré que le LMWF diminue significativement le taux de EXT-2, au contraire il augmente le taux de l'HPSE. Ces résultats suggèrent qu'il semble y avoir une balance entre l'expression d'EXT-2 et d'HPSE induite par LMWF jouant un rôle important dans l'angiogenèse.

Dans un modèle de souris transgénique, sur-exprimant l'HPSE, la néovascularisation du conduit mammaire est augmentée malgré la taille des chaînes HS fortement diminuée (Zcharia 2004). Dans notre étude nous retrouvons aussi une augmentation de l'HPSE avec le traitement du LMWF qui abouti à une stimulation de l'angiogenèse (Haddad, 2015). L'HPSE a un effet pro-angiogénique, elle augmente la migration des CE et la dégradation de la lame basale qui les soutient. En dégradant les chaîne HS, l'HPSE libère les facteurs des croissances FGF et VEGF qui étaient retenus dans la MEC par liaison à ces HS. Les fragments de chaînes HS générés par l'action d'HPSE, augmentent la liaison du FGF à son récepteur, puis induit sa signalisation (Vlodavsky 2013).

➤ ***Effet du fucoïdane sur l'angiogenèse in vivo***

Précédemment nous avons mis en évidence l'effet pro-angiogénique du MMWF en présence de VEGF₁₆₅ (Puranama 2015). Les deux facteurs pro-angiogéniques ont été intégrés dans une prothèse biodégradable tridimensionnelle (3D), qui par la suite a été implantée en sous-cutané chez la souris. Nos travaux suggèrent que l'application d'un support 3D muni de MMWF/VEGF est une bonne stratégie pour induire la ré-vascularisation des zones ischémisées.

Une autre étude extérieure du laboratoire a utilisé le fucoïdane dans le modèle de régénérescence endothéliale *in vivo* (Hlawaty 2011). Le LMWF (Kraeber GBHTM) a été administré par injection intramusculaire dans un modèle d'hyperplasie intinale induite dans l'aorte thoracique et abdominale chez le rat par

angioplastie par ballonnet (Hlawaty 2011). Nous avons démontré que le LMWF a augmenté la prolifération des CE et a au contraire inhibé celle des CML. Ceci a permis d'avoir une diminution de la formation de la néointima. Nous avons aussi montré, par zymographie *in situ*, que le LMWF a diminué l'activité de la MMP-2. De plus, j'ai mis en évidence dans le même modèle d'hyperplasie intinale chez le rat, que le LMWF a des effets opposés sur l'expression des différents SDC, il induit l'expression de SDC-1 et diminue celle de SDC-4 dans la zone néo-intimale (Haddad, 2015).

Plus récemment, nous avons utilisé le LMWF (Algue & MerTM) associé au VEGF pour la régénérescence de valves porcines acellularisées et leur ré-endothélialisation (Marinval 2018). Nous voulons tester dans cette étude le potentiel anti-thrombotique et régénératif de l'application d'un film de polyélectrolytes en multicouche (PEM) composé du mélange de fucoïdane et de VEGF, qui a été mis en culture avec les CE humaines. Nous avons mis en évidence dans ce travail que l'application de PEM induit un potentiel antithrombotique, permet l'adhérence et la survie de CE. Nos travaux suggèrent que l'application de PEM est une bonne stratégie pour induire la ré-endothélialisation de valves acellulaires pour le développement de bio-prothèses autorégénératives.

➤ **Perspectives**

Nous avons montré que le LMWF a un effet sur l'expression de différentes cibles dont HPSE, EXT-2, SDC-1 et SDC-4. Nous avons également montré qu'il est internalisé et se localise dans la partie périnucléaire des cellules. Nous ne connaissons pas pour l'instant le mode d'action du LMWF qui permet de moduler l'expression de ces cibles. Les GAGs endogènes interviennent dans le trafic intracellulaire afin d'orienter le transport des protéines selon le type de GAG, accrochés ou libres (Mihov 2015). Nous voudrions savoir si le LMWF, en étant présent à l'intérieur de la cellule pouvait influencer le trafic intracellulaire des molécules avec lesquelles il se lie, comme les facteurs de croissance (VEGF, FGF) et les chimiokines (SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5).

Nous avons réalisé une séparation des différentes populations de fucoïdane en fonction de leurs poids moléculaires. Bien que pour le fucoïdane brut ASPHY, les deux fractions LMWF et MMWF ont des taux de sulfatation différents, nous n'avons pas trouvé de différence significative concernant leur affinité avec le VEGF, SDF-1/CXCL12 et RANTES/CCL5. Nous pourrions ainsi utiliser une chromatographie par échange d'ions pour séparer les populations de fucoïdane en fonction de leurs charges. Les fractions les plus chargées seraient donc les plus sulfatées. Nous pourrions ensuite vérifier leur affinité pour les facteurs pro-angiogéniques et leur efficacité à promouvoir l'angiogenèse.

Des études montrent que dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez le rat, la capacité des GAGs à interagir avec des HBP est altérée en conséquence de l'hypoxie du tissu musculaire. Ainsi, les GAGs du tissu ischémié ont une affinité plus faible pour le FGF-2 comparativement aux GAGs extraits du tissu sain (Chevalier 2015).

Nous avons montré que le LMWF induisait l'augmentation de l'expression protéique et l'activité de l'HPSE dans les cellules HUVEC. Nous avons mis en évidence une diminution de l'expression des GAGs totaux et chaînes HS. Il serait nécessaire d'étudier la composition dissacharidiques des chaines HS, leur taille, le taux et la position des groupements sulfates par la technique HPLC. Par la suite, il serait important d'étudier par résonance plasmonique de surface (Biacore) la conséquence fonctionnelle de cette activité enzymatique sur la liaison GAG-HBP. Ceci nous permettrait d'observer une éventuelle diminution de l'affinité GAG-HBP.

BIBLIOGRAPHIE

- Ai X, Do A-T, Lozynska O, Kusche-Gullberg M, Lindahl U and Emerson CP** 2003 Sulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *The Journal of Cell Biology* 162: 341–351.
- Alexopoulou AN, Multhaupt HAB and Couchman JR** 2007 Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 505–528.
- Babykutty S, S PP, J NR, Kumar MAS, Nair MS, Srinivas P and Gopala S** 2012 Nimbolide retards tumor cell migration, invasion, and angiogenesis by downregulating MMP-2/9 expression via inhibiting ERK1/2 and reducing DNA-binding activity of NF- κ B in colon cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* 51: 475–490.
- Balaji S, King A, Crombleholme TM and Keswani SG** 2013 The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Advances in Wound Care* 2: 283–295.
- Bame KJ** 2001 Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. *Glycobiology* 11: 91R-98R.
- Barquera S, Pedroza-Tobías A, Medina C, Hernández-Barrera L, Bibbins-Domingo K, Lozano R and Moran AE** 2015 Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Archives of Medical Research* 46: 328–338.
- Beenken A and Mohammadi M** 2009 The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 8: 235–253.
- Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL and Lose EJ** 1992 Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annual Review of Cell Biology* 8: 365–393.
- Berteau O and Mulloy B** 2003 Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* 13: 29R-40R.
- Bilan MI, Grachev AA, Ustuzhanina NE, Shashkov AS, Nifantiev NE and Usov AI** 2002 Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. *Carbohydrate Research* 337: 719–730.
- Boccalon H, Lehert P and Mosnier M** 2000 Appréciation de la prévalence de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs en France à l'aide de l'index systolique dans une population à risque vasculaire. *Journal des Maladies Vasculaires*: 9.
- Boisson-Vidal C, Zemani F, Caligiuri G, Galy-Fauroux I, Collic-Jouault S, Helley D and Fischer A-M** 2007 Neoangiogenesis induced by progenitor endothelial cells: effect of fucoidan from marine algae. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 5: 67–77.
- Bonnard T, Yang G, Petiet A, Ollivier V, Haddad O, Arnaud D, Louedec L, Bachelet-**

Violette L, Derkaoui SM, Letourneur D, Chauvierre C and Visage CL 2014 Abdominal Aortic Aneurysms Targeted by Functionalized Polysaccharide Microparticles: a new Tool for SPECT Imaging. *Theranostics* 4: 592–603.

Bouvard C, Galy-Fauroux I, Grelac F, Carpentier W, Lokajczyk A, Gandrille S, Collic-Jouault S, Fischer A-M and Helley D 2015 Low-Molecular-Weight Fucoidan Induces Endothelial Cell Migration via the PI3K/AKT Pathway and Modulates the Transcription of Genes Involved in Angiogenesis. *Marine Drugs* 13: 7446–7462.

Brennan TV, Lin L, Brandstadter JD, Rendell VR, Dredge K, Huang X and Yang Y 2016 Heparan sulfate mimetic PG545-mediated antilymphoma effects require TLR9-dependent NK cell activation. *The Journal of Clinical Investigation* 126: 207–219.

Brooke BS, Karnik SK and Li DY 2003 Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal. *Trends in Cell Biology* 13: 51–56.

Cardin AD and Weintraub HJ 1989 Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 9: 21–32.

Carmeliet P and Jain RK 2011 Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery* 10: 417–427.

Carulli S, Beck K, Dayan G, Boulesteix S, Lortat-Jacob H and Rousselle P 2012 Cell surface proteoglycans syndecan-1 and -4 bind overlapping but distinct sites in laminin $\alpha 3$ LG45 protein domain. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 12204–12216.

Castellot JJ, Wong K, Herman B, Hoover RL, Albertini DF, Wright TC, Caleb BL and Karnovsky MJ 1985 Binding and internalization of heparin by vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology* 124: 13–20.

Chappell D, Dörfler N, Jacob M, Rehm M, Welsch U, Conzen P and Becker BF 2010 Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion. *Shock* 34: 133–139.

Chaubet F, Chevolot L, Jozefonvicz J, Durand P and Boisson-Vidal C 2000 Relationships between chemical characteristics and anticoagulant activity of low molecular weight fucans from marine algae. In Paulsen BS (ed.) *Bioactive Carbohydrate Polymers* pp. 59–84. Springer Netherlands, Dordrecht

Chen M-C, Hsu W-L, Hwang P-A and Chou T-C 2015 Low Molecular Weight Fucoidan Inhibits Tumor Angiogenesis through Downregulation of HIF-1/VEGF Signaling under Hypoxia. *Marine Drugs* 13: 4436–4451.

Chevalier F, Arnaud D, Henault E, Guillevic O, Siñeriz F, Ponsen AC, Papy-Garcia D, Barritault D, Letourneur D, Uzan G, Meddahi-Pellé A, Hlawaty H and Albanese P 2015 A fine structural modification of glycosaminoglycans is correlated with the progression of muscle regeneration after ischaemia: towards a matrix-based therapy?. *European Cells & Materials* 30: 51–68.

Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC and Martínez De La Escalera G 2009 Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiological Reviews* 89: 1177–1215.

Das S, Monteforte AJ, Singh G, Majid M, Sherman MB, Dunn AK and Baker AB 2016 Syndecan-4 Enhances Therapeutic Angiogenesis after Hind Limb Ischemia in Mice with Type 2 Diabetes. *Advanced Healthcare Materials* 5: 1008–1013.

De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, Truffa S, Biglioli P, Napolitano M, Capogrossi MC and Pesce M 2004 SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood* 104: 3472–3482.

Delcombel R, Janssen L, Vassy R, Gammons M, Haddad O, Richard B, Letourneur D, Bates D, Hendricks C, Waltenberger J, Starzec A, Sounni NE, Noël A, Deroanne C, Lambert C and Colige A 2013 New prospects in the roles of the C-terminal domains of VEGF-A and their cooperation for ligand binding, cellular signaling and vessels formation. *Angiogenesis* 16: 353–371.

Desgranges P, Louissaint T, Allaire E, Godeau B, Kichenin K, Becquemin J-P and Barritault D 2018 First Clinical Pilot Study on critical ischemic leg ulcers with Matrix Therapy ReGeneraTing Agent (RGTA®) technology. *Journal of Wound Technology*

Deux J-F, Meddahi-Pellé A, Le Blanche AF, Feldman LJ, Collic-Jouault S, Brée F, Boudghène F, Michel J-B and Letourneur D 2002 Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia in rabbit iliac artery in-stent restenosis model. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22: 1604–1609.

Edwards IJ 2012 Proteoglycans in prostate cancer. *Nature Reviews Urology* 9: 196–206.

Egeblad M and Werb Z 2002 New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* 2: 161–174.

El Masri R, Seffouh A, Lortat-Jacob H and Vivès RR 2017 The ‘in and out’ of glucosamine 6-O-sulfation: the 6th sense of heparan sulfate. *Glycoconjugate Journal* 34: 285–298.

Elfenbein A and Simons M 2013 Syndecan-4 signaling at a glance. *Journal of Cell Science* 126: 3799–3804.

Fermas S, Gonnet F, Sutton A, Charnaux N, Mulloy B, Du Y, Baleux F and Daniel R 2008 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* 18: 1054–1064.

Friand V, Haddad O, Papy-Garcia D, Hlawaty H, Vassy R, Hamma-Kourbali Y, Perret G-Y, Courty J, Baleux F, Oudar O, Gattegno L, Sutton A and Charnaux N 2009 Glycosaminoglycan mimetics inhibit SDF-1/CXCL12-mediated migration and invasion of human hepatoma cells. *Glycobiology* 19: 1511–1524.

- Frueh J, Maimari N, Homma T, Bovens SM, Pedrigi RM, Towhidi L and Krams R** 2013 Systems biology of the functional and dysfunctional endothelium. *Cardiovascular Research* 99: 334–341.
- Fujita M, Ishihara M, Shimizu M, Obara K, Nakamura S, Kanatani Y, Morimoto Y, Takase B, Matsui T, Kikuchi M and Maehara T** 2007 Therapeutic angiogenesis induced by controlled release of fibroblast growth factor-2 from injectable chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel in a rat hindlimb ischemia model. *Wound Repair and Regen* 15: 58–65.
- Gandhi NS and Mancera RL** 2008 The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chemical Biology & Drug Design* 72: 455–482.
- Gingis-Velitski S, Zetser A, Kaplan V, Ben-Zaken O, Cohen E, Levy-Adam F, Bashenko Y, Flugelman MY, Vlodavsky I and Ilan N** 2004 Heparanase Uptake Is Mediated by Cell Membrane Heparan Sulfate Proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* 279: 44084–44092.
- Gingras M, Farand P, Safar ME and Plante GE** 2009 Adventitia: the vital wall of conduit arteries. *Journal of the American Society of Hypertension: JASH* 3: 166–183.
- Goodger SJ, Robinson CJ, Murphy KJ, Gasiunas N, Harmer NJ, Blundell TL, Pye DA and Gallagher JT** 2008 Evidence that heparin saccharides promote FGF2 mitogenesis through two distinct mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 13001–13008.
- Grootjans JJ, Zimmermann P, Reekmans G, Smets A, Degeest G, Dürr J and David G** 1997 Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 13683–13688.
- Haddad O, Guyot E, Marinval N, Chevalier F, Maillard L, Gadi L, Laguillier-Morizot C, Oudar O, Sutton A, Charnaux N and Hlawaty H** 2015 Heparanase and Syndecan-4 Are Involved in Low Molecular Weight Fucoidan-Induced Angiogenesis. *Marine Drugs* 13: 6588–6608.
- Heil M and Schaper W** 2004 Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circulation Research* 95: 449–458.
- Heymann D, Ruiz-Velasco C, Chesneau J, Ratiskol J, Siquin C and Collic-Jouault S** 2016 Anti-Metastatic Properties of a Marine Bacterial Exopolysaccharide-Based Derivative Designed to Mimic Glycosaminoglycans. *Molecules* 21: 309.
- Hlawaty H, Suffee N, Sutton A, Oudar O, Haddad O, Ollivier V, Laguillier-Morizot C, Gattegno L, Letourneur D and Charnaux N** 2011 Low molecular weight fucoidan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2 expression. *Biochemical Pharmacology* 81: 233–243.

- Holtkamp AD, Kelly S, Ulber R and Lang S** 2009 Fucoidans and fucoidanases--focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 1–11.
- Horowitz A and Simons M** 1998 Phosphorylation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase Calpha. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 25548–25551.
- Hristov M, Zerneck A, Bidzhekov K, Liehn EA, Shagdarsuren E, Ludwig A and Weber C** 2007 Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circulation Research* 100: 590–597.
- Ihrcke NS, Parker W, Reissner KJ and Platt JL** 1998 Regulation of platelet heparanase during inflammation: role of pH and proteinases. *Journal of Cellular Physiology* 175: 255–267.
- Ikeda Y, Charef S, Ouidja M-O, Barbier-Chassefière V, Sineriz F, Duchesnay A, Narasimprakash H, Martelly I, Kern P, Barritault D, Petit E and Papy-Garcia D** 2011 Synthesis and biological activities of a library of glycosaminoglycans mimetic oligosaccharides. *Biomaterials* 32: 769–776.
- Iozzo RV and Sanderson RD** 2011 Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15: 1013–1031.
- Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Matsushima K, Mukaida N and Kondo T** 2012 Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *The Journal of Clinical Investigation* 122: 711–721.
- Khor E and Lim LY** 2003 Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24: 2339–2349.
- Kim BS, Park J-Y, Kang H-J, Kim H-J and Lee J** 2014 Fucoidan/FGF-2 induces angiogenesis through JNK- and p38-mediated activation of AKT/MMP-2 signalling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 450: 1333–1338.
- Kolb M, Margetts PJ, Sime PJ and Gauldie J** 2001 Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF-beta-mediated fibrotic responses in the lung. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 280: L1327–1334.
- Kreuger J and Kjellén L** 2012 Heparan Sulfate Biosynthesis: Regulation and Variability. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 60: 898–907.
- Lake AC, Vassy R, Di Benedetto M, Lavigne D, Le Visage C, Perret GY and Letourneur D** 2006 Low molecular weight fucoidan increases VEGF165-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF165 binding to VEGFR-2 and NRP1. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 37844–37852.

- Li B, Lu F, Wei X and Zhao R** 2008 Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules* 13: 1671–1695.
- 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 and Michel J-B** 2003 Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 305: 24–30.
- Ly M, Laremore TN and Linhardt RJ** 2010 Proteoglycomics: Recent Progress and Future Challenges. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 14: 389–399.
- Manon-Jensen T, Itoh Y and Couchman JR** 2010 Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *The FEBS journal* 277: 3876–3889.
- Manon-Jensen T, Multhaupt HAB and Couchman JR** 2013 Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. *The FEBS journal* 280: 2320–2331.
- Marinval N, Morenc M, Labour MN, Samotus A, Mzyk A, Ollivier V, Maire M, Jesse K, Bassand K, Niemiec-Cyganek A, Haddad O, Jacob MP, Chaubet F, Charnaux N, Wilczek P and Hlawaty H** 2018 Fucoidan/VEGF-based surface modification of decellularized pulmonary heart valve improves the antithrombotic and re-endothelialization potential of bioprostheses. *Biomaterials* 172: 14–29.
- Marinval N, Saboural P, Haddad O, Maire M, Bassand K, Geinguenaud F, Djaker N, Ben Akrou K, Lamy de la Chapelle M, Robert R, Oudar O, Guyot E, Laguillier-Morizot C, Sutton A, Chauvierre C, Chaubet F, Charnaux N and Hlawaty H** 2016 Identification of a Pro-Angiogenic Potential and Cellular Uptake Mechanism of a LMW Highly Sulfated Fraction of Fucoidan from *Ascophyllum nodosum*. *Marine Drugs* 14: 185.
- Martinez-Lemus LA** 2012 The dynamic structure of arterioles. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 110: 5–11.
- Mathieu C, Chevrier A, Lascau-Coman V, Rivard GE and Hoemann CD** 2013 Stereological analysis of subchondral angiogenesis induced by chitosan and coagulation factors in microdrilled articular cartilage defects. *Osteoarthritis and Cartilage* 21: 849–859.
- Matou S, Helley D, Chabut D, Bros A and Fischer A-M** 2002 Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro. *Thrombosis Research* 106: 213–221.
- Mihov D and Spiess M** 2015 Glycosaminoglycans: Sorting determinants in intracellular protein traffic. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 68: 87–91.
- de Munnik SM, Smit MJ, Leurs R and Vischer HF** 2015 Modulation of cellular signaling by herpesvirus-encoded G protein-coupled receptors. *Frontiers in Pharmacology* 6: 40.

- Muona K, Mäkinen K, Hedman M, Manninen H and Ylä-Herttuala S** 2012 10-year safety follow-up in patients with local VEGF gene transfer to ischemic lower limb. *Gene Therapy* 19: 392–395.
- Murakami M and Simons M** 2008 Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Current Opinion in Hematology* 15: 215–220.
- Naik RJ, Sharma R, Nisakar D, Purohit G and Ganguli M** 2015 Exogenous chondroitin sulfate glycosaminoglycan associate with arginine-rich peptide-DNA complexes to alter their intracellular processing and gene delivery efficiency. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1848: 1053–1064.
- Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR, TASC II Working Group, Bell K, Caporusso J, Durand-Zaleski I, Komori K, Lammer J, Liapis C, Novo S, Razavi M, Robbs J, Schaper N, Shigematsu H, Sapoval M, White C, White J, Clement D, Creager M, Jaff M, Mohler E, Rutherford RB, Sheehan P, Sillesen H and Rosenfield K** 2007 Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 33 Suppl 1: S1-75.
- Patel NJ, Karuturi R, Al-Horani RA, Baranwal S, Patel J, Desai UR and Patel BB** 2014 Synthetic, non-saccharide, glycosaminoglycan mimetics selectively target colon cancer stem cells. *ACS chemical biology* 9: 1826–1833.
- Patel-Hett S and D'Amore PA** 2011 Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *The International Journal of Developmental Biology* 55: 353–363.
- Payne CK, Jones SA, Chen C and Zhuang X** 2007 Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic* 8: 389–401.
- Pepine CJ** 1998 The effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial dysfunction: potential role in myocardial ischemia. *The American Journal of Cardiology* 82: 23S-27S.
- Pierce KL, Premont RT and Lefkowitz RJ** 2002 Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3: 639–650.
- Potente M, Gerhardt H and Carmeliet P** 2011 Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146: 873–887.
- Proudfoot AEI, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TNC and Kosco-Vilbois MH** 2003 Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 1885–1890.
- Purnama A, Aid-Launais R, Haddad O, Maire M, Mantovani D, Letourneur D,**

- Hlawaty H and Le Visage C** 2015 Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Delivery and Translational Research* 5: 187–197.
- Pye DA, Vives RR, Turnbull JE, Hyde P and Gallagher JT** 1998 Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 22936–22942.
- Rahbarghazi R, Nassiri SM, Ahmadi SH, Mohammadi E, Rabbani S, Araghi A and Hosseinkhani H** 2014 Dynamic induction of pro-angiogenic milieu after transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction. *International Journal of Cardiology* 173: 453–466.
- Ram N, Aroui S, Jaumain E, Bichraoui H, Mabrouk K, Ronjat M, Lortat-Jacob H and De Waard M** 2008 Direct peptide interaction with surface glycosaminoglycans contributes to the cell penetration of maurocalcine. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 24274–24284.
- Rapraeger AC, Krufka A and Olwin BB** 1991 Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252: 1705–1708.
- Reine TM, Vuong TT, Rutkovskiy A, Meen AJ, Vaage J, Jenssen TG and Kolset SO** 2015 Serglycin in Quiescent and Proliferating Primary Endothelial Cells. *PLOS ONE* 10: e0145584.
- Ribatti D and Djonov V** 2012 Intussusceptive microvascular growth in tumors. *Cancer Letters* 316: 126–131.
- Riou D, Collic-Jouault S, Pinczon du Sel D, Bosch S, Siavoshian S, Le Bert V, Tomasoni C, Siquin C, Durand P and Roussakis C** 1996 Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. *Anticancer Research* 16: 1213–1218.
- Robinson CJ, Mulloy B, Gallagher JT and Stringer SE** 2006 VEGF165-binding sites within heparan sulfate encompass two highly sulfated domains and can be liberated by K5 lyase. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 1731–1740.
- Rouet V, Hamma-Kourbali Y, Petit E, Panagopoulou P, Katsoris P, Barritault D, Caruelle J-P and Courty J** 2005 A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 32792–32800.
- Roughley PJ** 2006 The structure and function of cartilage proteoglycans. *European Cells & Materials* 12: 92–101.
- 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 and Letourneur D** 2011 Radiolabeled fucoidan as a p-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-

rich thrombus and endothelial activation. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 52: 1433–1440.

Saboural P, Chaubet F, Rouzet F, Al-Shoukr F, Azzouna R, Bouchemal N, Picton L, Louedec L, Maire M, Rolland L, Potier G, Guludec D, Letourneur D and Chauvierre C 2014 Purification of a Low Molecular Weight Fucoidan for SPECT Molecular Imaging of Myocardial Infarction. *Marine Drugs* 12: 4851–4867.

Schirmer SH, van Nooijen FC, Piek JJ and van Royen N 2009 Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. *Heart* 95: 191–197.

Soeda S, Kozako T, Iwata K and Shimeno H 2000 Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1497: 127–134.

Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A and Keshet E 1995 Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Molecular and Cellular Biology* 15: 5363–5368.

Stenmark KR, Yeager ME, El Kasmi KC, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya EV, Li M, Riddle SR and Frid MG 2013 The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annual Review of Physiology* 75: 23–47.

Styp-Rekowska B, Hlushchuk R, Pries AR and Djonov V 2011 Intussusceptive angiogenesis: pillars against the blood flow. *Acta Physiologica* 202: 213–223.

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 and Sutton A 2012 RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. *Angiogenesis* 15: 727–744.

Tan MI 2016 Cell and molecular biology for diagnostic and therapeutic technology. *Journal of Physics: Conference Series* 694: 012001.

Trueb B 2011 Biology of FGFR1, the fifth fibroblast growth factor receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 951–964.

Tung JJ, Tattersall IW and Kitajewski J 2012 Tips, stalks, tubes: notch-mediated cell fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2: a006601.

Vlodavsky I, Abboud-Jarrous G, Elkin M, Naggi A, Casu B, Sasisekharan R and Ilan N 2006 The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 35: 116–127.

Vlodavsky I, Blich M, Li J-P, Sanderson RD and Ilan N 2013 Involvement of heparanase in atherosclerosis and other vessel wall pathologies. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 32: 241–251.

- Vuong TT, Reine TM, Sudworth A, Jenssen TG and Kolset SO** 2015 Syndecan-4 Is a Major Syndecan in Primary Human Endothelial Cells In Vitro, Modulated by Inflammatory Stimuli and Involved in Wound Healing. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 63: 280–292.
- Wang Y, Yang X, Yamagata S, Yamagata T and Sato T** 2013 Involvement of Ext1 and heparanase in migration of mouse FBJ osteosarcoma cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 373: 63–72.
- Yanagishita M and Hascall VC** 1984 Metabolism of proteoglycans in rat ovarian granulosa cell culture. Multiple intracellular degradative pathways and the effect of chloroquine.. *Journal of Biological Chemistry* 259: 10270–10283.
- Ylä-Herttuala S** 2013 Cardiovascular gene therapy with vascular endothelial growth factors. *Gene* 525: 217–219.
- Yu Y, Luo T, Liu S, Song G, Han J, Wang Y, Yao S, Feng L and Qin S** 2015 Chitosan Oligosaccharides Attenuate Atherosclerosis and Decrease Non-HDL in ApoE^{-/-} Mice. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 22: 926–941.
- Zachary I and Morgan RD** 2011 Therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease: biological context, challenges, prospects. *Heart* 97: 181–189.
- Zcharia E, Metzger S, Chajek-Shaul T, Aingorn H, Elkin M, Friedmann Y, Weinstein T, Li J-P, Lindahl U and Vlodavsky I** 2004 Transgenic expression of mammalian heparanase uncovers physiological functions of heparan sulfate in tissue morphogenesis, vascularization, and feeding behavior. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18: 252–263.
- Zemani F, Benisvy D, Galy-Fauroux I, Lokajczyk A, Collic-Jouault S, Uzan G, Fischer AM and Boisson-Vidal C** 2005 Low-molecular-weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells. *Biochemical Pharmacology* 70: 1167–1175.
- Zlotnik A and Yoshie O** 2000 Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121–127.

ANNEXE

Au cours de ma thèse j'ai également participé à la réalisation d'autres travaux. Voici ci-dessous la liste des articles correspondants :

- ❖ Rolas L, Boussif A, Weiss E, Lettéron P, **Haddad O**, El-Benna J, Rautou PE, Moreau R, Périanin A. NADPH oxidase depletion in neutrophils from patients with cirrhosis and restoration via toll-like receptor 7/8 activation. Gut. 2018 Aug;67(8):1505-1516. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313443.
- ❖ Marinval N, Morenc M, Labour MN, Samotus A, Mzyk A, Ollivier V, Maire M, Jesse K, Bassand K, Niemiec-Cyganek A, **Haddad O**, Jacob MP, Chaubet F, Charnaux N, Wilczek P, Hlawaty H. Fucoidan/VEGF-based surface modification of decellularized pulmonary heart valve improves the antithrombotic and re-endothelialization potential of bioprostheses. Biomaterials. 2018 Jul;172:14-29. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.01.054.
- ❖ Suffee N, Le Visage C, Hlawaty H, Aid-Launais R, Vanneaux V, Larghero J, **Haddad O**, Oudar O, Charnaux N, Sutton A. Pro-angiogenic effect of RANTES-loaded polysaccharide-based microparticles for a mouse ischemia therapy. Sci Rep. 2017 Oct 16;7(1):13294. doi: 10.1038/s41598-017-13444-7.
- ❖ Mondadori dos Santos A, Metzinger L, **Haddad O**, M'baya-Moutoula E, Taïbi F, Charnaux N, Massy ZA, Hlawaty H, Metzinger-Le Meuth V. miR-126 Is Involved in Vascular Remodeling under Laminar Shear Stress. Biomed Res Int. 2015;2015:497280. doi: 10.1155/2015/497280.

L'ischémie se définit par la réduction de la lumière d'un vaisseau, ce qui provoque dans les tissus une baisse du flux sanguin, et une hypoxie locale. Pour lutter contre l'ischémie, différentes thérapies pro-angiogéniques ont été développées afin de stimuler la formation de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants. Durant ma thèse j'ai étudié l'effet pro-angiogénique du fucoïdane, un polysaccharide sulfaté provenant de l'algue brune, qui est un mimétique de glycosaminoglycans (GAGs). Nous avons choisi le fucoïdane de bas poids moléculaire (LMWF), qui a une bonne affinité pour des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, SDF-1/CXCL12). Puis, nous avons analysé son effet dans les cellules endothéliales humaines (HUVEC). Nos résultats montrent que LMWF est internalisé par les HUVEC en 2h par la voie d'endocytose clathrine-dépendante. De plus, LMWF stimule la viabilité, la migration des HUVEC et la formation de réseaux vasculaires. Nous avons démontré par la suite qu'en absence de GAGs sur les HUVEC, le LMWF garde toujours son potentiel pro-angiogénique. Nous avons mis en évidence que l'exostosine-2 (EXT-2), l'héparanase (HPSE) et le syndécan-4 (SDC-4), sont impliqués dans l'effet pro-angiogénique du LMWF, puisque quand nous inhibons leurs expressions par ARN interférence, le pouvoir pro-angiogénique du LMWF est diminué. Nous avons démontré, dans le modèle d'hyperplasie intimale chez le rat, que le LMWF a un effet opposé sur l'expression des SDC. En effet, le LMWF induit l'expression du SDC-1 et diminue celle du SDC-4 dans la néo-intima. Nos données indiquent que l'EXT2, l'HPSE et le SDC-4 sont impliqués dans les effets pro-angiogéniques du LMWF, suggérant que les changements du métabolisme des HS liés à l'angiogenèse induite par le LMWF offrent la possibilité d'une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement des maladies ischémiques.

Syndecans and enzymes involved in heparan sulfate biosynthesis and degradation are implicated in pro-angiogenic effects of low molecular weight fucoidan.

Induction of angiogenesis is a potential treatment for chronic ischemia. In this study we propose the analysis of pro-angiogenic treatment with fucoidan, sulfated polysaccharide from brown seaweeds, which act as glycosaminoglycans mimetics. Herein we used the low molecular weight fucoidan (LMWF), which presents a good affinity for pro-angiogenic factors (VEGF, SDF-1/CXCL12). The LMWF was mainly internalized through human vascular endothelial cell (HUVEC) clathrin-dependent endocytosis (in 2h) in which GAGs were partially involved. Our results showed that LMWF induced migration and angiogenesis in HUVEC. Interestingly, in a GAG-free HUVECs model, LMWF still kept a pro-angiogenic potential. In addition, we reported the implication of two heparan sulfate (HS) metabolism enzymes, exostosin-2 (EXT2) and heparanase (HPSE), and syndecan-4 (SDC-4) in LMWF induced angiogenesis. LMWF-treated and *EXT2*- or *HPSE*-siRNA-transfected cells shows that EXT2 or HPSE expression significantly affects the LMWF pro-angiogenic potential. In addition, LMWF increased SDC-1, but decreased SDC-4 expression. We studied the LMWF implication in SDC-1 and SDC-4 expression in rat model of intimal hyperplasia after balloon injury. Our results showed that LMWF treatment of injured artery increased SDC-1 expression, but decreased SDC-4 expression in the neointima layer. Our data indicate that EXT2, HPSE, and SDC-4 are involved in the pro-angiogenic effects of LMWF, suggesting that the HS metabolism changes linked to LMWF-induced angiogenesis offer the opportunity for new therapeutic approach for ischemic diseases treatment.

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Mots-Clés: Syndécannes, fucoïdane, angiogenèse, cellules endothéliales, héparanase, CXCL12

LVTS, INSERM U1148, Groupe Biothérapies et Glycoconjugués, Université Paris 13, UFR SMBH, 74 Rue Marcel Cachin 93 000, Bobigny, France