

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 :

Kévin BASSAND

Le 11 Octobre 2019

Modulation du processus d'angiogenèse induite par la chimiokine CXCL12 (SDF-1 α) : Implication du miR-126 et des Glycosaminoglycannes.

École doctorale : ED146 - Galilée

Unité de recherche : Inserm U1148 Laboratory for Vascular Translational Science

Groupe : Biothérapies et Glycoconjugués

Directrice de thèse : Pr CHARNAUX Nathalie
Co-encadrante de thèse : Dr HLAWATY Hanna

JURY

Pr EL HADRI-ZEGOUAH Khadija (Pr)	Rapporteur
Dr SILVESTRE Jean-Sébastien (DR)	Rapporteur
Pr ROLL Patrice (PU-PH)	Examineur
Pr LEDOUX Dominique (Pr)	Examineur
Dr HLAWATY Hanna (MCF)	Co-encadrante de Thèse
Pr CHARNAUX Nathalie (PU-PH)	Directrice de Thèse

Remerciements

Une fois la rédaction d'un manuscrit de thèse terminée, il est de coutume de finir par la section remerciements. J'espère sincèrement, malgré la fatigue accumulée, que les mots qui vont y être transcrits reflètent la profonde gratitude, le respect et parfois l'amitié que j'ai envers chacun d'entre vous.

Pour commencer, je tiens à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci au Pr Patrice ROLL de faire le déplacement depuis Marseille pour venir participer à la soutenance de cette thèse. Je remercie le Dr Jean-Sébastien SILVESTRE d'avoir accepté d'être l'un de mes rapporteurs mais également d'avoir fait le déplacement au début de ma troisième année de thèse pour participer à mon comité de suivi de thèse. Merci Jean-Sébastien pour votre écoute et la richesse de la discussion qui s'en est suivie.

Je ne saurais poser les mots nécessaires pour exprimer ma gratitude envers le Pr Khadija EL HADRI-ZEGOUAGH d'avoir tout d'abord acceptée d'être le second rapporteur mais surtout pour son accompagnement lors de la préparation de mon audition au poster d'ATER à Sorbonne Université. Merci Khadija pour ta gentillesse et ta bienveillance et je suis certain que nous allons faire du bon boulot ensemble pour cette nouvelle année.

Enfin, je tiens à remercier le Pr Dominique LEDOUX pour avoir accepté d'examiner cette thèse. Merci Dominique pour toutes ces années, de la Licence en passant par le Master puis durant la thèse pour nos discussions, notre travail au sein de l'Ecole Doctorale. J'ai énormément de sympathie pour vous et je vous souhaite le meilleur pour la suite de vos aventures post-ED.

Depuis 2014, je suis membre du laboratoire LVTS au sein de l'équipe 3 dans le groupe Biothérapies et Glycoconjugués sous la responsabilité du Pr Nathalie CHARNAUX puis du Dr Angela SUTTON. Merci à toute l'Unité INSERM, de Villeteuse ou de l'hôpital Bichat. Merci au groupe GBG, vous m'avez tout appris, j'ai grandi (pas en taille, je vous l'accorde) mais surtout grâce à vous tous, je sais que je réussirai à m'en sortir loin de vous, dans un nouvel environnement. C'est une vraie souffrance de devoir maintenant vous dire aurevoir mais je suis certain que l'on se reverra et que nous aurons l'occasion de retravailler tous ensemble.

Nathalie, merci infiniment pour ton accueil, d'avoir accepté de diriger ma thèse, de m'avoir fait confiance. Merci pour ces dernières années, ta compréhension et ton grand cœur. Je te souhaite toute la réussite et la réalisation de très beaux projets dans ta vie mais également pour l'UFR SMBH que tu diriges maintenant.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Pr Olivier OUDAR. Olivier, merci pour tout, depuis le début de mon cursus j'ai réellement apprécié travailler avec toi pour le bien des étudiants de l'Université. Je suis fier d'avoir eu la chance de t'avoir comme enseignant de biologie cellulaire. Merci à toi pour tout ton investissement et tout ton travail. Je regrette sincèrement de ne pas avoir profité davantage de ta présence lors de cette thèse. Merci pour ton humour, ta gentillesse et un grand merci de la part de tous les étudiants pour tout le travail que tu réalises au quotidien.

Angela, j'ai un profond respect pour toi. Merci pour ton écoute, ta présence et tous tes précieux conseils. Merci de m'avoir accompagné dans la rédaction de ce manuscrit. Merci pour toutes tes remarques, parfois incisives, mais pertinentes. Je te souhaite le meilleur pour ta vie personnelle et professionnelle et beaucoup de beaux projets pour le groupe GBG. Courage à toi !!

Je tiens à remercier également nos pharmaciens, le Dr Erwan GUYOT et le Dr Christelle LAGUILLIER-MORIZOT. Merci Erwan pour ta sympathie, ton calme et ta bienveillance. Christelle, merci pour tout, pour ton accompagnement tout au long de cette thèse, nos discussions, ta présence, tes précieux conseils. Tu es formidable et je te remercie très sincèrement pour ton implication dans la rédaction de ce manuscrit. Je te souhaite le meilleur pour tes futurs projets et j'espère que nous aurons l'occasion de nous revoir.

Je remercie les techniciennes et ingénieur du laboratoire. Au Dr Oualid HADDAD, merci pour tout, tu es un vrai pilier dans la vie et l'organisation du laboratoire. Merci pour ton humour, ton expertise scientifique et tous les précieux conseils que tu nous donnes au quotidien.

Naïma, merci pour ton énergie débordante et ta gentillesse. Tes rires et ton humour vont sincèrement me manquer.

Aucun mot ne pourrait suffire pour exprimer mes remerciements à ma co-encadrante de thèse, le Dr Hanna Hlawaty. Hanna, je ne sais pas trop par où commencer... C'est avec énormément d'émotions que je souhaite t'exprimer mes plus sincères remerciements. Tu as tout fait pour moi... Nous n'étions pas juste encadrante/étudiant. Tous les deux, nous formions une véritable équipe. J'ai le sentiment que nous étions complémentaires. Merci pour tout ce que tu m'as transmis, merci pour ta rigueur, ton écoute, ta présence. Merci d'avoir fait de moi le petit scientifique que je suis aujourd'hui, je ne cesserai jamais de t'avoir dans un coin de ma tête en me disant « *Que ferait Hanna, que dirait-elle ?* ». Merci pour m'avoir poussé à dépasser mon angoisse de parler anglais, merci pour cette fabuleuse collaboration que tu m'as apportée. Travailler avec toi fut un réel plaisir, je suis persuadé que nous ne nous arrêterons pas ici et que nous avons encore de très beaux projets à réaliser ensemble. Je ne t'abandonne pas et serai présent pour t'aider à la réalisation de ton HDR.

Merci Hanna pour tout !!

Je remercie énormément les actuels et anciens étudiants du laboratoire.

Ma Nesrine tu es formidable, aie confiance en toi, tu entres dans le sprint final qu'est la dernière année de ta thèse et tu vas réussir. Tu es une vraie amie, quelqu'un de confiance, je suis sincèrement très reconnaissant pour tout ce que tu as fait pour moi, tu vas vraiment me manquer mais je suis convaincu que notre histoire ne s'arrête pas ici.

Merci au Dr Amena BUTT, la super woman des étudiants qui réussit sa thèse, met au monde deux merveilleux petits garçons et qui reprend ses études médicales. Merci Amena de m'avoir accueilli et surtout tout appris à mon arrivé en Master 1, tu as été d'un grand soutien pour moi. Merci pour toutes nos discussions scientifique, l'écriture de nos publications et projets fictifs.

Merci également aux anciens, le Dr Nicolas MARINVAL, le Dr Hadjer Mamoune, Coralie, Sitti-Mouna, Annaëlle, Henri, Vincent, Sabine.

Merci à Meriem Naïm, bon courage pour le début de ta thèse et la reprise de mon sujet. Tu es brillante, très motivée, je suis certain que tout ira bien pour toi et je serais toujours disponible pour t'accompagner à tes débuts.

Merci aux autres étudiants avec qui j'ai passé énormément de bons moments. Abdallah, bon courage pour la fin de ta thèse, tu es bientôt à la fin. Merci au Dr Simon Chauveau pour son humour. Enfin, je remercie infiniment le Dr Eva Delbrel. Merci Eva pour ta bonne humeur au quotidien, tu es une superbe scientifique qui ira loin j'en suis persuadé. Merci à toi d'avoir accepté de faire le trajet pour venir m'écouter.

Je remercie très sincèrement les collègues des autres laboratoires de l'UFR SMBH, en particulier le laboratoire Hypoxie et Poumons de m'avoir fait bénéficier de leurs animaux mais aussi et surtout leur bonne humeur.

Je souhaite également remercier Alexandra Lepine. Merci Alexandra pour ton amitié depuis toute ces années. Merci de m'avoir fait confiance à l'OVE et surtout de m'avoir mis en contact avec la scolarité. Merci pour ton aide à l'obtention de mon logement étudiant. Merci également pour ces années associatives. Tu as grandement contribué à la réussite de mes études et je t'en serais reconnaissant à vie.

J'aimerais remercier mes proches, ma famille et en particulier ma mère, Fabienne Céré. Merci maman pour tout ce que tu m'as donné, tout ce que tu m'as transmis, de m'avoir accompagné jusqu'à aujourd'hui dans la réalisation de mes projets. Sans toi rien de tout ça n'aurait pu se produire. J'ai ENFIN terminé mes études, ne t'en fait plus pour moi, j'irai au bout de mes objectifs.

Pour finir, je remercie la personne qui partage ma vie au quotidien. Florian, merci de m'avoir soutenu, accompagné, supporté durant ces derniers mois. Merci pour ta présence. Tu as été une véritable bouffée d'air frais dans cette thèse. Merci de m'avoir écouté me plaindre de ce manuscrit quotidiennement ces dernières semaines. La réalisation de ce manuscrit c'est aussi grâce à toi et je t'en suis profondément reconnaissant.

Table des matières

Liste des abréviations	8
Liste des figures	11
Avant-Propos	13
INTRODUCTION	16
I. Contexte physiopathologique – L’angiogenèse	17
A. Système cardiovasculaire	17
1. Généralités	17
2. Structure des vaisseaux sanguins	17
B. Maladies cardiovasculaires : physiopathologie des ischémies	18
C. Formation des vaisseaux sanguins : Vasculogenèse et Angiogenèse 19	
1. La vasculogenèse.....	20
2. L’angiogenèse	21
a) <i>L’angiogenèse induite par bourgeonnement.</i>	22
b) <i>L’angiogenèse induite par invagination</i>	25
c) <i>La néo-angiogenèse post-ischémique</i>	26
3. Facteurs impliqués dans l’angiogenèse et voies de signalisation pro-angiogéniques	27
D. L’angiogenèse thérapeutique	28
1. Application de facteurs de croissance pro-angiogéniques.....	29
a) <i>Le VEGF</i>	29
b) <i>Le FGF-2</i>	30
2. La thérapie génique	30
3. La thérapie cellulaire à base de cellules souches.....	31
II. Les chimiokines	33
A. Fonctions des chimiokines	34
1. Les récepteurs des chimiokines	34
2. Voies de signalisation déclenchées par la liaison Chimiokines-Récepteurs	36
a) <i>Signalisation induite par les CKRs</i>	36
b) <i>Signalisation induite par les ACKRs</i>	38

3.	Effets biologiques des chimiokines.....	38
4.	Implication des chimiokines dans l'angiogenèse	40
	a) <i>Propriétés angiogéniques et angiostatiques des CXC chimiokines.....</i>	40
	b) <i>Propriétés angiogéniques des CC-chimiokines.....</i>	41
	c) <i>Propriétés angiogéniques de la famille des CX₃C3 chimiokines.</i>	42
B.	La chimiokine CXCL12.....	43
1.	Généralités	43
2.	Fonctions de la chimiokine CXCL12.....	44
	a) <i>Les récepteurs de CXCL12</i>	44
	a.1) <i>Le CXCR4</i>	44
	a.2) <i>ACKR3 (CXCR7).....</i>	46
	b) <i>Régulation de l'expression et de l'activité de CXCL12</i>	47
3.	Implication de CXCL12 dans l'angiogenèse.....	50
III.	Les Glycosaminoglycannes	53
A.	Introduction générale.....	53
B.	Métabolisme des GAG	54
1.	Biosynthèse des GAG	54
2.	Catabolisme et modifications post-synthèse des GAG.....	55
C.	Interactions entre GAG et facteurs pro-angiogéniques.....	56
1.	Interaction entre GAG et facteurs de croissance.....	57
2.	Interaction entre GAG et chimiokines	57
	a) <i>Généralités.....</i>	57
	b) <i>Cas de CXCL12</i>	58
D.	Implication des GAG dans l'angiogenèse	59
IV.	Les microARNs	62
A.	Définitions.....	62
B.	Biosynthèse : Du gène au miARN mature.....	62
C.	Implication des miRs dans l'angiogenèse.....	65
1.	Expression et régulation des miRs dans les cellules endothéliales.....	66
2.	Régulation de l'expression des miRs et leurs fonctions dans l'angiogenèse.....	66
	a) <i>miRs modulés par des facteurs de croissance et l'hypoxie.....</i>	67
	b) <i>miRs régulés par des stimuli anti-angiogénique.....</i>	68

c) <i>miRs régulés par des chimiokines</i>	69
3. <i>miRs dans l'angiogenèse post-ischémique</i>	70
D. Les miRs-126	72
1. Fonctions des miR-126.....	72
a) <i>Le miR-126-3p</i>	73
b) <i>Le miR-126-5p</i>	74
2. <i>miR-126 et pathologies ischémiques</i>	75
3. <i>miR-126-3p et miR-126-5p dans l'angiogenèse</i>	76
E. Implication des miRs dans la modulation d'expression et les modifications des GAG	81
V. Résumé – But des travaux de thèse	83
RÉSULTATS	87
Article 1. <i>CXCL12 induced angiogenesis through miR-126-3p/SPRED-1 pathway stimulation.</i>	88
Résumé :	88
Manuscrit	89
Article 2. <i>CXCL12 ⇔ Glycosaminoglycans dependent angiogenesis: implication of miR-126-3p.</i>	109
Résumé:	109
Manuscrit	110
DISCUSSION	121
Conclusion - Perspectives	139
BIBLIOGRAPHIE	142
ANNEXES	168
Annexe 1 : <i>Identification of a Pro-angiogenic potential and cellular uptake mechanism of a LMW Highly sulfated fraction of fucoidan from Ascophyllum nodosum. <u>Marine Drugs</u>, 2016.</i>	169
Annexe 2 : <i>Fucoidan/VEGF-based surface modification of decellularized pulmonary heart valve improves the antithrombotic and re-endothelialization potential of bioprostheses. <u>Biomaterials</u>, 2018.</i>	190
Annexe 3 : <i>New Synthesized Derivatives from N-Substituted-4-Oxo-[1] Benzopyrano [4,3-c] Pyrazole Influenced Proliferation, Viability, Spreading and Invasion of Human</i>	

Liver Tumor Cells. International Journal of Sciences : Basic and Applied Research,
2019..... **206**

Liste des abréviations

ACKR :	Atypical Chemokine Receptors
AH :	Acide Hyaluronique
ANG-1 :	Angiopoïétine-1
AOMI :	Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs
β -D-X:	4-Nitrophenyl- β -d-Xylopyranoside
cCKR:	Conventional Chemokine Receptors
CCL5:	CC Chemokine Ligand
CE :	Cellule Endothéliale
CML :	Cellule Musculaire Lisse
CS :	Chondroïtine Sulfate
CSM :	Cellules Souches Mésoenchymateuses
CXCL:	CXC Chemokine Ligand
DDP4 :	Dipeptidylpeptidase 4
DLL4 :	Delta Like Canonical Notch Ligand 4
DS :	Dermatane sulfate
eNOS :	endothelial Nitric Oxide Synthase
ERK :	Extracellular-regulated Kinases
EXT:	Exostosine
FAK:	Focal Adhesion Kinase
FGF:	Fibroblast Growth Factor
GAG :	Glycosaminoglycannes
GalNAc :	N-acétylgalactosamine
G-CSF :	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GlcA :	Acide Glucuronique
GlcNAc	N-acétylglucosamine
H :	Héparine
HEK :	Human Embryonic Kidney cells
HIF :	Hypoxia Inducible Factor
HMGB1 :	High Mobility Group Box 1 protein
HPSE :	Héparanase
HS:	Héparane Sulfate

HUVEC :	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICM :	Ischémie Critique des Membres
IdoA :	acide-L-iduronique
KO :	Knock Out
KS:	Kérotane Sulfate
LDL:	Low Density Lipoprotein
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCP-1 :	Macrophage Chemoattractant Protein 1
MCV :	Maladies CardioVasculaires
MEC :	Matrice ExtraCellulaire
miR :	microRNA
MMP :	Matrix Metalloproteinases
mTOR :	The mammalian target of rapamycin
NDST :	N-Désacétyl-Sulfotransférase
NF- κ B:	Nuclear Factor-Kappa B
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
OST :	O-SulfoTransférase
PBGF :	preB Cell Growth Factor
PEC :	Progéniteurs Endothéliaux
PG :	Protéoglycane
PGHS :	Protéoglycannes à chaînes héparanes sulfate
PI3K:	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC α :	Protéine Kinase C α
PLC:	Phospholipase C
RCPG:	Récepteurs Couplés aux Protéines G
RISC:	RNA-induced Silencing Complex
SCF:	Stem Cell Factor
SDC:	Syndécannes
SDF-1:	Stromal Derived Factor-1
SPRED-1:	Sprouty Related EVH1 Domain containing-1
SULF:	Sulfatases
TGF- β :	Tumor Growth Factor β

TIMP: Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases
TNF: Tumor Necrosis Factor
TSC1: TSC complex subunit 1
VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Protein 1
VEGFA: Vascular Endothelial Growth Factor A
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

Liste des figures

Figure 1. Structure d'une artère.	18
Figure 2. Développement de la plaque d'athérome lors de l'athérosclérose.....	19
Figure 3. Schéma représentatif des deux modes de formation des vaisseaux sanguins : Vasculogénèse et Angiogénèse.	20
Figure 4. La vasculogénèse.....	21
Figure 5. Initiation de l'angiogénèse par bourgeonnement.	23
Figure 6. Rôle des Tip cells et de la signalisation Notch dans l'angiogénèse induite par bourgeonnement.	24
Figure 7. Angiogénèse par invagination.	26
Figure 8. Voies de signalisation pro-angiogéniques induites par le VEGF-A.....	28
Figure 9. Classification des différents types de chimiokines. (<i>Castan et al, 2016</i>) ...	33
Figure 10. Schéma représentatif de la structure d'un Récepteur Couplés aux Protéines G (RCPG).....	34
Figure 11. Spécificité d'interactions des couples Chimiokines ⇔ Récepteurs.....	36
Figure 12. Panorama des effets biologiques possibles induits par la liaison des chimiokines à leurs récepteurs.	39
Figure 13. Chimiokines angiogéniques et angiostatiques.....	43
Figure 14. Voies de signalisations induites par les récepteurs CXCR4 et ACKR3 (CXCR7) en réponse à CXCL12.....	47
Figure 15. Représentation schématique d'un protéoglycane.....	53
Figure 16. Exemple de structure et de composition des chaînes GAG (Ly, Laremore et Linhardt, 2010).	54
Figure 17. Biosynthèse des chaînes GAG.....	55
Figure 18. Enzymes du catabolisme et de modifications post-synthèse des GAG. ...	56
Figure 19. Conséquence de l'ischémie sur l'intégrité structural du glycocalyx (d'après Chappell <i>et al.</i> , 2010).....	59
Figure 20. premiARN : un duplex miR-3p/miR-5p	63
Figure 21. Biosynthèse des miRs	64
Figure 22. Structure du gène <i>egfl7</i> et des miR-126: miR-126-3p/miR-126-5p.....	72

Figure 23. Le miR-126 est indispensable au développement vasculaire chez la souris.....	77
Figure 24. Le miR-126 régule un ensemble de processus physiologique.	80
Figure 25. But des travaux de thèse.....	86
Figure 26. Le miR-126-3p est majoritairement exprimé dans les cellules HUVEC.	124
Figure 27. Hypothèse : bien que SPRED-1 soit exprimé, l'antimiR-126-3p stimulerait l'angiogenèse <i>ex vivo</i> via la synthèse de CXCL12 et VEGF-A.	133
Figure 28. Hypothèse : L'inhibition conjointe de SPRED-1 et PI3KR2 est nécessaire pour lever l'inhibition induite par l'antimiR-126-3p.	135

Avant-Propos

À l'obtention de mon baccalauréat en 2009, je me suis dirigé vers des études médicales puis de biologie à l'Université Paris 13. Durant mes 5 premières années d'études, j'ai intégré l'Association Sciences Infuses de Bobigny (**ASIB**) mais également la Fédération Nationale des Etudiants Universitaires Scientifiques (**AFNEUS**). Ceci m'a permis d'appréhender le fonctionnement des Universités mais également de développer des compétences en gestion de projets. De plus, j'ai souhaité participer activement à la vie du campus de Bobigny et à la représentation des étudiants de notre Université en étant élu à plusieurs reprises au Conseil de Gestion de l'UFR SMBH, à la Commission Formation et Vie Universitaire (**CFVU**). Je suis également devenu membre de la commission du Fond de Solidarité et de Développement des Initiatives Etudiantes (**FSDIE**) de l'Université Paris 13.

Lors de ma deuxième année de Licence, j'ai pris la présidence de l'ASIB. A cette occasion, je me suis beaucoup rapproché des étudiants afin de leur apporter de nombreux supports pour la réussite de leurs études. Grâce à mes fonctions, j'ai été en lien étroit avec le Pr Olivier OUDAR, directeur adjoint de notre UFR et également directeur de notre Licence à cette époque. Olivier m'a présenté le dispositif appelé « cordées de la réussite » mis en place en Seine-Saint-Denis, en association avec l'Université Paris 13, afin d'aider de jeunes lycéens à la réussite de leurs études mais également leur faire découvrir les sciences. Depuis, j'ai eu l'opportunité de co-encadrer des lycéens lors de plusieurs semaines de stages en laboratoire et de travaux pratiques. J'ai également participé à la mise en place d'un tutorat pour aider les Terminales à la préparation de leur Baccalauréat. C'est à cet instant que j'ai su que je souhaitais participer activement à la formation des étudiants en leur transmettant mes connaissances et que j'ai donc décidé de continuer mon cursus scientifique dans le but de devenir enseignant.

En troisième année, j'ai eu la chance de rencontrer le Dr Hanna HLAWATY, maître de conférences en biologie cellulaire. Hanna m'a choisi pour être stagiaire au laboratoire LVTS durant deux semaines. Ces deux semaines ont été brèves mais ont suffi à Hanna pour me transmettre la joie du laboratoire et de la recherche scientifique. J'ai

donc décidé de poursuivre mes études en Master de Biologie-Santé puis en Doctorat sous l'encadrement scientifique d'Hanna.

Je ne dirais pas que ma thèse a été difficile, mais j'ai fait face à quelques difficultés qui m'ont ralenti. Initialement, mon travail de thèse devait porter sur la communication intercellulaire entre cellules endothéliales et cellules musculaires lisses et le rôle du miR-126 dans cette communication. Malheureusement, tout ce que nous avions prévu d'étudier a été publié au mois de Mars de ma première année de thèse. Il a donc fallu rebondir rapidement, s'adapter et trouver un nouveau sujet sans perdre le bénéfice de ce que j'avais déjà effectué. Nous avons ainsi décidé d'étudier le rôle des miR-126 et des glycosaminoglycannes (GAG) dans la régulation du processus angiogénique induit par la chimiokine CXCL12.

Durant ma thèse, j'ai eu l'occasion de co-encadrer 7 étudiants (1 étudiant en BTS, 3 étudiants en Licence, 1 étudiant en Master 1 et une étudiante en Master 2) dont un étudiant Japonais (Licence 3^{ème} année) en échange international durant 10 mois et une étudiante en Master 2 durant 6 mois au cours de ma dernière année de thèse. En parallèle, depuis le début de mon doctorat, j'ai effectué des missions d'enseignements (64h/an) en Science de la Vie (Licence 1-3) Master 1 et médecine (PACES) et j'ai également assumé plusieurs responsabilités collectives en étant élu à deux reprises au Conseil de Gestion de l'UFR SMBH mais également au conseil de l'École Doctorale Galilée. De plus, j'ai participé activement aux collaborations nationales et internationales (3 études) qui ont mené à des publications placées en annexes de ce manuscrit.

Par ailleurs durant ces 3 années de thèse, j'ai eu l'occasion de valoriser mes résultats lors de deux congrès nationaux. De plus, j'ai présenté mon travail lors d'un séjour d'un mois et demi effectué en Allemagne dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Iwona CICHRA (Laboratoire SEON, Erlangen). Ce séjour m'a beaucoup appris. J'ai fait preuve d'ouverture d'esprit pour me familiariser rapidement avec une nouvelle équipe, de nouvelles technologies avec notamment l'apprentissage d'une technique d'extraction des artères ombilicales humaines et la mise en culture ex vivo sous flux laminaire mais également la culture cellulaire sur un support biocompatible afin de développer une

prothèse vasculaire. Ce séjour a été pour moi un réel défi au cours duquel j'ai su faire abstraction de la barrière de la langue pour mettre en place et développer cette nouvelle collaboration.

Mon travail de thèse se divise en deux parties. La première a consisté en l'étude des miR-126 dans le processus angiogénique induit par la chimiokine CXCL12. La seconde partie de mon travail, initiée au milieu de ma dernière année en co-encadrant une étudiante en Master 2, consiste au début d'une étude sur l'implication des glycosaminoglycannes (GAG) dans le processus angiogénique induit par CXCL12 et l'implication du miR-126 dans l'expression d'enzymes de modification des chaînes GAG. Ce travail n'est pas terminé et sera poursuivi par cette étudiante qui commencera sa thèse en Septembre 2019.

Je vous propose ainsi un manuscrit de thèse sur article contenant les parties suivantes :

- une introduction contenant 4 chapitres (Angiogenèse, les chimiokines, les glycosaminoglycannes et les microARNs)
- suivie d'une partie résultat présentant un premier article soumis dans le journal *Molecular Therapy (Mol Ther)*,
- les premiers résultats obtenus sur la partie concernant les GAG,
- enfin, je vous présente une discussion suivie d'une conclusion générale et de quelques perspectives.

INTRODUCTION



I. Contexte physiopathologique – L'angiogenèse

A. Système cardiovasculaire

1. Généralités

Le système cardiovasculaire permet d'assurer la circulation du sang, de l'oxygène et des nutriments dans l'ensemble de l'organisme. Il est constitué du **cœur**, d'un **réseau artériel** permettant l'apport de sang depuis le cœur vers la périphérie ; d'un **réseau veineux**, assurant le retour du sang depuis les organes vers le cœur et d'un **réseau de capillaires** permettant d'effectuer les échanges d'éléments nutritifs et des gaz au niveau tissulaire. Au niveau des poumons, se produisent les échanges gazeux entre le sang et l'extérieur de l'organisme permettant l'apport du dioxygène (O₂) et l'élimination du gaz carbonique (CO₂).

2. Structure des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins sont constitués de trois couches concentriques nommées : intima, média et adventice. **L'intima** est au contact direct du sang. C'est une structure mince, lisse, élastique et étanche. Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) implantées sur une matrice complexe comportant notamment du collagène et des glycosaminoglycannes (GAG). **La média** est constituée de cellules musculaires lisses (CML) organisées en couches concentriques, séparées par des lames élastiques épaisses et fenêtrées, associées entre elles par du tissu conjonctif riche en collagène, de l'élastine et des protéoglycannes. **L'adventice** (la couche la plus externe), reçoit les terminaisons nerveuses. Elle est principalement constituée de collagène et de fibroblastes. Cette architecture est globalement commune à tous les vaisseaux sanguins mais la proportion de chaque couche peut différer selon la localisation du vaisseau dans l'arbre vasculaire.

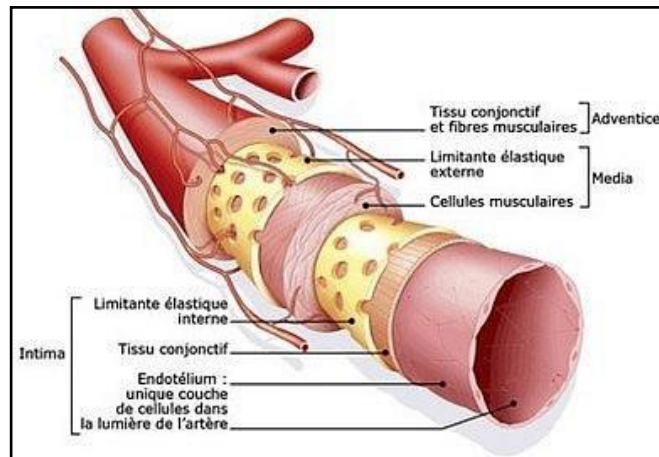


Figure 1. Structure d'une artère.

L'intima, la média et l'adventice sont trois couches concentriques qui constituent les artères. L'intima est caractérisée par une monocouche de cellules endothéliales ; la média est constituée majoritairement par des cellules musculaires lisses et l'adventice est composée de fibroblastes et de collagène (source Sanofi).

B. Maladies cardiovasculaires : physiopathologie des ischémies

Les maladies cardiovasculaires (MCV) regroupent un grand nombre de troubles affectant le cœur et les vaisseaux comme l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque, les maladies coronariennes et l'ischémie tissulaire. En 2016, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. En 2016, elles ont causé 15,2 millions de décès soit 26,7% de la mortalité mondiale totale. L'incidence des maladies cardiovasculaires est susceptible de croître d'ici quelques années en raison de l'augmentation de certains facteurs de risque, certains étant non modifiables comme le sexe, l'âge et l'hérédité, d'autres étant modifiables comme le tabac, l'hypertension artérielle, le diabète, l'excès de cholestérol, l'obésité et le surpoids, la sédentarité, et l'abus d'alcool.

L'ischémie est la conséquence d'une sténose (un rétrécissement des vaisseaux) réduisant la lumière du vaisseau conduisant à une perturbation du flux sanguin apporté vers les tissus et de l'apport en O₂ (hypoxie) et en nutriments au niveau des tissus situés en aval (Pugh et Ratcliffe, 2003).

L'athérosclérose est une pathologie vasculaire qui conduit dans les stades ultimes de son développement à la formation d'une plaque d'athérome (Figure 2). La vascularisation de cette plaque va la fragiliser et entraîner une rupture. La plaque rompue peut aller obstruer une artère plus petite et altérer la circulation sanguine. En fonction de la localisation de l'obstruction, cela peut causer un infarctus du myocarde (artère coronaire) ou un Accident Vasculaire Cérébrale ischémique (obstruction d'une artère dans le cerveau). En revanche, lorsque la plaque d'athérome se forme au niveau des membres inférieurs, cela cause une pathologie appelé artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI). L'évolution de la pathologie est progressive, lente et souvent asymptomatique.

En conséquence, les cellules présentes dans les organes touchés par une ischémie vont se nécroser localement et altérer l'intégralité des tissus en aval. Pour prévenir la nécrose, des phénomènes d'angiogenèse doivent être stimulés localement pour favoriser la formation de néo-vaisseaux qui permettront de rétablir une circulation sanguine dans la zone lésée. Pour cela, les cellules en situation d'hypoxie vont sécréter des facteurs dits pro-angiogéniques afin de stimuler localement l'angiogenèse via notamment l'activation de cellules endothéliales ou par le recrutement de progéniteurs endothéliaux circulants (Mauge *et al.*, 2010).

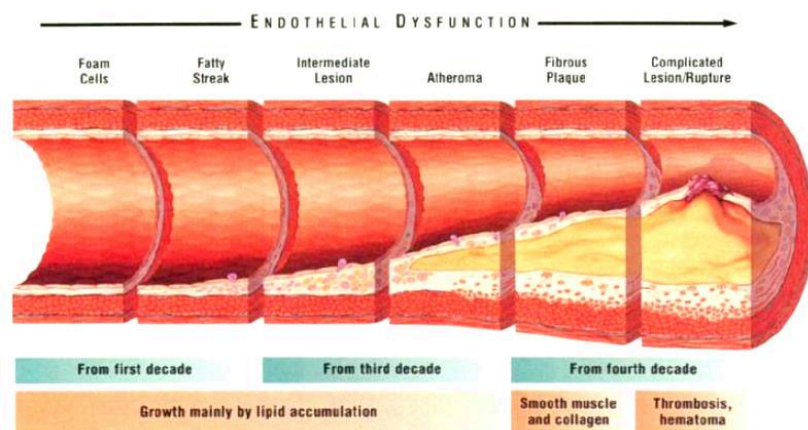


Figure 2. Développement de la plaque d'athérome lors de l'athérosclérose.

La phase précoce de l'athérosclérose est appelée hyperplasie intimale. Elle est caractérisée par un dysfonctionnement des cellules endothéliales suite à une lésion ou abrasion du vaisseau causant progressivement la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses depuis la média vers l'intima, conduisant à l'épaississement de la paroi artérielle et à la formation avec des Low Density Lipoprotein (LDL), d'une plaque d'athérome.

Le système cardiovasculaire est le premier système organique à se développer au cours de la vie embryonnaire (Adair TH, 2010). Chez l'embryon, la formation des vaisseaux sanguins est permise uniquement par le processus de vasculogénèse alors que chez l'adulte, on peut retrouver de la vasculogénèse associé à de l'angiogénèse (Figure 3).

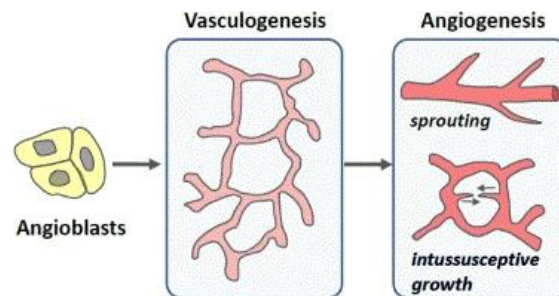


Figure 3. Schéma représentatif des deux modes de formation des vaisseaux sanguins : Vasculogénèse et Angiogénèse.

La vasculogénèse est le processus de formation de vaisseaux *de novo* par opposition avec le processus d'angiogénèse qui induit la formation de néo-vaisseaux à partir de ceux préexistants (par bourgeonnement ou par intussusception).

1. La vasculogénèse

La formation des vaisseaux sanguins durant la vie embryonnaire est appelée vasculogénèse. Au cours du développement embryonnaire, la vasculogénèse est définie comme le processus au cours duquel des cellules précurseurs appelées angioblastes et/ou hémangioblastes migrent et se différencient en CE qui s'unissent pour former un plexus vasculaire primitif (Figure 4) (Oliver, 2004) et des vaisseaux *de novo* (Wener Risau, 1997; Schmidt, Brixius et Bloch, 2007). Jusqu'à la fin des années 90, on pensait que la vasculogénèse était limitée au développement embryonnaire. Cependant, la découverte par Ashara *et al*, de progéniteurs endothéliaux circulants (PEC), issus de la moelle osseuse, dans la circulation périphérique chez l'adulte ont remis en cause cette théorie. En effet, dans cette étude il est décrit que la formation des vaisseaux sanguins peut se faire par angiogénèse mais également par la différenciation des PEC indépendamment du système vasculaire existant. Ils ont constaté que ces PEC peuvent acquérir des caractéristiques morphologiques associées aux CE matures et se localiser au niveau de zones de néovascularisation

post-ischémique (Asahara *et al.*, 1997). En situation d'ischémie, des PEC sont recrutés à partir de la moelle osseuse et sont présents dans la circulation systémique, puis ils migrent vers les sites de lésions vasculaires sous l'influence de signaux tels que l'hypoxie, les facteurs de croissance ou les signaux chimio attractants induits par des chimiokines. Une fois sur site, une extravasation des PEC est ensuite décrite au travers de l'endothélium afin de former des nouveaux vaisseaux et participer à la réparation tissulaire en synergie avec les CE résidentes (Urbich et Dimmeler, 2004).

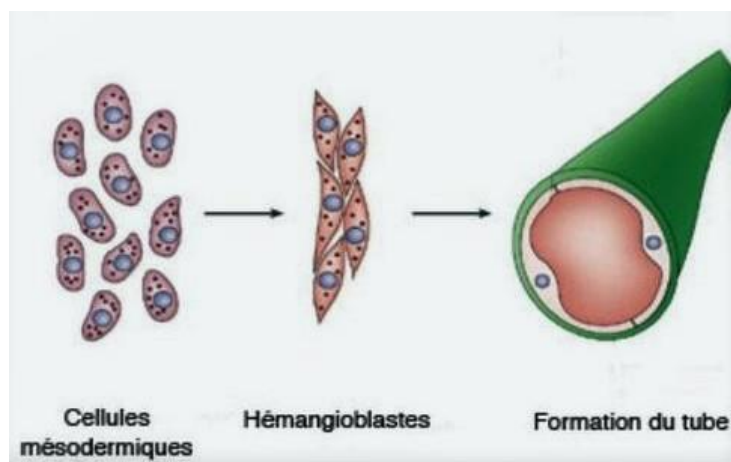


Figure 4. La vasculogénèse

Le processus de vasculogénèse est médié par des cellules souches embryonnaires issues du mésoderme qui vont se différencier en hémangioblastes et en cellules endothéliales afin de former un réseau vasculaire primitif constitué d'artères et de veines (Adapté de Oliver *et al.*, 2004).

2. L'angiogénèse

L'angiogénèse est un processus physiologique permettant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux préexistants. Ce processus est majoritairement sous le contrôle des cellules endothéliales qui vont former des néo-vaisseaux selon deux processus : 1-**par bourgeonnement** ; 2-**par invagination**.

a) L'angiogenèse induite par bourgeonnement.

Comme son nom l'indique, l'angiogenèse par bourgeonnement est caractérisée par la formation de bourgeons composés de cellules endothéliales, qui se développent habituellement en direction d'un stimulus angiogénique.

Les étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement comprennent la dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire (MEC), la prolifération des CE, leur migration dirigée, la tubulogenèse (formation de tubes par les CE), la fusion des vaisseaux et la stabilisation par des péricytes. L'angiogenèse par bourgeonnement est amorcée dans des tissus mal perfusés, c'est-à-dire lorsque le niveau d'O₂ dans les tissus est insuffisant pour satisfaire les besoins métaboliques des tissus (Figure 5). La plupart des cellules parenchymateuses (myocytes, hépatocytes, neurones, astrocytes, etc.) réagissent à un environnement hypoxique en sécrétant un facteur de croissance pro-angiogénique appelé *Vascular Endothelial Growth Factor-A* (VEGF-A). Une cellule endothéliale nommée « *tip cell* » va initier la formation d'un bourgeon capillaire au travers de la MEC en direction d'un stimulus angiogénique tel que le VEGF-A (Ruhrberg *et al.*, 2002; Horowitz et Simons, 2008). La « *tip cell* » est connectée aux autres CE afin de former le nouveau vaisseau. Les filopodes présents sur les « *tip cells* » sécrètent de grandes quantités d'enzymes protéolytiques, qui dégradent la MEC afin de permettre au bourgeon capillaire en développement de migrer (Small *et al.*, 2002; Van Hinsbergh et Koolwijk, 2008). Ces filopodes expriment fortement le récepteur du VEGF-A (VEGFR2), leur permettant ainsi de détecter des différences dans les concentrations de VEGF-A et de s'aligner suivant ce gradient (Figure 5). Pendant ce temps, les CE prolifèrent en suivant bout à bout les « *tip cell* » ce qui provoque l'allongement du bourgeon capillaire. Lorsque les cellules de l'extrémité de deux ou plusieurs bourgeons capillaires convergent à la source de la sécrétion de VEGF-A, elles fusionnent et créent une lumière continue à travers laquelle le sang oxygéné pourra circuler. Lorsque les tissus locaux reçoivent une quantité adéquate d'O₂, les niveaux de VEGF-A se normalisent.

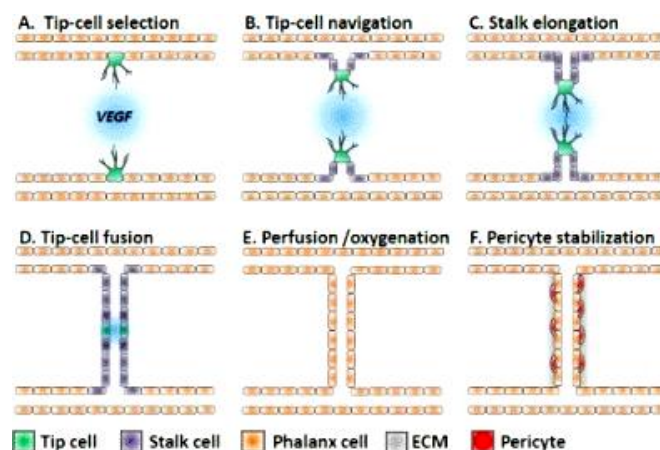


Figure 5. Initiation de l'angiogenèse par bourgeonnement.

Le VEGF-A dirige la croissance capillaire vers les tissus mal perfusés. (A) Les cellules endothéliales exposées à la plus forte concentration de VEGF-A deviennent des cellules tip (vertes). Le tissu hypoxique est indiqué par le fondu bleu circulaire. (B) Les « tip cells » dirigent le développement du bourgeon en prolongeant de nombreux filopodes. (C) Le bourgeon en développement s'allonge par prolifération de cellules endothéliales (violette) qui s'alignent derrière la « tip cell ». (D) Les cellules de l'extrémité de deux bourgeons en développement fusionnent et créent une lumière. (E) Le sang qui circule dans le nouveau capillaire oxygène les tissus et conduit à une réduction de la sécrétion de VEGF-A. (F) Le capillaire nouvellement développé est stabilisé par le recrutement de péricytes (rouge), le dépôt de matrice extracellulaire (gris), les contraintes de cisaillement et d'autres forces mécaniques associées au débit et à la pression artérielle (Carmeliet *et al.*, 2009).

La maturation et la stabilisation du capillaire nécessitent le recrutement de péricytes, de CML et le dépôt de MEC ainsi que la mise en place de contraintes de cisaillement « Shear Stress » et d'autres signaux mécaniques (Carmeliet et Tessier-Lavigne, 2005) afin de mettre en place un vaisseau fonctionnel.

La signalisation Delta-Notch est un élément clé de la formation des bourgeons (Figure 6). Il s'agit d'un système de signalisation cellulaire dans lequel le ligand Delta-like-4 (Dll4) interagit avec son récepteur sur les cellules voisines. Le récepteur et le ligand sont tous deux liés aux cellules et n'agissent donc que par contact intercellulaire. Le VEGF-A induit la production de Dll4 par les « tip cells », conduisant à l'activation des récepteurs Notch dans les CE. L'activation des récepteurs Notch inhibe l'expression du VEGFR2 dans les CE, ce qui atténue leur comportement migratoire par rapport à celui des « tip cells ». Par conséquent, les CE exposées à la plus forte concentration de VEGF-A sont les plus susceptibles de devenir des cellules « tip cells » (Suchting *et al.*, 2007; Horowitz et Simons, 2008; Carmeliet *et al.*, 2009).

Bien que les « tip cells » soient exposées à la concentration la plus élevée de VEGF-A, leur taux de prolifération est beaucoup moins élevé que celui des CE.

Tous les aspects de la voie de signalisation Delta-Notch ne sont pas bien compris, mais il est clair que la production d'un système vasculaire normal dépend fortement de la concentration de VEGF-A dans les tissus. Une réduction de 50% de l'expression du VEGF-A chez l'embryon est létale et cause d'importants défauts vasculaires (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996), et un excès de VEGF-A dans les tumeurs induit une surproduction de « tip cells » menant à une vascularisation désorganisée (R. K. Jain, 2005).

Cette dépendance critique à l'égard des concentrations physiologiques de VEGF-A pour la formation de vaisseaux sanguins viables pourrait aider à expliquer pourquoi les tentatives d'induction de l'angiogenèse dans des tissus mal perfusés par l'administration de VEGF-A et la thérapie génique n'ont pas été très fructueuses.

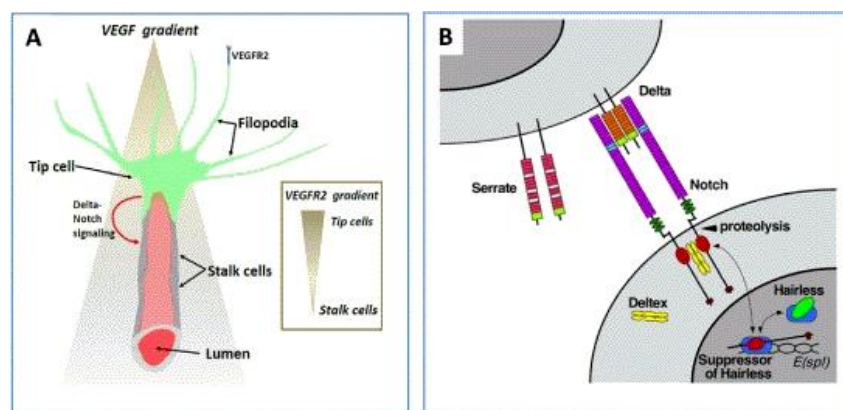


Figure 6. Rôle des Tip cells et de la signalisation Notch dans l'angiogenèse induite par bourgeonnement.

L'angiogenèse par bourgeonnement est dirigée par une cellule endothéliales appelée tip cell (A) qui va guider les cellules endothéliales vers un gradient chimiotactique de facteurs de croissance et de chimiokines. Ce processus est sous le contrôle de la signalisation Notch (B) induit par le VEGF-A (Adair *et al.*, 2010).

b) L'angiogenèse induite par invagination

L'angiogenèse induite par intussusception implique la formation de vaisseaux sanguins par un processus de division dans lequel des éléments des tissus interstitiels envahissent les vaisseaux existants.

L'angiogenèse par intussusception est aussi appelée *angiogenèse fendante* parce que la paroi du vaisseau s'étend dans la lumière, provoquant la division d'un seul vaisseau en deux. Ce type d'angiogenèse est considéré comme rapide et efficace comparativement à l'angiogenèse par bourgeonnement parce que, au début, elle ne nécessite qu'une réorganisation des cellules endothéliales existantes et ne repose pas sur une prolifération ou une migration immédiate des CE.

En plus de former de nouvelles structures capillaires, l'angiogenèse par intussusception joue un rôle majeur dans la formation des bifurcations artérielles et veineuses.

Le contrôle de l'angiogenèse par invagination est mal compris comparativement à l'angiogenèse par bourgeonnement. Cependant, des études démontrent que ce processus peut être induit dans le modèle d'angiogenèse *in vivo* sur membrane chorioallantoïde de poulet après stimulation par du VEGF-A, et il y a peu de doute que de nombreux facteurs de croissance et systèmes de signalisation sont impliqués (Kurz, Burri et Djonov, 2003; Burri, Hlushchuk et Djonov, 2004). L'angiogenèse par intussusception est réalisée en suivant plusieurs étapes : 1-La croissance microvasculaire intussusceptive, mise en place par le contact entre des CE des parois opposées d'un vaisseau. Le vaisseau va s'invaginer pour établir une zone de contact interne formant une structure appelée « noyau » dans lequel vont s'accumuler des facteurs de croissance, des péricytes et des myofibroblastes qui vont synthétiser du collagène afin de stabiliser le vaisseau (Figure 7); 2-l'arborisation intussusceptive, permet l'expansion de l'arbre vasculaire par la formation de petits vaisseaux ; 3-le remodelage de branches intussusceptives permet de moduler la structure vasculaire et le nombre de vaisseaux en réponse à divers signaux (Djonov, Kurz et Burri, 2002).

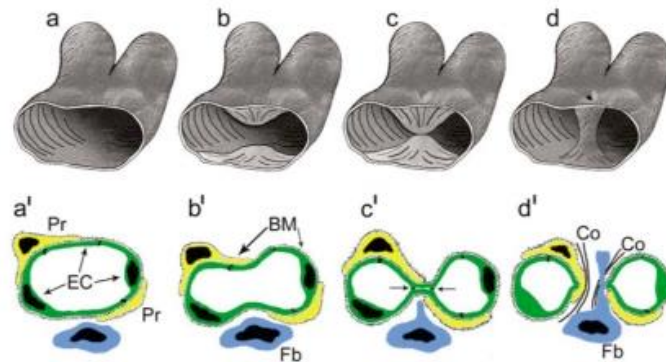


Figure 7. Angiogenèse par invagination.

Angiogenèse par invagination en trois dimensions (a-d) et en deux dimensions (a'-d'). (a,b,,a',b') Le processus commence par la protrusion de cellules endothéliales opposées dans la lumière capillaire. (c,c') Un contact interendothélial est établi et les jonctions endothéliales sont réorganisées. (d,d') Les membranes basale (BM) des cellules endothéliales sont perforées au centre pour permettre aux facteurs de croissance d'agir. Les fibroblastes (Fb) et les péricytes (Pr) migrent dans le site de perforation où ils produisent des fibrilles de collagène (Co) et d'autres composants de la MEC formant ainsi un pilier tissulaire. (d'après Djinov *et al*, 2002)

c) La néo-angiogenèse post-ischémique

Dans des situations ischémiques, les tissus sont en situation d'hypoxie. D'un point de vue médical, l'hypoxie tissulaire est définie par un taux d'O₂ inférieur à 2% et l'hypoxie sévère (également appelé anoxie) est définie par un taux d'O₂ inférieur à 0,02% (Bertout, Patel et Simon, 2008). En réponse à l'hypoxie, les cellules stabilisent les facteurs *Hypoxia Inducible Factors* (HIF), famille de facteurs de transcription dont l'activation dépend de la pression partielle en O₂. Une fois les facteurs HIF activés, se met en place un processus de néo-angiogenèse (Ahluwalia et Tarnawski, 2012). Cette néo-angiogenèse constitue une réponse adaptative de l'organisme à l'hypoxie générée lors d'une ischémie afin de restaurer une vascularisation et un apport en O₂ et en nutriments normal. Ce processus est contrôlé à la fois par l'activation des CE résidentes mais également par le recrutement de PEC à partir de la moelle osseuse qui vont migrer jusqu'au site ischémié et se différencier en CE (Rosenberger *et al.*, 2003).

3. Facteurs impliqués dans l'angiogenèse et voies de signalisation pro-angiogéniques

L'angiogenèse est un processus physiologique régulant la formation de néo-vaisseaux. Ce processus est régi par la synthèse et l'expression de facteurs de croissance et de chimiokines. Parmi les facteurs de croissance pro-angiogéniques, on retrouve la famille des VEGF, le Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 et les angiopoiétines.

Ces facteurs de croissance peuvent être synthétisés par divers types cellulaires comprenant les CE, les fibroblastes, les CML, les plaquettes, les cellules inflammatoires et les cellules cancéreuses. Certains facteurs de croissance, dont le FGF-2 sont séquestrés dans la MEC, qui sert de réservoir pour une libération prolongée de facteurs de croissance en fonction des besoins cellulaires. Les concentrations locales de ces facteurs de croissance dans le milieu extracellulaire peuvent être influencées par les réponses physiologiques ou pathologiques tels que celles observées lors d'une réaction à une blessure, d'un état inflammatoire chronique ou l'hypoxie.

Pour activer le processus d'angiogenèse, ces facteurs, une fois sécrétés dans le milieu extracellulaire, vont interagir avec leur récepteurs et/ou co-récepteurs spécifiques à la surface des CE déclenchant ainsi des voies de signalisation intracellulaires régulant des processus biologiques nécessaires à l'angiogenèse que sont **la migration, la prolifération et la survie**. Le VEGF-A est le facteur majoritaire dans l'initiation du processus d'angiogenèse. En se fixant à ses récepteurs VEGFR1 et VEGFR2, exprimés à la surface des CE, il stimule des voies de signalisation pro-angiogéniques à savoir les voies des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), de la Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K)/Akt, la Phospholipase C (PLC) γ , la protéine Kinase C (PKC), la Focal Adhesion Kinase (FAK) ou des voies médiées par les protéines Src (Figure 8).

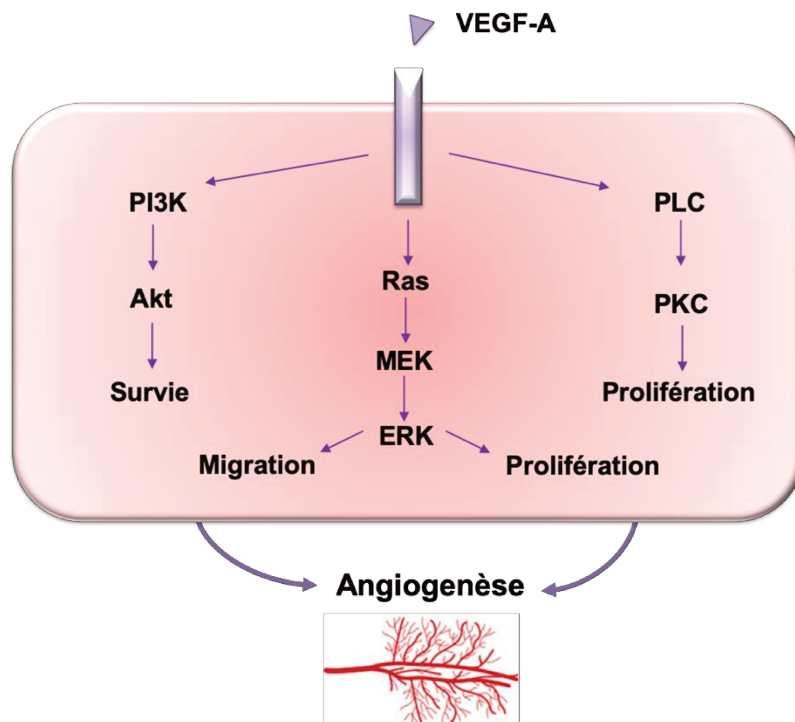


Figure 8. Voies de signalisation pro-angiogéniques induites par le VEGF-A.

En se fixant sur ses récepteurs, le VEGF-A stimule des voies de signalisation pro-angiogénique et notamment la voie PI3K/Akt, la voie ERK ou encore les voies de la PLC et de la PKC. La stimulation de ces voies de signalisation conduit à l'activation de processus biologiques comme la survie, la migration et la prolifération cellulaire qui sont nécessaire au fonctionnement de l'angiogenèse.

D. L'angiogenèse thérapeutique

En réponse à une ischémie tissulaire causée par une hypoperfusion ou à un apport sanguin insuffisant à la suite de l'obstruction d'un vaisseau sanguin, des modifications structurelles dans les vaisseaux sanguins existants ou la formation de nouveaux vaisseaux sanguins surviennent (néovascularisation).

De nombreux facteurs de croissance pro-angiogéniques stimulent la croissance des vaisseaux sanguins et peuvent être administrés sous forme de protéines recombinantes par injection intramusculaire pour favoriser la néo-angiogenèse.

Parmi ces facteurs, on retrouve le VEGF, le FGF, le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et le facteur HIF-1alpha, qui ont été utilisés dans des études cliniques prospectives de phase I et II avec des résultats qui varient en fonction des patients présentant une AOMI (Losordo et Dimmeler, 2004a, 2004b; Simons, 2005). De même, la greffe autologue (intraartérielle ou intramusculaire) de cellules souches hématopoïétiques est utilisée pour favoriser la formation de nouveaux vaisseaux

sanguins principalement par des effets paracrines entre cellules souches hématopoïétiques et CE (Isner, 1996; Collinson et Donnelly, 2004).

1. Application de facteurs de croissance pro-angiogéniques

Ces facteurs de croissance sont généralement transférés directement aux tissus cibles en utilisant des nanoparticules comme vecteurs agissant par deux mécanismes :

- directement en augmentant la concentration locale des facteurs de croissance pour favoriser l'angiogenèse.
- ou indirectement en favorisant leur expression génétique par transcription grâce à des vecteurs viraux ou des plasmides (Gorenoi *et al.*, 2017).

Ces facteurs de croissance favorisent la croissance, la prolifération et la maturation cellulaire (Ouma *et al.*, 2013).

a) Le VEGF

Le VEGF est reconnu depuis longtemps comme un régulateur central dans le processus d'angiogenèse. Il a été démontré que le VEGF, grâce à ses récepteurs tyrosine kinase, active plusieurs voies pro-angiogéniques. Le VEGF-A affecte le processus angiogénique en induisant la synthèse du gène de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS : endothelial nitric oxide synthase) et en favorisant ainsi la production d'oxyde nitrique (NO). Il favorise également l'activation de la transcription des gènes des métalloprotéases matricielles (MMP). De même, l'effet pro-angiogénique du VEGF-B, médié par une signalisation induite par sa liaison au VEGFR1, a été associé à l'activation des voies liées à eNOS (Silvestre *et al.*, 2003). Les effets du VEGF sur l'angiogenèse dans les ischémies des membres inférieurs ont été étudiés chez des patients présentant une claudication intermittente ou une ischémie critique des membres (Inampudi *et al.*, 2018). Les résultats de ces essais ont été très peu concluants. De ce fait, il est nécessaire de trouver de nouvelles thérapies applicables chez l'Homme.

b) Le FGF-2

Le FGF régule les fonctions biologiques comme la prolifération, la survie, la migration et la différenciation des cellules en se liant aux récepteurs du FGF et en les activant principalement par la voie des kinases Ras/MAPK. Le premier essai contrôlé randomisé qui a démontré l'effet positif du traitement par facteur de croissance dans l'ischémie des membres a été l'essai « *The Therapeutic Angiogenesis with Recombinant Fibroblast Growth Factor-2 for Intermittent Claudication* » (TRAFFIC). L'étude a montré une amélioration de la distance de marche maximale chez les patients souffrant de claudication intermittente par administration intra-artérielle de 30 mg/kg de FGF-2 recombinants (injections uniques ou doubles séparées de 30 jours). En revanche, des effets indésirables comprenant une protéinurie et un œdème des membres inférieurs ont contrebalancé les résultats positifs observés dans l'étude, supposant des atteintes rénales chez ces patients (Lederman *et al.*, 2002).

Deux autres essais cliniques utilisant le FGF-2, l'étude « *The Therapeutic Angiogenesis Leg Ischemia Study for the Management of Arteriopathy and Non healing Ulcer* » (TAL-ISMAN 201) et l'essai TAMARIS de phase 3, n'ont montré aucun effet significatif du traitement sur les paramètres primaires de guérison complète d'au moins un ulcère des membres traités et sur le délai avant une amputation majeure ou un décès à un an. Cependant, dans l'étude TALISMAN, l'utilisation du FGF-2 a réduit de moitié le risque d'amputations.

D'après les données probantes disponibles et malgré les résultats prometteurs de certaines études, l'administration locale de facteurs de croissance pro-angiogéniques dans les AOMI ne procure aucun avantage évident à ce jour.

2. La thérapie génique

Les effets bénéfiques des thérapies géniques à la suite d'une AOMI ont été évalués dans des études précliniques. Comme la demi-vie des facteurs de croissance recombinants est courte, les essais cliniques sont basés sur la thérapie génique afin d'accroître l'expression de ces protéines. La thérapie génique implique le transfert d'acides nucléiques étrangers dans des cellules cibles pour stimuler l'expression thérapeutique soutenue du gène sélectionné. Le transfert de gènes peut être viral ou

non viral. Le transfert non viral implique le couplage de l'ADN avec des agents lipophiles qui favorisent le transfert de l'ADN à travers la membrane cellulaire. Les vecteurs viraux utilisant des vecteurs adénoviraux sont étudiés depuis longtemps pour le transfert de gènes et il a été démontré qu'ils augmentent l'efficacité du transfert d'ADN. L'administration d'adénovirus recombinant (rAAV) par injection intramusculaire s'est avérée une méthode d'administration prometteuse dans les études d'angiogenèse thérapeutique (Haro *et al.*, 2009). La thérapie génique induisant l'expression de gènes codant pour le VEGF, le FGF, le HGF, l'angiopoétine 1 (Ang-1) ou le HIF-1 α induit le développement de vaisseaux collatéraux. L'étude « *Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial Growth Factor Peripheral Arterial Disease* » (RAVE), de phase 2, consistant à l'administration de vecteurs adénoviraux exprimant le gène du VEGF par voie intramusculaire, n'a montré aucune différence significative à 6 mois (Rajagopalan *et al.*, 2003).

3. La thérapie cellulaire à base de cellules souches

En raison de l'absence d'avantages constants et démontrables dans le traitement des patients atteints d'AOMI avec des stimuli pro-angiogéniques par délivrance de facteurs de croissance, la thérapie cellulaire est apparue comme une alternative thérapeutique. La capacité des cellules souches à se renouveler et à se différencier en cellules spécifiques d'un organe et leurs effets paracrines sur la libération de facteurs de croissance pro-angiogéniques ou de cytokines peuvent favoriser la néovascularisation chez les patients atteints d'AOMI (Sahoo *et al.*, 2011). Les principaux types de cellules souches utilisés sont les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et les PEC issues de la moelle osseuse.

Normalement dans le sang périphérique, les PEC sont peu nombreux, mais en réponse à l'ischémie périphérique, les cellules sont libérées dans la circulation, migrent vers les zones lésées et favorisent la formation de vaisseaux. Les PEC peuvent libérer des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF-A ou CXCL12 qui peuvent favoriser l'angiogenèse par effet paracrine et recruter des cellules progénitrices supplémentaires dans les tissus ischémiés. La mobilisation des PEC peut être obtenue par l'administration de facteurs de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF),

leur sécurité et leur efficacité ont été testées dans des études à faibles effectifs qui nécessitent donc d'être répétées (Kawamoto *et al.*, 2009).

Des études précliniques sur les CSM ont démontré le potentiel de ces cellules à favoriser l'angiogenèse par la libération de facteurs de croissance angiogéniques et à améliorer la circulation sanguine (Kinnaird *et al.*, 2004).

Mais, l'angiogenèse thérapeutique, en tant que nouveau traitement des ischémies dans les essais cliniques a été en grande partie un échec. Afin d'améliorer l'efficacité de ces stratégies, il serait intéressant de se concentrer sur des formes sûres et efficaces d'administration de facteurs pro-angiogéniques aux tissus ischémiés et identifier des cibles cellulaires nécessaires à leur fonctionnement.

Les thérapies innovantes (thérapies génique et cellulaire) se sont principalement focalisées sur les facteurs de croissance et seulement quelques études ont été réalisées avec une autre famille de molécules solubles jouant elles-aussi un rôle important dans le processus d'angiogenèse : les chimiokines.

II. Les chimiokines

Les chimiokines sont de petites protéines de 70 à 80 acides aminés très conservées au cours de l'évolution, appartenant à la famille des cytokines.

Le génome humain et les autres génomes de mammifères codent chacun pour environ 50 chimiokines différentes, qui sont classées en deux sous-familles principales (CC et CXC) et deux sous-familles mineures (CX₃C et XC). La classification des chimiokines a été établie en fonction de l'espacement de deux résidus de cystéine conservés, situé à environ 10 résidus de l'extrémité N-terminale de la chaîne peptidique. Dans les sous-familles CC, CXC et CX₃C, les deux résidus Cystéines sont séparés par 0, 1 et 3 acides aminés, respectivement, tandis que dans la sous-famille XC, la deuxième Cystéine est absente de la séquence (Figure 8).

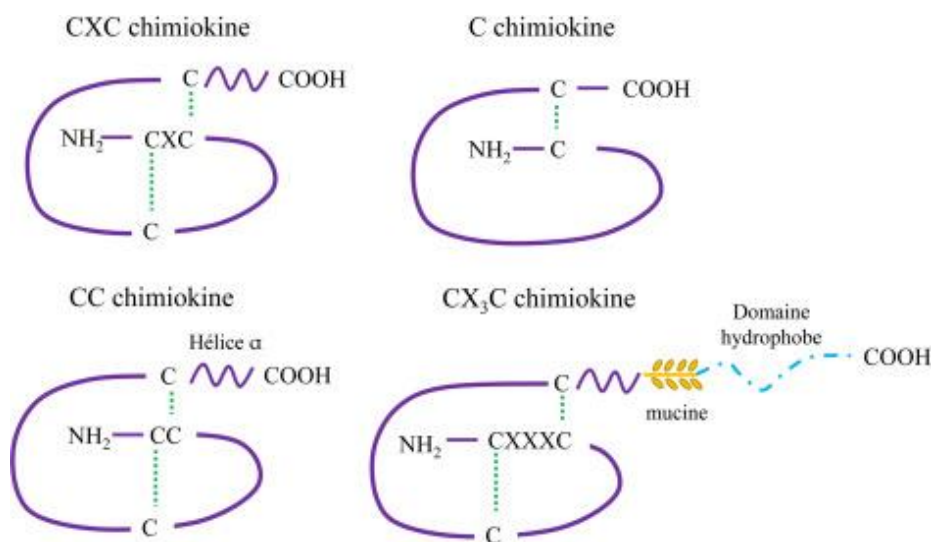


Figure 9. Classification des différents types de chimiokines. (Castan et al, 2016)

Les chimiokines sont désignées selon leur classification de sous-famille par des noms systématiques composés d'un préfixe (CCL, CXCL, CX₃CL ou XCL ; "L" signifiant ligand) suivi d'un numéro identifiant. Cependant, la plupart des chimiokines ont également des noms communs relatifs à leurs premières fonctions caractérisées.

A. Fonctions des chimiokines

1. Les récepteurs des chimiokines

Les chimiokines exercent leurs fonctions en se fixant à des récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Deux familles de récepteurs des chimiokines ont ainsi été mises en évidence : les **Conventional Chemokine Receptors (cCKRs)** et les **Atypical Chemokine Receptors (ACKRs)**.

Les récepteurs conventionnels des chimiokines sont des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) à 7 domaines transmembranaires avec un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal intracellulaire (Chung, 2013) (Figure 9).

Les RCPG sont ancrés dans la membrane plasmique par 7 domaines transmembranaires en hélice α reliés entre eux par 3 boucles extracellulaires (E1, E2, E3) et 3 boucles intracellulaires (I1, I2, I3). La séquence du domaine N-terminal extracellulaire est variable d'un récepteur à l'autre mais contient des tyrosines sulfatées impliquées dans l'interaction avec les ligands. Le domaine N-terminal peut comporter jusqu'à 600 acides aminés mais les récepteurs des chimiokines ont un domaine N-terminal très court de moins de 50 acides aminés. La présence de cystéines permet de former des ponts disulfures entre la boucle E1 et E2 mais également entre le fragment N-terminal et la boucle E3. Les ponts disulfures permettent une meilleure stabilité du récepteur et de la liaison du ligand au récepteur (Rajagopalan et Rajarathnam, 2006). Le domaine C-terminal intracellulaire est également court et a une importance dans la liaison avec la protéine G trimérique (Chung, 2013).

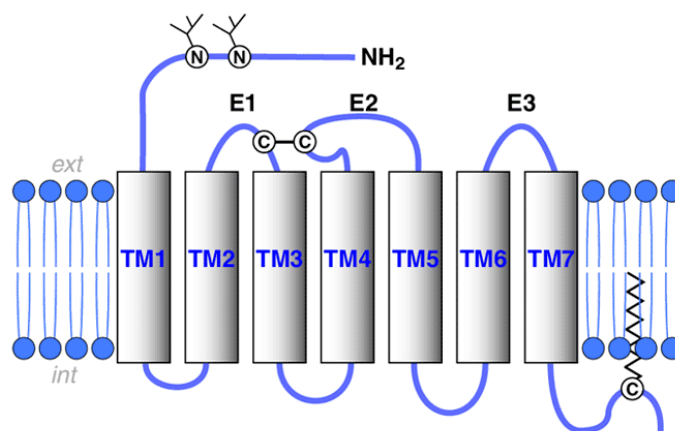


Figure 10. Schéma représentatif de la structure d'un Récepteur Couplés aux Protéines G (RCPG)

On retrouve 18 récepteurs cCKRs nommés en fonction du type de chimiokine fixée (CCR, CXCR, CX3CR ou XCR ; « R » signifiant récepteur) suivi d'un numéro fixé par ordre de découverte des différents récepteurs. En 2018, 10 CCRs, 6 CXCRs, 1 CX₃CR et 1 CXR ont été répertoriés.

La spécificité de ces récepteurs pour les chimiokines est assez complexe (Figure 10). En effet, plusieurs chimiokines peuvent interagir avec de multiples récepteurs et un récepteur donné peut lier de multiples chimiokines (sauf exception, tel que CXCR4 qui ne possède que CXCL12 comme unique ligand de type chimiokine). C'est le cas de la plupart des chimiokines/CKRs inductibles impliqués dans l'inflammation alors que les chimiokines homéostasiques sont plutôt liées à un seul et unique CKR. Il existe une sélectivité fonctionnelle des chimiokines pour leur récepteurs et les voies de signalisation qui en découlent dépendent du type de chimiokine fixée mais également du contexte cellulaire ayant conduit à la fixation d'une chimiokine à son récepteur (Steen *et al.*, 2014; Zweemer *et al.*, 2014; Corbisier *et al.*, 2015; Hauser *et al.*, 2016).

Par ailleurs, plusieurs CKRs peuvent également interagir avec d'autres ligands non-chimiokines. Par exemple, la beta-défensine peut activer le CCR6 (Yang *et al.*, 1999), le *high mobility group box 1* (HMGB1) peut se lier au CXCR4 (Tirone *et al.*, 2018). Comme les autres RCPG, les récepteurs aux chimiokines existent sous forme d'homodimères mais peuvent également former des hétérodimères avec d'autres CKRs ou des ACKRs mais également avec d'autres RCPG qui ne sont pas des récepteurs pour des chimiokines ou encore avec d'autres protéines membranaires (Mellado *et al.*, 2001; Levoye *et al.*, 2009; Coke *et al.*, 2016).

Les récepteurs atypiques des chimiokines (ACKRs), au nombre de 4, sont identiques aux CKRs d'un point de vue structural, mais ne sont pas associés aux mêmes voies de signalisation transduites (Bachelier *et al.*, 2014).

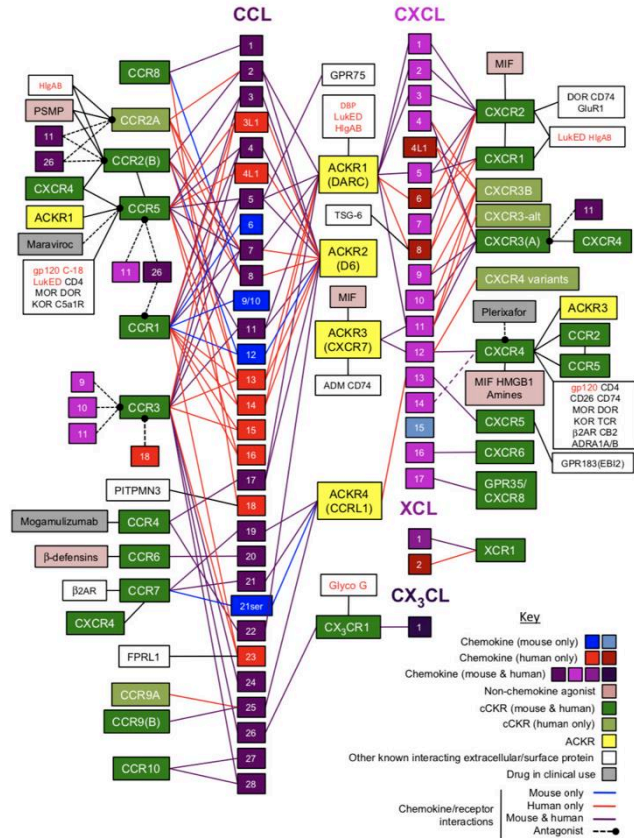


Figure 11. Spécificité d'interactions des couples Chimiokines ↔ Récepteurs.
 La spécificité d'interaction entre les chimiokines et leurs récepteurs est particulière. En effet, il n'existe pas un seul et unique couple chimiokine-récepteur. Comme illustré sur cette figure, une chimiokine donnée peut se fixer à plusieurs récepteurs et un récepteur peut interagir avec plusieurs chimiokines (sauf exception, cas du CXCR4 par exemple).

2. Voies de signalisation déclenchées par la liaison Chimiokines-Récepteurs

a) Signalisation induite par les CKRs

Les récepteurs conventionnels des chimiokines font partie de la superfamille des RCPG. La liaison chimiokine-récepteur induit un changement conformationnel dans le domaine transmembranaire du récepteur, qui peut induire une variété d'événements de signalisation en aval médiés par des protéines G hétérotrimériques. Lors de l'activation, les RCPGs fonctionnent comme des facteurs d'échange nucléotidique de

la guanine, ce qui permet à la sous-unité α de la protéine G hétérotrimérique de passer d'inactive (liée au GDP) à active (liée au GTP) et de se dissocier des sous-unités $\beta\gamma$. Les deux parties de la protéine G sont capables d'interagir avec d'autres effecteurs pour générer la transduction du signal (Strange, 2008). Chez l'Homme, 16, 5 et 12 gènes ont été identifiés comme codant respectivement pour les sous-unités α , β et γ . Des combinaisons spécifiques entre les différentes sous-unités sont possibles et activeront différentes cibles impliquées dans diverses voies de signalisation en aval (Corbisier *et al.*, 2015). Les protéines $G\alpha$ sont divisées en quatre grandes classes selon leur séquence et leur fonction : $G_{\alpha q}$ active la phospholipase C pour augmenter les taux de calcium intracellulaire ; $G_{\alpha s}$ stimule la production d'AMPc ; $G_{\alpha i}$ inhibe la production d'AMPc ; et $G_{\alpha o}$ contrôle les autres fonctions de signalisation comme la voie des facteurs STATs ou MAPK (Hamm, 1998; Lefkowitz, 2004). Le dimère $G\beta\gamma$ peut agir comme un inhibiteur de $G\alpha$ lorsqu'il est lié à une sous-unité $G\alpha$, car il favorise l'interaction entre $G\alpha$ et le GDP. Cependant, lorsque le complexe $G\beta\gamma$ est dissocié de $G\alpha$, il peut également participer à la cascade de signalisation. Par exemple, $G\beta\gamma$ peut réguler l'ouverture des canaux ioniques (Logothetis *et al.*, 1987) et participe également à la phosphorylation de kinases intracellulaires comme la voie des MAPK en induisant la phosphorylation de Extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) via la voie de la protéine kinase C/protéine kinase A (Zidar *et al.*, 2009).

En plus des voies canoniques impliquant les protéines G, les CKRs peuvent également agir sur des voies de signalisation indépendamment des protéines G. Dans ce contexte, les arrestines, initialement impliquées dans l'internalisation des récepteurs ont maintenant été identifiées comme des protéines permettant d'interagir et d'activer des médiateurs de la signalisation comme les MAPK, la PI3K ou encore la protéine kinase B (Shenoy et Lefkowitz, 2011; Whalen, Rajagopal et Lefkowitz, 2011).

b) Signalisation induite par les ACKRs.

Les ACKRs comme ACKR1 (antigène Duffy/récepteur de chimiokines (DARC)), ACKR2 (D6), ACKR3 (CXCR7) et ACKR4 (récepteur chimiokine chimiocentryx (CCX-CKR)) peuvent lier une grande variété de chimiokines allant jusqu'à 18 ligands pour ACKR1 (Zweemer *et al.*, 2014). Ces récepteurs ont d'abord été considérés comme des récepteurs « leurres » sans signalisation en raison de leur incapacité à activer les voies de signalisation typiques associées aux protéines G. Cependant, des études ont montré que les ACKRs peuvent induire une signalisation principalement par l'intermédiaire des β -arrestines. Les chimiokines CXCL11 et CXCL12 induisent le recrutement de la β -arrestine-2 par le récepteur ACKR3 (Zabel *et al.*, 2009). Une autre étude a également rapporté que CXCL12 induit le recrutement de la β -arrestine-2 par ACKR3 dans les cellules HEK293 ainsi que dans les CML chez le rat entraînant une activation de la protéine ERK1/2 (Rajagopal *et al.*, 2010).

3. Effets biologiques des chimiokines

Les chimiokines sont de petites protéines solubles (exceptée CX3CL13) jouant un rôle dans la migration cellulaire durant l'inflammation, la réponse immunitaire et l'organogenèse (Moser et Willimann, 2004; Nomiyama, Osada et Yoshie, 2010). Outre les critères structuraux, les chimiokines peuvent être réparties, d'un point de vue fonctionnel, en différents groupes (Mantovani, Bonocchi et Locati, 2006; Nomiyama, Osada et Yoshie, 2010). On peut ainsi retrouver des **chimiokines inflammatoires**, dont l'expression est stimulée dans des conditions inflammatoires et qui sont impliquées dans le recrutement des leucocytes au niveau des sites lésés. La seconde catégorie regroupe des **chimiokines homéostatiques** qui sont exprimées de façon constitutive en absence d'inflammation et sont impliquées dans la migration et le guidage (« *homing* ») de cellules circulantes dans des conditions physiologiques (Nomiyama, Osada et Yoshie, 2011). Cependant, certaines chimiokines peuvent avoir les deux propriétés.

Si la fonction majeure décrite des chimiokines est le recrutement des leucocytes dans un contexte inflammatoire, l'activation des chimiokines et de leurs récepteurs peut également conduire à une grande variété de réponses cellulaires et tissulaires incluant la prolifération, l'activation, la différenciation, le remodelage de la matrice extracellulaire, les processus tumoraux ou encore l'angiogenèse (Luther et Cyster, 2001; Ben-Baruch, 2006; Speyer et Ward, 2011) (Figure 11).

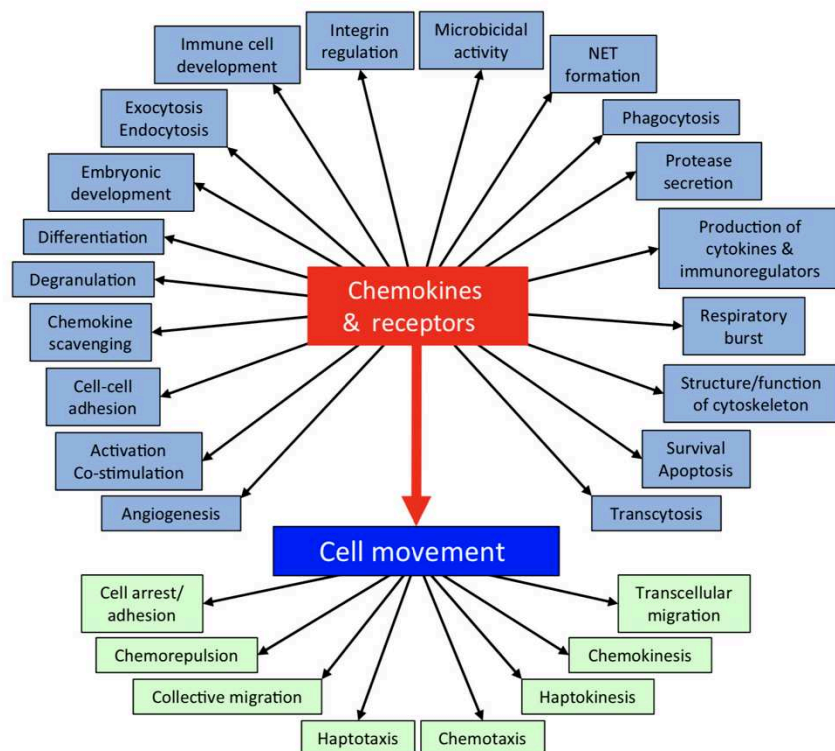


Figure 12. Panorama des effets biologiques possibles induits par la liaison des chimiokines à leurs récepteurs.

Les chimiokines peuvent être impliquées dans la régulation de diverses fonctions et processus cellulaires incluant l'angiogenèse.

4. Implication des chimiokines dans l'angiogenèse

En plus de leur rôle dans le maintien de l'homéostasie des cellules immunitaires, certaines chimiokines peuvent jouer un rôle dans la régulation de l'angiogenèse. Dans ce contexte, les chimiokines sont divisées en deux groupes : les **chimiokines angiogéniques** et les **chimiokines angiostatiques**.

Dans la régulation du processus angiogénique induit par des chimiokines, il est important de distinguer deux cas de figure : **l'angiogenèse pathologique** (due à une inflammation accrue ou à la progression tumorale) et **l'angiogenèse physiologique** principalement médiée par l'ischémie (Ridiandries, Tan et Bursill, 2016).

a) Propriétés angiogéniques et angiostatiques des CXC chimiokines.

Les CXC chimiokines sont des protéines se liant à l'héparine (« *Heparin Binding Proteins* ») qui peuvent jouer un rôle dans l'angiogenèse. En plus de leurs 4 résidus cystéines hautement conservés au cours de l'évolution, un second domaine structural semble être responsable de leur activité. Au niveau de la région N-terminale d'un grand nombre de ces chimiokines, il y a une succession de trois acides aminés : Acide Glutamique – Leucine – Arginine (Glu-Leu-Arg) constituant un motif appelé « **ELR** » (nom donné à partir de la nomenclature internationale des acides aminés « E » pour Glu, « L » pour Leu et « R » pour Arg). Ce motif se situe juste avant le premier résidu cystéine (Strieter *et al.*, 2005). Il a ainsi été montré que les chimiokines dites « ELR+ » seraient pro-angiogéniques. En revanche, de façon générale, les chimiokines dépourvues de motif ELR « ELR- » seraient angiostatiques. S'il est vrai qu'actuellement toutes les chimiokines ELR+ sont pro-angiogéniques, les chimiokines ELR- sont presque toutes angiostatiques à l'exception de CXCL12.

Parmi les chimiokines ELR+ on retrouve CXCL1 (Y. Wang *et al.*, 2017), CXCL2 (Sakai *et al.*, 2018), CXCL3 (Liu *et al.*, 2019), CXCL5 (C. Chen *et al.*, 2019), CXCL6 (Torán *et al.*, 2017), CXCL7 (Giuliano *et al.*, 2014a) et le CXCL8 (Connell, Gordon et Saleh, 2015). Parmi ces membres, CXCL8 (IL-8) est la chimiokine la plus étudiée dans le processus angiogénique. Il est apparu que les chimiokines ELR+, en plus d'avoir en

commun une action pro-angiogénique, possèdent deux récepteurs en commun qui sont le CXCR1 et le CXCR2. Cependant, CXCR1 interagit spécifiquement avec CXCL8 et CXCL6 alors que le CXCR2 peut fixer toutes les chimiokines ELR+.

Les CXC-chimiokines angiostatiques appartiennent toutes à la famille des ELR-. Dans cette famille on retrouve le CXCL4 (Wang et Huang, 2013), CXCL9 (Huang *et al.*, 2016), CXCL10 (Hueso *et al.*, 2018), CXCL11 (Hueso *et al.*, 2018) et CXCL14 (Maehata *et al.*, 2010). Il semble que leur action angiostatique passe par leur fixation au récepteur CXCR3 (Strieter *et al.*, 2005) et plus particulièrement le variant, CXCR3B de ce récepteur. De plus, ces chimiokines semblent pouvoir exercer leur action indépendamment du CXCR3. En effet, il est montré pour CXCL4 par exemple, qu'elle inhibe la migration et la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* et l'angiogenèse *in vivo* induite par les facteurs bFGF et VEGF (Maione *et al.*, 1990; Gupta et Singh, 1994). Dans ce processus, il est montré que CXCL4 diminue très fortement l'interaction de ces facteurs pro-angiogéniques avec leurs récepteurs spécifique (Sato, Abe et Takaki, 1990; Gengrinovitch *et al.*, 1995; Perollet *et al.*, 1998). De plus, il semblerait que cela soit dû à la capacité pour CXCL4 de former des hétérodimères avec ces facteurs agissant ainsi comme une sorte d'inhibiteur compétitif (Jouan *et al.*, 1999).

CXCL12 est une chimiokine ERL-. Cependant, contrairement aux autres membres de cette famille, CXCL12 est l'une des chimiokines majoritaires dans la stimulation de l'angiogenèse post-ischémique. Le rôle de CXCL12 dans ce processus sera détaillé ultérieurement.

En conclusion, les membres de la famille des CXC-chimiokines présentent à la fois des propriétés angiogéniques, médiées par le CXCR1, CXCR2 et CXCR4, et des propriétés angiostatiques, médiées par CXCR3 principalement.

b) Propriétés angiogéniques des CC-chimiokines.

La CC-chimiokine la plus étudiée dans l'angiogenèse est CCL2 (MCP-1). L'axe CCL2/CCR2 joue non seulement un rôle dans le recrutement des monocytes/macrophages, mais également au niveau des cellules vasculaires. Ainsi,

les CE expriment le CCR2, qui est régulé par des cytokines inflammatoires. Plusieurs études ont suggéré un effet direct du CCL2 sur l'angiogenèse en l'absence d'inflammation. Des CE stimulées par du VEGF (Marumo, Schini-Kerth et Busse, 1999) ou exposées à l'hypoxie (Lakshminarayanan *et al.*, 2001) présentent une augmentation de la synthèse de CCL2 et une augmentation de l'angiogenèse (Hong, Ryu et Han, 2005).

L'angiogenèse induite par le CCL2 est médiée par une augmentation de l'expression du facteur de transcription HIF, qui à son tour induit une expression du VEGF-A.

Le VEGF-A va ensuite activer la petite protéine G RhoA qui induit la migration et la prolifération des cellules endothéliales. En effet, il a été montré que l'inhibition de RhoA abolit l'angiogenèse induite par CCL2 mais sans affecter la production de VEGF-A. Ceci suggère que l'angiogenèse induite par le CCL2 est composée de deux étapes séquentielles et nécessaires ; la première étant l'induction de l'expression du VEGF-A puis, l'angiogenèse induite par le VEGF-A lui-même (Hong, Ryu et Han, 2005).

Des études dans divers modèles *in vivo* ont montré que le CCL2 induit également l'angiogenèse. Le CCL2 a augmenté l'angiogenèse dans les essais sur les membranes chorioallantoïde de poulet mais également dans le modèle d'implantation sous cutanée de Matrigel en chez la souris (Salcedo *et al.*, 2000).

D'autres CC-chimiokines présentent également des effets pro-angiogéniques (Figure 12).

c) Propriétés angiogéniques de la famille des CX₃C3 chimiokines.

CX3CL1/fractalkine, la seule chimiokine de la famille CX₃C, induit la prolifération, la migration et la formation de réseaux vasculaire par les CE mais également l'angiogenèse *in vivo* via la fixation au récepteur CX3CR1 exprimé à la membrane des CE (Ruth *et al.*, 2001).

Angiogéniques		Angiostatiques	
Chimiokines	Références	Chimiokines	Références
CXCL1	Wang <i>et al.</i> , 2017	CXCL4 et 4B	Wang <i>et al.</i> , 2013
CXCL2	Kollmar <i>et al.</i> , 2006	CXCL9	Huang <i>et al.</i> , 2016
CXCL3	Reich <i>et al.</i> , 2011	CXCL10	Hueso <i>et al.</i> , 2018
CXCL5	Chen <i>et al.</i> , 2019	CXCL11	Hueso <i>et al.</i> , 2018
CXCL7	Giuliano <i>et al.</i> , 2014	CXCL13	Spinetti <i>et al.</i> , 2013
CXCL8	Chen <i>et al.</i> , 2018	CXCL14	Shellenberger <i>et al.</i> , 2004
CXCL12	Mirshahi <i>et al.</i> , 2000		
CCL2	Liu <i>et al.</i> , 2016		
CCL5	Wang <i>et al.</i> , 2015		
CCL11	Park <i>et al.</i> , 2017		
CCL15	Hwang <i>et al.</i> , 2004		
CCL16	Strasly <i>et al.</i> , 2004		



Figure 13. Chimiokines angiogéniques et angiostatiques.

Les chimiokines peuvent être impliquées dans l'angiogenèse. Parmi ces chimiokines, on peut distinguer des chimiokines angiogénique (en vert) dont le rôle est de favoriser la stimulation de l'angiogenèse en opposition avec les chimiokines dites angiostatiques (en rouge) qui au contraire, régulent négativement ce processus biologique.

B. La chimiokine CXCL12

1. Généralités

La chimiokine CXCL12 a été découverte initialement comme étant le *pre-B cell growth factor* (PBGF) et identifiée comme étant indispensable à la régulation de processus homéostatique comme la lymphopoïèse et l'embryogenèse (Nagasawa *et al.*, 1996). Quelque temps plus tard, il est apparu que le PBGF était constitutivement exprimé par les cellules stromales de la moelle osseuse et a donc été renommé *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) (C C Bleul *et al.*, 1996). CXCL12 est très fortement exprimée dans la moelle osseuse et conduit à une rétention des progéniteurs hématopoïétique et des cellules souches (Kim *et al.*, 1998; Marubini *et al.*, 1999). Contrairement à la plupart des gènes codant pour des chimiokines de type CXC (situé dans le chromosome 14), le gène codant pour CXCL12 est localisé au niveau du chromosome 10q11 (Shirozu *et al.*, 1995). De plus, CXCL12 est la seule chimiokine de sa famille à subir un épissage alternatif et ainsi avoir différentes isoformes. Six variants ont ainsi

été identifiés chez l'homme (CXCL12 α à CXCL12 ϕ) et 3 chez la souris (CXCL12 α à CXCL12 γ) (Yu *et al.*, 2006). Tous ces variants ne diffèrent que par le 4^{ème} exon et montrent des différences en termes de distribution tissulaire et d'activité (Shirozu *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2006; Laguri *et al.*, 2007).

L'expression de CXCL12 est essentielle pour le développement de l'organisme (Janssens, Struyf et Proost, 2018). En effet, il a été montré chez des souris KO pour CXCL12 une très faible viabilité associée à de sévères défauts au niveau de l'hématopoïèse embryonnaire, la neurogenèse, mais également des défauts du développement du système cardiovasculaire (Nagasawa *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1998).

2. Fonctions de la chimiokine CXCL12

a) Les récepteurs de CXCL12

Les récepteurs de CXCL12 décrits à ce jour sont le CXCR4 et le ACKR3 (CXCR7) (Figure 13).

a.1) Le CXCR4

Le CXCR4 (CD184) a d'abord été découvert sous forme de récepteur à sept domaines transmembranaires dérivé de leucocytes (LESTR) (Loetscher *et al.*, 1994). Il s'agit d'un récepteur à sept domaines transmembranaires qui est généralement classé comme récepteur couplé aux protéines G (RCPG). En 1996, deux groupes ont montré séparément que la chimiokine CXCL12, agissait comme ligand naturel de ce récepteur et pouvait bloquer l'infection des cellules T par les souches du Virus de l'Immunodéficience Humaine-1 (VIH-1) qui utilisent LESTR comme voie d'entrée (Bachelier *et al.*, 1996; Conrad C Bleul *et al.*, 1996).

En raison de son interaction avec CXCL12, LESTR a été renommé CXCR4 et classé comme un récepteur de chimiokines. L'importance de ce récepteur est soulignée par l'étude de la découverte d'un nombre sans cesse croissant de types de cellules qui l'expriment à leur surface. Parmi ces cellules, on retrouve la plupart des sous-ensembles de leucocytes, les progéniteurs hématopoïétiques et les cellules souches circulantes ainsi que les cellules des organes lymphoïdes comme la moelle osseuse,

le thymus et les ganglions lymphatiques. Les cellules endothéliales, les cellules stromales et épithéliales de la moelle osseuse, du poumon et de l'intestin grêle expriment également le CXCR4 (Pawig *et al.*, 2015). De plus, contrairement aux autres récepteurs de chimiokines, et de façon similaire à l'absence de CXCL12, les souris dont le gène codant pour CXCR4 a été invalidé présentent une forte létalité associée à d'importants défauts de l'hématopoïèse, de la neurogenèse, de la cardiogenèse et de la vascularisation, montrant ainsi le rôle crucial de ce récepteur et particulièrement de la chimiokine CXCL12 (Deaconess *et al.*, 1998; Tachibana *et al.*, 1998; Power, 2003). Par ailleurs, contrairement aux autres récepteurs de chimiokines, CXCR4 semble avoir CXCL12 pour unique ligand de type chimiokine (Janssens, Struyf et Proost, 2018). En effet, CXCR4 possède d'autres ligands non-chimiokine parmi lesquels la protéine d'enveloppe gp120 du VIH permet son entrée dans les cellules par l'intermédiaire de ce récepteur (Feng *et al.*, 1996).

Deux variants d'épissage de CXCR4 ont été découverts : CXCR4-A et CXCR4-B. CXCR4-B est plus abondamment exprimé et est le résultat de l'épissage de l'ARNm. CXCR4-A, quant à lui est traduit à partir d'un ARNm non épissé ayant un codon initiateur différent de CXCR4-B. Par conséquent, l'extrémité NH₂ du CXCR4-A est plus longue de quatre acides aminés que celle du CXCR4-B et diffère au total de cinq acides aminés (Gupta et Pillarisetti, 1999). Bien que Duquenne *et al.*, n'aient observé aucune différence d'activité entre ces deux variants d'épissage des récepteurs (Duquenne *et al.*, 2014), Gupta *et al.*, ont signalé une réduction de l'activité du CXCR4-A dans le modèle de cellules basophiles de rats leucémique. Dans ces deux études, les deux récepteurs sont fonctionnels, et il semble que le CXCR4-A sert de « récepteur de secours » pour le CXCR4-B. En effet, étant donné l'importance de l'expression de CXCR4 dans le développement embryonnaire, dans le cas d'un épissage d'ARNm CXCR4 absent, un ARNm non épissé peut encore être traduit en un récepteur fonctionnel.

L'activation de CXCR4 induit principalement une transduction du signal couplée à la protéine G, à commencer par la dissociation des sous-unités G $\beta\gamma$ et G α . CXCR4 peut être couplé à G α_i , G α_q ou G $\alpha_{12/13}$, ce qui entraîne l'activation de diverses voies de

signalisation (Rubin, 2008). Il en résulte une cascade de signalisation complexe impliquant, entre autres, les voies MAPK, PLC et PI3K/Akt (Busillo et Benovic, 2007). Malgré l'absence de consensus à ce sujet, il a été démontré que CXCR4 pouvait activer une voie de signalisation cellulaire indépendante des protéines G par le recrutement de Janus kinase (JAK)2 et JAK3 après activation et homodimérisation des récepteurs. Les kinases recrutées s'activent simultanément par transphosphorylation puis phosphorylent CXCR4, ce qui permet de recruter et d'activer le transducteur de signal et les activateurs de transcription (STAT) (Vila-Coro *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001; Moriguchi *et al.*, 2004). De plus, la voie de la β -arrestine est également activée par CXCR4 après son activation, montrant une activation directe de la voie MAPK p38 (Sun *et al.*, 2002).

a.2) ACKR3 (CXCR7)

Le CXCR7 ou Atypical Chemokine Receptor 3 (ACKR3), initialement découvert comme récepteur orphelin de chimiokine RDC-1/ CXCR7, se lie à CXCL12 avec une affinité élevée dix fois supérieure à celle observée pour le CXCR4 et peut induire une diminution de la présence de la chimiokine à la surface des cellules en s'internalisant avec elle (Balabanian *et al.*, 2005; Burns *et al.*, 2006; Boldajipour *et al.*, 2008). Comme pour le CXCR4, l'ACKR3 peut également interagir avec la protéine d'enveloppe gp120 de certaines souches virales et sert comme récepteur central pour l'entrée de VIH (Shimizu *et al.*, 2000). L'ACKR3 s'exprime sur de nombreux types de cellules, y compris les cellules hématopoïétiques, les cellules progénitrices neuronales et les cellules endothéliales activées (Pawig *et al.*, 2015). Par ailleurs, ce récepteur semble essentiel au développement car des souris dont le gène ACKR3 a été inactivés présentent une forte mortalité postnatale mais également des défauts du développement cardiaque (Sierro *et al.*, 2007).

La transduction du signal induite par la fixation de CXCL12 à l'ACKR3 ne s'amorce pas par les protéines G classiques. Bien que l'ACKR3 ait deux substitutions d'acides aminés dans le motif DRYLAIV typique pour la liaison aux protéines G, la restauration de ce motif ne permet pas à l'ACKR3 d'induire une signalisation par le biais des

protéines G (Naumann *et al.*, 2010). Au lieu de cela, la transduction du signal est initiée par le β -arrestine. C'est pourquoi ACKR3 est classé comme un récepteur atypique de chimiokines (Rajagopal *et al.*, 2010).

Étant activé, le récepteur ACKR3 induit des effets biologiques et notamment la migration, la survie et l'adhérence des cellules (Balabanian *et al.*, 2005; Miao *et al.*, 2007).

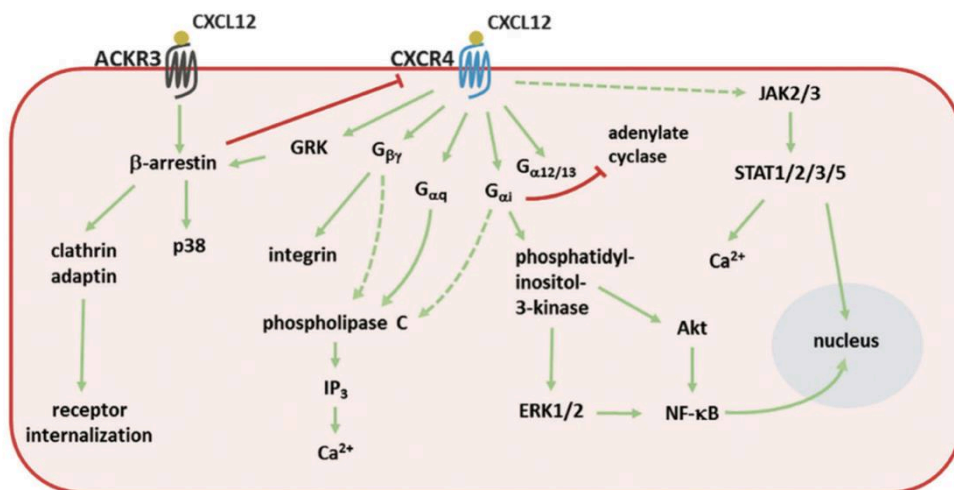


Figure 14. Voies de signalisations induites par les récepteurs CXCR4 et ACKR3 (CXCR7) en réponse à CXCL12.

Les récepteurs connus de CXCL12 sont le CXCR4 et l'ACKR3. En interagissant avec le CXCL12, le CXCR4 peut déclencher des voies de signalisation impliquant les petites protéines G qui vont en réponse activer des médiateurs de la signalisation intracellulaire comme la phospholipase C, la PI3K ou encore les protéines ERK_{1/2}. De son côté, l'ACKR3 est principalement connu comme un récepteur qui s'internalise via la voie des β -arrestines mais peut également stimuler des voies de signalisation MAPK en activant la protéine p38 (Janssens *et al.*, 2018).

L'expression et l'activité de CXCL12 sont hautement régulées. Plusieurs niveaux de régulation peuvent être retrouvés au niveau transcriptionnel, au niveau post-transcriptionnel par obtention de variants issus de processus d'épissage alternatif, par des modifications post-traductionnelles, par sa disponibilité ou encore son interaction avec d'autres protéines (Janssens, Struyf et Proost, 2018).

CXCL12 est une chimiokine cruciale dans la régulation de processus homéostatiques et c'est pourquoi elle est constitutivement exprimée par différents types cellulaires. De plus, des conditions comme l'hypoxie ou l'arrêt de la croissance cellulaire peuvent induire une synthèse accrue de CXCL12 (Lo Celso *et al.*, 2009; van der Vorst, Döring et Weber, 2015). Dans des situations hypoxiques, une importante synthèse de CXCL12 est nécessaire pour assurer une régénérescence de l'endothélium. Pour ce faire, la stimulation de la transcription de CXCL12 est assurée par le facteur HIF dans les cellules endothéliales permettant notamment de recruter des progéniteurs endothéliaux (Anderson *et al.*, 2015). L'hypoxie peut également induire l'expression des récepteurs de CXCL12 à la surface des CE mais également des cellules cancéreuses rendant ainsi ces cellules plus sensibles à la chimiokine (Kryczek *et al.*, 2005).

Comme mentionné plus haut, CXCL12 existe sous 6 différents variants chez l'homme et 3 chez la souris. L'importance de ces différents variants a été montrée dans différents processus. Par exemple, CXCL12 α , β et ϵ induisent la survie des progéniteurs hématopoïétiques *in vitro* alors que les autres variants ne jouent pas de rôle dans ce processus. Tous les variants de CXCL12 exercent une action de protection contre le VIH, le variant γ étant celui ayant les meilleurs effets en empêchant l'interaction des protéines de surface du virus avec le CXCR4 (Altenburg *et al.*, 2007). Par ailleurs, le pouvoir chimio-attractant de ce variant est plutôt faible comparativement au variant α qui est celui qui est le plus étudié aujourd'hui (Rueda *et al.*, 2008; Connell *et al.*, 2016). En revanche, *in vivo*, le chimiotactisme induit par l'isoforme γ semble être plus important, probablement dû à une plus forte résistance à l'inactivation médiée par des enzymes protéolytiques (Rueda *et al.*, 2008). De plus, le variant γ est celui qui possède la plus haute affinité pour les GAG et cette haute affinité lui confère également une protection contre la protéolyse (Laguri *et al.*, 2007; Rueda *et al.*, 2012).

Chez l'adulte, ce sont les variants α et dans une moindre mesure β , qui sont le plus exprimés dans les tissus et ce sont les seuls qu'on détecte dans la moelle osseuse (Janssens, Struyf et Proost, 2018). CXCL12 γ est retrouvé majoritairement dans le

cœur alors que les isoformes δ , ε et ϕ sont majoritairement exprimées dans le pancréas.

La disponibilité de CXCL12 est régulée par l'activité du CXCR4 et de ACKR3. Après la stimulation par CXCL12, CXCR4 est immédiatement internalisé puis dégradé dans les cellules diminuant ainsi le taux de CXCR4 disponible à la membrane. En revanche, l'activation de l'ACKR3 conduit également à son internalisation mais sans conduire à sa dégradation. En effet, ce récepteur réalise un trafic constant entre la membrane et le cytoplasme (Boldajipour *et al.*, 2008). De cette façon, ACKR3 participe à la régulation du gradient et de la disponibilité de CXCL12 à la membrane des cellules et joue donc un rôle majeur dans le chimiotactisme.

CXCL12 peut également être régulée via des modifications enzymatiques ou chimiques post-traductionnelles. Ces modifications peuvent altérer plusieurs aspects de la chimiokine comme notamment ses propriétés à se lier aux GAG ou encore sa capacité à se lier et induire l'activation de ses récepteurs.

Parmi les modifications recensées, on retrouve des changements au niveau des extrémités N et C-terminales qui peuvent être tronquées, citrullinées sur des résidus arginine ou encore subir une nitration sur des résidus tyrosine.

Parmi les enzymes capables de cliver CXCL12 on retrouve la serine protéase Dipeptidyl Peptidase IV (DDP4, CD26) qui existe sous forme soluble ou bien liée aux membranes des CE, de lymphocytes, de fibroblastes ou encore de cellules épithéliales. Cette enzyme peut cliver les isoformes α et β *in vitro* (Shioda *et al.*, 1998). Une fois clivée, il y a une réduction de l'interaction entre CXCL12 et les Glycosaminoglyanes (GAG) mais également entre CXCL12 et CXCR4 (De La Luz Sierra *et al.*, 2004).

L'activité de CXCL12 peut également être altérée par modification chimique et notamment la citrullinisation médiée par la peptidylarginine deiminase (Struyf *et al.*, 2009) ou bien par nitration en présence de peroxy-nitrite (Janssens *et al.*, 2016) qui conduit à une diminution de la capacité de CXCL12 à activer le CXCR4 et diminue le chimiotactisme *in vitro* des lymphocytes et monocytes et une diminution importante du chimiotactisme des lymphocytes *in vivo*.

L'expression de CXCL12 et de ses récepteurs peut être induite par de nombreux facteurs et le plus important d'entre eux est l'hypoxie (Schioppa *et al.*, 2003; Esencay, Sarfraz et Zagzag, 2013). Dans le contexte de l'angiogenèse, l'hypoxie est le facteur le plus impliqué dans la stimulation de ce processus. C'est pourquoi, le rôle de CXCL12 dans l'angiogenèse semble crucial.

3. Implication de CXCL12 dans l'angiogenèse

En 1997, Asahara *et al.* ont isolé à partir du sang périphérique des cellules progénitrices circulantes présentant à leur surface des marqueurs endothéliaux comme le CD34 (Asahara *et al.*, 1997). Ces cellules se différencient en CE qui semblent être particulièrement localisées au niveau de sites où l'angiogenèse est active dans plusieurs modèles animaux d'ischémie. L'apport de ces cellules progénitrices contribuerait en plus des CE résidentes à améliorer le processus de néovascularisation post-ischémique. Les progéniteurs endothéliaux, mais également les CE résidentes, expriment à leur surface le CXCR4 et l'ACKR3, les rendant ainsi potentiellement sensibles à CXCL12 (Luis Pablos *et al.*, 1999; Murdoch, Monk et Finn, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2003).

Le rôle de CXCL12 dans l'angiogenèse a été démontré pour la première fois dans une étude au cours de laquelle des souris dont le gène codant pour CXCL12 ou CXCR4 a été invalidé, présentent de graves défauts dans la formation des vaisseaux du tractus gastrointestinal (Ma *et al.*, 1998).

Dans des conditions ischémiques, CXCL12 est directement induit par le facteur HIF en réponse à la diminution de la concentration en oxygène. (Ceradini et Gurtner, 2005).

Dans ces études, les auteurs ont montré que dans ces conditions il y a une sécrétion de CXCL12 proportionnelle au degré d'hypoxie. De plus, il est montré qu'il y a un changement du gradient de concentration de CXCL12 avec une importante baisse de la concentration de la chimiokine dans la moelle osseuse et une hausse dans les tissus ischémiés (Askari *et al.*, 2003; De Falco *et al.*, 2004) ce qui permet notamment de

recruter et de mobiliser des cellules souches CXCR4 positives depuis la moelle vers ces zones ischémisées (Heissig *et al.*, sans date; Hattori *et al.*, 2001; Döring *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'injection locale de CXCL12 a permis de stimuler la néovascularisation de zones ischémisées via une accumulation de cellules progénitrices. Dans les tissus ischémisés, la sécrétion locale de CXCL12 augmente la vasculogénèse et contribue à la néovascularisation post-ischémique *in vivo* en augmentant le recrutement de progéniteurs endothéliaux (Yamaguchi *et al.*, 2003).

En se fixant à CXCR4 exprimé par les PEC ou pas les CE matures, la chimiokine induit la stimulation de voies de signalisation pro-angiogéniques sur ces deux types cellulaires (Li et Ransohoff, 2009).

En plus de son rôle sur la vasculogénèse, CXCL12 peut moduler l'angiogénèse en stimulant directement des CE résidentes. Mirshahi *et al.*, ont ainsi démontré sur le modèle de cellules endothéliales HUVEC qu'une stimulation par CXCL12 permet d'induire la prolifération de ces cellules mais également leur migration par chimiotactisme dans le modèle de chambre de Boyden. De plus, CXCL12 a permis de stimuler la formation de réseaux vasculaires par les HUVEC sur Matrigel en deux dimensions (2D) mais également de stimuler l'angiogénèse *in vivo* chez le lapin. Par ailleurs, dans le même modèle cellulaire, CXCL12 permet de stimuler la synthèse et la sécrétion de VEGF (Salcedo *et al.*, 1999). D'un point de vue mécanistique, les effets de CXCL12 sur les cellules endothéliales semblent être sous la dépendance des voies de signalisation pro-angiogéniques MAPK, ERK1/2 et PI3K/Akt. En effet, Ho *et al.*, ont démontré dans le modèle des cellules endothéliales HMECs que la fixation de CXCL12 sur CXCR4 conduit à l'activation des protéines ERK1/2 et Akt par leur phosphorylation (Ho *et al.*, 2012). Le blocage par des inhibiteurs pharmacologiques (PD98059, LY294002) de ces deux voies ont permis d'identifier que la voie ERK est indispensable à la prolifération des cellules endothéliales induite par CXCL12 et que la voie PI3K/Akt est essentielle à son effet anti-apoptotique. En revanche, l'activation de ces deux voies est indispensable pour la formation de réseaux vasculaires *in vitro* par les HMECs. En effet, le blocage de l'une ou l'autre voie conduit à une forte inhibition de l'effet pro-angiogénique de CXCL12.

CXCL12 permet également d'augmenter l'interaction des cellules endothéliales entre elles via la stimulation de la voie PI3K/Akt stimulant ainsi la formation de tubes vasculaires par les cellules endothéliales (Kanda, Mochizuki et Kanetake, 2002). Enfin, l'injection *in vivo* de CXCL12 réduit la taille de l'infarctus post-ischémique chez la souris associée à une augmentation de la néo-angiogenèse (Hu *et al.*, 2007).

Bien qu'il soit établi que CXCL12 exerce ses fonctions pro-angiogéniques via la stimulation de voies de signalisation, on ne sait pas encore si ces fonctions peuvent résulter de la synthèse de facteurs intracellulaires comme des microARNs ou nécessiter la présence des GAG.

III. Les Glycosaminoglycannes

A. Introduction générale

Les glycosaminoglycannes (GAG) sont une famille de polysaccharides linéaires qui interagissent avec une large gamme de protéines, y compris des facteurs de croissance et chimiokines dans le but de réguler des processus physiologiques et pathologiques (Handel *et al.*, 2005).

Les chaînes GAG sont constituées par la répétition d'unités disaccharidiques de dérivés sulfatés et non sulfatés comprenant un résidu d'acide uronique (acide D-glucuronique ou acide L-iduronique) et d'une osamine (glucosamine ou galactosamine). La famille des GAG comprend l'héparine (H), les héparanes sulfates (HS), l'acide hyaluronique (AH), les chondroïtines sulfates (CS), les dermatanes sulfates (DS) et les kératanes sulfates (KS). Après leur synthèse, les chaînes GAG sont modifiées par N-acétylation et N-sulfatation (Capila et Linhardt, 2002; Gandhi et Mancera, 2008), donnant ainsi lieu à la production de structures très variables. A l'exception de l'AH (GAG non sulfaté), les GAG sont synthétisés sur une protéine centrale pour former un protéoglycane (PG) (Figure 13).

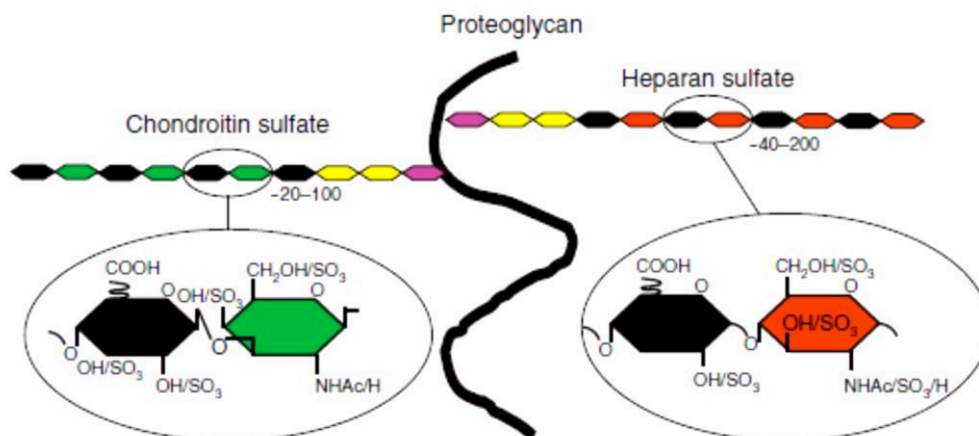


Figure 15. Représentation schématique d'un protéoglycane.

Les GAG (à l'exception de l'acide hyaluronique) sont synthétisés sur une protéine centrale pour former un protéoglycane (PG). Les PG peuvent être membranaires, transmembranaires ou présents dans la MEC.

B. Métabolisme des GAG

1. Biosynthèse des GAG

Les GAG sont synthétisés à partir d'un tétrasaccharide de liaison constitué d'un acide glucuronique (GlcA), de deux galactoses (Gal) et d'un résidu xylose (Xyl), lié à un résidu sérine (Ser) de la protéine centrale d'un protéoglycane. La synthèse de cette région est initiée par l'addition d'un Xyl à une Ser suivie de l'addition de deux résidus Gal et est complétée par l'addition de GlcA (Xyl-Gal-Gal-GlcA). Les voies de synthèse des GAG divergent après la formation de ce tétrasaccharide de liaison. Par exemple, l'ajout d'une N-Acétyl-Glucosamine (GlcNAc), au tétrasaccharide de liaison, engage le protéoglycane dans l'assemblage de chaînes HS alors que l'ajout d'une N-Acétyl-Galactosamine (GalNAc) l'engage dans l'assemblage de chaînes CS (Zhang, 2010). Les HS sont caractérisés par la répétition de GlcNAc et de Glc ou d'acide Iduronique (IdoA). Les CS ou DS sont des GAG constitués d'une répétition de GalNAc, de GlcA ou IdoA (Figure 14). Grâce aux groupements acides présents sur les acides uroniques et aux groupements sulfates, les GAG sont chargés négativement, ce qui leur confère des propriétés biologiques particulières.

GAG	Disaccharide structure	Uronic acid	Hexosamine	Substitutions
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 16. Exemple de structure et de composition des chaînes GAG (Ly, Laremore et Linhardt, 2010).

Les GAG regroupent différentes familles de polysaccharides parmi lesquels on retrouve les héparines (Hp), les héparanes sulfates (HS), les chondroïtines sulfates (CS), les dermatanes sulfates (DS) et les kératanes sulfates (KS).

La biosynthèse et l'élongation des chaînes GAG sont deux processus régulés par des enzymes appelées Exostosines (EXT)-1 et 2 (Figure 15). Ces chaînes sont ensuite prises en charge par des N-Déacétylases N-Sulfotransférases (NDST) dont le rôle est de substituer des groupements N-acétylés par des groupements N-sulfatés (Figure 15). Une épimérase en C5 peut transformer certains Glc en IdoA conduisant ainsi à une épimérisation partielle des résidus Glc. Pour terminer, les chaînes GAG peuvent être sulfatées en position 2, 3 et 6 par des O-sulfotransférases (OST) (Figure 15) (Kreuger et Kjellén, 2012; El Masri *et al.*, 2017).

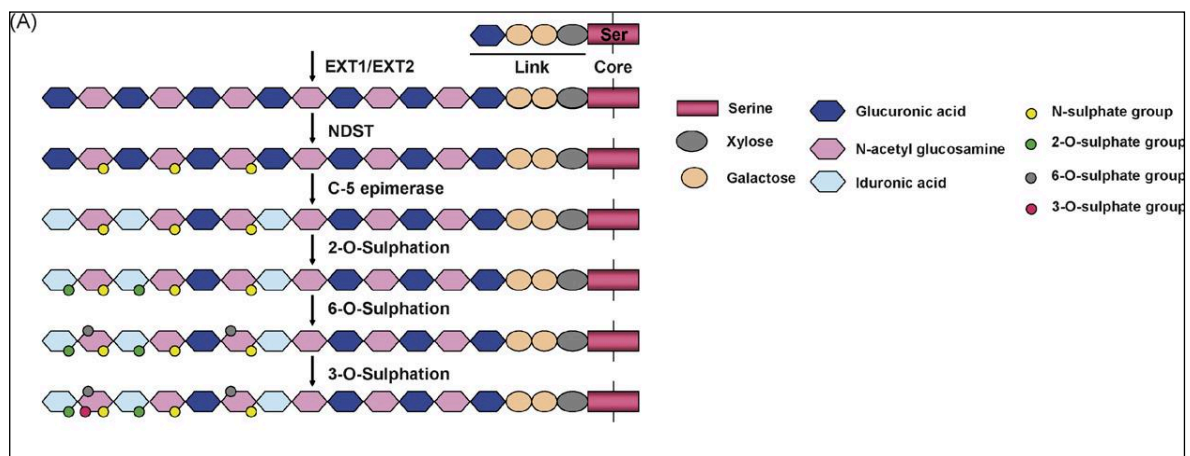


Figure 17. Biosynthèse des chaînes GAG.

Les GAG sont bio-synthétisés à partir d'un tétrasaccharide de liaison (Xyl-Gal-Gal-GlcA) lié de manière covalente à un résidu sérine porté par la protéine centrale d'un protéoglycane. Les sucres qui vont ensuite être ajoutés à ce tétrasaccharide de liaison vont déterminer le type de GAG à synthétiser. L'élongation des chaînes GAG est assurée par des exostosines (EXT-1 et EXT-2). Les GAG sont ensuite pris en charge par une N-déacétylase N-sulfotransférase (NDST) dont le but est d'échanger des groupements N-acétylés par des groupements N-sulfatés. Par la suite, une épimérase en C5 peut transformer certains Glc en IdoA. Enfin, les GAG subissent des sulfatations en position 2-O, 3-O et 6-O par des O-sulfotransférases (OST).

2. Catabolisme et modifications post-synthèse des GAG

La demi-vie des GAG est assez courte, entre trois et quatre heures. Les HS peuvent être dégradés par une endoglucuronidase appelé Héparanase (HPSE). L'HPSE clive les chaînes HS en fragments fonctionnels d'environ 20 unités disaccharidiques pouvant lier des facteurs de croissance et des chimiokines (Yanagishita et Hascall, 1984).

Le taux de sulfatation des HS peut également être modulé par des enzymes de type Sulfatases (SULF) (El Masri *et al.*, 2017). Les SULF hydrolysent des groupements 6-O sulfates réduisant ainsi fortement le potentiel électro-négatif des HS et donc la possibilité pour ces GAG d'interagir avec des facteurs de croissance et chimiokines (Figure 16) (Ai *et al.*, 2003).

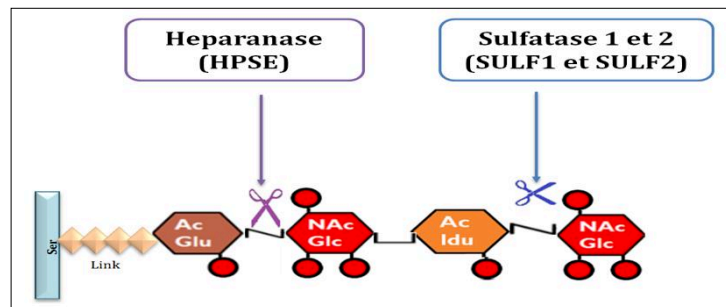


Figure 18. Enzymes du catabolisme et de modifications post-synthèse des GAG. Les chaînes GAG peuvent être dégradées ou subir des modifications post-synthèse. La dégradation des GAG est assurée par une endoglucuronidase (l'HPSE). Le taux de sulfatation des GAG peut être modifié par des SULF qui clivent les groupements sulfates en position 6 des glucosamines.

C. Interactions entre GAG et facteurs pro-angiogéniques

Les GAG participent à divers processus physiologiques tels que la liaison, l'activation ou l'immobilisation de divers ligands protéiques, tels que les facteurs de croissance et les chimiokines (Billings et Pacifici, 2015). Ces interactions dépendent dans une large mesure de la composition et de la structure des chaînes GAG. Plus de 200 protéines de liaison aux GAG ont été décrites dans la littérature (Zhang, 2010).

Compte tenu de la charge négative des GAG, il a d'abord été suggéré que des interactions électrostatiques non spécifiques étaient responsables de la liaison des protéines aux chaînes GAG des protéoglycannes dans les tissus et à la surface cellulaire. Par la suite, des études ont démontré un degré élevé de spécificité dans ces interactions, et que l'interaction des GAG aux séquences consensus dans les protéines est fonction de la structure, de la composition et de la longueur de la chaîne ainsi que de la charge des GAG (Capila et Linhardt, 2002; Gandhi et Mancera, 2008). Ces interactions avec des protéines sont permises par la présence au sein de la

protéine d'acides aminés basiques (arginine, lysine, histidine), chargés positivement pouvant ainsi se lier aux GAG principalement par interactions ioniques, mais également par liaisons hydrogènes (Capila et Linhardt, 2002; Gandhi et Mancera, 2008).

1. Interaction entre GAG et facteurs de croissance

Les GAG et en particulier les HS portés par des protéoglycannes à chaînes HS (PGHS) lient un certain nombre de facteurs de croissance dans la MEC et à la surface des cellules (Taipale et Keski-Oja, 1997). La liaison et la régulation de l'activité des facteurs de croissance aux HS dépendent de leur liaison aux syndécannes à la surface des cellules (Alexopoulou, Multhaupt et Couchman, 2007) et du perlecanne au niveau de la membrane basale (Taipale et Keski-Oja, 1997). Bien que la liaison sélective des facteurs de croissance aux chaînes HS puisse impliquer des séquences de saccharides et des schémas de sulfatation particuliers (Rek *et al.*, 2009), il semble que le degré de sulfatation et les interactions de charge relativement non spécifiques, en plus de l'organisation du domaine, puissent également être impliqués (Kreuger *et al.*, 2006). Il est important de noter que les chaînes HS ne sont pas les seules à pouvoir interagir avec des facteurs de croissance ; en effet, le FGF, le HGF et le VEGF peuvent également se lier aux chaînes latérales des CS et des DS portées par les protéoglycannes (Malavaki *et al.*, 2008).

Enfin, les GAG peuvent également interagir avec d'autres molécules pro-angiogéniques comme les chimiokines, régulant ainsi leurs effets biologiques.

2. Interaction entre GAG et chimiokines

a) Généralités

Malgré de faibles homologies de séquences entre elles, les chimiokines ont des structures tertiaires similaires et la plupart sont des protéines hautement basiques. De plus, à ce jour, toutes les chimiokines se lient à l'héparine et aux HS (MacGregor *et al.*, 2011).

b) Cas de CXCL12

Bien que le CXCR4 et l'ACKR3 soient les deux récepteurs fonctionnels de CXCL12, l'interaction avec des GAG comme l'héparine ou les HS semble nécessaire aux fonctions de la chimiokine. L'interaction de CXCL12 avec les GAG assure une meilleure présentation de la chimiokine pour ses récepteurs, et notamment au niveau de l'endothélium permettant ainsi d'assurer un gradient de concentration nécessaire au recrutement de cellules circulantes. Cette interaction entre les GAG et CXCL12 est permise par la présence d'un motif Lysine-Histidine-Lysine (dans le premier feuillet β de la chimiokine), contenant des acides aminés chargés positivement qui vont interagir de façon électrostatique avec les charges négatives des groupements sulfates portés par les GAG (Luis Pablos *et al.*, 1999; Sadir *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2007).

De plus, l'interaction avec les GAG permet à CXCL12 de s'homodimériser (Sadir *et al.*, 2001; Fermas *et al.*, 2008). L'importance de ces GAG a été démontrée chez la souris. Lorsque CXCL12- α , β ou γ sont dépourvus de site de liaison aux GAG (substitution du motif Lys-His-Lys par un motif Ser-Ser-Ser), il y a une augmentation du nombre de PEC dans la circulation et une diminution du nombre de cellules ayant infiltré les tissus ischémiés montrant ainsi que la fixation de la chimiokine CXCL12 aux GAG est nécessaire aux fonctions de recrutement de cellules circulantes exercées par CXCL12 (Rueda *et al.*, 2012).

Par ailleurs, la liaison aux HS protège également CXCL12 α contre l'inactivation protéolytique par le CD26/DPP4 (Lortat-Jacob, 2009).

En plus de la liaison de CXCL12 aux PGHS exprimés par l'endothélium, une liaison de CXCL12 aux chaînes HS, et plus particulièrement au syndécanne-4 (SDC-4) a été mise en évidence par notre laboratoire sur les cellules HeLa, les cellules T et les macrophages (Charnaux *et al.*, 2005). La liaison du CXCL12 au SDC-4 sur les macrophages facilite sa liaison au récepteur CXCR4. Cependant, nous avons démontré préalablement sur les cellules HeLa, que la liaison de CXCL12 au SDC-4 active des voies de transduction du signal intracellulaires, indiquant ainsi que le SDC-4 se comporte comme un récepteur fonctionnel de CXCL12 (Charnaux *et al.*, 2005).

Par ailleurs, les GAG et le SDC-4 sont nécessaires à l'invasion des cellules Hela induite par CXCL12 (Brule *et al.*, 2009).

En revanche, l'implication des GAG dans la régulation du processus angiogénique médiée par CXCL12 n'est pas encore connue.

D. Implication des GAG dans l'angiogenèse

Le glycocalyx endothélial se compose d'une variété de molécules transmembranaires et membranaires, constituées principalement de SDC-1 et de chaînes HS (Chappell *et al.*, 2008). Associés aux protéines plasmatiques et aux GAG solubles, le glycocalyx forme une couche superficielle à la surface des CE d'une épaisseur fonctionnelle supérieure à 1 000 nm (Chappell *et al.*, 2008). Il a été démontré que les lésions endothéliales précoces après une ischémie/reperfusion (Rehm *et al.*, 2007) et une inflammation causée par le TNF- α (Chappell *et al.*, 2009) ou le LPS (Marechal *et al.*, 2008) induisent une dégradation du glycocalyx. L'endommagement du glycocalyx augmente la perméabilité capillaire, entraînant un œdème tissulaire, ce qui suggère que le glycocalyx agit comme une barrière protectrice importante (Chappell *et al.*, 2007). Chappell *et al.*, ont démontré *in vivo* dans un modèle porcin qu'une ischémie prolongée conduit à un clivage et une dégradation importante du glycocalyx endothéliale (Chappell *et al.*, 2010) (Figure 18).

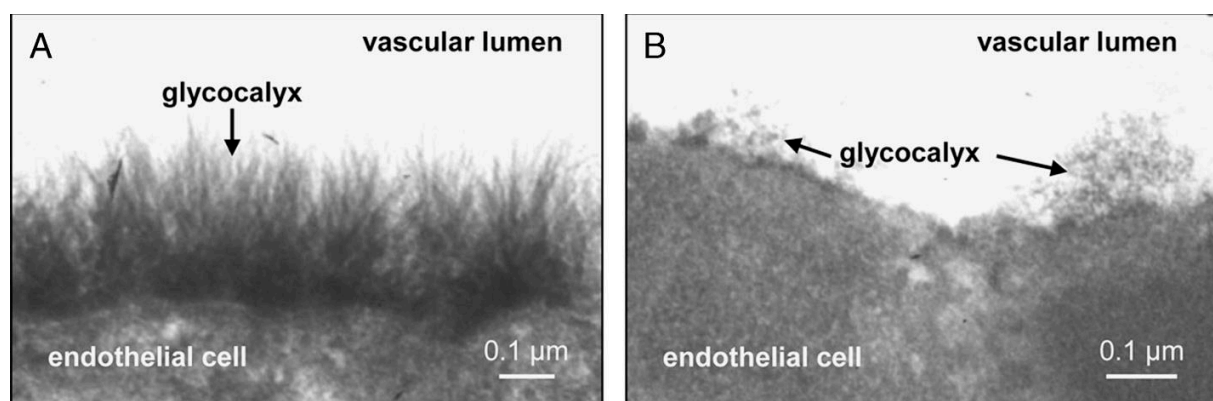


Figure 19. Conséquence de l'ischémie sur l'intégrité structural du glycocalyx (d'après Chappell *et al.*, 2010).

Dans ces conditions, il semble impossible que des GAG puissent interagir avec les signaux pro-angiogéniques. En effet, plusieurs études ont démontré le rôle des GAG et plus particulièrement des protéoglycannes dans le processus d'angiogenèse. Des souris dont le gène codant pour le SDC-4 a été invalidé ont présenté une diminution de l'angiogenèse dans un modèle d'implantation de matrice sous-cutanée ainsi qu'une diminution du nombre de CE CD31⁺ (Echtermeyer *et al.*, 2001). De plus, dans un modèle de cellules HUVEC, une diminution de l'expression du SDC-4 par ARN interférence a conduit à une diminution de la migration des HUVEC par chimiotactisme induite par du bFGF (Li *et al.*, 2016). Dans un modèle de développement chez le poisson-zèbre, une forme tronquée de la partie intracellulaire du SDC-2 a conduit à d'importants défauts de la vascularisation associés à une diminution de la signalisation induite par le VEGF (Chen, Hermanson et Ekker, 2004). Par ailleurs, dans un modèle de cellules endothéliales microvasculaires (HMEC-1), une diminution de l'expression du SDC-2 a conduit à une diminution de l'adhérence, de l'étalement et de la formation de réseaux vasculaires (Noguer *et al.*, 2009). Une autre étude a montré *in vivo* l'importance du perlécane, un PGHS, dans ce processus. Dans cette étude, des souris dont le gène codant pour le perlécane a été invalidé, ont présenté une importante diminution de la reperfusion post-ischémique de la patte, une diminution du nombre de CE CD31⁺ ainsi que la formation d'ulcères (Qiang *et al.*, 2014).

Si la présence des GAG et des PGHS semble indispensable au processus d'angiogenèse, il en est de même en ce qui concerne les enzymes de biosynthèse et de dégradation des GAG. En effet, nous avons montré préalablement, dans un modèle de cellules HUVEC, qu'une diminution de l'expression d'EXT-1 et surtout d'EXT-2, conduit à une inhibition de la formation de réseaux vasculaires induit par un polysaccharide sulfaté. De plus, une diminution de l'expression de l'HPSE (enzyme impliquée dans la dégradation des GAG) a permis d'induire une augmentation de la formation de réseaux vasculaires induite par le même polysaccharide sulfaté (Haddad *et al.*, 2015). De façon similaire, le taux et la position de groupements sulfates au sein des HS est important pour assurer une bonne interaction avec des facteurs de croissance. En effet comme le montre l'étude de Ferreras *et al.*, une diminution de la 6-O sulfatation conduit à une diminution du bourgeonnement des CE sur une matrice

de sphéroïdes mais également une inhibition de la stimulation de voies de signalisation ERK1/2 dans le modèle de cellules HUVEC (Ferrerias *et al.*, 2012).

D'un point de vue thérapeutique, la surexpression de PGHS ou l'apport de mimétiques de GAG exogènes ont montré un grand intérêt. En effet, notre laboratoire a montré qu'une surexpression du SDC-4 dans le modèle de cellules HUVEC conduit à une augmentation de la migration et de la formation de réseaux vasculaires induite par la chimiokine CCL5 (Maillard *et al.*, 2014). De plus, Rouet *et al.*, ont démontré que l'application de mimétique synthétique de GAG, ayant une haute affinité pour le VEGF-A, a permis de stimuler la migration et la prolifération de cellules HUVEC mais également l'angiogenèse *in vivo* dans le modèle d'implantation de matrigel en sous-cutané chez la souris ou sur membrane chorioallantoïde de poulet (Rouet *et al.*, 2005). De même, dans le modèle d'ischémie de la patte chez la souris, l'injection de matrices constituées de chaînes HS a permis de restaurer une vascularisation post-ischémique normale et une régénérescence de la MEC (Chevalier *et al.*, 2015).

L'apport en PGHS ou des mimétiques de GAG semble être une piste très prometteuse dans la stimulation de l'angiogenèse. En situation d'ischémie, nous avons vu qu'il y a une importante dégradation du glycocalyx endothélial. Afin de permettre une régénérescence de l'endothélium et du glycocalyx post-ischémique et de stimuler l'angiogenèse, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont en train d'émerger basées sur la délivrance de facteurs intracellulaires, tels que les microARNs.

IV. Les microARNs

A. Définitions

Les microARNs (miRs) sont de petits ARNs simple brin, non codant, hautement conservés au cours de l'évolution, retrouvés de façon naturelle dans les cellules. C'est en 1993 que les miRs ont été mis en évidence chez *C.elegans* (Lee, 1993). Il n'existe pas de classification ou de noms particuliers donnés aux miRs ; ils sont nommés miRs suivis d'un numéro d'identification. Il a fallu attendre 2001 afin que leur fonctionnement soit décrit pour la première fois (Lagos-Quintana *et al.*, 2001). Les miRs ont ainsi été décrits comme étant des régulateurs post-transcriptionnels de l'expression des gènes. Les miRs sont étudiés depuis de longues années pour comprendre des mécanismes biologiques mais également comme outils que l'on peut introduire dans des cellules et/ou des tissus pour contrôler leur niveau d'expression afin d'induire ou d'inhiber certains processus biologiques.

B. Biosynthèse : Du gène au miARN mature

Les miRs sont de petits transcrits issus d'un précurseur double brin ayant comme particularité la présence d'une structure tige boucle (Cheung et Sanyal, 2010) (Figure 18). La transcription et la maturation des miRs est un processus multi-étapes faisant intervenir un certain nombre de partenaires protéiques.

La première étape de biosynthèse d'un miR, est sa transcription à partir de certaines séquences présentes dans les gènes. Basées sur leur localisation dans le génome, plusieurs classes de miR ont pu être identifiées : les intergenic miRs dont la transcription est indépendante de celle de leur gène hôte ; les intronic ou exonic miRs, présents dans les introns ou les exons de leur hôte et enfin des miRs présents dans les régions 5' ou 3' non traduites de leur hôte (Zhu et Fan, 2012). Dans la majorité des situations, les miRs sont retrouvés dans les introns de gènes codant pour une protéine et leur transcription est dépendante de celle de leur gène hôte.

La transcription des miRs en pri-miARN se fait par l'action d'une ARN polymérase de type II. Ce transcrit d'environ 70 nt est ensuite pris en charge et clivé en un pre-miARN (premiR) (60-70 nt) par une endonucléase de type III nommée Drosha associée à un

partenaire protéique essentiel pour la reconnaissance de l'ARN : son co-facteur *DiGeorge syndrome critical region 8* (Figure 19) (Bartel, 2004a).

Afin d'achever sa maturation, le premiR doit être transporté dans le cytoplasme. Pour cela, il est activement exporté du noyau via le système Exportin 5/RanGTP (Lee *et al.*, 2004).

Une fois dans le cytoplasme, le premiR est ensuite clivé en un duplex d'environ 22 nt par une endonucléase (RNase de type III) cytosolique nommée Dicer (Bartel, 2004b) associé à son partenaire protéique TRBP. Dicer/TRBP permet de cliver la boucle présente à l'une des extrémités du premiR laissant apparaître un duplex miR-3p/miR-5p imparfait. En effet, lors du clivage nucléaire initié par la protéine Drosha, le premiR laisse apparaître une extrémité 3' sur l'un des deux brins plus longue de 2 nucléotides que le brin opposé (Figure 19).

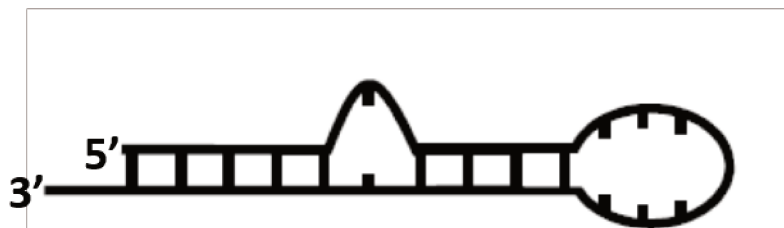


Figure 20. premiARN : un duplex miR-3p/miR-5p

Bien que le mécanisme ne soit pas encore bien connu, le duplex miR-3p/miR-5p est ensuite incorporé dans un complexe multiprotéique constitué par les protéines Argonautes (Argonautes 1 à 4) afin de former le complexe *RNA -induced silencing complexe* (RISC).

Il était communément admis que seul l'un des deux brins est ensuite associé au complexe RISC l'autre devant être libéré ou détruit (Nykänen, Haley et Zamore, 2001). En effet, la stabilité thermodynamique relative des deux brins est différente et détermine ainsi qu'un brin soit majoritairement dégradé par rapport à l'autre. Cependant, il est montré dans la littérature que le brin dit passager (miR-5p), demeure dans les cellules, dans une moindre quantité et peut être fonctionnel et impliqué au

même titre que le brin mature dans la régulation de processus biologique en étant incorporé ensemble ou séparément au sein du même complexe RISC.

Enfin, le complexe RISC associé à un ou plusieurs miRs fonctionnels se dirige vers un ARNm cible et induit une dégradation de cet ARNm ou une répression de la traduction de ce dernier en protéine (Bartel, 2004b) (Figure 20).

La répression de la traduction d'un ARNm est permise dès lors qu'il y a une faible complémentarité avec le miR. Cependant, sa dégradation requiert une forte complémentarité avec le miR (Lewis *et al.*, 2003).

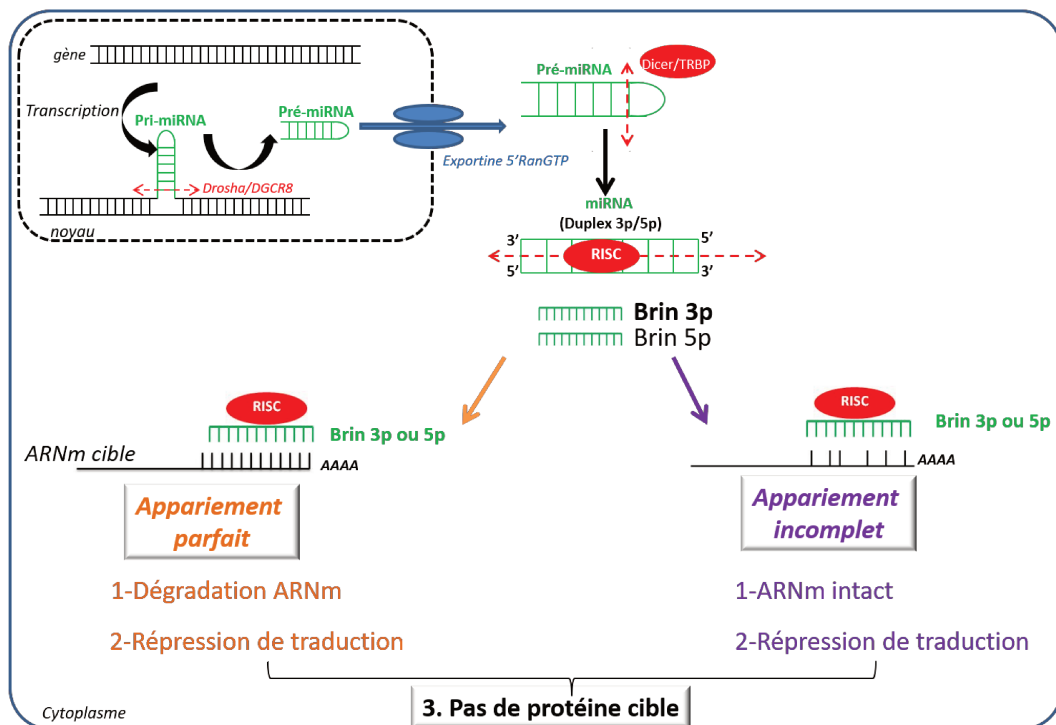


Figure 21. Biosynthèse des miRs

C. Implication des miRs dans l'angiogenèse

Les premières preuves impliquant des miRs dans la régulation du développement vasculaire proviennent de l'analyse de souris homozygotes pour un allèle hypomorphe de Dicer, qui est, nécessaire à la maturation des miRs. Les souris déficientes en Dicer ont présenté d'importants défauts d'angiogenèse et sont mortes entre 12,5 et 14,5 jours de gestation (Yang *et al.*, 2005). Ces données ont été renforcées par Suarez *et al.*, qui ont effectué une invalidation-KO conditionnelle du gène codant pour Dicer dans l'endothélium. Ces souris étaient phénotypiquement normales sans aucune différence dans le phénotype vasculaire par rapport aux témoins. Cependant, l'extinction de l'expression de Dicer dans les CE, aboutit à une diminution de la réponse angiogénique induite par le VEGF-A (Suárez *et al.*, 2008). Pour étudier les effets directs d'une altération de la biosynthèse de miR sur la biologie des CE, plusieurs équipes ont évalué l'activité angiogénique des CE après la destruction spécifique de Dicer et Drosha *in vitro*. La réduction de l'expression de Dicer (via ARN interférence) dans les CE humaines a entraîné une diminution de la prolifération et de la formation d'ébauches vasculaires (Kuehbacher *et al.*, 2007; Suárez *et al.*, 2007; Shilo *et al.*, 2008). De façon similaire, l'inhibition de la protéine Drosha *in vitro* a entraîné une diminution de l'angiogenèse *in vitro*, mais sans effet signalé *in vivo* (Kuehbacher *et al.*, 2007). La protéine Dicer étant nécessaire à la maturation des miRs par les cellules, l'implication de ces derniers dans l'angiogenèse semble incontestable. Cependant, toutes ces études n'ont fourni que des preuves indirectes de l'implication des miRs dans l'angiogenèse et ces chercheurs ne savaient pas quels miRs étaient responsables des phénotypes observés. Dans la régulation de leurs effets biologiques, les miRs peuvent agir seul ou associés à d'autres miRs en formant ce que l'on appelle des clusters. La surexpression des miR-18a, miR-17-5p et miR-20a (qui appartiennent tous au cluster du miR-17-92) a rétabli la prolifération des CE dont l'expression de Dicer était inhibée, démontrant ainsi le rôle fondamental du cluster miR-17-92 dans l'angiogenèse (Suárez *et al.*, 2008). L'importance physiologique des miRs dans le développement vasculaire a émergé avec l'analyse de profils génétiques de miR chez le poisson zèbre et la souris.

1. Expression et régulation des miRs dans les cellules endothéliales

Le premier profil de miR dans les CE a été réalisé par *Poliseno et al.* (Poliseno *et al.*, 2006). Ils ont identifié 15 miRs hautement exprimés dans le modèle de cellules endothéliales HUVEC. Jusqu'à présent, 28 miRs couramment exprimés dans toutes les études de profilage (miR-15b, -16, -20, -21, -23a, -23a, -23b, -24, -27a, -29a, -30a, -30c, -31, -100, -103, -106, 125a et -b, 126, -181a, -191, -199a, -221, -222, -222, -320, let-7, let-7, let-7b, let-7c et let-7d) ont été identifiés dans des CE cultivés dans des conditions normales (Kuehbacher *et al.*, 2007; Suárez *et al.*, 2007, 2008; Chen et Gorski, 2008; Fasanaro *et al.*, 2008; Fish *et al.*, 2008). Cependant, le nombre de miRs impliqués dans l'angiogenèse pourrait être sous-estimé en raison des différentes plateformes et des différentes sources de CE utilisées dans les analyses. De plus, le profil d'expression des miRs pourrait changer si les CE sont étudiées dans des conditions pathologiques. Voellenkle *et al.*, ont été les premiers à analyser massivement les miRs exprimés par les cellules endothéliales soumises à des conditions d'hypoxie (Voellenkle *et al.*, 2010).

En se basant sur la littérature concernant l'expression et la fonction des miRs dans les CE, on peut distinguer : les **miRs anti-angiogéniques** et, les **miRs pro-angiogéniques**. Parmi ceux-ci, il est également possible de distinguer deux groupes : 1. **les miRs qui ciblent les gènes impliqués dans l'angiogenèse** et 2. **les miRs dont l'expression peut être modulée par des stimuli pro-angiogéniques ou anti-angiogéniques**.

2. Régulation de l'expression des miRs et leurs fonctions dans l'angiogenèse

Les miRs ciblant des gènes impliqués dans l'angiogenèse sont appelés : **les angio-miRs**. Les angio-miRs sont fréquemment détectés dans les CE, où ils induisent des fonctions connues par liaison à des gènes cibles bien caractérisés (Wang et Olson, 2009). Les angio-miRs les plus exprimés par les CE sont les miR-126, miR-221/222, miR-23/27 et le cluster miR-17-92. La surexpression du miR-221/222 (anti-angiogénique) inhibe les réponses pro-angiogéniques du « stem cell factor » (SCF) en

ciblant le récepteur c-kit du SCF (Poliseno *et al.*, 2006). miR-23 et miR-27 améliorent l'angiogenèse en ciblant les protéines Sprouty2 et Sema6A, qui exercent une activité anti-angiogénique. Le rôle du cluster miR-17-92 dans l'angiogenèse est complexe. L'activité pro-angiogénique de ce cluster a d'abord été découverte grâce à des travaux sur miR-17-5p, miR-18a et miR-19a (Suárez *et al.*, 2008). Il a été démontré que les miR-18a et miR-19a ciblent les protéines contenant des répétitions de thrombospondine de type 1 (Dews *et al.*, 2006; Suárez *et al.*, 2008) ; tandis que miR-17-5p semble moduler la migration et la prolifération des CE en ciblant la protéine TIMP-1 qui est un inhibiteur de métalloprotéases matricielles (TIMP1) (Otsuka *et al.*, 2008). En revanche, miR-20a et miR-92a semblent présenter une activité anti-angiogénique en ciblant respectivement les transcriptions du VEGF-A et de l'intégrine β 5 (Bonauer *et al.*, 2009; Pin *et al.*, 2012).

a) miRs modulés par des facteurs de croissance et l'hypoxie

Le premier facteur pro-angiogénique ayant démontré son effet sur l'expression de miRs est le VEGF-A qui induit l'expression des miR-191, -155, -31, -17-5p, -18a et miR-20a (Suárez *et al.*, 2008). De plus, l'incubation de cellules endothéliales avec du sérum de veau fœtal (SVF), le VEGF-A et le facteur de basic fibroblast growth factor (bFGF) ont induit une augmentation de l'expression du miR-130a (pro-angiogénique), qui inhibe GAX et HOXA5 ; deux facteurs de transcription anti-angiogénique qui induisent respectivement, la phase G0 des CE par activation de p21 et l'inhibition de l'expression du VEGFR-2 ainsi que la synthèse de la thrombospondine-2 (un facteur anti-angiogénique) (Chen et Gorski, 2008; Cuevas *et al.*, 2015). En présence du VEGF-A et de EGF, l'expression du miR-296 (pro-angiogénique) était significativement accrue dans les CE du cerveau (Würdinger *et al.*, 2008). Enfin, le miR-101 est inhibé par le VEGF-A, ce qui favorise l'angiogenèse en permettant l'expression de l'histone-méthyltransférase EZH2 ; une enzyme dont l'activation conduit à une synthèse du facteur pro-angiogénique eNOS (Mitić *et al.*, 2015).

L'hypoxie augmente l'expression des miR-210 et miR-424, deux miRs à activité pro-angiogénique, dans les CE (Fasanaro *et al.*, 2008; Ghosh *et al.*, 2010). En réalité, la surexpression du miR-210 a considérablement augmenté la migration des HUVEC et la formation de structures capillaires en ciblant l'éphrine A3 (Fasanaro *et al.*, 2008).

Enfin, un environnement hypoxique a induit une diminution de l'expression miR-200b et conduit à une augmentation des facteurs de transcriptions ETS1/2 pour favoriser l'angiogénèse dans les CE microvasculaires humaines ; les ETS étant des facteurs pro-angiogéniques impliqués dans l'expression des récepteurs du VEGF (Chan *et al.*, 2011; Craig et Sumanas, 2016).

b) miRs régulés par des stimuli anti-angiogénique

Il a été démontré que les espèces réactives de l'oxygène et notamment le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'anion superoxyde et les radicaux hydroxyle inhibent la croissance des CE et induisent la mort ainsi que la sénescence cellulaire (Minamino et Komuro, 2007; Kondo *et al.*, 2009). Magenta *et al.*, ont lié les effets du stress oxydant sur la prolifération, la mort et la sénescence des CE à l'augmentation de l'expression du miR-200c qui a conduit à une diminution de l'expression de sa protéine cible ZEB1 ; un facteur de transcription inhibant la synthèse de VEGF-A (Magenta *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016). Le miR-217 a été identifié dans les CE vieillissantes. L'inhibition du miR-217 dans des CE sénescents a réduit la sénescence et augmenté leur activité angiogénique par une augmentation de l'activité de SirT1 ; une enzyme stimulant l'angiogénèse via une réduction du stress oxydant (Li *et al.*, 2018).

Les CE représentent une cible importante au stress hyperglycémique induit par le diabète sucré. Il est bien établi que les CE cultivées dans des milieux de culture à haute teneur en glucose présentent une réplication retardée, un cycle cellulaire anormal et une apoptose accrue (Lorenzi, Nordberg et Toledo, 1987; Doyle, Smith et Roth, 1997). Des études transcriptionnelles ont identifié le miR-93 comme régulateur direct du VEGF-A dans l'environnement diabétique des cellules endothéliales rénales (Long *et al.*, 2010).

Caporali *et al.*, ont identifié que l'expression du miR-503 dans les CE est régulée à la hausse dans des conditions imitant le diabète sucré (concentration élevée en D-glucose) (Caporali et Emanuelli, 2011). Dans cette étude, ils ont identifié les protéines CCNE1 (une cycline impliquée dans la progression du cycle cellulaire) et cdc25A (une phosphatase impliquée dans la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire) comme étant des cibles directes du miR-503 qui sont régulées à la baisse par un taux élevé de glucose dans les CE. Le blocage de l'activité du miR-503 améliore

les capacités fonctionnelles des CE cultivées en présence de fortes concentrations de glucose et restaure l'expression du cdc25A et du CCNE1 (Caporali et Emanuelli, 2011).

c) miRs régulés par des chimiokines

Les miRs peuvent également réguler ou être régulés par d'autres facteurs impliqués dans l'angiogenèse et notamment par des chimiokines. Actuellement, aucune donnée de la littérature ne montre l'effet d'une chimiokine sur l'expression de miRs dans les cellules endothéliales. En revanche, il est montré dans le processus d'angiogenèse tumorale que la stimulation d'une lignée cellulaire humaine de chondrosarcome (JJ012) par la chimiokine CCL5 conduit à une diminution importante des miR-507, miR-199a et miR-200b. La diminution de ces miRs dans cette lignée cancéreuse conduit à une augmentation significative de la synthèse de VEGF-A ou de VEGF-C par ces cellules. La stimulation de cellules endothéliales par les milieux conditionnés des cellules JJ012 a conduit à une augmentation significative de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* mais également de la lymphoangiogenèse (Liu *et al.*, 2014, 2015; Wang *et al.*, 2016). De façon similaire, la stimulation de lignées de cellules cancéreuses humaine d'ostéosarcome par la chimiokine CCL3 a conduit à une diminution de l'expression du miR-374b et une augmentation de la synthèse de VEGF-A associée à une augmentation de la migration et la formation de réseaux vasculaire par des progéniteurs endothéliaux (Liao *et al.*, 2016).

Bien qu'aucune étude n'ait montré l'effet de chimiokines sur l'expression de miRs dans les cellules endothéliales, il semble que les miRs eux-mêmes, peuvent induire une modification de la synthèse des chimiokines par les cellules endothéliales. Il est ainsi montré, au cours de la différenciation de cellules souches embryonnaires en cellules endothéliales qu'il y a une diminution de l'expression du miR-7641. Par ailleurs, il est montré qu'une surexpression de ce miR dans des cellules endothéliales matures de type HUVEC conduit à une diminution de l'expression génique et protéique de la chimiokine pro-angiogénique CXCL1 (Yoo *et al.*, 2013). En revanche, l'impact sur l'angiogenèse n'a pas été étudié dans cette étude. Le miR-9-5p stimule l'angiogenèse et réduit l'apoptose et l'inflammation induites par une importante concentration de glucose dans le modèle de cellules endothéliales HUVEC en réprimant la protéine

CXCR4 qui est le récepteur de la chimiokine CXCL12 (Yi et Gao, 2019). Le miR-539-5p a quant à lui diminué la survie de cellules microvasculaires humaines issues de la rétine (HRMEC) et la formation des réseaux vasculaires induite par CXCL12 via la diminution du récepteur CXCR7 (Feng *et al.*, 2018). Des progéniteurs endothéliaux soumis à de l'adénosine ont vu leur taux de miR-150 réduit ainsi qu'une augmentation du CXCR4. Dans ce modèle, la surexpression du miR-150 a diminué la migration des progéniteurs endothéliaux induite par CXCL12 (Rolland-Turner *et al.*, 2013).

Dans le modèle de cellules endothéliales et/ou dans l'angiogenèse, d'autres études (présentées ultérieurement) montrent l'implication du miR-126 dans la modulation de CXCL12. Cependant, aucune autre étude n'a démontré l'implication de miR dans la régulation de l'expression de chimiokines et encore moins l'implication de chimiokines dans la modulation des miRs. En revanche, dans de nombreux modèles de cancer, le lien entre ces deux acteurs peut être établi. Par exemple dans le modèle de cellules U251 de gliome de haut grade, une surexpression du miR-93 est associée à une diminution de l'expression de CXCL8 (Fabbri *et al.*, 2015). Par ailleurs, les miR-561-5p (E.-B. Chen *et al.*, 2019) et miR-590-5p (Hanson *et al.*, 2019) participent respectivement à la formation de métastases issues de carcinome hépatocellulaire ou au développement de la fibrose dans la cirrhose hépatique non alcoolique via l'inhibition de CX₃CL1 (E.-B. Chen *et al.*, 2019) ou de CCL20 (Hanson *et al.*, 2019).

3. miRs dans l'angiogenèse post-ischémique

Les pathologies artérielles périphériques induisent une hypoperfusion tissulaire qui entraîne une ischémie critique des membres (ICM) (Slovut et Sullivan, 2008). Malgré l'amélioration des traitements médicaux de l'athérosclérose et des pathologies associées, ainsi que des techniques interventionnelles et chirurgicales pour améliorer la perfusion des membres, les ICM continuent de comporter un risque majeur d'amputation des membres (Norgren *et al.*, 2007). Les sujets diabétiques sont particulièrement exposés aux pathologies artérielles périphériques et aux ICM. L'ischémie des membres postérieurs de la souris peut être induite expérimentalement par la ligature de l'artère fémorale, et ce modèle est largement utilisé pour étudier les

causes et les interventions thérapeutiques des ICM (Madeddu *et al.*, 2006). La néo-angiogenèse est une réponse importante due aux lésions ischémiques. Dans ce contexte, la manipulation des miRs représente une nouvelle technologie potentiellement capable d'interférer avec la régulation de l'expression de gènes multiples, ouvrant ainsi de nouvelles voies pour la thérapeutique moléculaire. Étant donné que chaque miR a de multiples cibles, l'inhibition de l'expression d'un miR pourrait avoir un impact sur les voies moléculaires complexes régissant les complications ischémiques, augmentant ainsi l'expression et/ou le potentiel d'activité de multiples facteurs de croissance. Récemment, un sous-ensemble de miRs modulés dans un modèle murin d'ischémie des membres postérieurs et de néovascularisation post-ischémique a été identifié (Greco *et al.*, 2009; Grundmann *et al.*, 2011). En particulier, Grundmann *et al.*, ont montré que l'expression du miRNA-100 est significativement inhibée après induction d'une ischémie des membres postérieurs chez la souris. Le miR-100 module la prolifération des CE et la formation de réseaux vasculaires et fonctionne comme un répresseur endogène de la protéine mTOR (Grundmann *et al.*, 2011). Par conséquent, l'inhibition *in vivo* du miR-100 par des antagomiRs spécifiques, a stimulé l'angiogenèse et a entraîné une amélioration fonctionnelle de la perfusion après occlusion artérielle fémorale chez la souris (Grundmann *et al.*, 2011). Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas du miR-92a. La surexpression endothéliale du miR-92a a altéré l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*, tandis que l'inhibition du miR-92a par antagomiR a favorisé la croissance des vaisseaux sanguins et la récupération fonctionnelle des tissus endommagés dans les modèles d'ischémie des membres chez la souris ou d'infarctus du myocarde (Bonauer *et al.*, 2009). De plus, la surexpression de miR-210 à l'aide de vecteurs améliore l'angiogenèse, inhibe l'apoptose et améliore la fonction cardiaque dans un modèle murin d'infarctus du myocarde (Huang et Zuo, 2014). De plus, miR-424 est modulé pendant l'infarctus du myocarde expérimental ou l'ischémie d'un membre dans des modèles de rats. Les données obtenues dans cette étude suggèrent une association physiologique entre l'expression de miR-424 et la réponse post-ischémique dans l'infarctus du myocarde ou l'ischémie d'un membre (Ghosh *et al.*, 2010). En résumé, il est évident qu'un certain nombre de miRs sont modulés par l'ischémie et capables de participer à l'angiogenèse post-ischémique.

D. Les miRs-126

Le miR-126 est un microARN identifié en 2002 comme étant fortement exprimé par les cellules endothéliales (Kuehbacher *et al.*, 2007). C'est en 2009 que sa structure et sa localisation dans le génome ont été identifiés. En effet, il est constitué de 2 brins, le miR-126-3p et son brin complémentaire, le miR-126-5p (Figure 21), qui sont retrouvés au niveau du 7^{ème} intron du gène *egfl7* (*Epidermal Growth Factor Like-domain 7*).

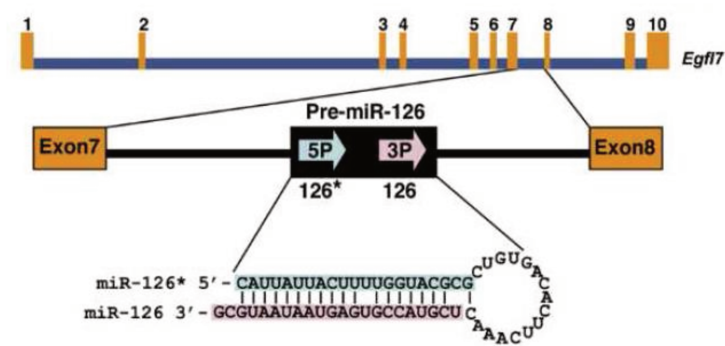


Figure 22. Structure du gène *egfl7* et des miR-126: miR-126-3p/miR-126-5p.

Schéma de la localisation des deux brins du miR-126, le miR-3p et le miR-5p, au niveau du 7^{ème} intron du gène *egfl7* (d'après Wang *et al.*, 2008).

Les fonctions décrites pour ce miR concernent essentiellement le miR-3p (brin guide du duplex 3p/5p) (Figure 21).

1. Fonctions des miR-126

Depuis sa découverte en 2002, la régulation de l'expression des miR-126 est associée à de nombreux processus physiopathologiques. Cependant, les principales données de la littérature sont focalisées sur le miR-126-3p. Bien que fonctionnel, très peu d'études se sont intéressées au miR-126-5p et seule une étude a étudié simultanément le miR-126-3p et le miR-126-5p (Zhou *et al.*, 2016).

a) Le miR-126-3p

Le miR-126-3p a dans un premier temps été décrit comme jouant un rôle dans l'inflammation (Harris *et al.*, 2008), au cours de laquelle une augmentation de l'expression du miR-126-3p dans des HUVEC induit une diminution de l'expression de la protéine Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) et une diminution de l'adhérence leucocytaire induite par le Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α).

Le miR-126-3p est également étudié dans le contexte de l'endométriose (Ohlsson Teague *et al.*, 2009), l'asthme (Mattes *et al.*, 2009), la mucoviscidose (Oglesby *et al.*, 2010), le lupus érythémateux (Zhao *et al.*, 2011) mais également très analysé dans le diabète de type 2 (Zampetaki *et al.*, 2010).

Par ailleurs, le miR-126-3p est très étudié dans les pathologies tumorales et vasculaires. Bien que majoritairement exprimé par les cellules endothéliales (Van Solingen *et al.*, 2009), le miR-126-3p peut être retrouvé dans la presque totalité des tissus et une modulation de son expression est souvent associée à des processus tumoraux.

C'est en 2008 que le miR-126 a été mis en évidence pour la première fois dans le cancer du sein (Tavazoie *et al.*, 2008). Dans cette étude, il est montré qu'il y a une perte de l'expression du miR-126-3p dans le tissu cancéreux comparativement au tissu sain. Lorsque les chercheurs ont restauré l'expression du miR-126-3p, ils ont constaté une diminution du volume des tumeurs et de la croissance tumorale *in vivo* associée à une diminution de la prolifération de cellules *in vitro*. C'est ainsi que le miR-126-3p a été associé comme étant un suppresseur de tumeur dont la perte est associée à un mauvais pronostic d'évolution des pathologies. Depuis, des centaines d'études ont démontré l'implication du miR-126-3p dans l'évolution de pathologies tumorales. Dans un grand nombre de types de cancer, l'expression du miR-126-3p semble abolie dans les tissus tumoraux comparativement au tissu sain. C'est ainsi que le miR-126-3p a été décrit dans le cancer du côlon (Li *et al.*, 2011), les cancers du poumons (Miko *et al.*, 2011), cancers du pancréas (Hamada *et al.*, 2012) ou encore les carcinomes hépatocellulaires (Hu *et al.*, 2016). Dans toutes ses études, une surexpression du miR-126-3p conduit à une diminution de la prolifération, de la migration et de l'invasion des

cellules tumorales. L'une des stratégies existantes pour la lutte contre l'évolution des cancers est de cibler le processus d'angiogenèse tumorale afin de réduire l'apport en oxygène et en nutriments des cellules cancéreuses et déclencher leur apoptose.

Dans ce contexte, le miR-126-3p semble être un bon outil afin d'inhiber l'angiogenèse tumorale. Il a été démontré qu'une surexpression du miR-126-3p réduit la synthèse et la sécrétion de VEGF-A (Zhu *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2016) par les cellules cancéreuses. L'ARNm du VEGF-A est ainsi décrit dans ces modèles comme étant une cible directe du miR-126-3p. Par ailleurs, lorsque des milieux conditionnés de cellules cancéreuses surexprimant le miR-126-3p sont mis en présence de cellules endothéliales HUVEC, les chercheurs ont constaté une diminution importante de la formation des réseaux vasculaires.

Lorsque le miR-126 est surexprimé dans des cellules cancéreuses, il semble présenter des propriétés anti-angiogéniques. En revanche, son rôle dans la régulation de processus angiogénique physiologique est différent. En effet, le miR-126-3p semble être un acteurs anti-angiogénique dans le contexte tumoral, alors que dans les CE, il semble agir comme un facteur pro-angiogénique.

b) Le miR-126-5p

Lors de la biosynthèse des miRs, le miR-126-5p est considéré comme étant le brin passager du miR-126-3p. Dans une grande majorité des cas, seul un brin du duplex de miR est fonctionnel. Toutefois, bien que très faiblement exprimé en comparaison au miR-126-3p, le miR-126-5p demeure fonctionnel et joue un rôle dans la régulation de processus biologiques. Le miR-126-5p est décrit de façon générale comme jouant un rôle dans la régulation du processus tumoral. C'est en 2008 que les premiers travaux sur ce brin ont été réalisés. Dans cette étude, il est montré que les cellules cancéreuses de la prostate sont naturellement déficientes en miR-126-5p, cela étant sans doute dû à une faible expression du gène *Egfl7* dans ces tissus (Musiyenko, Bitko et Barik, sans date). Lorsque les chercheurs ont induit l'expression du miR-126-5p dans ces tissus, ils ont remarqué une répression de la prostéine (protéine impliquée dans le processus tumorigénique de la prostate) associée à une diminution de la

prolifération et de la migration des cellules cancéreuses comparativement aux cellules non transfectées. Cette étude souligne pour la première fois la fonctionnalité du brin passager du duplex miR-126-3p/miR-126-5p. Une faible expression du miR-126-5p est également associée à un mauvais pronostic dans l'évolution de cancer colorectal (Jinushi *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2019). En effet, une surexpression du miR-126-5p dans des cellules de cancer colorectal permet de réduire la taille des tumeurs en ciblant la protéine SMC4.

Depuis, le miR-126-5p est étudié dans d'autres processus cellulaires comme la différenciation ostéoclastique (Wu *et al.*, 2014) via l'inhibition de la MMP-13 ; la régulation de l'adhésion et de la transmigration leucocytaire via la répression des protéines SetD5 et ALCAM (Poissonnier *et al.*, 2014) ou encore une implication dans le cancer cervical en ciblant la protéine bcl212 (C. Wang *et al.*, 2017).

De plus, de manière intéressante, le miR-126-5p comme son brin complémentaire, semble être impliqué dans la régulation de physiopathologies vasculaires. En 2014 et 2017, le miR-126-5p est ainsi décrit comme un outil prometteur dans le traitement de l'hyperplasie intimale. Une injection de miR-126-5p chez la souris a permis de diminuer l'hyperplasie intimale via une diminution de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses en ciblant la protéine Dlk1 ; une protéine dont le rôle est d'inhiber la prolifération des CE (Schober *et al.*, 2014; Zhou, Schober et Nazari-Jahantigh, 2018; Z. Chen *et al.*, 2019)

En revanche, peu d'études ont démontré l'implication du miR-126-5p dans la régulation du processus angiogénique. C'est pourquoi, au cours de mes travaux de thèse, je me suis intéressé simultanément au rôle des deux brins miR-126-3p et miR-126-5p dans la régulation du processus d'angiogenèse.

2. miR-126 et pathologies ischémiques

Les maladies cardiovasculaires constituent l'une des premières causes de mortalité dans les pays développés. Dans le cadre de pathologies ischémiques, le miR-126 et plus particulièrement le miR-126-3p a démontré des propriétés sur la ré-

endothélialisation. En effet, il a été montré que des microparticules endothéliales contenant du miR-126-3p peuvent stimuler la prolifération et la migration de cellules HCAECs. En revanche, l'inhibition de l'expression du miR-126-3p dans ces microparticules altère leur effet pro-migratoire et pro-prolifératif. De plus, *in vivo*, dans le modèle d'ischémie de la patte chez la souris, l'injection de microparticules dépourvues de miR-126-3p a inhibé la ré-endothélialisation post-ischémique (Jansen *et al.*, 2013). De façon similaire, les cellules souches mésenchymateuses enrichies en miR-126-3p et injectées dans la patte de souris ischémisée, permettent d'augmenter la réponse angiogénique post-ischémique en augmentant la densité capillaire via l'augmentation de la voie de signalisation pro-angiogénique ERK1/2 (Chen et Zhou, 2011).

Par ailleurs, des cellules endothéliales progénitrices enrichies en miR-126-3p présentent une migration plus importante vers les zones ischémisées *in vivo* et cela serait dû à une augmentation de l'expression du récepteurs CXCR4 à la surface de ces cellules (Wang *et al.*, 2018).

Cependant, dans les pathologies vasculaires, le niveau d'expression du miR-126-3p est souvent diminué dans le plasma des patients (Chen, Xu et Yang, 2017; Qu *et al.*, 2017). Ainsi le miR-126-3p semble être un bon candidat dans le traitement des pathologies ischémiques et la compréhension de ces mécanismes d'action visant la stimulation de l'angiogénèse est nécessaire pour son utilisation thérapeutique.

3. miR-126-3p et miR-126-5p dans l'angiogénèse

Le rôle potentiel du miR-126 dans l'angiogénèse a été identifié en 2007 (Kuehbach *et al.*, 2007). Dans cette étude, il est montré que l'expression des protéines Dicer et Drosha dans les CE est essentielle pour la fonction angiogénique de ces cellules. Par ailleurs, il est montré dans cette même étude que lorsque ces protéines sont inhibées par des petits ARN interférents (siRNA), il y a une modulation importante des miRs exprimés par ces cellules. En effet, lorsque les protéines Dicer et Drosha sont inhibées, il y a une diminution de l'expression du miR-126-3p de 83% et 54% respectivement. Ces résultats ont donc suggéré à la fois l'implication de miR dans

l'angiogenèse mais également l'implication du miR-126-3p dans la régulation de ce processus. C'est en 2008 qu'il est démontré pour la première fois l'effet du miR-126-3p sur l'angiogenèse et l'intégrité vasculaire (Wang *et al.*, 2008). Dans cette étude, il est montré que des souris miR-126^{-/-} présentent des défauts de formation des vaisseaux sanguins au cours du développement embryonnaire associés à d'importantes hémorragies (Figure 22).

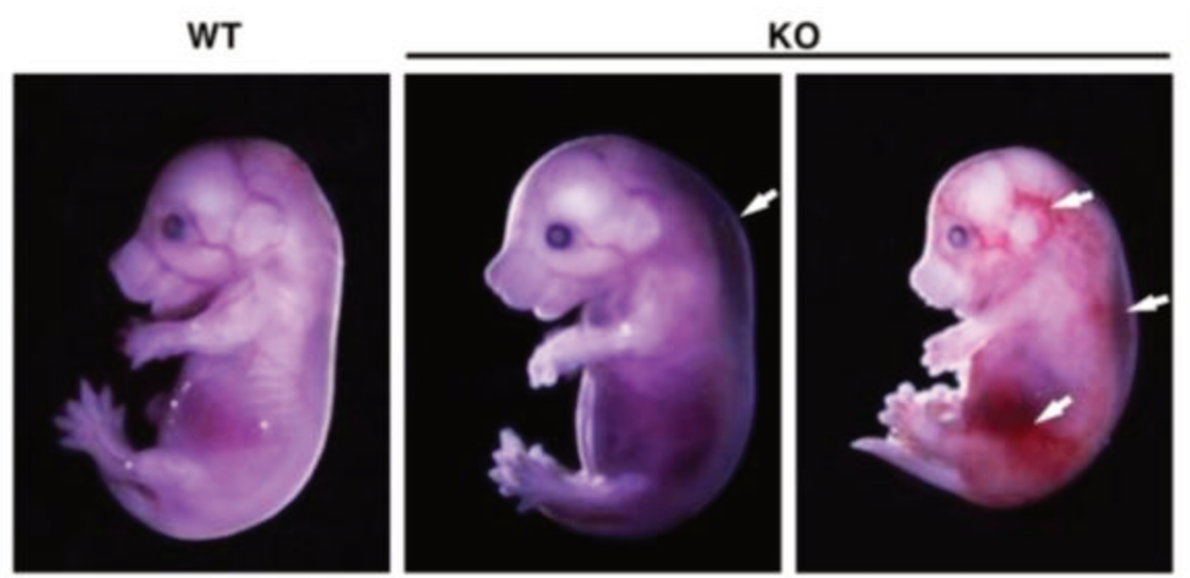


Figure 23. Le miR-126 est indispensable au développement vasculaire chez la souris.

Des souris invalidées pour le miR-126 présentent d'importants défauts vasculaires au cours du développement. Ces souris présentent de nombreux oedèmes et des zones hémorragiques (flèches blanches) (Wang *et al.*, 2008).

Par ailleurs, ces souris présentent une létalité très importante. Pour celles qui arrivent à la fin de leur développement, elles présentent de gros défauts de structure au niveau des vaisseaux sanguins. En effet, les aortes prélevées sur les souris miR-126^{-/-} déposées sur Matrigel présentent une diminution du bourgeonnement par les cellules endothéliales comparativement aux aortes des souris sauvages. De plus, dans cette étude, il est montré l'implication du miR-126-3p sur des cellules endothéliales HUVEC *in vitro*. Une diminution de l'expression du miR-126-3p, par un antagomiR a induit une diminution de la prolifération, de la migration et de la formation de réseaux vasculaires par les cellules HUVEC.

Afin de comprendre comment l'absence de miR-126-3p pouvait induire ces effets biologiques, les chercheurs se sont intéressés aux voies de signalisation induites par deux facteurs pro-angiogéniques bien connus que sont le VEGF-A et le FGF. C'est ainsi qu'il est montré qu'en absence de miR-126-3p, il y a une diminution importante de la phosphorylation de la MAPK ERK1/2 nécessaire à l'activation de cette voie de signalisation en réponse à ces stimuli pro-angiogéniques. En revanche, une surexpression du miR-126-3p dans les HUVEC montre des résultats contraires en augmentant l'activation des voies de signalisation induites par le VEGF-A et le FGF comparativement aux cellules non transfectées.

Il semble ainsi que le miR-126-3p peut modifier l'état de phosphorylation des voies MAPK-ERK1/2. En réalisant des études *in silico* basées sur le potentiel pouvoir d'hybridation d'un miR à un ARNm, les chercheurs de cette étude ont identifié la protéine SPRED-1 comme étant une cible du miR-126-3p. SPRED-1 est une protéine cytosolique impliquée dans la répression de la phosphorylation de ERK1/2 via l'inhibition de la petite protéine G Ras située en amont de la voie de signalisation (Yoshida *et al.*, 2006). Il est ainsi montré qu'une surexpression du miR-126-3p conduit à une répression de l'expression de la protéine SPRED-1 dans le modèle de cellules HUVEC. De plus, l'inhibition de la protéine SPRED-1 par un siRNA conduit à une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales. Enfin, les chercheurs ont démontré que l'inhibition de SPRED-1, induite par le miR-126-3p, permet de stimuler la voie ERK1/2 induite par le VEGF-A ou le FGF. En effet, la transfection simultanée avec un siRNA anti-SPRED-1 ou avec un antagomiR-126-3p a permis de lever l'inhibition de la prolifération des cellules HUVEC induite par l'antagomiR-126-3p seul. Dans une autre étude, dans le modèle du poisson zèbre et de cellules endothéliales HUVEC, le miR-126-3p semble nécessaire au développement de la vasculature au cours du développement embryonnaire mais également à l'angiogenèse *in vitro* (Fish *et al.*, 2008). Cette fois-ci, en plus de l'implication de la protéine SPRED-1, les chercheurs ont mis en évidence l'implication de la protéine PI3KR2/p85 β dans la régulation de l'angiogenèse induite par le VEGF-A et le miR-126-3p. PI3KR2/p85 β est une sous-unité régulatrice de la protéine PI3K. Son inhibition conduit à l'activation de PI3K et à la phosphorylation de la protéine Akt (Cuevas *et al.*, 2001). La surexpression du miR-126-3p conduit à une inhibition de la protéine PI3KR2/p85 β et permet une

phosphorylation de la protéine Akt plus importante après induction par le VEGF. De façon similaire, il est montré au cours du développement chez le poisson zèbre, qu'en absence de miR-126-3p, il y a inhibition des voies de signalisation de l'angiopoïétine 1 (Sessa *et al.*, 2012). Dans cette étude, l'absence de miR-126-3p ou l'inhibition des fonctions de l'angiopoïétine chez le poisson zèbre, conduit à un phénotype similaire avec une altération de la maturation des vaisseaux. De plus, dans des CE de la veine saphène (Qu *et al.*, 2017) enrichies en miR-126-3p, on augmente la prolifération, la migration et la formation de réseaux vasculaires par ces cellules. Par ailleurs, lorsque le miR-126-3p est surexprimé dans ces cellules, il y a également une diminution de l'expression de SPRED-1 et de PI3KR2/p85b, ainsi qu'une augmentation des formes phosphorylées des protéines ERK1/2 et Akt. En revanche, l'inhibition de l'expression du miR-126-3p dans ces cellules aboutit à une inhibition de leur prolifération, de leur migration mais également de la formation de réseaux vasculaires associée à une augmentation de l'expression des protéines SPRED-1 et PI3KR2/p85b et à une diminution des formes phosphorylées des protéines ERK1/2 et Akt.

En conclusion, le miR-126-3p est un bon acteur intracellulaire permettant la régulation du processus physiologique qu'est l'angiogenèse (Chistiakov, Orekhov et Bobryshev, 2016).

Concernant le miR-126-5p, deux études ont montré son implication dans l'angiogenèse. Il est ainsi montré que l'effet pro-angiogénique de la *Bone Morphogenic Protein* sur des cellules HUVEC résulte d'une augmentation de l'expression du miR-126-5p responsable d'une inhibition de la thrombospondine-1 qui est une protéine anti-angiogénique (Esser *et al.*, 2017). De plus, une déficience en miR-126-5p dans des cellules ganglionnaires rétiniennes est associée à un défaut de maturation de la vascularisation rétinienne au cours du développement chez la souris (Villain *et al.*, 2018).

A ce jour, peu d'études ont étudié simultanément le rôle du miR-126-3p et du miR-126-5p dans la régulation du processus angiogénique. Seule l'étude menée par Zhou *et al* en 2016 s'est intéressée à l'étude de ces deux miRs en parallèle. Cette étude présente l'implication des deux brins du miR-126 dans un contexte particulier qui est

la néovascularisation de la choroïde induite au laser. Comme l'ont décrit les auteurs, il s'agit d'un bon modèle de néovascularisation retrouvée dans les pathologies liées à la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou encore la rétinopathie diabétique. Il ne s'agit en aucun cas d'un modèle d'étude de l'angiogenèse dans des conditions physiologiques. Par ailleurs, dans cette étude, les miR-126-3p et miR-126-5p ne sont pas toujours étudiés en parallèle. De plus, lorsque c'est le cas, seuls les effets induits par une surexpression ou une diminution de leur expression sont présentés. Dans ce contexte, après injection au niveau de la rétine de souris C57BL/6J d'un anti-miR-126-3p ou d'un mimétique du miR-126-3p, il y a une diminution de la néovascularisation de la choroïde induite au laser. En revanche, la surexpression ou l'inhibition du miR-126-5p ne semble pas avoir d'effet.

Le rôle direct d'une modulation de ces deux miRs dans les cellules endothéliales n'est clairement pas établi dans cette étude et nécessite d'être étudié.

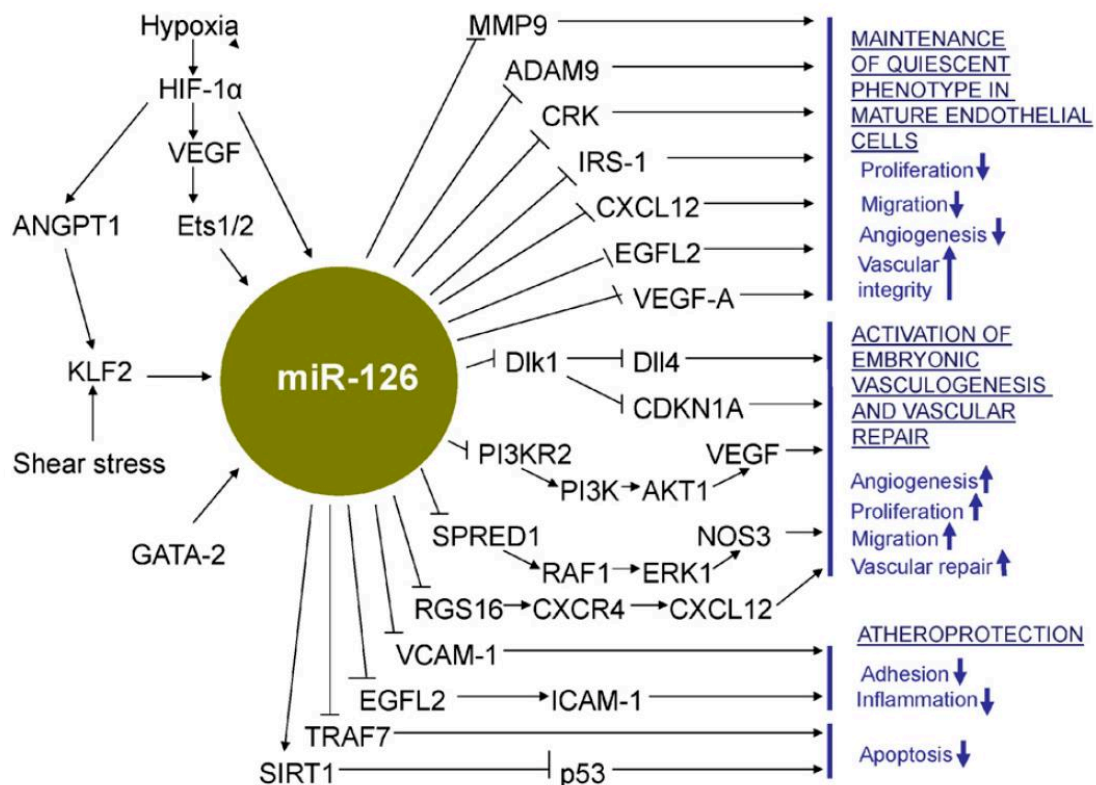


Figure 24. Le miR-126 régule un ensemble de processus physiologique.

E. Implication des miRs dans la modulation d'expression et les modifications des GAG

Les GAG sont des polysaccharides présents dans les cellules, à leur surface ou dans la MEC. La présence de ces GAG procure une protection aux cellules. La littérature portant sur le rôle de miR dans l'expression et la modification des GAG est assez pauvre. Les rares liens que l'on peut faire concerne l'implication des miRs dans la modulation d'expression de protéoglycannes. Il est ainsi montré que le miR-125a inhibe la croissance cellulaire des cellules HEK293T en ciblant le glypican-4. Cela a réduit la signalisation induite par le FGF et inhibé la phosphorylation des protéines ERK1/2 et Akt (Feng *et al.*, 2012). Dans le modèle de cellules de carcinome hépatocellulaire Huh7, le miR-96 inhibe l'expression du glypican-3 (Jalvy-Delvaile *et al.*, 2012). Dans ce même modèle de carcinome hépatocellulaire, le miR-520c-3p inhibe la prolifération de cellules Huh7 et HepG2 par induction de l'apoptose et en ciblant le glypican-3 (Miao *et al.*, 2014). Toujours dans le contexte tumoral, le miR-10b stimule la prolifération et l'invasion de cellules du cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7 en ciblant le syndécanne-1 (Ibrahim *et al.*, 2012).

Concernant la modification des GAG, bien que le lien ne soit pas parfaitement établi dans les études, il est montré que le miR-21 inhibe la sulfatase-1 dans le modèle de carcinome hépatocellulaire et conduit à une hyperactivation des voies ERK et Akt et favorise la transition épithélio-mésenchymateuse ainsi qu'une augmentation de la croissance tumorale après xénogreffe de tumeurs chez la souris (Bao *et al.*, 2013). De plus, dans le modèle de neuroblastomes, miR-558 stimule la tumorigenèse et l'agressivité des cellules tumorales via l'activation de la transcription de l'héparanase et de ces gènes cibles comme le VEGF notamment (Qu *et al.*, 2015).

Dans le modèle de cellules endothéliales, seules deux études ont montré l'implication de miR dans l'expression et/ou la modification de GAG ou protéoglycannes. C'est ainsi que Kasza *et al* (Kasza *et al.*, 2013) ont démontré qu'une surexpression du miR-24 dans les cellules HUVEC conduit à une diminution de l'expression de NDST1 réduisant ainsi la réponse pro-migratoire des HUVEC en réponse au VEGF-A mais également une modification de la structure des chaînes héparanes et chondroïtines sulfate. En

effet, la diminution de l'expression de NDST1 (enzyme de la modification de sulfatation des GAG) est responsable d'une modification du taux et de la position des groupements sulfates portés par les GAG entraînant une diminution de l'affinité de ces chaînes GAG pour le VEGF et de la signalisation ERK et Akt en aval via une diminution de l'activation du récepteur au VEGF (KDR). Ces modifications ont conduit à une diminution de la migration des cellules HUVEC induites par un gradient chimiotactique de VEGF. Enfin, notre équipe a montré qu'une surexpression du miR-126-3p dans les cellules HUVEC conduit à une augmentation de l'expression du syndécanne-4 (Mondadori dos Santos *et al.*, 2015).

Les miRs modulent donc l'expression de protéoglycannes ainsi que la composition structurale des GAG. La littérature étant très pauvre sur le sujet dans le modèle de cellules endothéliales, d'autres investigations sont nécessaires afin d'établir d'éventuelles pistes thérapeutiques à base de miRs visant la restauration des GAG dégradés au cours de l'ischémie afin de rétablir un endothélium de bonne qualité.

Au cours de ma thèse, me basant sur des études *in silico*, je me suis intéressé au potentiel rôle du miR-126-3p dans la régulation de l'expression des GAG et en particulier dans l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse et la modification de ces GAG.

V. Résumé – But des travaux de thèse

Les pathologies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité dans les pays développés. Parmi elles, l'athérosclérose, due à une dysfonction endothéliale, conduit dans les phases ultimes de son développement à la formation d'une plaque d'athérome. Au cours du temps, la taille de la plaque d'athérome évolue au sein des artères et mène à une diminution de la lumière artérielle et ainsi une perturbation du flux sanguin. Lorsque cette plaque est fragilisée, elle peut se détacher de la paroi artérielle (rupture de plaque), circuler dans des artères et enfin être bloquée dans des artéioles allant jusqu'à obstruer ces dernières provoquant l'arrêt de la circulation sanguine.

Cette obstruction entraîne une diminution importante du taux de dioxygène mais également une réduction de l'apport en nutriments aux tissus situés en aval de l'obstruction conduisant ainsi à ce que l'on appelle l'ischémie. Si elle n'est pas traitée, l'ischémie entraîne la mort des tissus touchés par nécrose pouvant ainsi entraîner l'amputation d'un membre (si l'obstruction est localisée aux niveaux des membres supérieurs ou inférieurs) mais également la mort d'un individu selon la localisation ischémique (arrêt cardiaque, accident vasculaire-cérébral...).

En situation d'ischémie, la pression partielle en dioxygène est perçue par les cellules endothéliales qui vont en réponse déclencher un processus d'angiogenèse.

L'angiogenèse est un processus physiologique de formation de néo vaisseaux à partir de ceux préexistant. En situation d'ischémie, la stimulation de ce processus est nécessaire afin de restaurer une vascularisation normale et assurer l'apport métabolique nécessaire aux tissus.

Ce processus physiologique est sous le contrôle de facteurs pro-angiogénique parmi lesquels on retrouve des microARNs (miRs).

Les miRs, sont de petits ARN non codants, synthétisés par les cellules, impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. En se fixant à un ARNm cible, ils induisent la dégradation ou une répression de la traduction de cet ARN en protéine. Les miRs sont impliqués dans une grande diversité d'effets biologique et notamment l'angiogenèse. Parmi eux, le miR-126 est la résultante de la maturation d'un précurseur double brin de miR appelé prémiR constitué du miR-126-3p/miR-126-5p. Le rôle du miR-126 dans

l'angiogenèse et notamment du miR-126-3p est bien connu dans l'angiogenèse. Bien que les deux brins du miR-126 soient fonctionnels, aucune étude ne s'est intéressée simultanément aux rôles du miR-126-3p et du miR-126-5p dans l'angiogenèse.

D'autres facteurs comme les chimiokines peuvent également stimuler le processus d'angiogenèse

Les chimiokines, et en particulier CXCL12 (SDF-1 α), peuvent être surexprimées par les cellules endothéliales en situation ischémique. En se liant à ses récepteurs spécifiques ou corécepteurs et notamment des protéoglycannes à chaînes héparanes sulfates (PGHS), elle stimule le processus d'angiogenèse via l'activation de voies de signalisation pro-angiogénique, comme la voie des MAPK ERK1/2. En situation d'ischémie, le glycocalyx endothélial est endommagé et des études ont démontrées l'importance des PGHS dans la stimulation de l'angiogenèse. En revanche, l'importance des GAG dans la stimulation de l'angiogenèse induite par CXCL12 demeure inconnue.

Enfin, la régulation de l'expression des miRs peut être modulée par des chimiokines. Bien qu'un lien entre miRs-chimiokines et angiogenèse tumorale ait pu être fait, aucune étude ne s'est encore intéressée aux rôles des chimiokines dans l'expression des miRs par les cellules endothéliales et la conséquence sur la régulation du processus d'angiogenèse. De plus, il semble que les miRs peuvent être impliqués dans l'expression des GAG et qu'ils peuvent jouer un rôle dans la qualité des chaînes HS. Ainsi le développement de l'outil miRs pourrait être une bonne stratégie pour la restauration du glycocalyx endothéliale endommagé durant l'ischémie.

Mes travaux de thèse se sont divisés en deux parties schématisées sur la figure 24. La première partie a consisté en l'étude de l'implication des deux brins de miR-126, miR-126-3p et miR-126-5p dans la stimulation de l'angiogenèse induite par CXCL12. Dans une deuxième partie, je me suis intéressé à l'importance des GAG dans le processus d'angiogenèse induit par CXCL12.

A. Concernant la première partie, les points suivants ont été étudiés :

1-Rôle de la chimiokine **CXCL12** sur **l'expression du miR-126** dans le modèle de cellules HUVEC et d'aortes de rats.

2-Implication de CXCL12 dans **l'activation du promoteur du gène codant pour le miR-126** dans le modèle de cellule *in vitro*.

3-Etude simultanée de l'implication des miR-126-3p et miR-126-5p dans le processus de **migration** (en chambre de Boyden) et **d'angiogenèse *in vitro*** (dans le modèle d'angiogenèse en 2D sur matrigel) et ***ex vivo*** (dans le modèle de bourgeonnements d'anneaux aortiques de rats). Ensuite, le rôle de ces deux miRs dans le processus de migration et d'angiogenèse *in vitro* et *ex vivo*, induit par CXCL12, a été étudié.

4-Pour confirmer le lien entre CXCL12 et miR-126, l'effet de CXCL12 sur l'expression de SPRED-1 (une cible connue du miR-126 impliquée dans l'angiogenèse) dans les cellules HUVEC a été étudié.

5-Pour finir, j'ai analysé l'implication de SPRED-1 dans la formation de réseaux vasculaires *in vitro* induite par CXCL12.

Ces travaux font l'objet d'une publication en cours de révision, soumise dans le journal *Molecular Therapy* (ATVB, IF=8.402).

B. Concernant la seconde partie, les points suivants ont été traités :

1-Rôles des GAG dans la migration des cellules HUVEC et dans l'angiogenèse *in vitro* et *ex vivo* induite par CXCL12.

2-Effet de l'absence de GAG dans la stimulation de la voie de signalisation pro-angiogénique MAPK-ERK1/2 dans les cellules HUVEC induite par CXCL12.

Ces travaux ne sont pas terminés et feront l'objet d'une future publication en cours de préparation à soumettre dans le journal *Molecular Therapy (Mol Ther, IF=8.402)*.

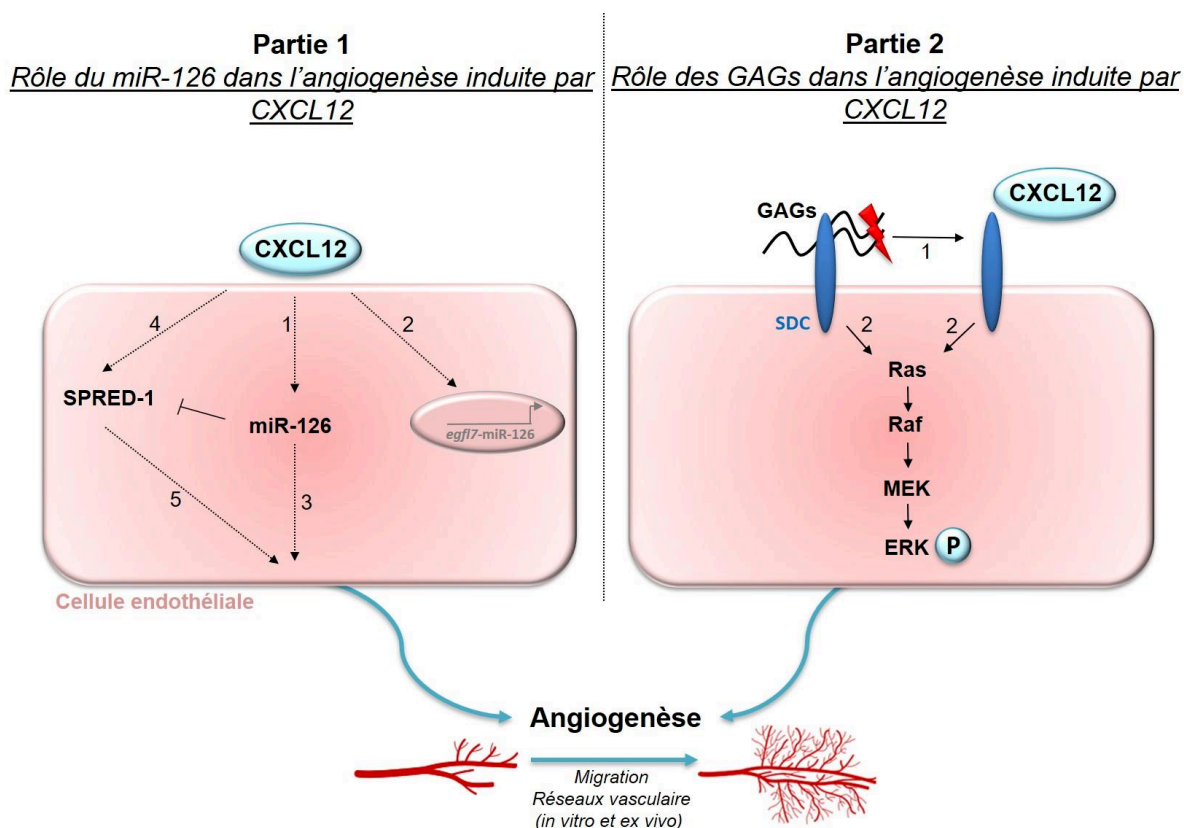


Figure 25. But des travaux de thèse.

Partie 1. (1) L'effet de CXCL12 sur l'expression du miR-126 a été étudié par qRT-PCR. (2) L'effet de CXCL12 sur l'activation du promoteur du miR-126 a été analysé en utilisant la méthode du *luciferase assay*. (3) L'implication simultanée des miR-126-3p et miR-126-5p dans l'angiogenèse induite par CXCL12 a été étudié dans un modèle de migration de cellules HUVEC en chambre de Boyden et dans la formation de réseaux vasculaire *in vitro* sur matrigel et *ex vivo* à partir de bourgeonnement d'anneaux aortiques de rats. (4) L'effet de CXCL12 sur l'expression de la protéine SPRED-1 a été étudié par la technique du Western Blot. (5) L'implication de SPRED-1 dans la formation de réseaux vasculaires *in vitro* induite par CXCL12 a été analysé en utilisant la stratégie d'ARN interférence.

Partie 2. (1) L'absence de GAG dans la migration et l'angiogenèse *in vitro* et *ex vivo* a été étudiée en utilisant un inhibiteur de l'élongation des GAG (β -DX). (2) L'implication des GAG dans l'activation de la voie de signalisation pro-angiogénique ERK1/2 a été analysée par western blot.

RÉSULTATS



Article 1. *CXCL12 induced angiogenesis through miR-126-3p/SPRED-1 pathway stimulation.*

Résumé :

Les maladies cardiovasculaires font parties des principales causes de décès dans les pays développés. Parmi elles, l'athérosclérose, au stade ultime de son développement, provoque une obstruction partielle ou totale des vaisseaux sanguins entraînant une ischémie. Pour rétablir une vascularisation normale, une stimulation de l'angiogenèse est nécessaire. Dans ce contexte, certaines chimiokines et certains microARNs (miRs) ont été étudiés comme molécules pro-angiogéniques. Ainsi, nous avons analysé l'axe miR-126 ⇔ CXCL12 et comparé l'effet du miR-126-3p et du miR-126-5p dans l'angiogenèse induite par CXCL12. Ces deux brins du miR-126 sont fonctionnels mais n'ont jamais été comparés simultanément de l'angiogenèse.

Le processus angiogénique a été étudié en analysant la formation de réseaux vasculaires par des cellules endothéliales humaines (HUVEC) *in vitro*, dans le modèle d'angiogenèse en 2 dimensions sur Matrigel et *ex vivo*, en analysant le bourgeonnement des cellules endothéliales d'anneaux aortiques chez le rat. En parallèle, la migration des HUVEC a été étudiée en chambre de Boyden.

Premièrement, nous avons montré pour la première fois que la CXCL12 induit l'expression du miR-126-3p dans les HUVEC *in vitro* et dans les aortes de rats *ex vivo*. Par ailleurs, nous avons montré que le miR-126-3p est nécessaire à la formation de réseaux vasculaires et la migration induite par CXCL12. Enfin, nous avons observé que SPRED-1 (l'une des cibles connues de miR-126-3p) a été inhibée après une stimulation des cellules HUVEC par CXCL12 et cette inhibition permet d'améliorer le potentiel pro-angiogénique de CXCL12 *in vitro*.

Pour conclure, j'ai démontré dans cet article pour la première fois :

- 1- le rôle de CXCL12 dans la modulation de l'expression du miR-126 ;**
- 2- l'implication du miR-126 dans les effets pro-angiogéniques de CXCL12 ;**
- 3- la participation de SPRED-1 dans l'angiogenèse induite par l'axe CXCL12 ⇔ miR-126.**

Title: CXCL12 induced angiogenesis through miR-126-3p/SPRED-1 pathway stimulation.

BASSAND, K¹; METZINGER, L²; MOUHOUBI, N¹; HADDAD, O¹; ASSOUN, V¹; ZAÏDI, N¹; SAINTE-CATHERINE, O¹; BUTT, A¹; NAÏM, M¹; LAGUILLIER-MORIZOT, C^{1,3}; GUYOT, E^{1,3}; OUDAR, O¹; SUTTON, A^{1,3}; CHARNAUX, N^{1,3}; METZINGER-LE MEUTH, V¹; HLAWATY, H^{1*}.

Authors affiliations

1. Laboratory for Vascular Translational Sciences, INSERM U1148, Université Paris XIII, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

2. EA-4666 HEMATIM, Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), Université de Picardie Jules Verne, CHU-Amiens-Picardie, Amiens, France.

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

Running Title: CXCL12 induces angiogenesis via miR-126/SPRED-1 pathway

*Corresponding Authors : 74 rue Marcel Cachin, UFR SMBH, INSERM U1148, Bureau 224, 93000 Bobigny (FRANCE): hanna.hlawaty@univ-paris13.fr; phone number : 0148388518

Keywords: miRNA, Angiogenesis, Chemokines, miR-126, CXCL12, SPRED-1

Subject codes: Angiogenesis, Cell signaling/signal transduction, Endothelium, Vascular Biology.

Word count: 6512

Total number of figures:

TOC category: Basic

TOC subcategory: Vascular Biology

Abstract:

Objective: Cardiovascular diseases are the major cause of death in developed countries. Among them, atherosclerosis, in the ultimate stage of its development, causes partial or total obstruction of the vessels leading to ischemia and cardiovascular disease. To restore normal vascularization, angiogenesis stimulation is necessary. In this context, some chemokines and microRNAs have been studied as proangiogenic molecules. Thus, we studied the axis miR-126 \leftrightarrow CXCL12 and also compared the miR-126-3p and miR-126-5p in CXCL12 induced angiogenesis as the two strands were shown to be active but were never compared in regard to their differential functions during angiogenesis.

Approach and Results: Angiogenesis process was studied in 2D-angiogenesis and migration assay in HUVEC *in vitro* and rat's aortic rings spouting *ex vivo* transfected with premiR-126-3p/-5p or antimiR-126-3p/-5p and stimulated or not with CXCL12. Firstly, we showed that CXCL12 had proangiogenic effect both *in vitro* and *ex vivo* associated with overexpression of miR-126-3p in HUVECs and rat's aortas. Secondly, we evidenced that migration and 2D-angiogenesis induced by CXCL12 was abolished in HUVEC *in vitro* and on rat's aortic rings *ex vivo* after miR-126-3p inhibition. Finally, we observed that SPRED-1 (one of miR-126-3p known targets) was inhibited after CXCL12 on HUVECs and led to improve CXCL12 proangiogenic potential *in vitro*.

Conclusions: Our results presented for the first time: 1-a role of CXCL12 in the modulation of miR126 expression; 2-the involvement of miR-126 in the proangiogenic effects of CXCL12; 3-the involvement of SPRED-1 in angiogenesis induced by axis CXCL12 \leftrightarrow miR-126.

Introduction

Atherosclerosis is a vascular pathology leading to partial or total obstruction of the blood vessels. This obstruction leads to a disruption of blood flow resulting in a decrease in oxygen and nutrient supply, also called ischemia. Without adequate management, ischemia leads to tissue necrosis leading to the cessation of functions of the affected tissue and ultimately to their death. In order to prevent this necrosis, angiogenesis stimulation needs to be performed. Angiogenesis is a biological process that allows new vessels to be formed from pre-existing ones. This process involves endothelial cells that respond to certain stimuli by proliferating, migrating and then creating interactions between them to form functional vessels. In an ischemic context, the decrease in oxygen supply allows the synthesis of proangiogenic factors secreted by adjacent endothelial cells in order to stimulate angiogenesis. Among these factors, there are growth factors such as Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A or Fibroblast Growth Factor (FGF)-2, which, in combination with their tyrosine kinase receptors, induce intracellular signaling to stimulate angiogenesis. In addition to these growth factors, other molecules called chemokines are also secreted in ischemic areas. Chemokines are small soluble proteins belonging to the family of chemoattractant cytokines, involved in vascular inflammatory processes including leukocyte recruitment. In addition to their role in inflammation, chemokines may also be involved in angiogenesis¹. CXCL12 (SDF-1) synthesis and secretion in ischemic areas allows the recruitment of endothelial progenitor cells in injured vascular areas to reform a healthy endothelium². In addition to its chemo attractive role, CXCL12 can locally stimulate angiogenesis by binding to specific seven transmembrane domains receptors coupled to G proteins such as CXCR4 or CXCR7. By binding to its receptors, CXCL12 allows the induction of signaling pathways known to be involved in angiogenesis such as the MAPK ERK1/2 pathway³.

Proangiogenic signaling pathways can also be stimulated by modulation of microRNA expression⁴. MicroRNAs (miRNAs) are small, single-stranded, non-coding RNAs involved in

gene expression regulation. By binding to a targeted mRNA, they induce the degradation of this mRNA or a repression of its translation into protein⁵. miRNAs have been extensively studied in angiogenic processes in recent years. Indeed, in angiogenesis, three classes of miRNAs could be dissociated: proangiogenic miRNAs, anti-angiogenic miRNAs and miRNAs with a dual role⁶. Among these miRNAs, miR-126, strongly expressed in endothelial cells, has been shown to be involved in angiogenic processes^{7,8}. In some miRNA species, including miR-126, both the passenger strand and active strand have been shown to have biological effects, complicating the biological interpretation, of miRNA modulation⁹. The proangiogenic role of miR-126-3p has been extensively studied. Indeed, it is implicated in the ERK1/2 signaling pathway induced by VEGF-A by a repression of the protein SPRED-1¹⁰ whose role is to repress the expression of the small protein G Ras¹¹. Although mainly degraded, miR-126-5p has also demonstrated a proangiogenic role *in vitro* but also a role in reducing intimal hyperplasia *in vivo* by stimulating the proliferation of endothelial cells¹². In endothelial cells, a link between miR-126-3p and chemokine CXCL12 has been demonstrated¹³. Indeed, overexpression of miR-126 leads to an increase in protein expression of CXCR4 and CXCR7, both receptors for CXCL12¹⁴. Finally, an inhibition of miR-126 leads to an increase in the synthesis of CXCL12 by endothelial cells¹³.

Our study consists in the simultaneous analysis of the proangiogenic effects of miR-126-3p and miR-126-5p to determine whether the modulation of their expression is involved in angiogenesis induced by chemokine CXCL12.

Materials and Methods

Cell culture

Human umbilical vascular endothelial cells : HUVEC (ATCC® CRL-1730TM) were cultured in endothelial cell basal medium 2 (ECBM2, ref C22211, Promocell) and supplemented with 12% of Foetal Bovine Serum, 5 ng/mL Epidermal Growth Factor (EGF), 0.2 µg/mL hydrocortisone, 0.5 ng/mL VEGF, 10 ng/mL bFGF (basic FGF), 20 ng/mL Insulin like Growth Factor (IGF-1), 1 µg/mL ascorbic acid and 100 Units/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin. The cells were cultured in an incubator at 37°C under a controlled atmosphere of 5% CO₂.

Animal Model

Aortas from euthanized Sprague Dawley rats were taken. Experimental protocol was realized in accordance with the European Communities Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) for animal care and conducted in accordance with French laws for animal care.

Western Blot

For the analysis of SPRED-1 protein expression, 20 µg of total proteins were loaded on a 7% poly-acrylamide gel and then transferred to a nitrocellulose membrane (ref 10600001, GE Healthcare). The membranes were saturated with twice 1-hour baths containing TBS/T (TBS, 0.1% Tween 20) and 5% milk. An anti-SPRED-1 (E-5) antibody (sc-393198, Santa Cruz) was added diluted to 1/500^e in TBS/T and 5% milk overnight. The revelation was made by incubation with a secondary goat anti-mouse antibody (ref P044701, DAKO) for 1 hour and then by adding the ECL solution (Pierce® ECL Western Blotting Substrate #32106) and digital reading using Chemidoc apparatus and the Image Lab 4.2 software (Bio-Rad).

Transfection

HUVECs were transfected with premiR-126-3p (ref 10782307, Assay ID PM2841, Fisher Scientific), premiR-126-5p (ref 10782307, Assay ID PM10401, Fisher Scientific), antimiR-126-3p (ref 10299484, Assay ID AM10401, Fisher Scientific), antimiR-126-5p (ref 10299484, Assay ID AM12841, Fisher Scientific) or scramble negative control at the concentration of 20

nM in the presence of INTERFERin transfection reagent according to the manufacturer (Polyplus) and incubated for 24 hours at 37°C with 5% CO₂. Cells were then harvested for further analysis.

qRT-PCR

Total RNA from transfected or not transfected HUVECs were isolated using the RNeasy® Plus minikit (QIAGEN) according to the manufacturer's instruction. The purity of total RNA was analyzed by measuring the ratio between 260/280 and 260/230 nm optical density. Reverse Transcription was performed using 1µg of total RNA using High Capacity cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystem) according to the manufacturer's instruction. For reverse transcription of miR-126-3p, miR-126-5p or U6 snRNA, specific RT primers were added to the master mix. Finally, PCR reaction were performed with Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystem) using the following Taqman primers: miR-126-3p (Hsa-miR-126-3p, cat number 4427975, Assay ID 002228, Fisher Scientific), miR-126-5p (Hsa-miR-126-5p, cat number 4427975, Assay ID 000451, Fisher Scientific), U6 (U6snRNA, cat number 4427975, Assay ID 001973, Fisher Scientific). The U6 small nuclear RNA was used as an endogenous control for miRNA expression.

Aortic Rings Assay

To study the role of miR-126 and CXCL12 in *ex vivo* angiogenesis, aortas were collected from 5 weeks-old Sprague Dawley rats, fragmented into 1mm rings and put on a layer of Matrigel (ref 354248, Corning) and then cultured in complete ECBM2 medium containing 2% of FBS (ref C22211, Promocell) for 48 hours. These rings were transfected or not by miR-126 or antimiR-126 (20nM) for respectively the miR-126-3p or miR-126-5p species or both for 48 hours and stimulated or not by CXCL12 at 6nM (ref 350-NS-050, R&D system) for 96 hours (2x48h). Finally, the aortic rings were fixed with 4% Paraformaldehyde and photographed under phase contrast microscope to quantify the total coverage area (in mm²), the quantity of meshes (N) and finally the maximum distance of migration (in mm).

2D angiogenesis

To study the role of miR-126 and CXCL12 in the formation of vascular networks *in vitro*, HUVECs were transfected for 18 hours by miR-126 or antimiRs (20nM) for respectively the miR-126-3p or miR-126-5p species or both. The cells were removed by PBS/EDTA at a concentration of 10mM and 7000 cells were later deposited on a thin layer of Matrigel (ref 354248, Corning) pre-cast in 96-well plates and incubated for 6 hours at 37°C, 5% CO₂, stimulated or not by CXCL12 at 6nM. The results present quantification of the number of meshes carried out under a phase contrast microscope by mapping over an entire well using the Archimede software.

MTT assay

The metabolic activity of HUVEC was analyzed using the reduction of MTT (Sigma-Aldrich). 10⁴ cells were transfected or not transfected with the corresponding premiRNA, antimiRNA or scramble negative control for 48h. Then HUVECs were incubated with 0.5 mg/mL of MTT during 3 hours at 37°C. After removing the supernatant, formazan crystals were solubilized in DMSO (Merk, Fontenay-sous-Bois, FRANCE) and absorbance was measured at 595 nm.

Migration assay

HUVECs migration was studied using a modified Boyden Chamber. First, the upper chamber was precoated with fibronectin at 100 µg/mL overnight at 4°C. After removing the excess of fibronectin, chambers were saturated with DMEM containing 0,1% BSA for 30 minutes at 37°C, 5% CO₂. Then, 5.10⁴ HUVECs transfected or not were deposited on the upper chamber containing 500uL of complete ECBM2 medium supplemented with 12% of FBS. Migration was stimulated by adding 1mL of complete medium with or without CXCL12 at 6nM during 24h. At the end of the experiment, cells were fixed using 4% of paraformaldehyde,

colored using hematoxylin-Hemalum and quantification of migrated cells was performed under phase contrast microscope.

Luciferase Assay

To study the effect of CXCL12 on egfl7-miR-126 promotor activity, Huh7 were cotransfected with plasmid pGL3Basic-miR-126-EGFL7-Promoter (Addgene) and control pGL4.73 [hRluc/SV40] (Promega) for 24 hours. Then the cells were stimulated or not stimulated by CXCL12 for 24 hours at 6 nM. Detection of luminescence was performed using Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega) following the manufacturers instruction.

Statistical Analysis

All the results are presented with mean \pm SEM. For statistical analysis, non parametric test were performed using GraphPad Prism software. Independent sample *t* test were applied in comparisons between two groups when the data followed a normal distribution and one-way analysis of variance (ANOVA) was used in comparisons among several groups. $p < 0.05$ indicated statistically significant differences.

Results

CXCL12 induces angiogenesis and miR-126-3p expression in vitro and ex vivo

First, we have studied angiogenesis *in vitro* in HUVECs and *ex vivo* in rats' aortic rings sprouting. *In vitro*, our results showed that there was a significant increase of HUVECs migration of $24\% \pm 16\%$ (Figure 1A) and 2D angiogenesis of $38\% \pm 16\%$ (Figure 1B) when HUVECs were stimulated by CXCL12 at 6 nM for 24h (Song *et al*, 2018) compared to untreated cells. In addition, there was a significant increase of up to 3.0 ± 0.3 times of *ex vivo* 2D angiogenesis (Figure 1C) when aortic rings were stimulated by CXCL12 compared to untreated rings.

We and others have shown that miR-126-3p regulates CXCL12. To study a potential reverse effect of CXCL12 on miR-126-3p expression, HUVECs or rats' aortas were stimulated with CXCL12 (6nM) for 24 hours. The results showed that there was a significant increase of miR-126-3p level up to $88\% \pm 5\%$ when HUVECs are stimulated with CXCL12 compared to untreated cells (Figure 1D). In addition, in our *ex vivo* model, there was a significant increase up to 48 ± 58 times compared with untreated aortas (Figure 1E). Since the promotor activity is generally analyzed in cancer cells, we used the Human Hepatoma cancer cells (Huh7) to know if CXCL12 induces modification of miR-126 promotor activity. The results showed (Figure 1F) that there was a significant increase of 2.35 ± 0.35 times of promotor activity after stimulation by CXCL12 compared to untreated cells.

miR-126 is implicated in angiogenesis

Then, we decided to discriminate between the effects of both strands of miR-126, namely miR-126-3p and miR-126-5p in our system. To do so, we first set up the conditions needed to up- and down-regulate both miRNA species in our *in vitro* system. The results showed that there was a significant increase of miR-126-3p level up to 4 ± 1.2 times after premiR-126-3p transfection compared with HUVECs transfected with negative control (SCL) (Figure 2A). Moreover, there was a significant abolition of miR-126-3p after transfection with antimiR-126-3p. Transfecting both antimiR-126-3p and antimiR-126-5p (antimiR-3p/5p) induced the same result. In parallel, there was a significant increase of miR-126-5p level up to 4.6 ± 0.8 times when the cells were transfected with premiR-126-5p compared to HUVECs transfected with SCL and miR-126-5p expression was also extinguished after antimiR-126-5p or both antimiR-126-3p and antimiR-126-5p transfection (Figure 2B). In order to control the cell viability after transfection with the various RNAs, a MTT test was performed. The results showed (Figure 2C) that there was no toxicity after any miRNA transfection as compared with SCL control. To verify efficiency of miRNA, we analyzed miR-126-3p know target,

SPRED-1. The results showed that there was a decrease of SPRED-1 protein level expression after premiR-126-3p transfection as compared with HUVECs transfected with SCL (Figure 2D).

We thus validated the up- and down-regulation of the various miRNA species and their effect on a known target

The second step of this work was to study the role of these miRNAs on biological effects on HUVECs migration and 2D angiogenesis tests.

miR-126-3p increases HUVECs migration and 2D angiogenesis in vitro

Our results showed that there was a significant increase of HUVECs migration with 29,4% ± 16% and 28,5% ± 15% of increase as compared with SCL after transfection with premiR-126-3p alone or both premiR-126-3p/5p (premiR-126) respectively (Figure 3A). However, there was no effect on cell migration after transfection with premiR-126-5p, antimiR-126-3p or both antimiR-126-3p and antimiR-126-5p (antimiR-126-3p/5p) as compared with SCL condition. Then, we studied the effect of the various treatments on the number of meshes formed by HUVECs. The most striking result was a significant increase of the number of meshes of 3 ± 0.1 times after premiR-126-3p transfection as compared with SCL (Figure 3B). In contrast, there was no significant effect when transfecting with premiR-126-5p. Transfecting both species at the same time (premiR-126-3p/5p) gave an intermediary result with a significant increase of the number of meshes of 65% ± 16%, that was however significantly lower than with premiR-126-3p alone, suggesting an inhibitory effect of miR-126-5p on miR-126-3p. Concerning inhibitory treatments, antimir-126-3p transfection induced a significant decrease of 42% ± 10% as compared with SCL. AntimiR-126 transfection using both species (antimiR-126-3p/5p) induced a comparable significant decrease of 53% ± 15% compared to SCL. In contrast, there wasn't any effect on 2D angiogenesis after antimiR-126-5p transfection.

miR-126-3p is implicated on CXCL12 induced HUVECs migration.

The next step of our study was to analyze the impact of miR-126 deregulation on CXCL12 induced migration. Our results indicate (Figure 4A) a significant increase of HUVECs migration of 24% ± 16% when cells were stimulated by CXCL12 compared to SCL contact. Moreover, there was a decrease of 22% ± 8% when cells were transfected at the same time with antimiR-126-3p and stimulated by CXCL12 compared to cells only stimulated with CXCL12. In addition, the results showed that there was a significant increase of migration of 25% ± 7% when the cells were transfected with premiR-126-5p and stimulated by CXCL12 compared to cells only transfected with premiR-126-5p alone. In contrast, there was no effect after antimiR-126-5p, premiR-126-3p or antimiR-126 on CXCL12 stimulated HUVECs.

miR-126-3p is implicated on CXCL12 induced vascular networks formation in vitro.

The results showed (Figure 4B) that there was a significant increase of HUVECs vascular network formation of 38% ± 16% after CXCL12 stimulation compared to SCL. The results showed that there was a significant increase up to 2.3 ± 0.3 times of the number of meshes with HUVEC transfected with premiR-126 and stimulated by CXCL12 compared to HUVECs only stimulated by CXCL12 alone. In addition, there was a significant increase of 91% ± 23% after transfection with premiR-126-3p/5p and stimulation with CXCL12 compared to HUVECs only transfected with premiR-126-3p/5p. Moreover, there was a significant decrease of 42% ± 14% when HUVECs were transfected with antimiR-126 and stimulated by CXCL12 when compared to HUVECs only stimulated by CXCL12 alone and no significant changes compared to HUVECs only transfected with antimiR-126-3p/5p. In addition, when we studied miR-126-3p and miR-126-5p separately, the results showed (Figure 4B) that there was a significant increase of this effect up to 3.2 ± 0.2 times after premiR-126-3p transfection and CXCL12 stimulation compared to HUVECs only stimulated by CXCL12 and a significant increase of 46% ± 6% compared to HUVECs only transfected by premiR-126-3p (Figure 4B). Interestingly, the results showed that there was a significant decrease of 71% ± 8% of vascular network formation after antimiR-126-3p transfection compared to HUVECs only

stimulated with CXCL12 and no significant changes compared to HUVECs only transfected with anti-miR-126-3p. However, there was no significant changes in 2D angiogenesis after modulation of miR-126-5p expression.

miR-126 is implicated on CXCL12 induced rat vascular network formation ex vivo.

To further investigate the involvement of miR-126 in CXCL12-induced angiogenesis *ex vivo*, aortic rings collected from rats were transfected (or not) by miRNAs and then stimulated (or not) by CXCL12. The results showed (Figure 5) that there was a significant increase of up to 3 ± 0.3 times of 2D angiogenesis with aortas stimulated with CXCL12 (Figure 5). Moreover, without stimulation by CXCL12 there was a significant increase of 2.3 ± 0.1 and $40\% \pm 10\%$ of 2D angiogenesis after transfection with premiR-126-3p/5p or anti-miR-126-3p/5p respectively. When we modulated miR-126-3p and miR-126-5p separately, the results showed a significant increase of 2.4 ± 0.2 or $90\% \pm 10\%$ or $70\% \pm 40\%$ after transfection with premiR-126-3p or anti-miR-126-3p or anti-miR-126-5p respectively. However, there was no significant changes after transfection with premiR-126-5p. The next step was to study the same conditions after stimulation with CXCL12. Our results indicate a significant increase of $33\% \pm 4\%$ after transfection with premiR-126-3p/5p and stimulation with CXCL12 compared to aortas only transfected with premiR-126-3p/5p. However, there was no significant changes between aortas transfected with premiR-126-3p/5p and stimulated with CXCL12 compared to aortas only stimulated with CXCL12 alone. Interestingly, the results showed that there was a significant decrease of $52\% \pm 6\%$ of 2D angiogenesis after transfection with anti-miR-126-3p/5p and stimulation by CXCL12 compared to aortas only stimulated with CXCL12. In addition, there was no significant changes between aortas transfected with anti-miR-126-3p/5p and those transfected with anti-miR-126-3p/5p and stimulated by CXCL12.

When we studied separately the strands miR-126-3p and miR-126-5p, the results showed that there was a significant increase of $26\% \pm 4\%$ after transfection with premiR-126-3p and stimulation with CXCL12 compared to aortas only transfected with premiR-126-3p. However, there was no significant changes between aortas transfected with premiR-126-3p and stimulated with CXCL12 compared to aortas only stimulated with CXCL12. Interestingly, the results showed that there was a significant decrease of $57.5\% \pm 5\%$ after transfection with anti-miR-126-3p and stimulation with CXCL12 compared to aortas only stimulated with CXCL12. In addition, there was a significant decrease of $33\% \pm 8\%$ after transfection with anti-miR-126-3p and stimulation with CXCL12 compared to aortas only transfected with anti-miR-126-3p. Furthermore, the results showed that there was a significant decrease of $26\% \pm 6\%$ of 2D angiogenesis after transfection with premiR-126-5p and stimulation with CXCL12 compared to aortas only stimulated with CXCL12. Interestingly, the results showed that there was a significant increase up to 2.2 ± 0.2 times after transfection with premiR-126-5p and stimulation with CXCL12 compared to aortas only transfected with premiR-126-5p. Finally, the results showed that there was a significant decrease of $53\% \pm 4\%$ after transfection with anti-miR-126-5p and stimulation with CXCL12 compared to aortas only stimulated with CXCL12. However, there was no significant changes between aortas transfected with anti-miR-126-5p and stimulated with CXCL12 with those only transfected with anti-miR-126-5p.

SPRED-1 is implicated in SDF-1 ⇔ miR-126 vascular network formation

In order to know if there was an effect of CXCL12 on SPRED-1 protein level expression, HUVECs were stimulated or not stimulated with CXCL12 at 6nM for 24 hours. CXCL12 stimulation for 24h triggered a marked decrease of SPRED-1 protein level expression (Figure 6A).

To study the role of SPRED-1 in SDF-1 ⇔ miR-126 vascular network formation, HUVECs were first transfected with SPRED-1 siRNA. The results show (Figure 6B) that SPRED-1 siRNA transfection induced a complete and significant abolition of SPRED-1 mRNA expression compared to SCL (Figure 6B). In this condition, the results showed that there was a significant increase of $50\% \pm 15\%$ of 2D angiogenesis compared to HUVEC transfected with negative control (Figure 6C). After that, transfected HUVECs were loaded on Matrigel

surface and stimulated or not stimulated by CXCL12. The results showed that there was a significant increase of 59% ± 9% of 2D angiogenesis after transfection with siRNA-SPRED-1 and stimulation with CXCL12 compared to HUVECs only stimulated with CXCL12 (Figure 6D). In the last part of this work we compared siRNA-SPRED-1 transfection with siRNA-SPRED-1 and anti-miR-126-3p co transfection in HUVECs 2D angiogenesis. The results showed that there was a significant increase of 53% ± 10% of the number of meshes after siRNA-SPRED-1 and anti-miR-126-3p co transfection compared to SNC (Figure 6D). Interestingly, there was no change on HUVECs 2D angiogenesis after addition of CXCL12 in HUVECs co transfected cells with siRNA-SPRED-1 and anti-miR-126-3p. Taking together these results evidenced that downregulation of SPRED-1 in CXCL12 induced angiogenesis is miR-126-3p dependent.

Discussion

Cardiovascular disease is the leading cause of death in the world. Among them, ischemia caused by a decrease in oxygen and nutrient supply leads to tissue degeneration and to organ death by necrosis. To overcome this, the body implements a physiological process called angiogenesis to restore normal vascularization.

In this study, we focused on two proangiogenic factors, the chemokine CXCL12 and the miR-126, and we evidenced that the miR-126 ↔ CXCL12 axis was implicated in cell migration and vascular network formation. In this context, we demonstrated: (1) that miR-126 is implicated in proangiogenic effect induced by CXCL12; (2) CXCL12 modulated the miR-126 expression *in vitro* on human endothelial cells (HUVEC) as well as *ex vivo* on rat aorta; (3) miR-126 plays an important role in proangiogenic processes (migration and vascular network formation) induced by CXCL12 *in vitro* and *ex vivo*; (4) SPRED-1 is involved in the regulation of this process. In addition, the overexpression of miR-126-3p enhanced migration and angiogenesis in HUVECs, but overexpression of miR-126-5p had no effect on both processes. These indicate the strand-specific function of miR-126 in angiogenesis.

❖ CXCL12 increased miR-126-3p expression via activation of ETS_{1/2}/Egfl7.

To carry out our study, we first analyzed the proangiogenic effect of CXCL12 in two models, in HUVEC cells and in rat aortic rings. Our results showed a significant increase of migration and vascular network formation *in vitro* and *ex vivo* induced by CXCL12, according to the literature¹⁵⁻¹⁷. Secondly, we wanted to study the CXCL12 ↔ miR-126 axis and find out the mechanism associated with the proangiogenic effect of CXCL12 and the involvement of miR-126 in it. Interestingly, our results showed for the first time that CXCL12 increased miR-126-3p but not -5p expression (data not shown), in both HUVECs and rat aorta. Finally, to understand the modulation of miR-126-3p expression by CXCL12, we studied the activation of epidermal growth factor-like protein 7 (*Egfl7*) promoter, a gene encoding for both miR-126 strands. For this, we used the Huh7 cancer cell model in order to guarantee a good transfection efficiency of our plasmids of interest. Our results showed that CXCL12 increased the activation of *Egfl7* promoter. Probably it is possible that CXCL12 increased miR-126-3p expression via its transcriptional regulation. Since ETS_{1/2} is known as transcription factor for the transcriptional activity of *Egfl7* we hypothesize that CXCL12 induced the transcriptional activity of *Egfl7* through an increase of ETS_{1/2} transcription factor. Indeed, it has been previously shown by Harris TA *et al*¹⁸. that the activation of ETS_{1/2}, in the same cell model, leads to an increase of transcriptional activity of *Egfl7*.

Herein for the first time, we analyzed the involvement of chemokine CXCL12 in the regulation of miR-126-3p expression via *Egfl7* activation probably activating ETS_{1/2} pathways.

❖ **miR-126-3p and miR-126-5p had different roles in HUVEC**

MiR-126 is strongly expressed by endothelial cells and it has been studied for several years as an actor in the regulation of pathophysiological processes. Indeed, previously, it has been shown that an increase of miR-126 expression was associated not only with the reduction of smooth muscle cells proliferation, migration and intimal hyperplasia decrease, but also with stimulation of endothelial regeneration¹⁹. In addition, an increase of miR-126 expression is associated with anti-inflammatory²⁰ and proangiogenic^{7,10} activity. miR-126 is produced from a double stranded precursor consisting of a miR-3p and miR-5p duplex²¹. Interestingly, it was previously shown that the two strands of the same miR can be functional and have different targets^{9,22,23}. In herein study, we analyzes of both miR-126-3p and -5p. miR-126-3p strand can be associated with an anti-inflammatory²⁴ and proangiogenic²⁵ effect and miR-126-5p strand can be associated with the reduction of intimal hyperplasia development¹² and angiogenesis²².

There is only one study²³ that analyzed both miR-126-3p and -5p strands, showing that the silencing of miR-126-3p repressed angiogenesis, while overexpression of miR-126-5p enhanced angiogenesis. However, this study was performed using different cells, primary HUVEC and dermal fibroblast in coculture model. In this model they observed the vascular tubules resembling capillaries formation and not vascular network formation like in our model. The limit of their model was that they could not observe only the miR-126 effect on HUVECs angiogenesis, but they observed effects of both fibroblastes cells and antimir-126-3p/5p cotransfection. Moreover, they could not observe the vascular network structure since in their model there were no mesh formations representing the endothelial cell interconnection similar to physiological *in vivo* cell behavior. Finally, in the coculture model of angiogenesis, we can't evidence the miR-126 effect on endothelial cells.

The originality and interest of our study was to compare simultaneously the effect of both miR-126-3p and -5p strands on endothelial cells angiogenesis induced by CXCL12.

For this purpose, HUVEC cells were transfected with premiR-126-3p, premiR-126-5p or antimir-126-3p, antimir-126-5p or with the combination of both premiR and antimir tools to modulate total miR-126 level in the cells.

❖ **miR-126-3p increased HUVEC migration and vascular network formation**

The next step was to investigate the implication of miR-126-3p and -5p in the regulation of proangiogenic processes. In this process, we evaluated cell migration and vascular network formation, since both are the important steps of angiogenesis.

Our results showed that there was an increase of migration after cotransfection with both premiR-126-3p/5p. In addition, premiR-126-3p but not -5p had a promigratory effect on HUVECs. So, miR-126-3p is implicated in HUVEC migration. Interestingly, the absence of miR-126 (antimir-126-3p and -5p) did not affect HUVECs migration.

Concerning the vascular networks formation, our results showed that miR-126-3p increased and antimir-126-3p decreased this process. However, miR-126-5p (premiR-126-5p or antimir-126-5p) had no effect on this process. Surprisingly, in comparison with migration assay, we found a difference between the cotransfection with premiR-126-3p/5p and the premiR-126-3p alone. Indeed, premiR-126-3p had a more important impact on vascular network formation in HUVECs. This would suggest that the presence of miR-126-5p reduced the miR-126-3p proangiogenic effect in 2D-angiogenesis model.

In conclusion, our results and others¹⁰ suggest that miR-126-3p had a strong proangiogenic potential. Our model evidenced that miR-126-5p alone had no effect on 2D- angiogenesis. However, its overexpression (premiR-126-3p/5p) reduced the miR-126-3p proangiogenic effect in HUVECs *in vitro*.

❖ **miR-126-3p but not miR-126-5p was crucial for CXCL12-induced HUVEC migration *in vitro***

After validation of our proangiogenic miR-126 based tools in angiogenesis, we then studied the impact of miR-126-3p and -5p in CXCL12-induced angiogenesis.

First, we studied HUVECs migration after CXCL12 stimulation. Our results showed that only antimiR-126-3p abolished the promigratory effect of CXCL12. However, under all other conditions (premiR-126-3p/5p, antimir-126-3p/3p, premiR-126-3p, premiR-126-5p or antimir-126-5p), there was no effect as compared to CXCL12-stimulated HUVEC alone. We can conclude from this result that there did not seem to be any additive effect due of CXCL12 and miR-126-3p, but its presence was crucial for CXCL12 promigratory effect. Finally, the miR-126-5p overexpression (premiR-126-5p) or inhibition (antimiR-126-5p) didn't has any effect on CXCL12-induced HUVECs migration.

❖ **miR-126-3p and CXCL12 had additive effect on vascular network formation, and miR-126-5p reduced it**

In parallel, we studied the impact of miR-126-3p and -5p on vascular network formation induced by CXCL12 in HUVECs. Our results evidenced that miR-126 is more involved in vascular network formation than in migratory process. Interestingly, only miR-126-3p was implicated in stimulation of vascular network formation induced by CXCL12 and miR-126-5p had no effect on this process. In addition, our results suggested that the association of miR-126-3p and CXCL12 induced an additive effect. Finally, in our model miR-126-5p had no effect on CXCL12-induced angiogenesis.

To confirm the involvement of miR-126-3p in CXCL12-induced angiogenic processes, we developed an *ex vivo* angiogenesis model using the rat's aortic rings.

Firstly, we evidenced the proangiogenic effect of both miR-126-3p and -5p (premiR-126-3p/5p) but without the additive effect associated in presence of CXCL12. However, the absence of miR-126-3p/5p abolished CXCL12-proangiogenic effect indicating that miR-126-3p/5p is crucial for CXCL12-induced *ex vivo* angiogenesis. Secondly, we studied the involvement of these two strands, premiR-126-3p and -5p separately. Our results evidenced that overexpression of miR-126-3p didn't modulate CXCL12-proangiogenic effect. In addition, the modulation of miR-126-5p level (premiR-126-5p or antimiR-126-5p transfection) decreased the CXCL12-induced angiogenesis. In conclusion, the presence of miR-126-3p and miR-126-5p remains necessary for the effect of CXCL12.

Surprisingly, we obtained very interesting results after transfecting using only antimiR-126-3p. In this condition, there was an increase of *ex vivo* angiogenesis after long term tissue culture up to 9 days. We and others have previously shown that the absence of miR-126-3p leads to the synthesis and secretion of CXCL12 in HUVECs culture medium^{14,26}. Since CXCL12 and antimiR-126-3p enhanced VEGF expression^{16,27,28} and both of them can stimulate PKC/ERK_{1/2} proangiogenic pathways through the stimulation of the Raf protein²⁹⁻³¹, we hypothesise that antimiR-126-3p could have proangiogenic action in long term *ex vivo* tissue culture.

❖ **SPRED-1 was implicated in CXCL12-induced angiogenesis**

We thus demonstrated that miR-126-3p seems essential for the proangiogenic effect induced by CXCL12. We assume that the role of miR-126-3p in CXCL12-induced angiogenesis was through modulation of SPRED-1 protein expression.

To confirm our hypothesis, we studied the role of CXCL12 in the expression of SPRED-1. We demonstrated that there was a decrease of SPRED-1 (one of the known targets of miR-126) protein level after miR-126-3p overexpression, according to the literature in the same cell model¹⁰.

Interestingly, our results showed the significant decrease of SPRED-1 after CXCL12 stimulation. We thus evidenced that SPRED-1 plays an important role in CXCL12-induced angiogenesis in HUVECs cells.

In addition, our results showed that the abolition of SPRED-1 (*via* siRNA-SPRED-1) increased the vascular network formation *in vitro*. Interestingly, this network formation was much more important in absence of SPRED-1 in CXCL12-stimulated HUVECs, than in HUVECs stimulated only by CXCL12. Thus, the absence of SPRED-1 seems to potentiate the effect induced by CXCL12 like previously shown with VEGF¹⁰. They showed that the inhibition of the SPRED-1 leads to an overactivation of the ERK_{1/2} proangiogenic signaling pathway after VEGF stimulation. We therefore evidenced that CXCL12 treatment increased miR-126-3p expression which led to SPRED-1 abolition and amplification of proangiogenic signaling. Consistently with Wang *et al.*¹⁰, our results showed that angiogenesis inhibited by decrease of miR-126-3p was restored after SPRED-1 abolition.

We can thus say that SPRED-1 modulates angiogenesis induced by CXCL12 but on the other hand, the abolition of miR-126-3p associated with the abolition of SPRED-1 limits the beneficial effect of absence of SPRED-1.

Under these conditions, although the proangiogenic ERK_{1/2} pathway can be activated by decreasing SPRED-1 expression, the abolition of miR-126-3p appears to block other signal pathways essential for proangiogenic effects induced by CXCL12. Its proangiogenic effect depends on two signaling pathways ERK_{1/2} and PI3K/Akt³. We hypothesize that the PI3K/Akt pathway may be involved in this process since Fish *et al.*⁷ had demonstrated that anti-miR-126 lead to an overexpression of PI3KR2, a negative regulator of PI3K/Akt proangiogenic pathways.

Finally, herein study show for the first time the role of miR-126-3p but not miR-126-5p expression and SPRED-1 downregulation on CXCL12-induced angiogenesis in endothelial cells.

Acknowledgments:

a) Acknowledgments: We would like to thank the INSERM U1272 laboratory of Professor Carole PLANES for given us access to their animals in order to allow us to carry out our experiments.

b) Sources of funding: We would like to thank the Galilee Doctoral School, the University of Paris XIII and the IFRB Foundation for their support.

c) Disclosures: none

References:

1. Mehrad B, Keane MP, Strieter RM. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2007;97(5):755-762.
2. Yin Y, Zhao X, Fang Y, Yu S, Zhao J. SDF-1 α involved in mobilization and recruitment of endothelial progenitor cells after arterial injury in mice. *Cardiovasc Pathol.* 2010;19(4):218-227. doi:10.1016/j.carpath.2009.04.002
3. Ho TK, Tsui J, Xu S, Leoni P, Abraham DJ, Baker DM. Angiogenic effects of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) variants in vitro and the in vivo expressions of CXCL12 variants and CXCR4 in human critical leg ischemia. *J Vasc Surg.* 2010;51(3):689-699. doi:10.1016/j.jvs.2009.10.044
4. Welten SMJ, Goossens EAC, Quax PHA, Nossent AY. The multifactorial nature of microRNAs in vascular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2016;110(1):6-22. doi:10.1093/cvr/cvw039
5. Bartel DP, Chen C-Z. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet.* 2004;5(5):396-400.

- doi:10.1038/nrg1328
6. Sun L-L, Li W-D, Lei F-R, Li X-Q. The regulatory role of microRNAs in angiogenesis-related diseases. *J Cell Mol Med.* 2018;22(10):4568-4587. doi:10.1111/jcmm.13700
 7. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. 2008. doi:10.1016/j.devcel.2008.07.008
 8. Wang X, Lian Y, Wen X, et al. Expression of miR-126 and its potential function in coronary artery disease. *Afri Heal Sci.* 2017;17(2):474-480. doi:10.4314/ahs.v17i2.22
 9. Villain G, Poissonnier L, Noueihed B, et al. miR-126-5p promotes retinal endothelial cell survival through SetD5 regulation in neurons. *Development.* 2018;145(1):dev156232. doi:10.1242/dev.156232
 10. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell.* 2008;15(2):261-271. doi:10.1016/j.devcel.2008.07.002
 11. Quintanar-Audelo M, Yusoff P, Sinniah S, Chandramouli S, Guy GR. Sprouty-related Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein homology 1-domain-containing protein (SPRED1), a tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 (SHP2) substrate in the ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway. *J Biol Chem.* 2011;286(26):23102-23112. doi:10.1074/jbc.M110.212662
 12. Schober A, Nazari-Jahantigh M, Wei Y, et al. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nat Med.* 2014;20(4):368-376. doi:10.1038/nm.3487
 13. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal.* 2009;2(100). doi:10.1126/scisignal.2000610
 14. Mondadori dos Santos A, Metzinger L, Haddad O, et al. miR-126 Is Involved in Vascular Remodeling under Laminar Shear Stress. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1-11. doi:10.1155/2015/497280
 15. Salcedo R, Oppenheim JJ. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation.* 2003;10(3-4):359-370. doi:10.1038/sj.mn.7800200
 16. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, et al. Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Induce Expression of CXCR4 on Human Endothelial Cells In Vivo Neovascularization Induced by Stromal-Derived. 1999;154(4):1125-1135.
 17. Feil C, Augustin HG. Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998. doi:10.1006/bbrc.1998.8499
 18. Harris T a, Yamakuchi M, Kondo M, Oettgen P, Lowenstein CJ. Ets-1 and Ets-2 regulate the expression of miR-126 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(10):1990-1997. doi:10.1161/ATVBAHA.110.211706.Ets-1
 19. Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Schober A. The role of microRNAs in arterial remodelling. *Thromb Haemost.* 2012;107(04):611-618. doi:10.1160/th11-12-0826
 20. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(5):1516-1521. doi:10.1073/pnas.0707493105
 21. Metzinger-Le Meuth V, Burtsey S, Maitrias P, Massy ZA, Metzinger L. microRNAs in the pathophysiology of CKD-MBD: Biomarkers and innovative drugs. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2017;1863(1):337-345. doi:10.1016/j.bbadis.2016.10.027
 22. Poissonnier L, Villain G, Soncin F, Mattot V. MiR126-5p repression of ALCAM and SetD5 in endothelial cells regulates leucocyte adhesion and transmigration. *Cardiovasc Res.* 2014;102(3):436-447. doi:10.1093/cvr/cvu040
 23. Zhou Q, Anderson C, Hanus J, et al. Strand and Cell Type-specific Function of microRNA-126 in Angiogenesis. 2016. doi:10.1038/mt.2016.108
 24. Hu J, Zeng L, Huang J, Wang G, Lu H. MiR-126 promotes angiogenesis and attenuates inflammation after contusion spinal cord injury in rats. *Brain Res.* 2015. doi:10.1016/j.brainres.2015.02.036

25. Fish JE, Srivastava D. MicroRNAs: Opening a new vein in angiogenesis research. *Sci Signal*. 2009;2(52):1-7. doi:10.1126/scisignal.252pe1
26. Van Solingen C, De Boer HC, Bijkerk R, et al. MicroRNA-126 modulates endothelial SDF-1 expression and mobilization of Sca-1+/Lin- progenitor cells in ischaemia. *Cardiovasc Res*. 2011;92(3):449-455. doi:10.1093/cvr/cvr227
27. Ye P, Liu J, He F, Xu W, Yao K. Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulative effect on VEGF and MMP-9 expression. *Int J Med Sci*. 2013;11(1):17-23. doi:10.7150/ijms.7329
28. Ge HY, Han ZJ, Tian P, et al. VEGFA expression is inhibited by arsenic trioxide in HUVECs through the upregulation of Ets-2 and miRNA-126. *PLoS One*. 2015;10(8):1-18. doi:10.1371/journal.pone.0135795
29. Valdés G, Erices R, Chacón C, Corthorn J. Angiogenic, hyperpermeability and vasodilator network in utero-placental units along pregnancy in the guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Reprod Biol Endocrinol*. 2008;6:1-11. doi:10.1186/1477-7827-6-13
30. Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, Polishchuk L, Telegeev GD, Dubrovskaya A. OTT-36109-emerging-targets-in-cancer-management--role-of-the-cxcl12-cx. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1347-1361. doi:10.2147/OTT.S36109
31. Moghaddam AB, Namvar F, Moniri M, Tahir PM, Azizi S, Mohamad R. Nanoparticles biosynthesized by fungi and yeast: A review of their preparation, properties, and medical applications. *Molecules*. 2015;20(9):16540-16565. doi:10.3390/molecules200916540

Highlights:

1-CXCL12 induces miR-126-3p expression *in vitro* in HUVECs and *ex vivo* in rat's aortas.

2-miR-126-3p is necessary for CXCL12 induced migration and angiogenesis.

3-SPRED-1 is implicated in CXCL12 induced vascular network formation.

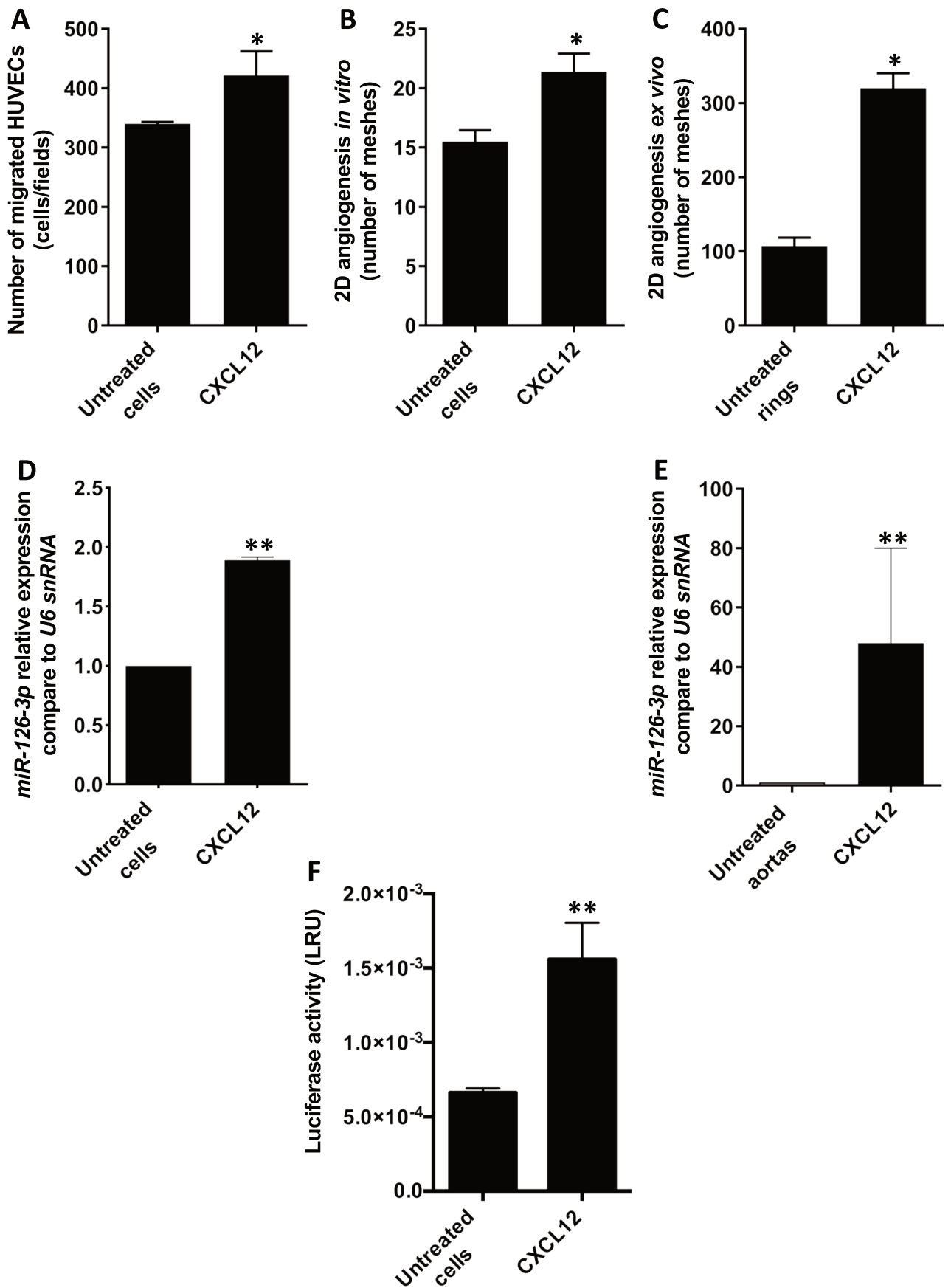


Figure 1. CXCL12 induced angiogenesis and miR-126-3p endogenous expression in HUVECs.

To analyse the effect of CXCL12 on HUVECs angiogenesis, we have performed migration test on boyden chamber and analysis of vascular network formation in 2D in vitro and ex vivo on aortics rings on Matrigel. For migration assay (A), 50.000 HUVECs were deposited on the top chamber of boyden chamber precoated by fibronectin. Migration was stimulated with CXCL12 at 6nM for 24h. The results present the number of migrated cells per fields. For 2D angiogenesis in vitro (B), HUVECs were stimulated with CXCL12 at 6nM for 18h and 6500 of them were then deposited on precoated 96 well plates with Matrigel and incubate for 6 hours. The results present the number of meshes. For 2D angiogenesis ex vivo (C), aortic rings obtained from Sprague Dawley rat were deposited on Matrigel and then stimulated or not stimulated by CXCL12 during 9 days. The results present the number of meshes present in the vascular network.

To analyse the effect of CXCL12 on miR-126-3p level endogenous expression, HUVEC (D) or aortas obtained from rats (E) were stimulated or not stimulated by CXCL12 during 24h at 6nM. After total RNA extraction, miR-126 level expression was analysed using qRT-PCR with U6 snRNA as endogenous control. The results are expressed with mean \pm SEM. Three independent experiments were performed for in vitro experiments and five for ex vivo experiments. ** $p < 0,01$ vs Untreated cells; * $p < 0,05$ vs Untreated aortas.

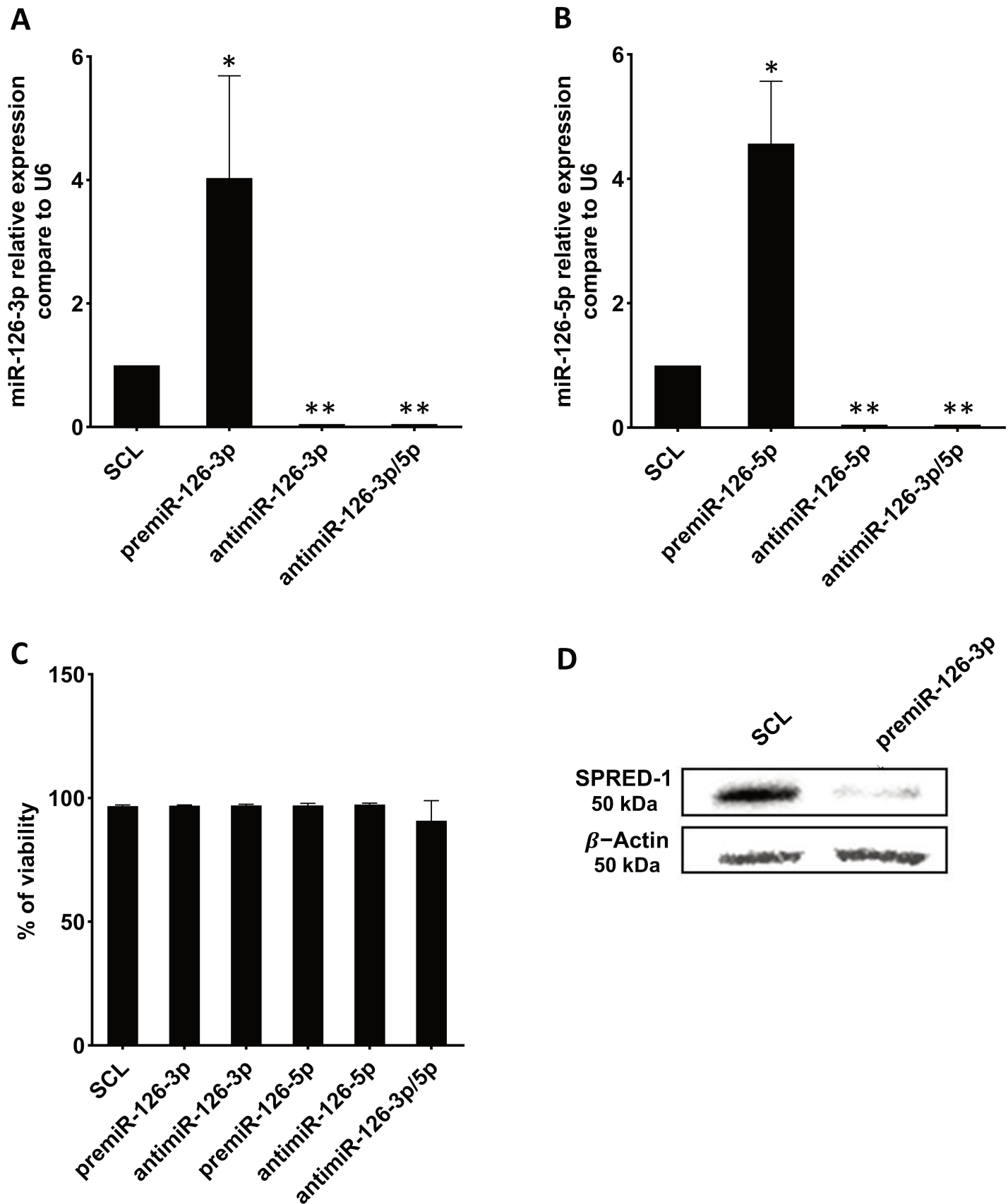


Figure 2. Construction of miR-126 expression models in HUVEC.

To analyse the expression of both miR-126-3p or miR-126-5p, HUVEC were transfected during 24 hours with 20nM of premiRNA or anti-miRNA and quantity of both miR-126-3p and miR-126-5p was analyzed by qRT-PCR (A and B). HUVEC viability was analyzed using MTT test (C). To confirm that upregulation of miR-126-3p could induce a decrease of one target, we analyzed SPRED-1 protein level expression by Western Blot (D). * $p < 0,05$ vs SCL; ** $p < 0,01$ vs SCL

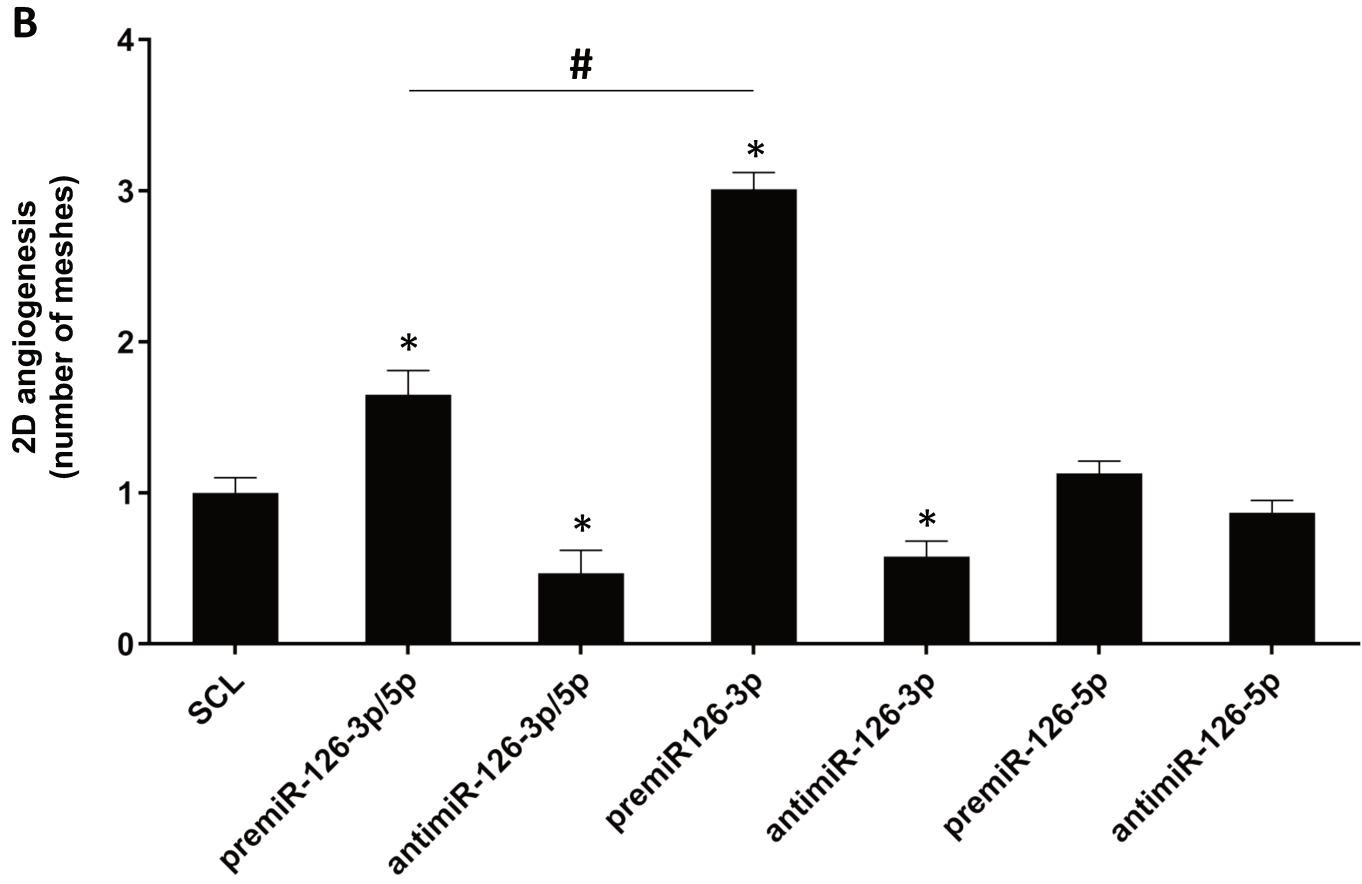
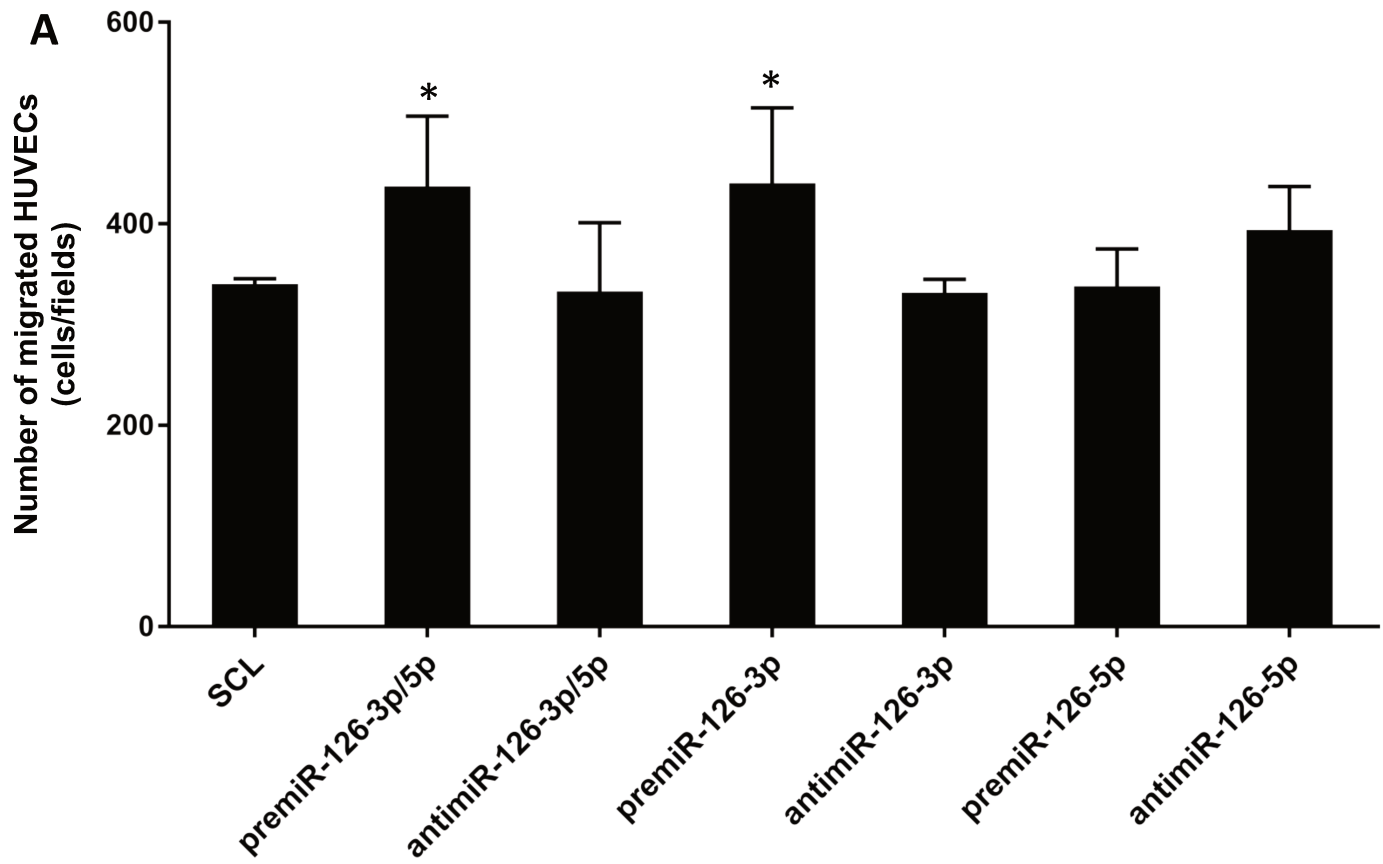


Figure 3. Effect of miR-126 on HUVEC migration and vascular networks formation.
 To analyse the effect of both miR-126-3p or miR-126-5p, HUVEC were transfected during 24 hours with 20nM of premiRNA or antimiRNA. HUVEC migration was studied using Boyden chamber (A) with 5.10^4 transfected cells on the upper chamber during 24h; the number of migrated cells was determined using phase contrast microscope. Vascular networks formation in 2D on matrigel (B) was performed using 7500 transfected cells deposited on the top of matrigel and the tubular formation was study after 6h of incubation. The quantity of meshes was determined using phase contrast microscope. For each assay, three independent experiments were performed. * $p < 0.05$ vs SCL; # $p < 0.01$ premiR-126-3p/5p vs premiR-126-3p.

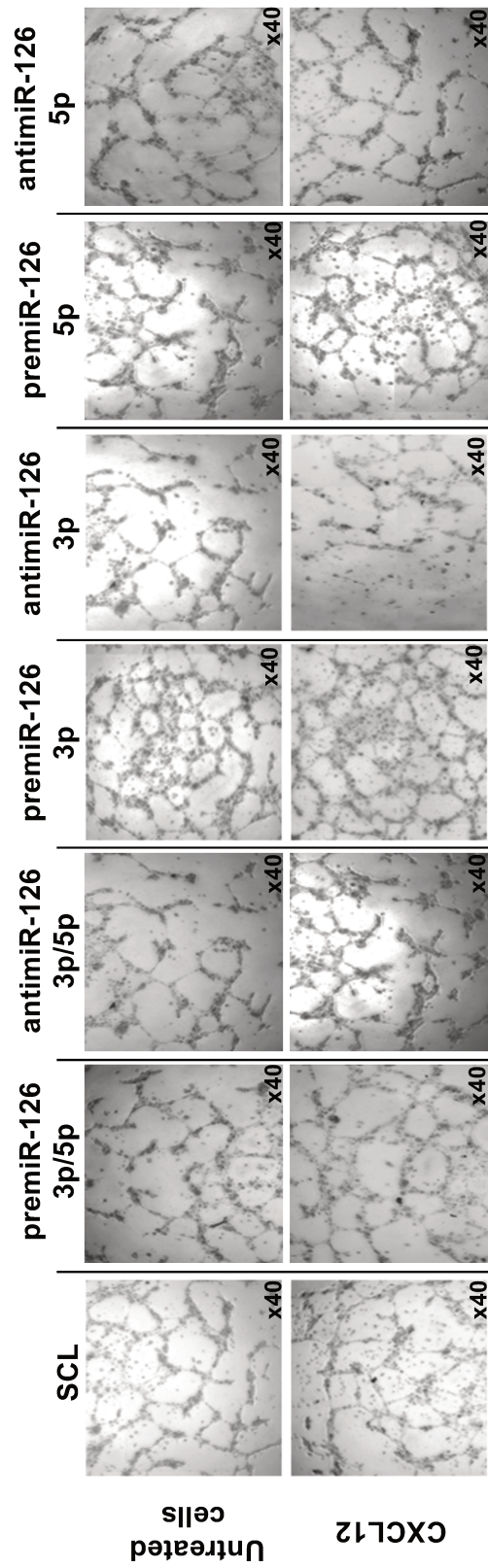
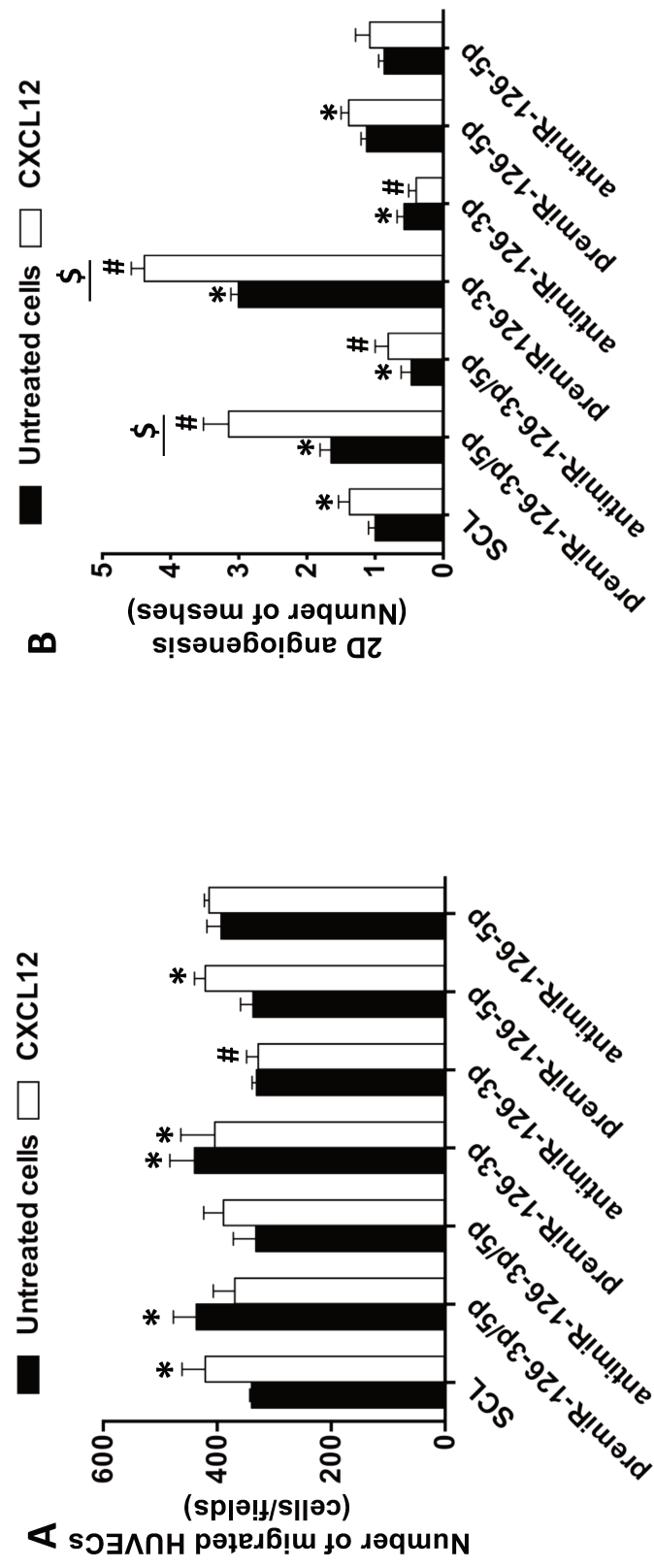


Figure 4. Effect of miR-126 on CXCL12 induced migration and vascular networks formation *in vitro*.

For migration assay (A), $5 \cdot 10^4$ transfected HUVEC were deposited on the upper chamber of boyden chamber and migration was stimulated by adding CXCL12 in the bottom chamber at 6nM during 24h; quantification of migrated cells was performed using phase contrast microscope. For vascular networks formation *in vitro* (B), 7500 transfected HUVECs were deposited on matrigel surface and stimulated during 6h with CXCL12 at 6nM; quantification of the number of meshes was performed using phase contrast microscope. The results are expressed with mean \pm SEM. Three independent experiments were performed for each assay. * $p < 0,05$ vs SCL; # $p < 0,05$ vs SCL + CXCL12; \$ $p < 0,05$ premiR-126-5p vs premiR-126-3p + CXCL12; & $p < 0,05$ premiR-126-3p vs premiR-126-3p + CXCL12.

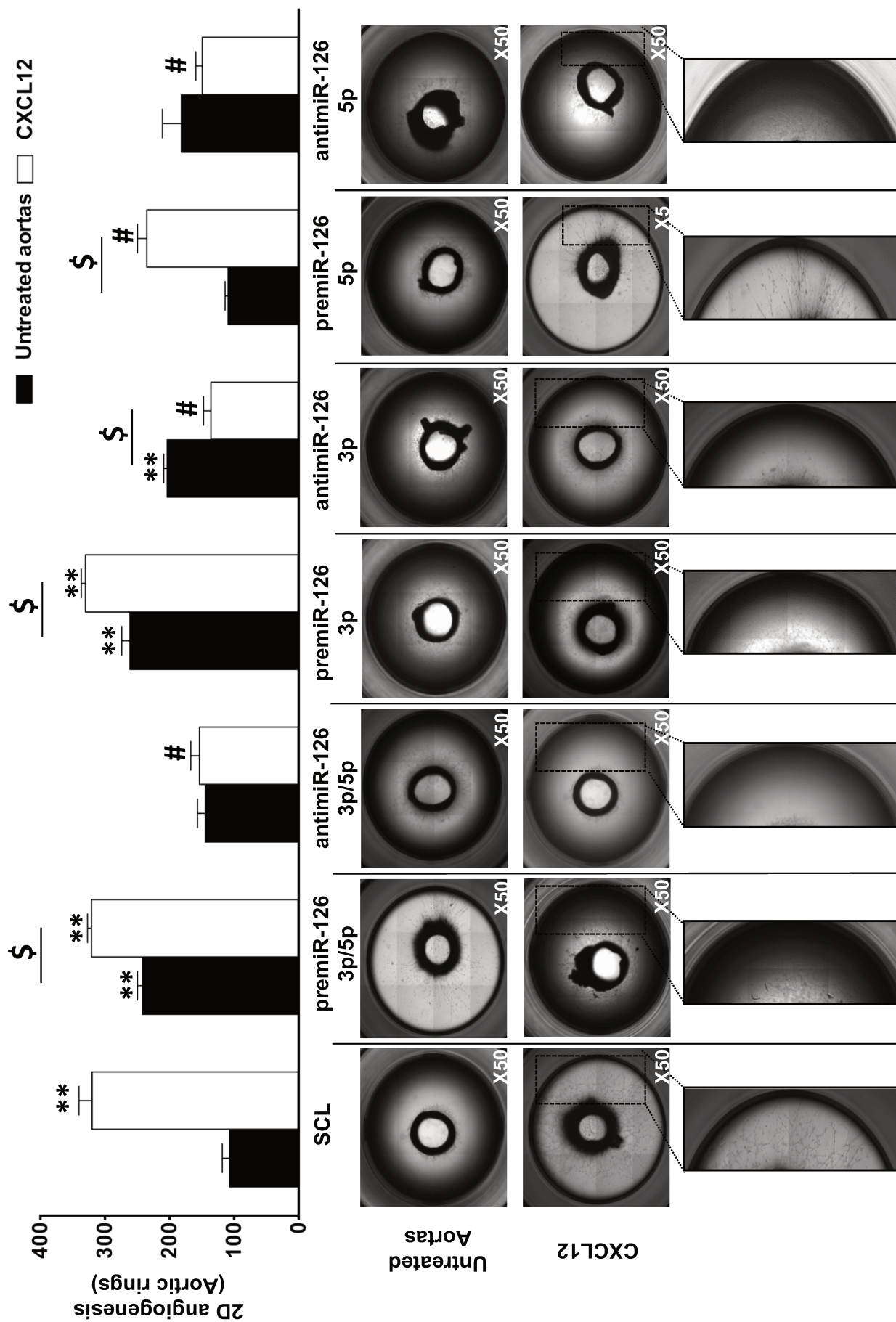


Figure 5. Effect of miR-126 on CXCL12 induced vascular network formation ex vivo.

To analyse the implication of miR-126 on CXCL12 induced angiogenesis ex vivo, aortic rings from Sprague Dawley Rats were transfected and stimulated with CXCL12 at 6nM for 5 days. Quantification of the number of meshes was performed using phase contrast microscope. The results are expressed with mean \pm SEM. Five independent experiments were performed for each assay. # $p < 0.05$ vs SCL; * $p < 0.01$ vs SCL; \$ $p < 0.05$ vs SCL; & $p < 0.05$ anti-miR-126-3p vs anti-miR-126-3p + CXCL12.

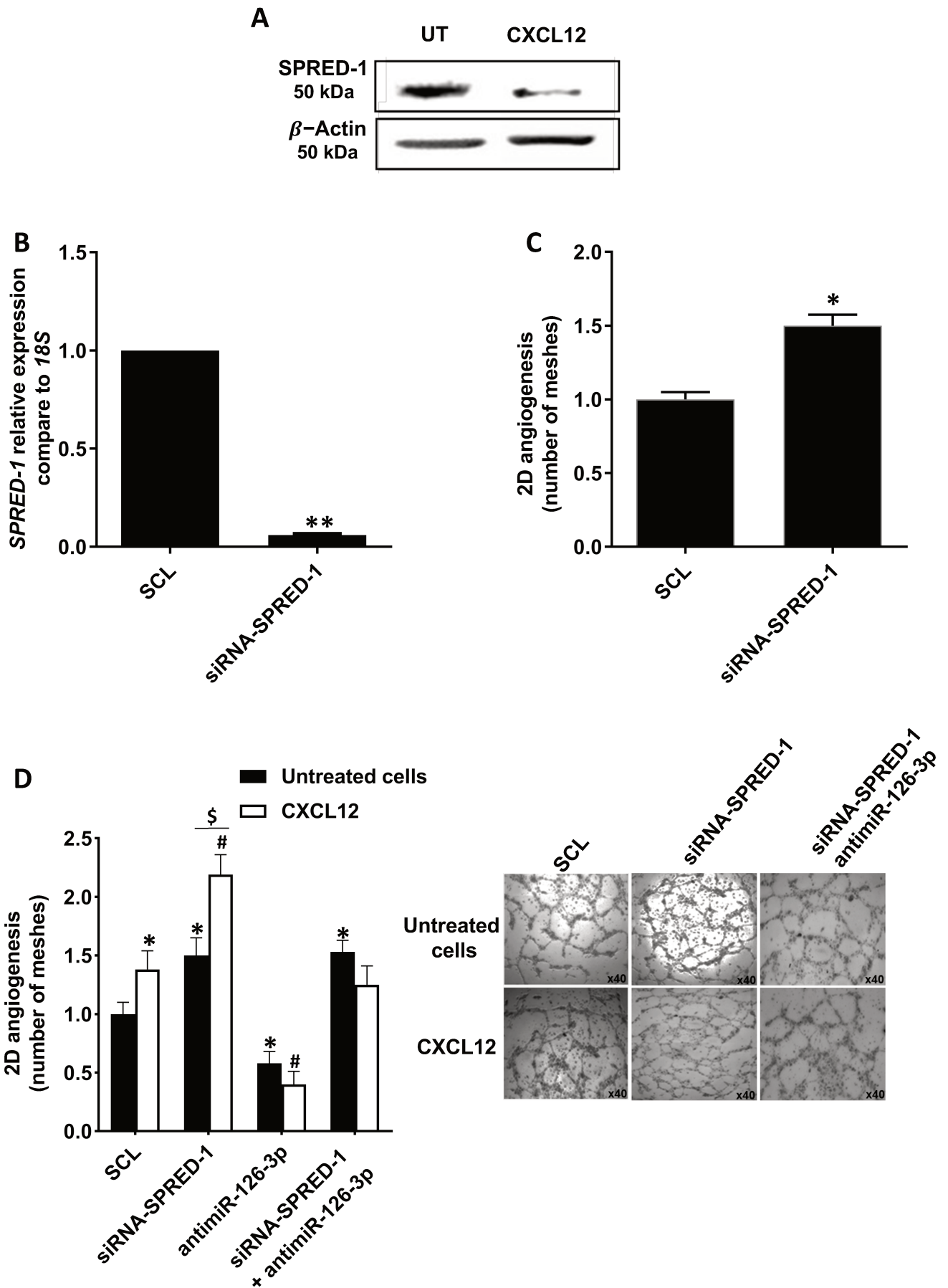


Figure 6. SPRED-1 is implicated in SDF-1 \leftrightarrow miR-126 vascular network formation.

To analyse the effect of CXCL12 on SPRED-1 expression, HUVEC were stimulated or not stimulated with CXCL12 at 6nM during 2, 5, 10 minutes and 24 hours. Total proteins were extracted, and western blot analysis was performed. Three independent experiments were performed.

To analyse the implication of SPRED-1 on CXCL12 induced vascular networks formation in vitro, HUVEC were first transfected with SPRED-1 siRNA at 25nM during 24h and after total RNA extraction, the inhibition of SPRED-1 mRNA was confirmed using qRT-PCR using 18S rRNA as endogenous control (A). After siRNA transfection, 7000 HUVECs were deposited on matrigel and stimulated by CXCL12 at 6nM during 6h. Vascular networks formation was observed and the quantity of meshes was determined using phase contrast microscope. The results are expressed with mean \pm SEM. Three and four independent experiments were performed for these experiments. ** $p < 0,01$ vs Untreated cells; * $p < 0,05$ vs Untreated aortas.

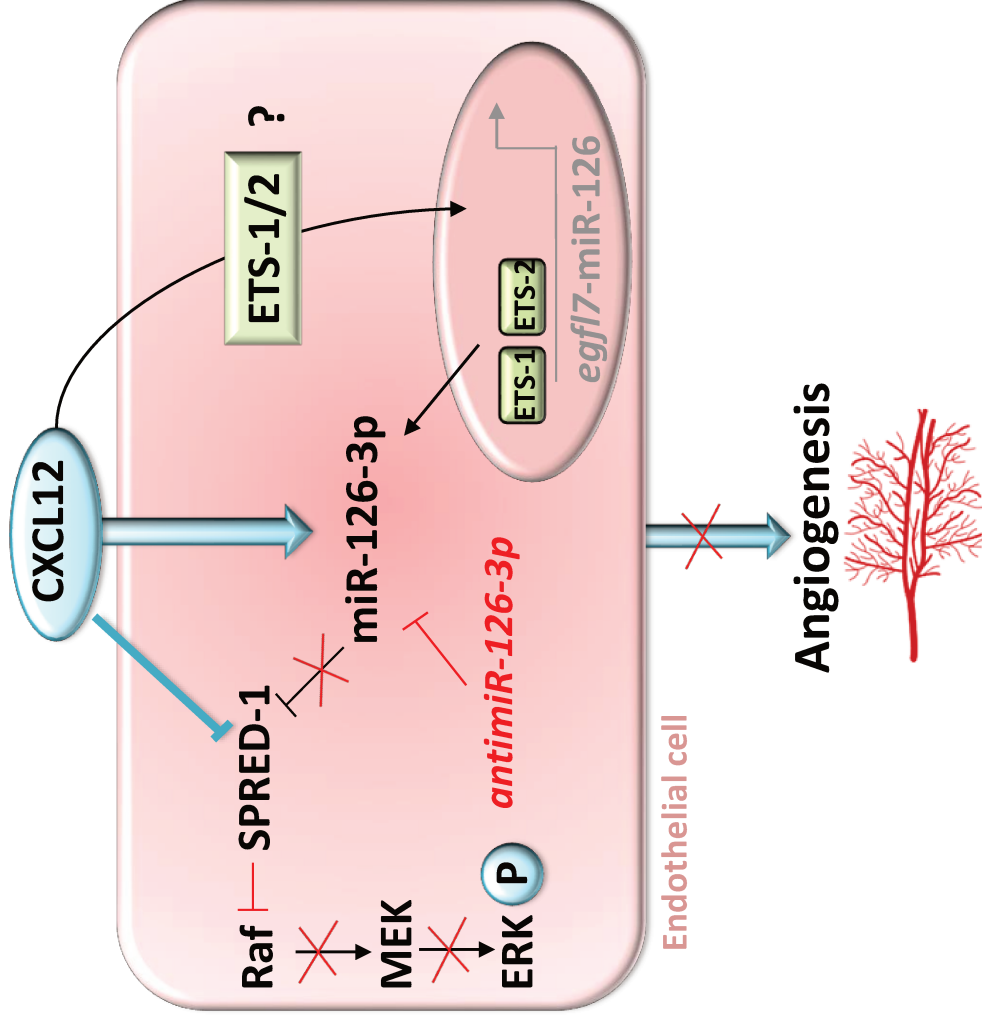


Figure 7. CXCL12 induce angiogenesis through miR-126-3p/SPRED-1 stimulation.

Our results showed for the first time that CXCL12 enhance miR-126-3p expression and its inhibition lead to a decrease of angiogenesis induced by CXCL12 in vitro. Moreover, CXCL12 induced a decrease of SPRED-1 (miR-126-3p known target) and this downregulation improve CXCL12 induced angiogenesis in vitro. In this context we hypothesized that CXCL12 induced angiogenesis through the expression of ETS_{1,2} transcription factor complex.

Article 2. *CXCL12 ⇔ Glycosaminoglycans dependent angiogenesis: implication of miR-126-3p*

Résumé:

L'obstruction d'un vaisseau sanguin conduit à une diminution locale de l'apport en dioxygène des tissus et peut induire une ischémie. Dans le but de prévenir l'ischémie une stimulation de l'angiogenèse doit se mettre en place. Pour cela, des facteurs pro-angiogéniques, comme des chimiokines, sont sécrétés afin de stimuler localement la formation de nouveaux vaisseaux sanguins via l'induction de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales. Le glycocalyx est composé d'un ensemble de polysaccharides parmi lesquels on retrouve des protéoglycannes à chaînes héparanes sulfates (PGHS). Les glycosaminoglycannes (GAG) constituant les PGHS sont nécessaire à au recrutement de progéniteurs endothéliaux induit par la chimiokine pro-angiogénique CXCL12 (SDF-1 α). En revanche, leur implication dans la stimulation de l'angiogenèse induite par CXCL12 est inconnue.

Notre travail consiste en l'étude de l'implication des GAGs dans la modulation du processus angiogénique. Pour cela, nous avons développé un modèle cellulaire et tissulaire dépourvu de GAG par l'action du 4-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranoside (β -D-X). Dans ces conditions, nous avons analysé la migration de cellules endothéliales humaines (HUVEC) mais également la formation de réseaux vasculaires *in vitro* par les cellules HUVEC et *ex vivo* par le bourgeonnement des cellules endothéliales d'anneaux aortiques de rat. De plus, en absence de GAG, nous avons étudiés l'activation de la voie de signalisation pro-angiogénique ERK1/2 induite par CXCL12.

Nos résultats ont montré que les GAG étaient indispensables à la formation de réseaux vasculaires, *in vitro* et *ex vivo* et impliqué dans la migration cellulaire induite par CXCL12. De plus, nos résultats montrent qu'en absence de GAGs la voie pro-angiogénique ERK1/2 est fortement activée.

Title: CXCL12 ⇔ Glycosaminoglycans dependent angiogenesis: implication of miR-126-3p

BASSAND, K^{1#}; NAÏM, M^{1#}; MOUHOUBI, N¹; HADDAD, O¹; ZAÏDI, N¹; SAINTE-CATHERINE, O¹; LAGUILLIER-MORIZOT, C^{1,2}; GUYOT, E^{1,2}; OUDAR, O¹; SUTTON, A^{1,2}; CHARNAUX, N^{1,2}; HLAWATY, H^{1*}.

Authors affiliations

Laboratory for Vascular Translational Sciences, INSERM U1148, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

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

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding Authors : 74 rue Marcel Cachin, UFR SMBH, INSERM U1148, Bureau 224, 93000 Bobigny (FRANCE): hanna.hlawaty@univ-paris13.fr; phone number : 0148388518

Keywords: Glycosaminoglycan, Angiogenesis, Chemokines, miR-126, CXCL12

Introduction

Endothelial glycocalyx is an ubiquitous element present on the cells surface. It consists of a layer of polysaccharides covalently associated with proteins and lipids associated with the outer membrane of the cells (Chappell *et al*, 2008). It is made of proteoglycans, such as Heparan Sulfate Proteoglycans (HSPGs) (Chappell *et al*, 2008). Cardiovascular diseases are one of the leading causes of death in the world. Among these pathologies, atherosclerosis leads to atheroma plaque formation obstructing blood vessels (Inampudi *et al*, 2018). Blood flow perturbation leads to ischemia related to a decrease in oxygen supply (hypoxia) as well as a decrease in nutrient supply to tissues downstream of this obstruction. In ischemic conditions, endothelial glycocalyx is damaged (Rehm *et al*, 2007; Chappel *et al*, 2010) and glycosaminoglycans (GAGs) are less functional and have a reduced affinity for growth factors (Chevalier *et al*, 2015). GAGs are a family of linear polysaccharides, including heparan sulfate, which interact with a wide range of proteins, including growth factors and chemokines, to regulate physiological and pathological processes (Handel *et al*, 2005). GAGs consist of the repetition of disaccharide units of sulphated and non-sulphated derivatives (Capila and Linhardt 2002; Gandhi and Mancera 2008).

In order to restore vascularization altered by ischemia, the body stimulates new blood vessel formation, also called angiogenesis (Madanecki *et al*, 2013). This process, led by endothelial cells (ECs), requires the synthesis of pro-angiogenic factors such as chemokines.

Chemokines are soluble proteins belonging to the cytokine family. In addition to their function in inflammation and recruitment of proinflammatory cells, chemokines can be implicated in proangiogenic process stimulation (Ridiandries *et al*, 2007). CXCL12 (SDF-1 α) is synthesized and secreted by ECs in ischemic conditions (Schioppa *et al*, 2003; Esencay *et al*, 2013). It stimulates angiogenesis through the recruitment of circulating endothelial progenitors' cells (EPCs) from bone marrow (Yamaguchi *et al*, 2003) but also by stimulating pro-angiogenic signaling pathways such as the ERK1/2 MAPK pathway. GAGs expression on the ECs surface allows CXCL12 to attract EPCs by its chemoattractive action (Rueda *et al*, 2012). However, there is no data to establish how GAGs are implicated in CXCL12-induced angiogenesis in resident ECs.

We have previously demonstrated that CXCL12 can induce microRNA-126 (miR-126) expression in human ECs (HUVEC) and that its expression is necessary for CXCL12 proangiogenic properties.

miRs are small, non-coding RNAs involved in gene expression regulation (Bartel *et al*, 2004) and proangiogenic processes (Suarez *et al*, 2008). In addition, miRs may be involved in the modulation of HSPGs expression or enzymes involved in their biosynthesis (Kasza *et al*, 2013). Moreover, we have previously demonstrated that miR-126 induces an increase of syndecan-4 (SDC-4) gene expression in HUVEC (Mondadori dos santos *et al*, 2015).

In our study, we hypothesize that GAGs are necessary for CXCL12-induced angiogenesis and that miR-126, by over-expressing of SDC-4, can act on GAGs and participate in the regeneration of a functional vascular endothelium.

Materials and methods

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC : ATCC® CRL-1730TM) were cultivated using Endothelial Cell Basal Medium 2 (ECBM2, ref C22211, Promocell, Heidelberg, Germany) supplemented with 12% of FBS, 5ng/mL of EGF, 0.2 µg / mL of hydrocortisone, 0.5 ng/mL of VEGF-A, 10 ng/mL of bFGF, 20 ng/mL of IGF-1, 1 µg/mL of ascorbic acid and 1% of penicillin/streptomycin. HUVEC were incubated at 37°C under controlled atmosphere with 5% of CO₂.

Animal model

Aortas from euthanized Sprague Dawley rats were taken. Experimental protocol was realized in accordance with the European Communities Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) for animal care and conducted in accordance with French laws for animal care.

GAGs inhibition and Flow cytometry assay

GAGs synthesis on HUVEC were inhibited using 4-Nitrophenyl β-D Xylopyranoside (β-D-X) at 2 mM for 48h (Sigma, St Quentin Favallier, France) and Heparan sulfate cell surface expression was analyzed using flow cytometry assay. HUVEC cells were detached using PBS-EDTA (10 mM) and incubated with an anti-heparan sulfate antibody (10 µg/mL of mouse IgM clone 10E4, amsbio, Oxon, England) or isotype

control for 1h at 4°C. After that, HUVEC were washed two times with PBS-BSA (0.05% BSA) and incubated with a secondary antibody goat anti mouse Ig associated with FITC (BD Biosciences) for 30 minutes at 4°C. Finally, HUVEC were fixed using paraformaldehyde at 1% for 20 minutes at 4°C and analyzed using FACScan (Becton Dickinson, Le pont de-Claix, France).

In vitro 2D angiogenesis

To study the implication of GAGs on vascular network formation *in vitro* induced by CXCL12, HUVEC cells were firstly treated or not treated for 24h using β -D-X. After that, HUVEC were stimulated or not using CXCL12 (R&D Systems, Lille, France) at 6nM associated or not with β -D-X at 2mM for 24h. Then, HUVEC were detached using PSB-EDTA (10mM) and 6500 of them were deposited on Matrigel (Corning, Amsterdam, Hollande) surface in 96 well plates. Cells were incubated for 6 hours in presence or not of CXCL12 and then fixed with paraformaldehyde 4%. Vascular networks formation was analyzed and mapped using phase contrast microscope (Leica) associated with Archimed software (Microvision, Evry, France). The results present the number of meshes quantified using Histolab software (Microvision, Evry, France).

Aortic rings assay

ex vivo angiogenesis was studied using aortic rings assay model. To do that, aorta from 4-7 old week rats were dissected and deposited on 96 well plate precoated with Matrigel. Aortic rings were then treated or not with β -D-X (2 mM) and with or without CXCL12 up to 9 days. Treatments were repeated each 2 days. Finally, aortas were fixed using paraformaldehyde at 4% for 30 minutes at 4°C and vascular networks formation was analyzed following the same protocol as *in vitro* angiogenesis assay.

Migration Assay

In order to study the role of GAGs in cell migration, 40.000 HUVEC treated or not with β -D-X (2 mM) were deposited inside a boyden insert chamber (0.8 μ m) precoated with fibronectin. Inserts were then deposited on 48 well plates with or without CXCL12 (6nM) in the lower chamber for 24h. Cells were fixed in ethanol for 15 minutes and colored using hematoxylin for 24h. Finally, migrated cells were quantified under phase contrast microscope (Zeiss Axiophot).

Western Blot

Analysis of ERK1/2 activation was performed using western blot. Protein extraction was performed from cell lysate of GAGs-free HUVEC treated or not treated with CXCL12. 20µg of total protein Total protein was probed using anti-phospho or anti-ERK1/2 antibody (mouse monoclonal antibody diluted at 1/500 and 1/1000 respectively, Cell signaling) overnight at 4°C with gentle agitation. After that, secondary antibody (anti-mouse horseradish peroxidase) was added for 30 minutes at room temperature. Proteins were detected using Enhanced chemiluminescence detection reagents (Pierce™ ECL western blotting substrate).

miRNA transfection

premiR-126-3p (ref 10782307, Assay ID PM2841, Fisher Scientific), antimiR-126-3p (ref 10299484, Assay ID AM10401, Fisher Scientific) or scramble negative control were transfected in HUVEC at 20nM during 24h in presence of INTERFERin transfection reagent (Polyplus) according to the manufacturer instructions. Cells were then harvested for further analysis.

qRT-PCR

Real-time RT-PCR were performed using an Applied Step-One device with SULF-1 (Hs01016469_g1) or SULF-2 (Hs01016477_g1) TaqMan Inventoried Assay and TaqMan Gene Expression Master Mix kit (Life Technologies, Saint Aubin, France). The mRNA levels were normalized with *β-Actin* housekeeping gene levels (Hs02758991_g1, TaqMan Inventoried Assay; Life Technologies, Saint Aubin, France).

Results

❖ GAGs were involved in CXCL12-induced vascular network formation *in vitro* and *ex vivo*.

To analyze the implication of GAGs in CXCL12 induced vascular network formation, we first developed a GAGs-free HUVEC model using an inhibitor of GAGs elongation (β -D-X). Our results showed that there was a decrease of $50 \pm 7\%$ of heparan sulfate expression on HUVEC membrane after β -D-X treatment compared to untreated HUVEC (Figure 1A). After that, to study the role of GAGs in CXCL12 induced angiogenesis, GAGs free HUVEC or rat aortas treated with β -D-X were used in 2D angiogenesis model on Matrigel. Our results showed that there was a significant

decrease of $33 \pm 5\%$ of vascular network formation length after treatment with β -D-X compare to untreated HUVEC. Moreover, there was a significant increase of $23\% \pm 5\%$ after CXCL12 stimulation compared to unstimulated HUVEC. Interestingly, there was a decrease of $77 \pm 5\%$ of vascular network length after treatment with β -D-X and stimulation with CXCL12 compare to HUVEC stimulated with CXCL12 only (Figure 1B). In parallel, similar results were obtained in *ex vivo* model of angiogenesis. Indeed, our results showed that there was a decrease up to $88.5 \pm 5\%$ of meshes number after treatment with β -D-X compare to untreated aortas. Moreover, there was a significant increase of $58.5 \pm 8\%$ after stimulation with CXCL12 compare to unstimulated aortas. In addition, similarly to our *in vitro* model, we lost the proangiogenic effect induced by CXCL12 after β -D-X treatment. Indeed, there was a significant decrease of $88.5 \pm 7\%$ after both β -D-X treatment and CXCL12 stimulation as compare to aortas only stimulated with CXCL12 (Figure 1C).

❖ **GAGs reduced ERK1/2 phosphorylation induced by CXCL12.**

In order to know how the loss of GAGs could impact the CXCL12-induced angiogenesis, we analyzed, in absence of GAGs, the activation of ERK1/2 proangiogenic signaling pathway after CXCL12 treatment. Our results showed that there was an increase of phosphorylated form of ERK1/2 after HUVEC stimulation with CXCL12 up to 15 minutes (Figure 2). Surprisingly, our results showed that there was an increase of phospho-ERK1/2 in GAGs free HUVEC (Figure 2). Moreover, our results showed that there was an increase of CXCL12 induced ERK1/2 phosphorylation after β -D-X treatment and CXCL12 stimulation compared to HUVEC only stimulated with CXCL12.

❖ **GAGs reduced CXCL12-induced HUVEC migration.**

The impact of CXCL12 treatment on HUVEC migration was studied using boyden chamber model in a GAGs free model. Our results showed that there was a significant increase of $29 \pm 5\%$ of HUVEC migration after CXCL12 stimulation us compare to untreated cells (Figure 3). Interestingly, there was a significant increase of $47.6 \pm 7\%$ of cell migration after β -D-X treatment. Moreover, our results evidenced that there was a significant increase of migration up to $47.5 \pm 5\%$ after β -D-X treatment and CXCL12 stimulation as compare to untreated HUVEC. In addition, there was no significant

changes between HUVEC treated only with β -D-X and HUVEC treated with β -D-X associated with stimulation by CXCL12.

Le travail sur la partie GAGs n'est pas encore aboutit. La suite de ce travail sera poursuivie par Mériem Naïm que j'ai co-encadré durant son Master 2. Nous étudierons l'implication du miR-126 dans l'expression d'enzymes impliqués dans la biosynthèse et les modifications des GAGs (SULF-1 et 2, EXT-1 et 2, les NDST etc...).

Par ailleurs, nous effectuerons une analyse de la composition des GAGs par HPLC afin de déterminer si le miR-126 peut moduler la composition biochimique des GAGs en modulant notamment le taux de chaînes HS vs CS ou la modulation du taux de sulfatation.

De plus, une fois les GAGs extraits à partir des cellules HUVEC transfectées par les miR-126, nous effectuerons une analyse de l'affinité de ces chaînes pour la chimiokine CXCL12.

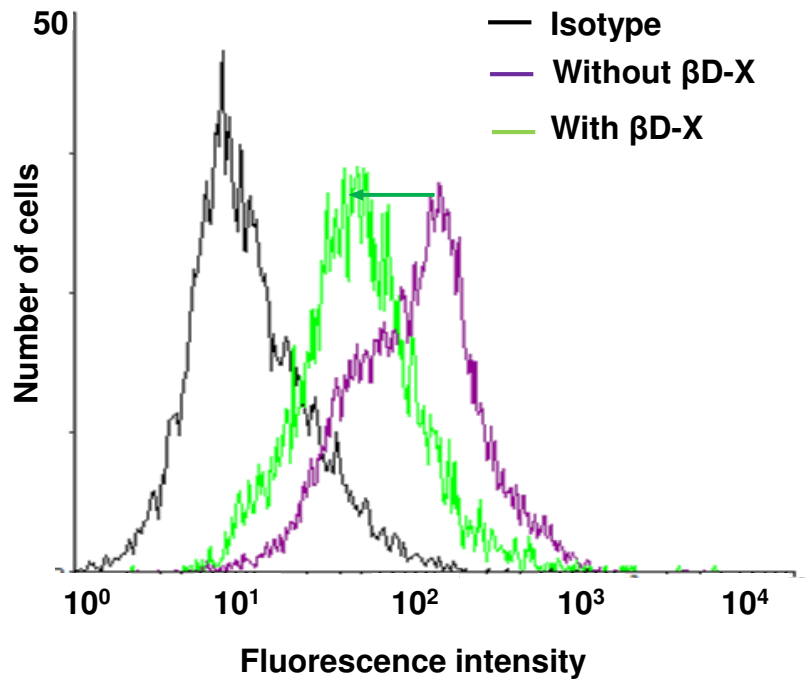


Figure 1. Heparan sulfate was inhibited after β D-X treatment in HUVEC.

HUVEC were treated or not treated with β D-X at 2nM for 48h. Cell surface HS level was analyzed using flow cytometry.

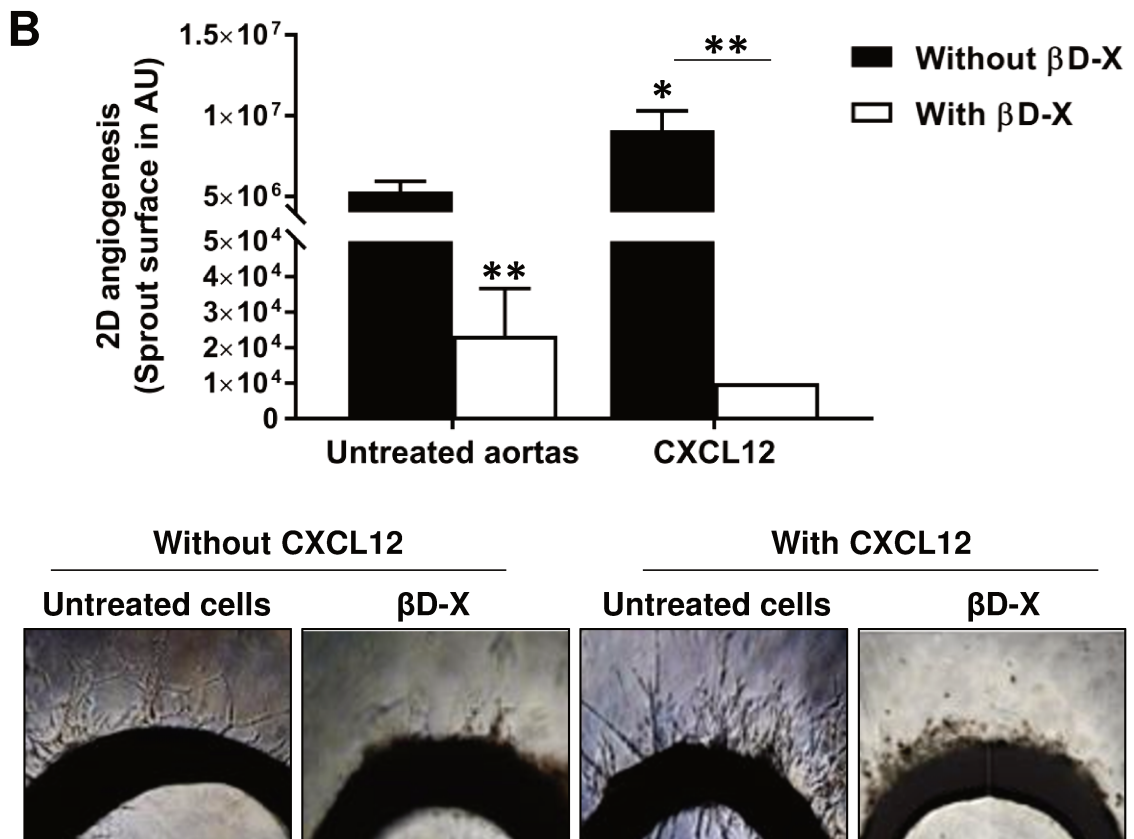
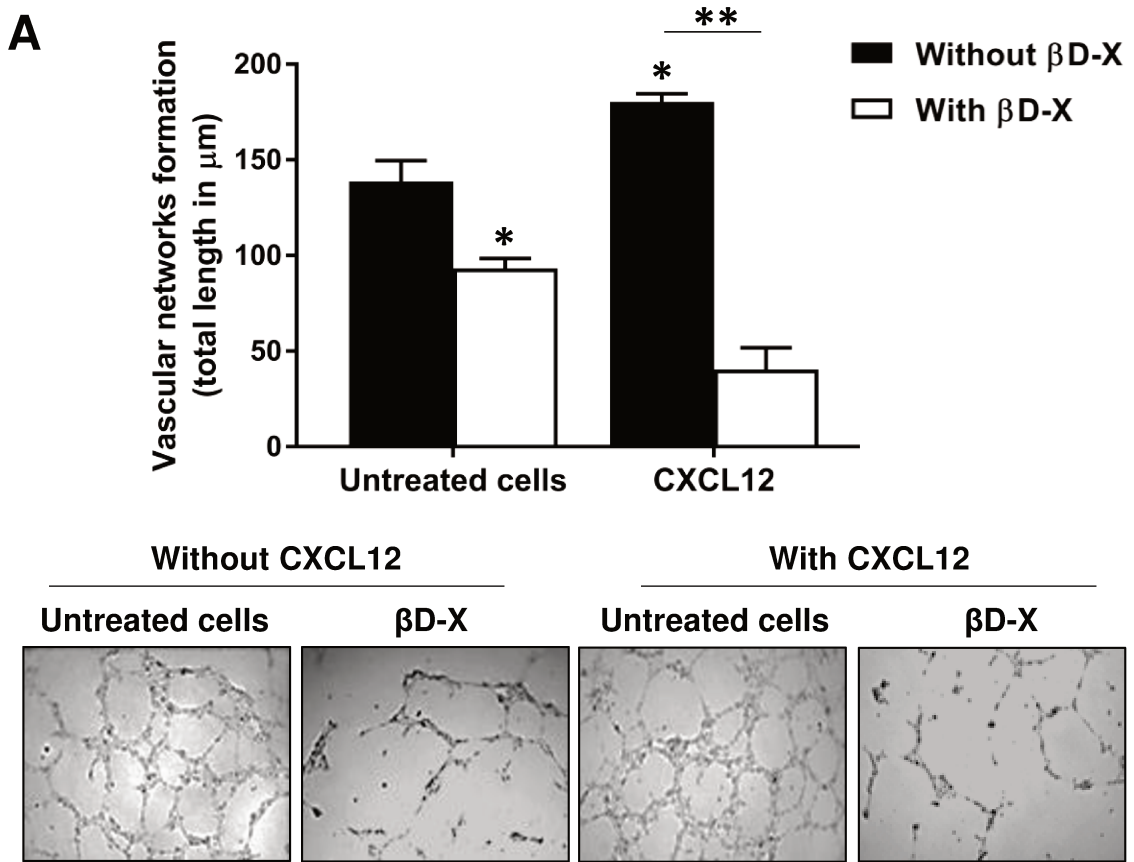


Figure 2. GAGs are necessary for CXCL12 induced angiogenesis.

A. In vitro Vascular network formation on Matrigel was study HUVEC treated or not treated with $\beta\text{D-X}$ for 48h and stimulated or not stimulated with CXCL12 for 24h. * $p < 0,05$ vs untreated cells without $\beta\text{D-X}$ ** $p < 0,01$

B. *Ex vivo* angiogenesis was study Using rat aorta treated or not treated with $\beta\text{D-X}$ and stimulated or not with CXCL12. * $p < 0,05$ vs untreated aortas without $\beta\text{D-X}$, ** $p < 0,01$ vs untreated aortas without $\beta\text{D-X}$

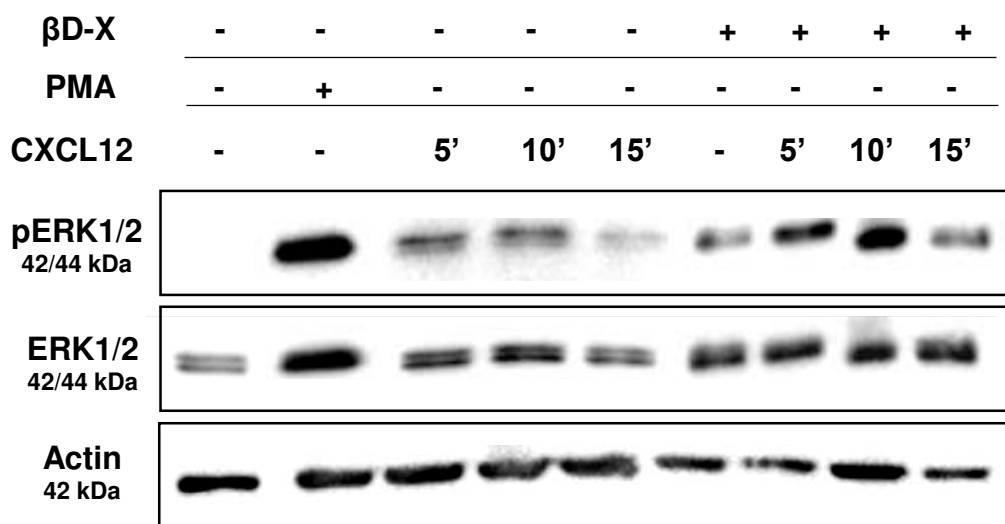


Figure 3. GAGs inhibited CXCL12 induced ERK1/2 phosphorylation.

ERK1/2 phosphorylation was studied using western blot assay in GAG-free HUVEC model stimulated or not with CXCL12 at 6nM for 5-10 or 15 minutes.

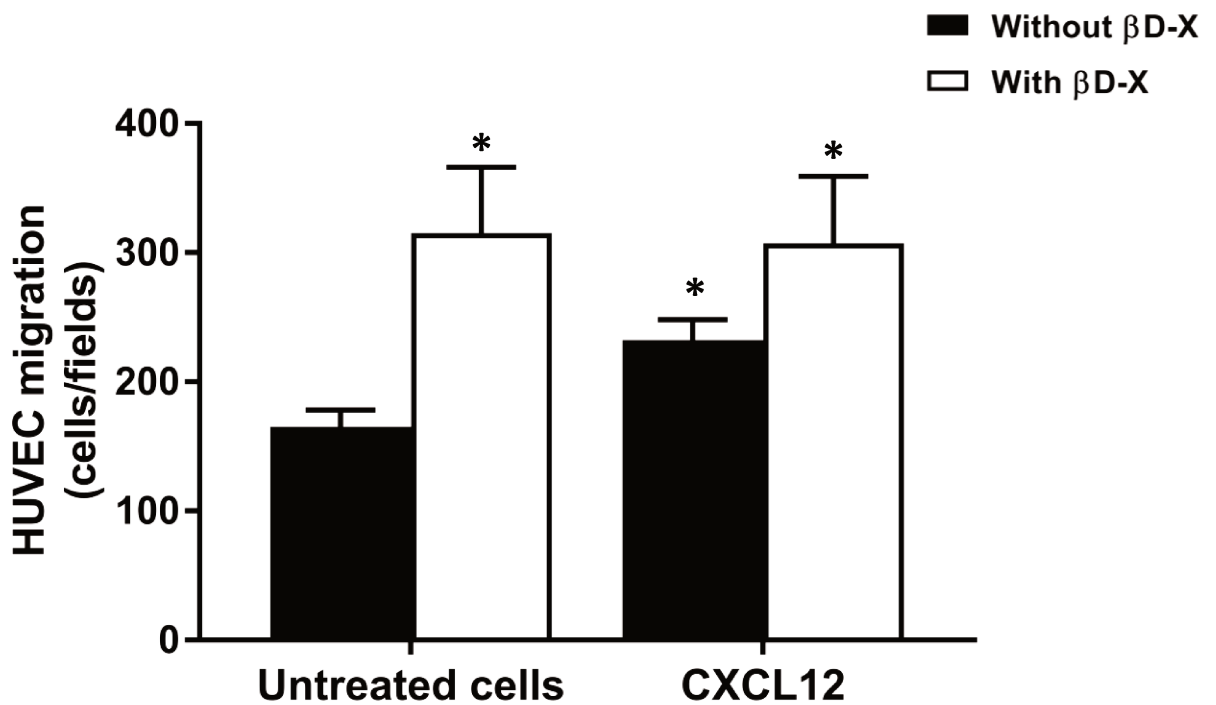


Figure 4. GAGs are implicated in CXCL12 –induced HUVECs migration

HUVEC migration was studied using Boyden chamber model. 50.000 HUVEC were treated or not treated with β D-X and deposited on the upper chamber. The Cell migration was stimulated by using CXCL12 in the bottom chamber for 24h at 6nM. Migrated cells were colored using hematoxylin and quantified under phase contrast microscope. * $p < 0,05$ vs untreated cells without β D-X,

DISCUSSION

Les pathologies cardiovasculaires constituent l'une des premières causes de mortalité dans le monde.

Un certain nombre de facteurs de risques (l'hypercholestérolémie, le tabagisme, l'alcool, l'âge, le sexe etc) peuvent conduire à l'obstruction d'une artère pouvant causer une hypoxie et une diminution de l'apport en nutriments aux tissus : c'est l'ischémie. En réponse à l'ischémie, l'organisme se défend et stimule un processus appelé angiogenèse afin de rétablir un apport normal en O₂ et en nutriments aux tissus de la zone lésée.

Au cours de cette thèse, je me suis intéressé à deux facteurs pro-angiogéniques que sont la chimiokine CXCL12 et le miR-126. Dans ce contexte, j'ai cherché à démontrer pour la première fois le rôle de CXCL12 dans la stimulation de l'expression du miR-126. Mon hypothèse étant que le miR-126 est nécessaire aux effets pro-angiogéniques induits par CXCL12. De plus, l'originalité de mon travail consiste en une étude simultanée de l'implication du miR-126-3p et du miR-126-5p.

En parallèle, je me suis intéressé aux GAG présents à la surface des cellules endothéliales (CE). Dans un contexte ischémique, une dégradation importante du glycocalyx est observée. Sachant que les GAG sont essentiels au chimiotactisme induit par CXCL12, je me suis intéressé à l'implication de ces derniers dans le processus d'angiogenèse induit par CXCL12.

Dans le but de traiter les ischémies, deux thérapies peuvent ainsi être envisagées afin de permettre une régénérescence des GAG endommagés et la stimulation de la néo-angiogenèse.

❖ Effet pro-angiogénique de CXCL12

Dans mon étude, je me suis intéressé au processus d'angiogenèse et plus particulièrement aux effets de la chimiokine CXCL12. L'angiogenèse est un processus multi-étapes impliquant les CE qui vont, en réponse à certains stimuli migrer, proliférer et former des réseaux vasculaires afin de créer de nouveaux vaisseaux matures et fonctionnels, à partir de ceux préexistants. Dans ma thèse, j'ai choisi d'étudier le processus de migration cellulaire, en utilisant un système de chambre de Boyden *in vitro*. La formation de réseaux vasculaires, par les cellules endothéliales humaines de

cordon ombilical HUVEC, a été étudiée *in vitro* dans le modèle d'angiogenèse en 2D sur Matrigel, et *ex vivo*, dans le modèle de bourgeonnements des CE d'anneaux aortiques prélevés chez le rat et cultivés sur Matrigel que j'ai mis au point au laboratoire.

Conformément à la littérature, CXCL12 induit une augmentation de la migration des HUVEC ainsi que la formation d'ébauches vasculaires *in vitro* et *ex vivo* mais aussi la stimulation de la voie de signalisation pro-angiogénique MAPK ERK1/2 (Salcedo *et al.*, 1999; Mirshahi *et al.*, 2000).

Dans la littérature, l'effet pro-angiogénique des chimiokines et notamment CXCL12 est souvent uniquement associé à la stimulation de voies de signalisation intracellulaires. L'implication des miRs dans la régulation du processus angiogénique induit par les chimiokines sur les CE n'est pas encore étudiée. En revanche, dans le modèle d'angiogenèse tumorale, il est montré que certaines chimiokines, comme le CCL5, peuvent moduler l'expression des miRs dans des lignées cancéreuses (Wang *et al.*, 2016). Concernant les CE, aucune donnée n'est encore décrite dans la régulation de l'angiogenèse. Pour l'ensemble de ces raisons, nous avons souhaité, dans notre modèle *in vitro* de cellules HUVEC ou *ex vivo* sur des aortes de rats, étudier l'effet d'une stimulation de CXCL12 sur l'expression des miR-126-3p et miR-126-5p, jamais étudiés en parallèle.

❖ **CXCL12 induit l'expression du miR-126-3p *in vitro* et *ex vivo*.**

Les miRs sont de petits ARN non codants impliqués dans la régulation de l'expression des gènes et dans des processus physiopathologiques comme l'angiogenèse. Le miR-126 est un miR fortement exprimé par les CE. Il est étudié depuis plusieurs années comme acteur de la régulation de processus physiopathologiques comme l'hyperplasie intimale, l'inflammation ou encore l'angiogenèse (Fish *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Poissonnier *et al.*, 2014; Schober *et al.*, 2014).

Nous avons démontré par qRT-PCR qu'après 24h de stimulation des HUVEC *in vitro* ou des aortes de rat *ex vivo* par CXCL12, l'expression du miR-126-3p est augmentée. En revanche, nous ne présentons pas les données obtenues sur la mesure de

l'expression du miR-126-5p. En effet, de trop grandes variations (induction ou inhibition de l'expression du miR-126-5p) ont été observées après la stimulation par CXCL12. Il est clair d'après nos expériences qu'il existe une forme de régulation fine de l'expression du miR-126-3p et du miR-126-5p. Comparativement aux ARNm, la stabilité des miRs est assez élevée (10h vs 28-220h) (Zhang *et al.*, 2012). Le miR-126-3p et le miR-126-5p sont les deux brins complémentaires constituant le pré-miR-126. Cela signifie qu'ils devraient être transcrits de la même manière. En revanche, au cours de la maturation des miRs, le brin 3p du duplex est thermodynamiquement plus stable et la quantité disponible dans la cellule est plus importante que celle observée pour le brin 5p. Nous le constatons dans nos cellules, en absence de toute stimulation, le miR-126-3p est 115 fois plus présent que le miR-126-5p (Figure 24). Cela suggère un processus de régulation actif impliquant soit la dégradation du miR-126-5p par des ribonucléases comme *la small RNA degrading nuclease 1* (SDN1) (Ramachandran et Chen, 2008) soit une sécrétion via des microvésicules endothéliales (exosomes) comme suggéré par Codagnone *et al* (Codagnone *et al.*, 2017).

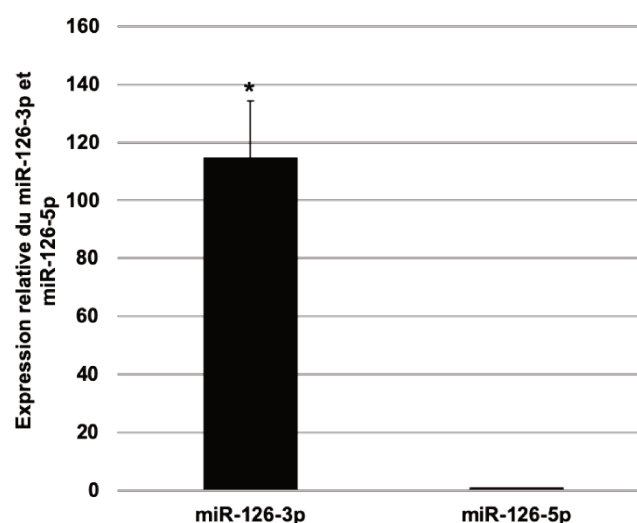


Figure 26. Le miR-126-3p est majoritairement exprimé dans les cellules HUVEC.

Par la suite, nous avons souhaité étudier si l'induction du miR-126-3p permise par CXCL12, était due à une augmentation de l'activité transcriptionnelle au niveau du promoteur du gène *Egfl7* codant pour le miR-126. Pour cela nous avons choisi la

technique de « *luciferase reporter assay* ». Pour cela, nous avons utilisé un autre modèle cellulaire, des cellules cancéreuses, comme l'ont fait Wang *et al* en 2008 ou Sun *et al* en 2018, afin d'augmenter l'efficacité de transfection (Wang *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2018). En effet, les cellules HUVEC étant difficilement transfectables par des plasmides, nous avons donc choisi d'étudier l'activité du promoteur *egfl7* dans le modèle de cellules de carcinome hépatocellulaire humaine Huh7. Nous avons conscience que changer de modèle cellulaire n'est pas sans conséquences sur les conclusions que nous pouvons apporter et qu'il peut y avoir des différences d'expression des récepteurs ou corécepteurs de CXCL12. Cependant, seule l'induction de la transcription nous intéresse. En ayant au préalable démontré une augmentation de l'expression du miR-126-3p, une induction de la transcription sera pour nous une preuve suffisante pour conforter notre hypothèse.

Nous démontrons ainsi que la stimulation par CXCL12 a augmenté la luminescence émise par les cellules Huh7 reflétant une augmentation de l'activité du promoteur *egfl7*. Mon hypothèse est que l'augmentation de l'activité du promoteur pourrait être due à une activation des facteurs de transcription ETS1/2, connus comme étant impliqués dans l'activation de ce promoteur et impliqués dans l'expression du miR-126. En effet, il a été montré par Harris TA *et al* que l'activation de ces facteurs conduit à une augmentation de la transcription du gène *Egfl7* associée à une surexpression du miR-126-3p. Par ailleurs, l'activation du facteur ETS par CXCL12 a été démontrée en 2005 par Luo *et al* dans un modèle de cellules neurales (Luo *et al.*, 2005).

Pour confirmer cela, je propose de stimuler des cellules HUVEC avec CXCL12 et d'étudier l'activation des facteurs ETS en analysant leur translocation nucléaire par la technique de sous-fractionnement cellulaire ou par immunofluorescence. Si ces facteurs sont activés (présents dans le noyau), il peut être nécessaire de démontrer qu'ils sont bien responsables de l'activation de la transcription du miR-126 induite par CXCL12. Pour cela, deux stratégies peuvent être déployées : une stratégie ARN interférence peut être développée afin d'inhiber l'expression des facteurs ETS (siRNA-ETS1+siRNA-ETS2) et quantifier l'expression des miR-126 dans les cellules HUVEC par la technique de RT-qPCR. L'autre stratégie serait d'utiliser des plasmides codants pour la luciférase contenant le promoteur du gène *Egfl7* (codant pour le miR-126)

sauvage et muté au niveau des sites de fixation pour les facteurs ETS sur le promoteur de miR-126.

Sachant qu'il existe une régulation de l'expression du miR-126 par CXCL12, j'ai par la suite étudié l'implication de ce dernier dans le processus angiogénique induit par CXCL12.

Comme pour tous les miRs, leur biosynthèse aboutit préférentiellement à l'accumulation d'un seul brin, le miR-3p (Schwarz *et al.*, 2003). En revanche, il est montré que les deux brins d'un même miR peuvent être fonctionnels et avoir des cibles différentes (Poissonnier *et al.*, 2014).

En revanche, rares sont les études qui s'intéressent, simultanément, à l'implication en parallèle du miR-126-3p et du miR-126-5p dans le même modèle cellulaire.

C'est pourquoi, l'originalité et la force de ma thèse sont le développement simultané des modèles de surexpression et de sous-expression des miR-126-3p et miR-126-5p (en mettant en place les outils suivants : premiR-126-3p et -5p et antimiR-126-3p et -5p) mais également l'impact d'une modulation de ces deux brins, ensemble, dans la régulation du processus angiogénique induit par CXCL12.

❖ **Le miR-126-3p induit la migration des cellules HUVEC *in vitro*.**

Nos résultats montrent que le premiR-126-3p/5p ou le premiR-126-3p induit une augmentation de la migration des HUVEC. En revanche, il ne semble pas y avoir de différence significative avec les antimiR-126-3p/5p, antimiR-126-3p, premiR-126-5p ou antimiR-126-5p. Nous pouvons ainsi dire qu'une augmentation de l'expression du miR-126-3p induit un effet pro-migratoire sur les cellules HUVEC indépendamment de la présence du miR-126-5p qui ne semble pas avoir d'effet dans le processus de migration.

Dans un autre modèle de cellules primaires HUVEC (fraichement isolées du cordon ombilical humain), le miR-126-5p semble stimuler la migration (Esser *et al.*, 2017). Nous ne pouvons comparer nos résultats avec ceux obtenus dans cette publication car le processus de migration étudié n'est pas le même. Dans ce travail, le processus de migration est analysé selon le procédé du « scratch Assay » 48h après la transfection par le premiR-126-5p à une concentration de 8nM. De plus, à cette

concentration de premiR-126-5p, il semble y avoir une augmentation de l'ordre de 150 fois de la quantité de miR-126-5p disponible dans les cellules HUVEC comparativement aux cellules transfectées par un scramble. Dans ma thèse, le processus de migration est étudié en chambre de Boyden. Dans cette expérience, les cellules HUVEC ont été transfectées durant 24h avec du premiR-126-5p à une concentration de 20nM. Dans ces conditions, une augmentation de 4,6 fois de la quantité de miR-126-5p a été observée dans les cellules HUVEC comparativement aux cellules contrôles.

Aucune autre étude n'ayant analysé le processus de migration induit par le miR-126-5p dans les cellules endothéliales, il nous est difficile de comparer nos résultats. En revanche, il a été démontré qu'une surexpression de ce brin induit une diminution de la migration des CML (Z. Chen *et al.*, 2019).

L'effet pro-migratoire du miR-126-3p est quant à lui similaire à celui observé dans le modèle de CE de la veine saphène (HSVECs) (Qu *et al.*, 2017).

❖ **Le miR-126 induit la formation de réseaux vasculaires de cellules HUVEC *in vitro*.**

Concernant la formation de réseaux vasculaires sur Matrigel, nos résultats montrent que le premiR-126-3p/5p ou le premiR-126-3p induit une augmentation de la formation de réseaux vasculaires par les HUVEC *in vitro*. De plus, nos résultats mettent en évidence que l'antimiR-126-3p/5p ou l'antimiR-126-3p (dont le rôle est d'inhiber l'expression du miR-126-3p ou du miR-126-5p) entraîne une diminution de cet effet. En revanche, il ne semble pas y avoir de différence significative après transfection par le premiR-126-5p ou l'antimiR-126-5p. Nous pouvons ainsi conclure que l'effet pro-angiogénique du miR-126 est spécifique à l'augmentation de la quantité de miR-126-3p, indépendamment de la présence du miR-126-5p

De façon surprenante, nous constatons une différence significative entre le premiR-126-3p/5p et le premiR-126-3p. En effet, la formation de réseaux vasculaires est significativement plus importante après surexpression du miR-126-3p seul. Nos résultats suggèrent un fort potentiel pro-angiogénique associé à une augmentation de l'expression du miR-126-3p comme démontré par Wang *et al* (Wang *et al.*, 2008). En

revanche, dans notre modèle, l'augmentation simultanée des deux brins du miR-126 induit un effet pro-angiogénique mais moins important que celui associé au miR-126-3p seul. Cela suggère que la présence du miR-126-5p diminue l'effet induit par le miR-126-3p. Cependant, l'augmentation de l'expression du miR-126-5p ne semble pas avoir d'effet inhibiteur sur la formation de réseaux vasculaires dans notre modèle. L'absence d'effet du miR-126-5p est contraire à ce qui est retrouvé dans l'étude d'Esser *et al* (Esser *et al.*, 2017). En revanche, plusieurs points de divergence sont à noter entre nos deux études. Le premier point de discordance est une différence dans le modèle cellulaire utilisé, mais également dans le nombre de cellulesensemencées et le temps d'incubation sur matrigel (3h vs 6h dans notre étude). De plus, dans leur modèle d'angiogenèse *in vitro*, leurs cellules HUVEC sont stimulées au préalable par du bFGF. Ainsi, nous pouvons conclure de leur résultat que le miR-126-5p induit une augmentation de la formation d'ébauches vasculaires à la suite d'une stimulation par le bFGF, mais nous ne pouvons rien conclure quant à l'effet propre du miR-126-5p seul.

Une seule étude a montré l'implication des miR-126-3p et -5p dans la formation d'ébauches vasculaires *in vitro* et *in vivo* (Zhou *et al.*, 2016). Plusieurs points de divergences avec notre travail sont à noter. Pour commencer, l'angiogenèse de la choroïde y est étudiée dans un contexte pathologique. Après transfection des cellules épithéliales (cellules ARPE) de la rétine, une néo-angiogenèse est induite au laser mimant ainsi une situation retrouvée dans le cas de la rétinopathie diabétique ou de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. *In vitro*, l'angiogenèse est étudiée dans un modèle de co-culture contenant des cellules HUVEC transfectées (par les miRs ou antimiRs), mises en présence de fibroblastes jusqu'à 14 jours de culture. Dans cette étude, les résultats ne sont pas très concluants. En effet, l'angiogenèse *in vivo* est inhibée quelle que soit la modulation du miR-126-3p (surexpression ou inhibition de son expression). De plus, il n'y a pas d'effet lié à l'inhibition du miR-126-5p *in vivo* et il n'y a pas d'indications concernant sa surexpression. *In vitro*, l'inhibition du miR-126-3p conduit à une inhibition de l'angiogenèse et la surexpression ne semble pas avoir d'effet. Concernant le miR-126-5p, son inhibition n'a pas d'effet alors qu'une surexpression induit une augmentation de l'angiogenèse.

Pour conclure sur les effets propres des miR-126 dans la régulation du processus angiogénique, nous pouvons dire que, dans notre modèle, seul le miR-126-3p module ce processus.

❖ **Le miR-126-3p est nécessaire aux effets pro-angiogéniques induits par CXCL12 *in vitro*.**

Une fois nos outils validés et leur implication dans l'angiogenèse démontrée, nous avons étudié l'impact d'une modulation des miR-126-3p et miR-126-5p dans l'angiogenèse induite par CXCL12.

Pour cela, nous avons tout d'abord étudié le phénomène de migration des cellules HUVEC stimulées par CXCL12 et dont l'expression des miR-126 a été modulée. Nos résultats montrent que seule l'inhibition du miR-126-3p modifie l'effet pro-angiogénique de CXCL12. En effet, bien qu'une surexpression du miR-126-3p ne stimule pas de façon plus importante la migration cellulaire, la présence de ce brin semble être indispensable à l'induction permise par CXCL12. Comme nous l'avons préalablement démontré au laboratoire (Mondadori dos Santos *et al.*, 2015), l'inhibition du miR-126-3p cause une réduction de l'ARNm du CXCR4 et du SDC-4, qui sont des récepteurs et corécepteurs de CXCL12. Une réduction de ces récepteurs à la membrane des cellules HUVEC pourrait expliquer l'absence d'effet pro-migratoire induit par CXCL12.

Enfin, la présence ou l'absence du miR-126-5p ne modifie pas l'effet de CXCL12 sur la migration des HUVEC.

De façon complémentaire, et dans les mêmes conditions, nous avons étudié l'impact d'une modulation des miR-126-3p et 5p dans la formation de réseaux vasculaires induite par CXCL12 sur des HUVEC *in vitro*. De façon intéressante, nous avons retrouvé des résultats différents dans ce processus comparativement à ceux observés dans la migration.

En effet, nos résultats montrent que le miR-126 semble être impliqué de façon plus importante dans la formation de réseaux vasculaires que dans le processus de migration.

Ici, la surexpression du miR-126-3p seule ou associée à celle du miR-126-5p conduit à un effet pro-angiogénique additif à celui observé par une unique stimulation par CXCL12. En revanche, la surexpression du brin 5p seul, ne semble pas avoir d'effet sur la formation de réseaux vasculaires induite par CXCL12. De plus, l'inhibition du miR-126-3p/5p à l'aide d'un antimiR-126-3p/5p, ou du miR-126-3p à l'aide d'un antimiR-126-3p seul entraîne une abolition de l'effet pro-angiogénique induit par CXCL12.

De façon intéressante, nous montrons une différence significative lorsque nous comparons les HUVEC transfectées par le premiR-126-3p/5p ou le premiR-126-3p seul, en présence de CXCL12. En effet, l'effet synergique sur la formation de réseaux vasculaires obtenu suite à la transfection des cellules HUVEC avec le premiR-126-3p/5p ou le premiR-126-3p seul et leur traitement par CXCL12, est d'autant plus important lorsque seul le miR-126-3p est surexprimé. Bien qu'à lui seul, le miR-126-5p ne module pas l'effet pro-angiogénique de CXCL12, il semble inhiber l'effet additif apporté par la surexpression du miR-126-3p en présence de CXCL12. Les mécanismes à l'origine de cet effet inhibiteur causé par le miR-126-5p sur l'angiogenèse induite par CXCL12 restent à élucider.

❖ **Le miR-126-3p est nécessaire à l'induction de l'angiogenèse par CXCL12 *ex vivo*.**

Pour confirmer l'implication du miR-126 et notamment du miR-126-3p dans le processus d'angiogenèse induit par CXCL12, nous avons développé un second modèle d'étude de l'angiogenèse *ex vivo* à partir d'anneaux aortiques de rats basé sur l'analyse du bourgeonnement des CE de l'aorte. Ainsi, nous confirmons l'effet pro-angiogénique associé à une augmentation du miR-126-3p/5p ou du miR-126-3p seul mais sans effet additif associé à celui de CXCL12 seul.

De plus, l'absence du miR-126-3p/5p ou du miR-126-3p seule obtenue suite à la transfection des HUVEC avec l'antimiR-126-3p/5p ou l'antimiR126-3p, inhibe l'effet pro-angiogénique induit par CXCL12. Par ailleurs, l'augmentation de l'expression du miR-126-5p ne module pas l'effet pro-angiogénique de CXCL12, ce qui confirme nos

résultats obtenus *in vitro*. En revanche, contrairement aux résultats obtenus *in vitro*, l'absence du miR-126-5p réduit l'effet pro-angiogénique de CXCL12.

Pour expliquer cette différence entre les résultats *in vitro* et *ex vivo*, nous émettons l'hypothèse que, dans le processus d'angiogenèse *ex vivo*, les CE ne sont pas les seules cellules à pouvoir agir en réponse au miR-126-5p. Il s'agit d'un modèle tissulaire complexe dans lequel se trouvent des CE présentes au niveau de l'intima mais également des CML présentes au niveau de la media ou des fibroblastes présents au niveau de l'adventice. Dans ce contexte, nous pouvons envisager que l'absence du miR-126-5p dans ces deux autres types cellulaires puisse être perçue comme un signal réduisant le potentiel angiogénique de CXCL12. En effet, dans ce modèle, nous ne pouvons être assurés que seules les CE ont été transfectées par nos outils. Afin d'identifier les types cellulaires transfectés durant notre protocole, je propose de transfecter les aortes de rat avec un miR fluorescent et réaliser une analyse histologique et immunohistochimique avec des anticorps spécifiques de chaque type cellulaire (CD31 pour les CE, l'alpha actine musculaire lisse pour les CML et la vimentine pour les fibroblastes). Un co-marquage indiquerait que les CML ou les fibroblastes sont susceptibles d'être transfectés par le miR.

De façon très surprenante, nous constatons dans notre modèle *ex vivo* qu'en absence du miR-126-3p, il y a une faible augmentation de la formation de réseaux vasculaires. Notre modèle *ex vivo* est réalisé à partir d'anneaux aortiques de rats mis en culture sur une période prolongée (9 jours). Dans ce contexte, plusieurs hypothèses pourraient expliquer un effet pro-angiogénique observé à long terme après inhibition du miR-126-3p et notamment le rôle de l'activation de la PKC permise par la présence du VEGF-A et de CXCL12 (Figure 25).

Notre première hypothèse est que l'effet observé serait dû à une synthèse de VEGF-A par les aortes en réponse à CXCL12, que nous pourrions mettre en évidence par la technique ELISA sur des milieux conditionnés d'aortes de rat soumises ou non à CXCL12. CXCL12 étant également sécrétée en absence de miR-126-3p (Van Solingen *et al.*, 2011). En effet, il a été démontré sur des modèles de CE que CXCL12 induit la synthèse et la sécrétion de VEGF-A (Ye *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2016). Par ailleurs il a été démontré que le VEGF-A mais également CXCL12, en se fixant à leurs

récepteurs spécifiques, peuvent stimuler les voies de signalisation de la PKC (Valdés *et al.*, 2008; Cojoc *et al.*, 2013). De plus, Moghaddam *et al.* ont démontré qu'une activation de la PKC conduit à une activation de la voie de signalisation pro-angiogénique ERK1/2, via la stimulation de la protéine Raf (Moghaddam *et al.*, 2015). Enfin, il a été démontré qu'en absence de miR-126-3p, il y a une augmentation de la protéine SPRED-1 dont le rôle est d'inhiber la stimulation de la voie ERK1/2 (Wang *et al.*, 2008) via une inhibition de la petite protéine G Ras (Quintanar-Audelo *et al.*, 2011).

C'est pourquoi, nous supposons dans notre modèle que CXCL12 pourrait, en association ou non avec le VEGF-A, stimuler la voie de la PKC, induisant ainsi l'activation de la protéine Raf située en aval de Ras, et permettre l'activation de la voie pro-angiogénique ERK1/2 (Figure 25). De plus, il a été démontré qu'en absence de miR-126-3p (anti-miR-126-3p) dans des CE, il y a une diminution et non pas une abolition de la phosphorylation de la protéine ERK1/2 induite par le VEGF-A (Wang *et al.*, 2008). Ainsi, bien qu'inhibée, cette voie de signalisation demeure légèrement active et pourrait expliquer l'effet pro-angiogénique à 9 jours induit par la diminution de l'expression du miR-126-3p.

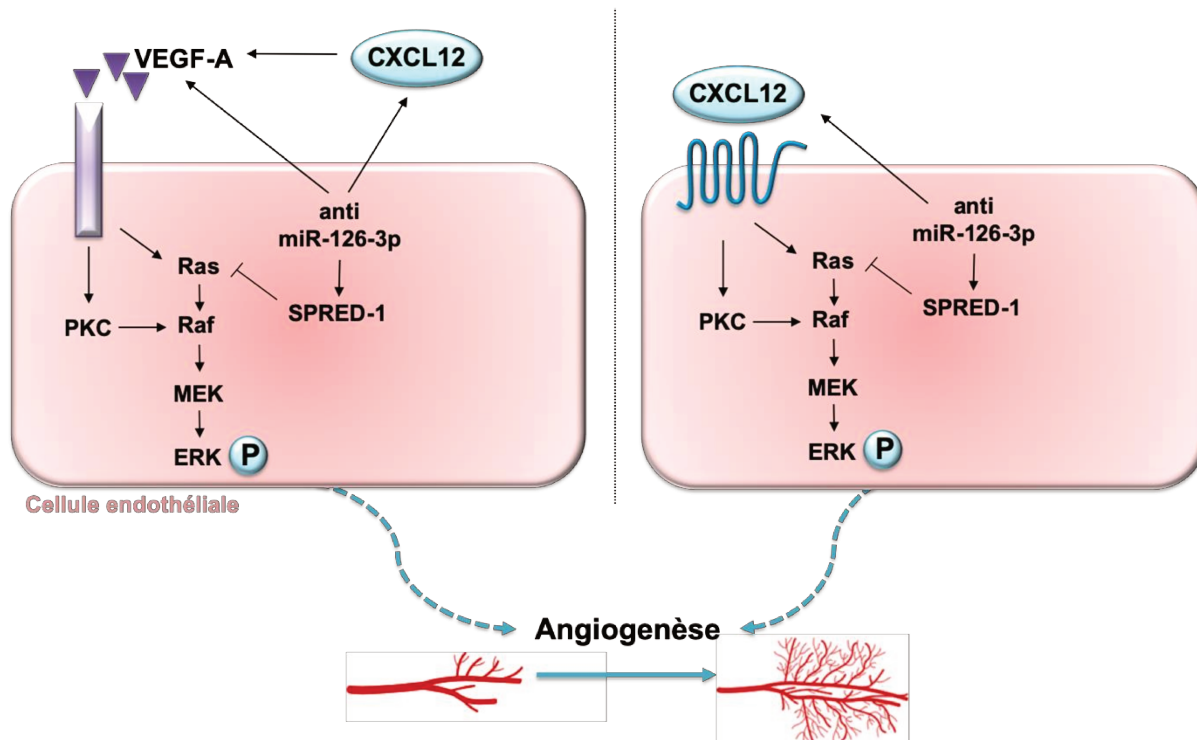


Figure 27. Hypothèse : bien que SPRED-1 soit exprimé, l'antimiR-126-3p stimulerait l'angiogenèse ex vivo via la synthèse de CXCL12 et VEGF-A.

En conclusion, bien que la surexpression des brins miR-126-3p et miR-126-5p ne module pas l'effet pro-angiogénique induit par CXCL12, leur présence demeure fondamentale pour que la chimiokine puisse agir. Nous démontrons ainsi pour la première fois que les miR-126 et plus particulièrement le brin miR-126-3p est indispensable à l'effet pro-angiogénique induit par CXCL12. Nous avons émis l'hypothèse que le rôle du miR-126-3p dans l'angiogenèse induite par CXCL12 passe par une modulation de l'expression de la protéine SPRED-1.

❖ **Modulation du potentiel pro-angiogénique de CXCL12 par l'inhibition de SPRED-1.**

Pour confirmer notre hypothèse, nous avons étudié l'implication de CXCL12 dans l'expression de SPRED-1. De façon très intéressante, nos résultats montrent que CXCL12 induit une diminution de l'expression protéique de SPRED-1. De plus, l'inhibition de SPRED-1, par un ARN interférant (siRNA-SPRED-1), induit une augmentation de la formation de réseaux vasculaires *in vitro* (Figure 26). Par ailleurs,

dans ces conditions, l'effet pro-angiogénique de CXCL12 est plus important. Ainsi, l'absence de SPRED-1 potentialise l'effet pro-angiogénique induit par CXCL12. Cela est en accord avec ce qui a été démontré par *Wang et al.* Dans cette étude, ils ont montré que l'inhibition de la protéine SPRED-1 conduit à une suractivation de la voie de signalisation pro-angiogénique ERK1/2 induite par le VEGF-A.

Nous supposons donc que l'inactivation de SPRED-1, induite par CXCL12 via une augmentation du miR-126-3p, permet d'activer de façon plus importante la signalisation pro-angiogénique induite par CXCL12.

Nos résultats montrent qu'après abolition de la protéine SPRED-1, l'angiogenèse inhibée par la baisse de niveau du miR-126-3p (transfection avec l'antimiR-126-3p) est restaurée comme démontré par *Wang et al.* En revanche, et de façon très intéressante, lorsque nous ajoutons CXCL12, l'effet additif retrouvé en absence de SPRED-1 uniquement est aboli.

Comme l'ont montré *Ho et al.*, l'activation conjointe de la voie ERK1/2 et PI3K/Akt semble nécessaire à l'effet pro-angiogénique de CXCL12 (*Ho et al.*, 2010). Or, dans nos conditions, bien que la voie pro-angiogénique ERK1/2 puisse être activée, par la diminution de l'expression de SPRED-1, l'abolition du miR-126-3p semble bloquer d'autres voies de signalisation essentielles aux effets pro-angiogéniques induits par CXCL12 (Figure 26). Nous faisons l'hypothèse que la voie PI3K/Akt/mTOR peut être impliquée. Cette voie de signalisation peut être stimulée par une surexpression du miR-126-3p. En effet, le miR-126-3p induit une diminution de la protéine PI3KR2 (*Fish et al.*, 2008) dont le rôle est d'inactiver la protéine Akt, elle-même connue comme étant pro-angiogénique (*Nakashio, Fujita et Tsuruo*, 2002) En revanche aucun lien direct n'est encore établi entre PI3KR2, CXCL12, miR-126 et leurs rôles dans l'angiogenèse. Nous émettons également l'hypothèse de l'implication de la protéine TSC1, cible directe du miR-126-3p mise en évidence dans les cellules dendritiques (*Agudo et al.*, 2014), dont l'inhibition permet l'activation de la voie mTOR impliquée dans l'angiogenèse (*J. Chen et al.*, 2019). En revanche, très peu de données nous permettent de faire un lien entre TSC1 et l'angiogenèse mise à part l'étude menée par *Ma et al.*, qui ont démontré chez des souris déficientes en TSC1 une hyperactivation de mTOR associée à des défauts d'angiogenèse et une létalité embryonnaire (*Ma et al.*, 2014).

Nous concluons que l'inhibition de SPRED-1, permise par la présence de miR-126-3p, n'est pas suffisante pour lever l'inhibition induite par l'anti-miR-126-3p.

Selon mon hypothèse, dans ce processus, la stimulation conjointe des voies ERK1/2 et PI3K/Akt est nécessaire. Il peut être intéressant de vérifier cette hypothèse dans la formation de réseaux vasculaires par les cellules HUVEC *in vitro* dans un modèle de double inhibition (siRNA-SPRED-1 et siRNA-PI3KR2 ou anti-miR-126).

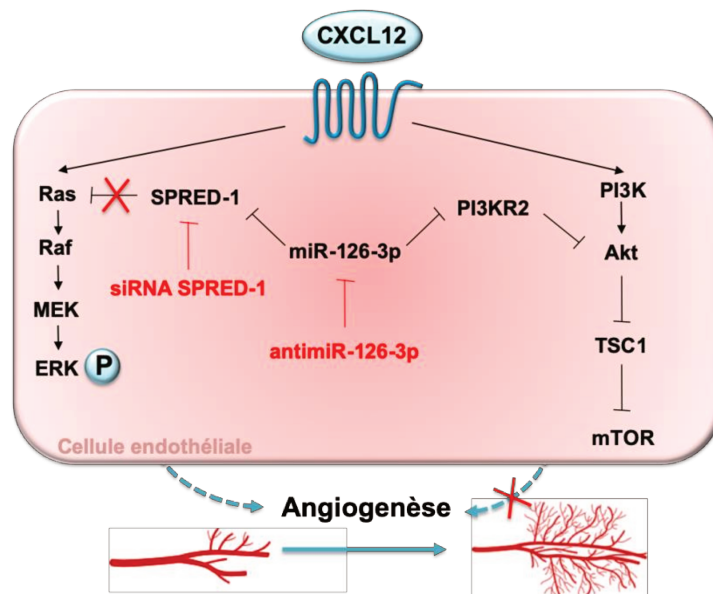


Figure 28. Hypothèse : L'inhibition conjointe de SPRED-1 et PI3KR2 est nécessaire pour lever l'inhibition induite par l'anti-miR-126-3p.

Dans un contexte ischémique, le glycocalyx est dégradé. Il est constitué en majorité par des protéoglycannes qui portent à leur surface des GAG, riches en groupement sulfates, ce qui leur permet d'interagir avec des facteurs de croissance (tels que le VEGF-A) et des chimiokines (telle que CXCL12). Les données de la littérature nous indiquent que les GAG sont nécessaires à la fonction de recrutement de progéniteurs endothéliaux par CXCL12. En revanche, nous ne savons pas quel est l'impact d'une dégradation de ces GAG sur l'angiogenèse induite par CXCL12 dans les CE.

Pour étudier cela, nous avons développé un modèle cellulaire et tissulaire où l'élongation des GAG est inhibée par l'ajout d'un inhibiteur compétitif du Xylose : 4-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranoside.

❖ **Les GAG sont nécessaires à l'angiogenèse induite par CXCL12 *in vitro* et *ex vivo*.**

Nos résultats montrent de façon très intéressante qu'en absence de GAG, il y a non seulement une inhibition de la formation de réseaux vasculaires mais surtout une abolition de ce processus induit par CXCL12 *in vitro* dans le modèle de cellules HUVEC et *ex vivo* dans le modèle de bourgeonnements des CE d'anneaux aortiques de rats.

Peu de données sont disponibles dans la littérature. Cependant nous savons qu'en absence des SDC-4 (Echtermeyer *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2016), du SDC-2 (Noguer *et al.*, 2009) ou du perlécan (Qiang *et al.*, 2014), il y a une diminution de l'angiogenèse dans le modèle de cellules HUVEC. De plus, la vascularisation est inhibée chez la souris lorsque l'interaction entre CXCL12 γ et les GAG est altérée (Rueda *et al.*, 2012). En revanche, de façon très surprenante, en absence de GAG, nous avons constaté une augmentation de l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 (dans des conditions basales) mais également une activation de la formation de réseaux vasculaires plus importante en présence de CXCL12.

Sachant qu'en absence de GAG il y avait une diminution de l'angiogenèse induite par CXCL12, nous nous attendions à ce qu'il y ait, dans ces conditions, une diminution de l'activation de la voie de signalisation pro-angiogénique ERK1/2 comme nous l'avons préalablement démontré au laboratoire dans le modèle de cellules HeLa (Charnaux *et al.*, 2005). De plus, d'autres études montrent un effet inhibiteur des GAG, sur la stimulation de voies de signalisation, dans des cellules myocardiques ou fibroblastiques (Mizutani *et al.*, 2001; Na *et al.*, 2018).

A ma connaissance, dans le modèle de CE, aucune étude n'a montré un lien direct entre l'absence de GAG et la stimulation de voies de signalisation induite par CXCL12. Une double fonction des GAG a été présentée dans la littérature (Smock et Meijers, 2018). D'une part, les GAG peuvent participer à la présentation d'un ligand à son récepteur spécifique ou, d'autre part, interagir avec ce ligand, limitant ainsi sa fixation au récepteur.

A la lecture de cette étude, nous pouvons penser que nous sommes dans la situation où les GAG empêcheraient la fixation de CXCL12 à ses récepteurs. En effet, en leur absence nous augmentons la stimulation de la voie ERK1/2 induite par CXCL12. Sachant que l'état d'activation cellulaire (ERK1/2 phosphorylées) semble favorable à la stimulation de l'angiogenèse, comment expliquer l'inhibition complète de ce processus en absence de GAG ?

Dans notre modèle, nous avons utilisé un inhibiteur de l'élongation des GAG (le 4-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranoside). Dans ces conditions, l'intégralité des GAG sont dégradés et pas seulement ceux portés par le SDC-4, le co-récepteur de CXCL12. Nous pouvons ainsi imaginer que tous les GAG ne jouent pas le même rôle dans la régulation du processus angiogénique. Il serait intéressant de développer un modèle d'inhibition des GAG, spécifique à ceux portés par le SDC-4. Pour cela, nous pourrions développer un plasmide d'expression du SDC-4 muté dans la région codant pour la liaison des chaînes GAG à la protéine centrale.

Les phénomènes biologiques sont complexes et ne se résument pas à un état d'activation ou d'inactivation d'une cellule. Il ne faut pas oublier les éléments structuraux qui composent les cellules. Les GAG, font partie intégrante de l'architecture cellulaire, ils permettent bien évidemment d'interagir avec des facteurs pro-angiogéniques mais également d'interagir avec des éléments de la matrice extracellulaire et de participer activement à l'adhérence, l'étalement et la motilité des cellules via l'interaction avec le cytosquelette. C'est pourquoi nous avons souhaité étudier l'impact d'une absence de GAG sur la migration des cellules HUVEC.

❖ **L'absence de GAG stimule la migration induite par CXCL12**

Nos résultats montrent qu'en absence de GAG et sans stimulation préalable, il y a une augmentation de la migration des cellules HUVEC mais également une augmentation

de la migration induite par CXCL12. Ces résultats sont cohérents avec ce qui est montré par d'autres équipes et aussi dans notre laboratoire dans le modèle de migration des cellules T ou des cellules Huh7 induite par CXCL12, en présence de chaînes HS ou de mimétiques des GAG (Friand *et al.*, 2009; Connell *et al.*, 2016).

Dans cette situation, on peut donc imaginer qu'en diminuant l'interaction des cellules avec des éléments du support (diminution de l'étalement cellulaire), on pourrait augmenter leur motilité. De plus, en absence de GAG, le CXCR4 ou l'ACKR3 (récepteurs de CXCL12) peuvent être démasqués et leur interaction avec CXCL12 pourrait ainsi être facilitée, permettant alors la stimulation de la migration cellulaire.

La migration et la formation de réseaux vasculaires sont deux processus nécessaires à l'angiogenèse. Pour autant, ces deux processus n'ont pas nécessairement besoin d'être stimulés par les mêmes facteurs. Il est évident que pour induire un processus de migration, les cellules doivent pouvoir rompre des interactions avec leur support pour induire leur déplacement. En revanche, dans la formation de réseaux vasculaires, les interactions intercellulaires sont nécessaires. On peut donc imaginer, que l'absence de GAG permet d'augmenter la motilité des cellules tout en diminuant leur capacité à se lier entre elles en contreparties. En absence de GAG, nous émettons l'hypothèse qu'il y a une modulation de l'expression de molécules d'adhérences comme des intégrines ou des cadhérines. Pour vérifier cette hypothèse, je propose d'analyser par cytométrie de flux et immunofluorescence l'expression des intégrines et de cadhérines (VE-cadhérine, impliquée dans les interactions cellules-cellules) sur des cellules HUVEC dépourvues de GAG.

Conclusion - Perspectives

L'objectif de ma thèse était d'étudier l'implication du miR-126 et des GAG dans la modulation du processus d'angiogenèse induite par CXCL12.

De façon intéressante, mes travaux ont démontré pour la première fois que la chimiokine CXCL12 induit l'expression du miR-126-3p dans les CE humaines et que ce miR est essentiel aux fonctions pro-angiogéniques de CXCL12. Pour aller plus loin dans ces recherches, il est nécessaire d'étudier d'autres miRs pouvant révéler d'autres mécanismes qui pourraient expliquer le fonctionnement de CXCL12. Pour ce faire, je propose d'effectuer un screening des miRs induits par CXCL12 dans les CE par la technologie *NanoString*. Cette technique permet d'analyser en parallèle 800 miRs par échantillon. Ce travail est en cours de réalisation et nous avons obtenu un financement BQR de l'Université Paris 13 pour le réaliser.

CXCL12 n'est sans doute pas la seule chimiokine responsable de la modulation de l'expression du miR-126 et il est donc nécessaire d'étudier le potentiel effet d'autres chimiokines. Des résultats préliminaires que j'ai obtenus dans le même modèle des cellules HUVEC ont montré que CCL5, qui a également un rôle pro-angiogénique, pouvait également stimuler l'expression du miR-126.

Mes travaux ont également montré que CXCL12 induit une inhibition de l'expression de la protéine SPRED-1 et que cette inhibition permet de stimuler de façon plus importante la formation de réseaux vasculaires *in vitro* induite par CXCL12. Je montre également que cette inhibition n'est pas suffisante pour restaurer l'angiogenèse induite par CXCL12 en absence de miR-126-3p.

La partie de mon travail concernant les GAG est en cours de développement et les premiers résultats obtenus sont très intéressants. J'ai démontré, en encadrant cette année une étudiante en Master 2, que les GAG sont nécessaires à l'angiogenèse induite par CXCL12 *in vitro* et *ex vivo* mais également que les GAG semblent inhiber la migration des CE induite par CXCL12.

Il est prévu que nous étudierons le rôle du miR-126 dans la modulation de l'expression des GAG et l'impact sur l'interaction avec la chimiokine CXCL12. Pour cela, je propose, après transfection des cellules endothéliales HUVEC par nos différents outils (pré-miR-126 et anti-miR-126), d'extraire les GAG et d'analyser leur structure par HPLC afin de connaître la composition des GAG présent à la surface des cellules mais également leurs caractéristiques biochimiques (taille, taux de sulfatation, position des groupements sulfates etc...). Par ailleurs, les GAG étant extraits, je propose d'étudier leur affinité pour la chimiokine CXCL12. Pour cela, nous disposons au laboratoire d'une technique de résonance plasmonique de surface qui permet de réaliser des mesures d'affinités entre différents acteurs. Nous pouvons ainsi immobiliser CXCL12 sur les puces en or nécessaire à la technique, et faire passer dans le système de microfluidique les GAG extrait à partir des cellules transfectées.

Tout mon travail de thèse a été réalisé *in vitro* ou *ex vivo* dans des systèmes isolés. L'angiogenèse est un processus physiologique sous le contrôle de nombreux facteurs et impliquant de nombreux types cellulaires. Afin de confirmer tout mon travail, une transposition *in vivo* en condition d'ischémie est nécessaire afin d'analyser comment va réagir un mécanisme entier. Mes travaux de thèse ont été très mécanistique mais sont nécessaires pour le développement futur de nouvelles perspectives thérapeutiques.

In vivo, dans l'ischémie, le glycocalyx est dégradé. Par ailleurs, les GAG extraits des tissus ischémiés sont moins fonctionnels et présentent une affinité plus faible pour des facteurs de croissance comme le FGF-2 (Chevalier *et al.*, 2015). Une fois l'étude fondamentale effectuée, je souhaite proposer et développer une nouvelle thérapie pro-angiogénique permettant également une régénérescence tissulaire et des GAG de bonne qualité. Pour cela, nous pourrions développer de nouveaux vecteurs à partir de nanoparticules d'or fonctionnalisées contenant du miR-126, la chimiokine CXCL12 et des GAG naturels. L'apport des GAG permettrait d'assurer une régénérescence du glycocalyx endommagé (Chevalier *et al.*, 2015; Marinval *et al.*, 2016). Le miR-126 permettrait d'améliorer la qualité des GAG mais également de stimuler l'angiogenèse et assurer l'expression membranaire des récepteurs et co-récepteurs de CXCL12 dans

les CE (Mondadori dos Santos *et al.*, 2015). Ainsi, CXCL12 pourra stimuler de façon plus importante les CE résidentes et augmenter le recrutement de progéniteurs endothéliaux circulants. L'ensemble de ces mécanismes faciliterait ainsi le processus de néo-angiogenèse post-ischémique.

Le développement de cet outil complet, testé dans un modèle d'ischémie de la patte chez la souris, permettra ainsi d'agir à la fois au niveau cellulaire et tissulaire afin d'assurer une régénérescence post-ischémique adéquate.

BIBLIOGRAPHIE

- Adair TH, M. J. (2010) *angiogenesis, Angiogenesis*.
- Agudo, J. *et al.* (2014) « The miR-126-VEGFR2 axis controls the innate response to pathogen-associated nucleic acids. », *Nature immunology*, 15(1), p. 54-62. doi: 10.1038/ni.2767.
- Ahluwalia, A. et Tarnawski, A. S. (2012) « Critical role of hypoxia sensor--HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. », *Current medicinal chemistry*, 19(1), p. 90-7. doi: 10.2174/092986712803413944.
- Ai, X. *et al.* (2003) « QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. », *The Journal of cell biology*, 162(2), p. 341-51. doi: 10.1083/jcb.200212083.
- Alexopoulou, A. N., Multhaupt, H. A. B. et Couchman, J. R. (2007) « Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. », *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(3), p. 505-28. doi: 10.1016/j.biocel.2006.10.014.
- Altenburg, J. D. *et al.* (2007) « A Naturally Occurring Splice Variant of CXCL12/Stromal Cell-Derived Factor 1 Is a Potent Human Immunodeficiency Virus Type 1 Inhibitor with Weak Chemotaxis and Cell Survival Activities », *Journal of Virology*, 81(15), p. 8140-8148. doi: 10.1128/jvi.00268-07.
- Anderson, E. M. *et al.* (2015) « Local delivery of VEGF and SDF enhances endothelial progenitor cell recruitment and resultant recovery from ischemia », *Tissue Engineering - Part A*, 21(7-8), p. 1217-1227. doi: 10.1089/ten.tea.2014.0508.
- Asahara, T. *et al.* (1997) « Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. », *Science (New York, N.Y.)*, 275(5302), p. 964-7. doi: 10.1126/science.275.5302.964.
- Askari, A. T. *et al.* (2003) « Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy », *Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14232-8.
- Bachelierie, F. *et al.* (1996) « The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1 », *Nature*, 382(6594), p. 833-835. doi: 10.1038/382833a0.
- Bachelierie, F. *et al.* (2014) « International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. », *Pharmacological reviews*, 66(1), p. 1-79. doi: 10.1124/pr.113.007724.
- Balabanian, K. *et al.* (2005) « The Chemokine SDF-1/CXCL12 Binds to and Signals through the Orphan Receptor RDC1 in T Lymphocytes * Downloaded from », *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 280(42), p. 35760-35766. doi: 10.1074/jbc.M508234200.

- Bao, L. *et al.* (2013) « MicroRNA-21 suppresses PTEN and hSulf-1 expression and promotes hepatocellular carcinoma progression through AKT/ERK pathor2 », *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 337(2), p. 226-236. doi: 10.1016/j.canlet.2013.05.007.
- Bartel, D. P. (2004a) « MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. », *Cell*, 116(2), p. 281-97. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
- Bartel, D. P. (2004b) « MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. », *Cell*, 116(2), p. 281-97. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
- Ben-Baruch, A. (2006) « The multifaceted roles of chemokines in malignancy », *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(3), p. 357-371. doi: 10.1007/s10555-006-9003-5.
- Bertout, J. A., Patel, S. A. et Simon, M. C. (2008) « The impact of O2 availability on human cancer. », *Nature reviews. Cancer*, 8(12), p. 967-75. doi: 10.1038/nrc2540.
- Billings, P. C. et Pacifici, M. (2015) « Interactions of signaling proteins, growth factors and other proteins with heparan sulfate: Mechanisms and mysteries », *Connective Tissue Research*, 56(4), p. 272-280. doi: 10.3109/03008207.2015.1045066.
- Bleul, C C *et al.* (1996) « A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) », *The Journal of experimental medicine*, 184(3), p. 1101-9. doi: 10.1084/jem.184.3.1101.
- Bleul, Conrad C *et al.* (1996) « The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. », *Nature*, 382(6594), p. 829-33. doi: 10.1038/382829a0.
- Boldajipour, B. *et al.* (2008) « Control of Chemokine-Guided Cell Migration by Ligand Sequestration », *Cell*, 132(3), p. 463-473. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.034.
- Bonauer, A. *et al.* (2009) « MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. », *Science (New York, N.Y.)*, 324(5935), p. 1710-3. doi: 10.1126/science.1174381.
- Brule, S. *et al.* (2009) « Glycosaminoglycans and syndecan-4 are involved in SDF-1/CXCL12-mediated invasion of human epitheloid carcinoma HeLa cells », *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier B.V., 1790(12), p. 1643-1650. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.08.001.
- Burns, J. M. *et al.* (2006) « A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. », *The Journal of experimental medicine*, 203(9), p. 2201-13. doi: 10.1084/jem.20052144.
- Burri, P. H., Hlushchuk, R. et Djonov, V. (2004) « Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance », *Developmental Dynamics*. doi: 10.1002/dvdy.20184.
- Busillo, J. M. et Benovic, J. L. (2007) *Regulation of CXCR4 signaling*, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.11.002.

- Capila, I. et Linhardt, R. J. (2002) « Heparin-protein interactions. », *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 41(3), p. 391-412.
- Caporali, A. et Emanuelli, C. (2011) « MicroRNA regulation in angiogenesis », *Vascular Pharmacology*. Elsevier Inc., 55(4), p. 79-86. doi: 10.1016/j.vph.2011.06.006.
- Carmeliet, P. *et al.* (1996) « Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele », *Nature*. doi: 10.1038/380435a0.
- Carmeliet, P. *et al.* (2009) « Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: Tip cells lead the way », *Nature Reviews Clinical Oncology*. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.64.
- Carmeliet, P. et Tessier-Lavigne, M. (2005) « Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. », *Nature*, 436(7048), p. 193-200. doi: 10.1038/nature03875.
- Lo Celso, C. *et al.* (2009) « Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. », *Nature*, 457(7225), p. 92-6. doi: 10.1038/nature07434.
- Ceradini, D. J. et Gurtner, G. C. (2005) « Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue », *Trends in Cardiovascular Medicine*. doi: 10.1016/j.tcm.2005.02.002.
- Chan, Y. C. *et al.* (2011) « miR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells. », *The Journal of biological chemistry*, 286(3), p. 2047-56. doi: 10.1074/jbc.M110.158790.
- Chappell, D. *et al.* (2007) « Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx », *Anesthesiology*, 107(5), p. 776-784. doi: 10.1097/01.anes.0000286984.39328.96.
- Chappell, D. *et al.* (2008) « Expedition glykokalyx: Ein neu entdecktes "Great Barrier Reef" », *Anaesthesist*, 57(10), p. 959-969. doi: 10.1007/s00101-008-1445-4.
- Chappell, D. *et al.* (2009) « TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. », *Basic research in cardiology*, 104(1), p. 78-89. doi: 10.1007/s00395-008-0749-5.
- Chappell, D. *et al.* (2010) « Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion », *Shock*, 34(2), p. 133-139. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181cdc363.
- Charnaux, N. *et al.* (2005) « Syndecan-4 is a signaling molecule for stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 », *FEBS Journal*, 272(8), p. 1937-1951. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04624.x.
- Chen, C. *et al.* (2019) « CXCL5 induces tumor angiogenesis via enhancing the expression of FOXD1 mediated by the AKT/NF-κB pathway in colorectal cancer », *Cell Death and Disease*. Springer US, 10(3). doi: 10.1038/s41419-019-1431-6.

- Chen, E.-B. *et al.* (2019) « The miR-561-5p/CX₃CL1 Signaling Axis Regulates Pulmonary Metastasis in Hepatocellular Carcinoma Involving CX₃CR1⁺ Natural Killer Cells Infiltration », *Theranostics*, 9(16), p. 4779-4794. doi: 10.7150/thno.32543.
- Chen, E., Hermanson, S. et Ekker, S. C. (2004) « Syndecan-2 is essential for angiogenic sprouting during zebrafish development. », *Blood*, 103(5), p. 1710-9. doi: 10.1182/blood-2003-06-1783.
- Chen, G.-H., Xu, J. et Yang, Y.-J. (2017) « Exosomes: promising sacks for treating ischemic heart disease? », *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 313(3), p. H508-H523. doi: 10.1152/ajpheart.00213.2017.
- Chen, J.-J. et Zhou, S.-H. (2011) « Mesenchymal stem cells overexpressing MiR-126 enhance ischemic angiogenesis via the AKT/ERK-related pathway. », *Cardiology journal*, 18(6), p. 675-81.
- Chen, J. *et al.* (2019) « Ginsenoside Rg1 promotes cerebral angiogenesis via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in ischemic mice », *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V., p. 172418. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172418.
- Chen, Y. *et al.* (2018) « Interleukin-17 induces angiogenesis in vitro via CXCL8 and CCL2 in retinal pigment epithelium. », *Molecular medicine reports*, 17(3), p. 4627-4632. doi: 10.3892/mmr.2018.8460.
- Chen, Y. et Gorski, D. H. (2008) « Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5 », *Blood*, 111(3), p. 1217-1226. doi: 10.1182/blood-2007-07-104133.
- Chen, Z. *et al.* (2019) « Baicalin suppresses the proliferation and migration of ox-LDL-VSMCs in atherosclerosis through upregulating miR-126-5p. », *Biological & pharmaceutical bulletin*. doi: 10.1248/bpb.b19-00196.
- Cheung, O. et Sanyal, A. J. (2010) « MicroRNAs », *Signaling Pathways in Liver Diseases*, 107, p. 493-499. doi: 10.1007/978-3-642-00150-5_33.
- Chevalier, F. *et al.* (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, p. 51-68. doi: 10.22203/eCM.v030a05.
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N. et Bobryshev, Y. V. (2016) « The role of miR-126 in embryonic angiogenesis, adult vascular homeostasis, and vascular repair and its alterations in atherosclerotic disease », *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Ltd, 97, p. 47-55. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.05.007.
- Chung, K. Y. (2013) « Structural Aspects of GPCR-G Protein Coupling. », *Toxicological research*, 29(3), p. 149-55. doi: 10.5487/TR.2013.29.3.149.
- Codagnone, M. *et al.* (2017) « Lipoxin A4 stimulates endothelial miR-126-5p expression and its transfer via microvesicles », *FASEB Journal*, 31(5), p. 1856-1866. doi: 10.1096/fj.201600952R.

- Cojoc, M. *et al.* (2013) « OTT-36109-emerging-targets-in-cancer-management-role-of-the-cxcl12-cx », *OncoTargets and Therapy*, 6, p. 1347-1361. doi: 10.2147/OTT.S36109.
- Coke, C. J. *et al.* (2016) « Simultaneous activation of induced heterodimerization between CXCR4 chemokine receptor and cannabinoid receptor 2 (CB2) reveals a mechanism for regulation of tumor progression », *Journal of Biological Chemistry*, 291(19), p. 9991-10005. doi: 10.1074/jbc.M115.712661.
- Collinson, D. J. et Donnelly, R. (2004) « Therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease: Can biotechnology produce an effective collateral circulation? », *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 28(1), p. 9-23. doi: 10.1016/j.ejvs.2004.03.021.
- Connell, B. J. *et al.* (2016) « Heparan sulfate differentially controls CXCL12a- And CXCL12g-mediated cell migration through differential presentation to their receptor CXCR4 », *Science Signaling*, 9(452), p. 1-12. doi: 10.1126/scisignal.aaf1839.
- Connell, B. J., Gordon, J. R. et Saleh, T. M. (2015) « ELR-CXC chemokine antagonism is neuroprotective in a rat model of ischemic stroke », *Neuroscience Letters*, 606, p. 117-122. doi: 10.1016/j.neulet.2015.08.041.
- Corbisier, J. *et al.* (2015) « Biased signaling at chemokine receptors. », *The Journal of biological chemistry*, 290(15), p. 9542-54. doi: 10.1074/jbc.M114.596098.
- Craig, M. P. et Sumanas, S. (2016) « ETS transcription factors in embryonic vascular development », *Angiogenesis*. Springer Netherlands, p. 275-285. doi: 10.1007/s10456-016-9511-z.
- Cuevas, B. D. *et al.* (2001) « Tyrosine Phosphorylation of p85 Relieves Its Inhibitory Activity on Phosphatidylinositol 3-Kinase* ». doi: 10.1074/jbc.M100556200.
- Cuevas, I. *et al.* (2015) « Sustained endothelial expression of HoxA5 in vivo impairs pathological angiogenesis and tumor progression », *PLoS ONE*. Public Library of Science, 10(3). doi: 10.1371/journal.pone.0121720.
- Deaconess, B. I. *et al.* (1998) « Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), p. 9448-53.
- Dews, M. *et al.* (2006) « Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. », *Nature genetics*, 38(9), p. 1060-5. doi: 10.1038/ng1855.
- Djonov, V. G., Kurz, H. et Burri, P. H. (2002) « Optimality in the developing vascular system: Branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism », *Developmental Dynamics*, 224(4), p. 391-402. doi: 10.1002/dvdy.10119.

- Döring, Y. *et al.* (2014) « The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease », *Frontiers in Physiology*, 5 JUN(June), p. 1-23. doi: 10.3389/fphys.2014.00212.
- Doyle, J. W., Smith, R. M. et Roth, T. P. (1997) « The effect of hyperglycemia and insulin on the replication of cultured human microvascular endothelial cells. », *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 29(1), p. 43-5. doi: 10.1055/s-2007-978979.
- Duquenne, C. *et al.* (2014) « The Two Human CXCR4 Isoforms Display Different HIV Receptor Activities: Consequences for the Emergence of X4 Strains », *The Journal of Immunology*, 193(8), p. 4188-4194. doi: 10.4049/jimmunol.1303298.
- Echtermeyer, F. *et al.* (2001) « Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. », *The Journal of clinical investigation*, 107(2), p. R9-R14. doi: 10.1172/JCI10559.
- Esencay, M., Sarfraz, Y. et Zagzag, D. (2013) *CXCR7 is induced by hypoxia and mediates glioma cell migration towards SDF-1 α* , *BMC Cancer*. doi: 10.1186/1471-2407-13-347.
- Esser, J. S. *et al.* (2017) « Bone morphogenetic protein 4 regulates microRNAs miR-494 and miR-126-5p in control of endothelial cell function in angiogenesis », *Thrombosis and Haemostasis*, 117(4), p. 734-749. doi: 10.1160/TH16-08-0643.
- Fabbri, E. *et al.* (2015) « Regulation of IL-8 gene expression in gliomas by microRNA miR-93 », *BMC Cancer*. *BMC Cancer*, 15(1), p. 1-15. doi: 10.1186/s12885-015-1659-1.
- De Falco, E. *et al.* (2004) « SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. », *Blood*, 104(12), p. 3472-82. doi: 10.1182/blood-2003-12-4423.
- Fasanaro, P. *et al.* (2008) « MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. », *The Journal of biological chemistry*, 283(23), p. 15878-83. doi: 10.1074/jbc.M800731200.
- Feng, C. *et al.* (2012) « MicroRNA-125a inhibits cell growth by targeting glypican-4 », *Glycoconjugate Journal*, 29(7), p. 503-511. doi: 10.1007/s10719-012-9387-0.
- Feng, Y. *et al.* (1996) « HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. », *Science (New York, N.Y.)*, 272(5263), p. 872-7. doi: 10.1126/science.272.5263.872.
- Feng, Y. *et al.* (2018) « MiR-539-5p inhibits experimental choroidal neovascularization by targeting CXCR7 », *FASEB Journal*, 32(3), p. 1626-1639. doi: 10.1096/fj.201700640R.

- Fermas, S. *et al.* (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(12), p. 1054-1064. doi: 10.1093/glycob/cwn088.
- Ferrara, N. *et al.* (1996) « Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. », *Nature*, 380(6573), p. 439-42. doi: 10.1038/380439a0.
- Ferreras, C. *et al.* (2012) « Endothelial heparan sulfate 6-O-sulfation levels regulate angiogenic responses of endothelial cells to fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor. », *The Journal of biological chemistry*, 287(43), p. 36132-46. doi: 10.1074/jbc.M112.384875.
- Fish, J. E. *et al.* (2008) « miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity ». doi: 10.1016/j.devcel.2008.07.008.
- Friand, V. *et al.* (2009) « Glycosaminoglycan mimetics inhibit SDF-1?CXCL12-mediated migration and invasion of human hepatoma cells », *Glycobiology*, 19(12), p. 1511-1524. doi: 10.1093/glycob/cwp130.
- Gandhi, N. S. et Mancera, R. L. (2008) « The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins », *Chemical Biology and Drug Design*, 72(6), p. 455-482. doi: 10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x.
- Gengrinovitch, S. *et al.* (1995) « Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. », *The Journal of biological chemistry*, 270(25), p. 15059-65. doi: 10.1074/jbc.270.25.15059.
- Ghosh, G. *et al.* (2010) « Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF- α isoforms and promotes angiogenesis. », *The Journal of clinical investigation*, 120(11), p. 4141-54. doi: 10.1172/JCI42980.
- Giuliano, S. *et al.* (2014a) « The ELR+CXCL chemokines and their receptors CXCR1/CXCR2: A signaling axis and new target for the treatment of renal cell carcinoma. », *Oncoimmunology*, 3, p. e28399. doi: 10.4161/onci.28399.
- Giuliano, S. *et al.* (2014b) « The ELR+CXCL chemokines and their receptors CXCR1/CXCR2: A signaling axis and new target for the treatment of renal cell carcinoma. », *Oncoimmunology*, 3(4), p. e28399. doi: 10.4161/onci.28399.
- Gorennoi, V. *et al.* (2017) « Growth Factors for Angiogenesis in Peripheral Arterial Disease », *Journal of Vascular Surgery*, 66(4), p. 1300. doi: 10.1016/j.jvs.2017.08.003.
- Greco, S. *et al.* (2009) « Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. », *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(10), p. 3335-46. doi: 10.1096/fj.08-128579.

- Grundmann, S. *et al.* (2011) « MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells. », *Circulation*, 123(9), p. 999-1009. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.000323.
- Gupta, S. K. et Pillarisetti, K. (1999) « Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant. », *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(5), p. 2368-72.
- Gupta, S. K. et Singh, J. P. (1994) « Inhibition of endothelial cell proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression », *Journal of Cell Biology*, 127(4), p. 1121-1127. doi: 10.1083/jcb.127.4.1121.
- Haddad, O. *et al.* (2015) « Heparanase and syndecan-4 are involved in low molecular weight fucoidan-induced angiogenesis », *Marine Drugs*, 13(11), p. 6588-6608. doi: 10.3390/md13116588.
- Hamada, S. *et al.* (2012) « MiR-126 acts as a tumor suppressor in pancreatic cancer cells via the regulation of ADAM9. », *Molecular cancer research : MCR*, 10(1), p. 3-10. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0272.
- Hamm, H. E. (1998) « The many faces of G protein signaling. », *The Journal of biological chemistry*, 273(2), p. 669-72. doi: 10.1074/jbc.273.2.669.
- Handel, T. M. *et al.* (2005) « Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. », *Annual review of biochemistry*, 74, p. 385-410. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161747.
- Hanson, A. *et al.* (2019) « Chemokine ligand 20 (CCL20) expression increases with NAFLD stage and hepatic stellate cell activation and is regulated by miR-590-5p », *Cytokine*. Elsevier, 123(June), p. 154789. doi: 10.1016/j.cyto.2019.154789.
- Haro, J. *et al.* (2009) « Meta-analysis of randomized, controlled clinical trials in angiogenesis: Gene and cell therapy in peripheral arterial disease », *Heart and Vessels*, 24(5), p. 321-328. doi: 10.1007/s00380-008-1140-z.
- Harris, T. A. *et al.* (2008) « MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1 », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(5), p. 1516-1521. doi: 10.1073/pnas.0707493105.
- Hattori, K. *et al.* (2001) *Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells.* Disponible sur: www.bloodjournal.org.
- Hauser, M. A. *et al.* (2016) « Inflammation-Induced CCR7 Oligomers Form Scaffolds to Integrate Distinct Signaling Pathways for Efficient Cell Migration », *Immunity*. Elsevier Inc., 44(1), p. 59-72. doi: 10.1016/j.immuni.2015.12.010.
- Heissig, B. *et al.* (sans date) *Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand.*
- Van Hinsbergh, V. W. M. et Koolwijk, P. (2008) « Endothelial sprouting and angiogenesis: Matrix metalloproteinases in the lead », *Cardiovascular Research*. doi: 10.1093/cvr/cvm102.

- Ho, T. K. *et al.* (2010) « Angiogenic effects of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) variants in vitro and the in vivo expressions of CXCL12 variants and CXCR4 in human critical leg ischemia. », *Journal of vascular surgery*. Elsevier Inc., 51(3), p. 689-99. doi: 10.1016/j.jvs.2009.10.044.
- Ho, T. K. *et al.* (2012) « Stromal-Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as Potential Target of Therapeutic Angiogenesis in Critical Leg Ischaemia. », *Cardiology research and practice*, 2012, p. 143209. doi: 10.1155/2012/143209.
- Hong, K. H., Ryu, J. et Han, K. H. (2005) « Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A », *Blood*, 105(4), p. 1405-1407. doi: 10.1182/blood-2004-08-3178.
- Horowitz, A. et Simons, M. (2008) « Branching morphogenesis. », *Circulation research*, 103(8), p. 784-95. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.181818.
- Hu, M. H. *et al.* (2016) *MicroRNA-126 inhibits tumor proliferation and angiogenesis of hepatocellular carcinoma by down-regulating EGFL7 expression*, *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.11877.
- Hu, X. *et al.* (2007) « Stromal cell derived factor-1 alpha confers protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of the cardiac stromal cell derived factor-1 alpha CXCR4 axis. », *Circulation*, 116(6), p. 654-63. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.672451.
- Huang, B. *et al.* (2016) « Osteoblasts secrete Cxcl9 to regulate angiogenesis in bone. », *Nature communications*, 7, p. 13885. doi: 10.1038/ncomms13885.
- Huang, X. et Zuo, J. (2014) « Emerging roles of miR-210 and other non-coding RNAs in the hypoxic response. », *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 46(3), p. 220-32. doi: 10.1093/abbs/gmt141.
- Hueso, L. *et al.* (2018) « Upregulation of angiostatic chemokines IP-10/CXCL10 and I-TAC/CXCL11 in human obesity and their implication for adipose tissue angiogenesis », *International Journal of Obesity*. Springer US, 42(8), p. 1406-1417. doi: 10.1038/s41366-018-0102-5.
- Hwang, J. *et al.* (2004) « Angiogenic activity of human CC chemokine CCL15 in vitro and in vivo », *FEBS Letters*, 570(1-3), p. 47-51. doi: 10.1016/j.febslet.2004.06.023.
- Ibrahim, S. A. *et al.* (2012) « Targeting of syndecan-1 by microRNA miR-10b promotes breast cancer cell motility and invasiveness via a Rho-GTPase- and E-cadherin-dependent mechanism », *International Journal of Cancer*, 131(6), p. 11-13. doi: 10.1002/ijc.27629.
- Inampudi, C. *et al.* (2018) « Angiogenesis in peripheral arterial disease », *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd, 39, p. 60-67. doi: 10.1016/j.coph.2018.02.011.
- Isner, J. M. (1996) « Therapeutic angiogenesis: A new frontier for vascular therapy », *Vascular Medicine*, 1(1), p. 79-87. doi: 10.1177/1358863X9600100114.

- Jalvy-Delvaile, S. *et al.* (2012) « Molecular basis of differential target regulation by miR-96 and miR-182: The Glypican-3 as a model », *Nucleic Acids Research*, 40(3), p. 1356-1365. doi: 10.1093/nar/gkr843.
- Jansen, F. *et al.* (2013) « Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles. », *Circulation*, 128(18), p. 2026-38. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001720.
- Janssens, R. *et al.* (2016) *Natural nitration of CXCL12 reduces its signaling capacity and chemotactic activity in vitro and abrogates intra-articular lymphocyte recruitment in vivo.*
- Janssens, R., Struyf, S. et Proost, P. (2018) « The unique structural and functional features of CXCL12 », *Cellular and Molecular Immunology*, 15(4), p. 299-311. doi: 10.1038/cmi.2017.107.
- Jinushi, T. *et al.* (2014) « Low expression levels of microRNA-124-5p correlated with poor prognosis in colorectal cancer via targeting of SMC4. », *Cancer medicine*, 3(6), p. 1544-52. doi: 10.1002/cam4.309.
- Jouan, V. *et al.* (1999) « Inhibition of in vitro angiogenesis by platelet factor-4-derived peptides and mechanism of action », *Blood*, 94(3), p. 984-993.
- Kanda, S., Mochizuki, Y. et Kanetake, H. (2002) « Stromal Cell-derived Factor-1 Induces Tube-like Structure Formation of Endothelial Cells through Phosphoinositide 3-Kinase* ». JBC Papers in Press. doi: 10.1074/jbc.M204771200.
- Kasza, Z. *et al.* (2013) « MicroRNA-24 suppression of N-deacetylase/N-sulfotransferase-1 (NDST1) reduces endothelial cell responsiveness to vascular endothelial growth factor A (VEGFA). », *The Journal of biological chemistry*, 288(36), p. 25956-63. doi: 10.1074/jbc.M113.484360.
- Kawamoto, A. *et al.* (2009) « Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. », *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 27(11), p. 2857-64. doi: 10.1002/stem.207.
- Kim, C. H. *et al.* (1998) « In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. », *Blood*, 91(1), p. 100-10.
- Kinnaird, T. *et al.* (2004) « Local Delivery of Marrow-Derived Stromal Cells Augments Collateral Perfusion Through Paracrine Mechanisms », *Circulation*, 109(12), p. 1543-1549. doi: 10.1161/01.CIR.0000124062.31102.57.
- Kollmar, O. *et al.* (2006) « Macrophage inflammatory protein-2 promotes angiogenesis, cell migration, and tumor growth in hepatic metastasis. », *Annals of surgical oncology*, 13(2), p. 263-75. doi: 10.1245/ASO.2006.03.096.
- Kondo, N. *et al.* (2009) « SOD2 gene polymorphisms in neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. », *Molecular vision*, 15, p. 1819-26.

- Kreuger, J. *et al.* (2006) « Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. », *The Journal of cell biology*, 174(3), p. 323-7. doi: 10.1083/jcb.200604035.
- Kreuger, J. et Kjellén, L. (2012) « Heparan sulfate biosynthesis: regulation and variability. », *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 60(12), p. 898-907. doi: 10.1369/0022155412464972.
- Kryczek, I. *et al.* (2005) « CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neovascularization in human ovarian cancers », *Cancer Research*, 65(2), p. 465-472.
- Kuehnbacher, A. *et al.* (2007) « Role of Dicer and Drosha for Endothelial MicroRNA Expression and Angiogenesis ». doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.153916.
- Kurz, H., Burri, P. H. et Djonov, V. G. (2003) « Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. », *News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 18, p. 65-70.
- De La Luz Sierra, M. *et al.* (2004) « Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. », *Blood*, 103(7), p. 2452-9. doi: 10.1182/blood-2003-08-2857.
- Lagos-Quintana, M. *et al.* (2001) « Identification of novel genes coding for small expressed RNAs », *Science*, 294(5543), p. 853-858. doi: 10.1126/science.1064921.
- Laguri, C. *et al.* (2007) « The novel CXCL12 γ isoform encodes an unstructured cationic domain which regulates bioactivity and interaction with both glycosaminoglycans and CXCR4 », *PLoS ONE*, 2(10). doi: 10.1371/journal.pone.0001110.
- Lakshminarayanan, V. *et al.* (2001) « Reactive oxygen intermediates induce monocyte chemoattractant protein-1 in vascular endothelium after brief ischemia », *American Journal of Pathology*, 159(4), p. 1301-1311. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62517-5.
- Lederman, R. J. *et al.* (2002) « <Lederman et al. - 2002 - Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC.pdf> », *Lancet*, 359, p. 2053-2058. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08937-7.
- Lee, R. C. (1993) « Lee Feinbaum Ambros the C Elegans Heterochronic Gene Lin4 Encodes Small Rnas With Antisense Complementarity To Lin14 », 75, p. 843-854.
- Lee, Y. *et al.* (2004) « MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. », *The EMBO journal*, 23(20), p. 4051-60. doi: 10.1038/sj.emboj.7600385.

- Lefkowitz, R. J. (2004) « Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors », *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(8), p. 413-422. doi: 10.1016/j.tips.2004.06.006.
- Levoye, A. *et al.* (2009) « CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. », *Blood*, 113(24), p. 6085-93. doi: 10.1182/blood-2008-12-196618.
- Lewis, B. P. *et al.* (2003) « Prediction of mammalian microRNA targets. », *Cell*, 115(7), p. 787-98. doi: 10.1016/s0092-8674(03)01018-3.
- Li, M. et Ransohoff, R. M. (2009) « The roles of chemokine CXCL12 in embryonic and brain tumor angiogenesis », *Seminars in Cancer Biology*, 19(2), p. 111-115. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.11.001.
- Li, R. *et al.* (2016) « Syndecan-4 regulates the bFGF-induced chemotactic migration of endothelial cells. », *Journal of molecular histology*, 47(5), p. 503-9. doi: 10.1007/s10735-016-9693-0.
- Li, X.-M. *et al.* (2011) « Down-regulation of miR-126 expression in colorectal cancer and its clinical significance. », *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 28(4), p. 1054-7. doi: 10.1007/s12032-010-9637-6.
- Li, X. *et al.* (2018) « SIRT1 activation promotes angiogenesis in diabetic wounds by protecting endothelial cells against oxidative stress ». doi: 10.1016/j.abb.2018.11.016.
- Liao, Y.-Y. *et al.* (2016) « CCL3 promotes angiogenesis by dysregulation of miR-374b/ VEGF-A axis in human osteosarcoma cells », *Oncotarget*, 7(4). doi: 10.18632/oncotarget.6708.
- Liu, G.-T. *et al.* (2014) « CCL5 promotes VEGF-dependent angiogenesis by down-regulating miR-200b through PI3K/Akt signaling pathway in human chondrosarcoma cells », *Oncotarget*, 5(21). doi: 10.18632/oncotarget.2532.
- Liu, G. T. *et al.* (2015) « CCL5 promotes vascular endothelial growth factor expression and induces angiogenesis by down-regulating miR-199a in human chondrosarcoma cells », *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 357(2), p. 476-487. doi: 10.1016/j.canlet.2014.11.015.
- Liu, L. *et al.* (2016) « ZEB1 upregulates VEGF expression and stimulates angiogenesis in breast cancer », *PLoS ONE*. Public Library of Science, 11(2). doi: 10.1371/journal.pone.0148774.
- Liu, L. *et al.* (2019) « IL-17A promotes CXCR2-dependent angiogenesis in a mouse model of liver cancer. », *Molecular medicine reports*, 20(2), p. 1065-1074. doi: 10.3892/mmr.2019.10310.
- Loetscher, M. *et al.* (1994) « Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes », *Journal of Biological Chemistry*, 269(1), p. 232-237.
- Logothetis, D. E. *et al.* (1987) « The $\beta\gamma$ subunits of GTP-Binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart », *Nature*, 325(6102), p. 321-326. doi: 10.1038/325321a0.

- Long, J. *et al.* (2010) « Identification of microRNA-93 as a novel regulator of vascular endothelial growth factor in hyperglycemic conditions. », *The Journal of biological chemistry*, 285(30), p. 23457-65. doi: 10.1074/jbc.M110.136168.
- Lorenzi, M., Nordberg, J. A. et Toledo, S. (1987) « High glucose prolongs cell-cycle traversal of cultured human endothelial cells. », *Diabetes*, 36(11), p. 1261-7. doi: 10.2337/diab.36.11.1261.
- Lortat-Jacob, H. (2009) « The molecular basis and functional implications of chemokine interactions with heparan sulphate. », *Current opinion in structural biology*, 19(5), p. 543-8. doi: 10.1016/j.sbi.2009.09.003.
- Losordo, D. W. et Dimmeler, S. (2004a) « Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: Part I: Angiogenic cytokines », *Circulation*, 109(21), p. 2487-2491. doi: 10.1161/01.CIR.0000128595.79378.FA.
- Losordo, D. W. et Dimmeler, S. (2004b) « Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part II: Cell-based therapies », *Circulation*, 109(22), p. 2692-2697. doi: 10.1161/01.CIR.0000128596.49339.05.
- Luis Pablos, J. *et al.* (1999) *Stromal-Cell Derived Factor Is Expressed by Dendritic Cells and Endothelium in Human Skin*, *American Journal of Pathology*.
- Luo, Y. *et al.* (2005) « Functional SDF1 α /CXCR4 signaling in the developing spinal cord », *Journal of Neurochemistry*, 93(2), p. 452-462. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03049.x.
- Luther, S. A. et Cyster, J. G. (2001) « Chemokines as regulators of T cell differentiation », *Nature Immunology*, 2(2), p. 102-107. doi: 10.1038/84205.
- Ly, M., Laremore, T. N. et Linhardt, R. J. (2010) « Proteoglycomics: recent progress and future challenges. », *OmicS : a journal of integrative biology*, 14(4), p. 389-99. doi: 10.1089/omi.2009.0123.
- Ma, A. *et al.* (2014) « Tsc1 deficiency-mediated mTOR hyperactivation in vascular endothelial cells causes angiogenesis defects and embryonic lethality », *Human Molecular Genetics*, 23(3), p. 693-705. doi: 10.1093/hmg/ddt456.
- Ma, Q. *et al.* (1998) *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4-and SDF-1-deficient mice*, *Immunology*.
- MacGregor, H. J. *et al.* (2011) « A copper-hydrogen peroxide redox system induces dityrosine cross-links and chemokine oligomerisation. », *Cytokine*, 56(3), p. 669-75. doi: 10.1016/j.cyto.2011.08.025.
- Madeddu, P. *et al.* (2006) « Murine models of myocardial and limb ischemia: diagnostic end-points and relevance to clinical problems. », *Vascular pharmacology*, 45(5), p. 281-301. doi: 10.1016/j.vph.2006.08.008.
- Maehata, Y. *et al.* (2010) « Reactive oxygen species (ROS) reduce the expression of BRAK/CXCL14 in human head and neck squamous cell carcinoma cells », *Free Radical Research*, 44(8), p. 913-924. doi: 10.3109/10715762.2010.490836.

- Magenta, A. *et al.* (2011) « miR-200c is upregulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition. », *Cell death and differentiation*, 18(10), p. 1628-39. doi: 10.1038/cdd.2011.42.
- Maillard, L. *et al.* (2014) « RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKC α signaling pathway. », *Biology open*, 3(10), p. 995-1004. doi: 10.1242/bio.20148227.
- Maione, T. E. *et al.* (1990) « Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides », *Science*, 247(4938), p. 77-79. doi: 10.1126/science.1688470.
- Malavaki, C. *et al.* (2008) « Recent advances in the structural study of functional chondroitin sulfate and dermatan sulfate in health and disease. », *Connective tissue research*, 49(3), p. 133-9. doi: 10.1080/03008200802148546.
- Mantovani, A., Bonecchi, R. et Locati, M. (2006) « Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. », *Nature reviews. Immunology*, 6(12), p. 907-18. doi: 10.1038/nri1964.
- Marechal, X. *et al.* (2008) « Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress », *Shock*, 29(5), p. 572-576. doi: 10.1097/SHK.0b013e318157e926.
- Marival, N. *et al.* (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(10). doi: 10.3390/md14100185.
- Marubini, F. *et al.* (1999) « Dependence of Human Stem Cell Engraftment and Repopulation of NOD/SCID Mice on CXCR4 », *Science*, 283(5403), p. 845-848. doi: 10.1126/science.283.5403.845.
- Marumo, T., Schini-Kerth, V. B. et Busse, R. (1999) « Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. », *Diabetes*, 48(5), p. 1131-7. doi: 10.2337/diabetes.48.5.1131.
- El Masri, R. *et al.* (2017) « The “in and out” of glucosamine 6-O-sulfation: the 6th sense of heparan sulfate. », *Glycoconjugate journal*, 34(3), p. 285-298. doi: 10.1007/s10719-016-9736-5.
- Mattes, J. *et al.* (2009) « Antagonism of microRNA-126 suppresses the effector function of TH2 cells and the development of allergic airways disease. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), p. 18704-9. doi: 10.1073/pnas.0905063106.
- Mauge, L. *et al.* (2010) « Les cellules endothéliales circulantes et les progéniteurs endothéliaux: produits de thérapie cellulaire ou biomarqueurs des pathologies vasculaires? », *Sang thrombose vaisseaux*, 22(6), p. 289-300. doi: 10.1684/stv.2010.0494.
- Mellado, M. *et al.* (2001) « Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways », *EMBO Journal*, 20(10), p. 2497-2507. doi: 10.1093/emboj/20.10.2497.

- Miao, H. L. *et al.* (2014) « MicroRNA-520c-3p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion through induction of cell apoptosis by targeting glypican-3 », *Hepatology Research*, 44(3), p. 338-348. doi: 10.1111/hepr.12121.
- Miao, Z. *et al.* (2007) *CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature.*
- Miko, E. *et al.* (2011) « miR-126 inhibits proliferation of small cell lung cancer cells by targeting SLC7A5. », *FEBS letters*, 585(8), p. 1191-6. doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.039.
- Minamino, T. et Komuro, I. (2007) « Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. », *Circulation research*, 100(1), p. 15-26. doi: 10.1161/01.RES.0000256837.40544.4a.
- Mirshahi, F. *et al.* (2000) « SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis in in vitro and in vivo models. », *Thrombosis research*, 99(6), p. 587-94. doi: 10.1016/s0049-3848(00)00292-9.
- Mitić, T. *et al.* (2015) « EZH2 modulates angiogenesis in vitro and in a mouse model of limb ischemia », *Molecular Therapy*. Nature Publishing Group, 23(1), p. 32-42. doi: 10.1038/mt.2014.163.
- Mizutani, K. *et al.* (2001) « Heparin and heparan sulfate inhibit extracellular signal-regulated kinase activation and myocardial cell hypertrophy induced by endothelin-1. », *The Kobe journal of medical sciences*, 47(2), p. 47-58.
- Moghaddam, A. B. *et al.* (2015) « Nanoparticles biosynthesized by fungi and yeast: A review of their preparation, properties, and medical applications », *Molecules*, 20(9), p. 16540-16565. doi: 10.3390/molecules200916540.
- Mondadori dos Santos, A. *et al.* (2015) « miR-126 Is Involved in Vascular Remodeling under Laminar Shear Stress », *BioMed Research International*, 2015, p. 1-11. doi: 10.1155/2015/497280.
- Moriguchi, M. *et al.* (2004) « CXCL12 Signaling Is Independent of Jak2 and Jak3* □ S ». doi: 10.1074/jbc.M414219200.
- Moser, B. et Willimann, K. (2004) « Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. », *Annals of the rheumatic diseases*, 63 Suppl 2, p. ii84-ii89. doi: 10.1136/ard.2004.028316.
- Murdoch, C., Monk, P. N. et Finn, A. (1999) « Cxc chemokine receptor expression on human endothelial cells. », *Cytokine*, 11(9), p. 704-12. doi: 10.1006/cyto.1998.0465.
- Murphy, J. W. *et al.* (2007) « Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 α) binding to heparin », *Journal of Biological Chemistry*, 282(13), p. 10018-10027. doi: 10.1074/jbc.M608796200.
- Musiyenko, A., Bitko, V. et Barik, S. (sans date) « Ectopic expression of miR-126*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates protein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells ». doi: 10.1007/s00109-007-0296-9.

- Na, J. *et al.* (2018) « Anti-apoptotic effects of glycosaminoglycans via inhibition of ERK/AP-1 signaling in TNF- α stimulated human dermal fibroblasts », *International Journal of Molecular Medicine*, 41(5), p. 3090-3098. doi: 10.3892/ijmm.2018.3483.
- Nagasawa, T. *et al.* (1996) « Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. », *Nature*, 382(6592), p. 635-8. doi: 10.1038/382635a0.
- Nakashio, A., Fujita, N. et Tsuruo, T. (2002) « Topotecan inhibits VEGF- and bFGF-induced vascular endothelial cell migration via downregulation of the PI3K-Akt signaling pathway », *International Journal of Cancer*, 98(1), p. 36-41. doi: 10.1002/ijc.10166.
- Naumann, U. *et al.* (2010) « CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11 », *PLoS ONE*, 5(2). doi: 10.1371/journal.pone.0009175.
- Noguer, O. *et al.* (2009) « Syndecan-2 downregulation impairs angiogenesis in human microvascular endothelial cells. », *Experimental cell research*, 315(5), p. 795-808. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.11.016.
- Nomiya, H., Osada, N. et Yoshie, O. (2010) « The evolution of mammalian chemokine genes. », *Cytokine & growth factor reviews*, 21(4), p. 253-62. doi: 10.1016/j.cytogr.2010.03.004.
- Nomiya, H., Osada, N. et Yoshie, O. (2011) « A family tree of vertebrate chemokine receptors for a unified nomenclature », *Developmental and Comparative Immunology*. Elsevier Ltd, 35(7), p. 705-715. doi: 10.1016/j.dci.2011.01.019.
- Norgren, L. *et al.* (2007) « TASC II section F on revascularization in PAD. », *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists*, 14(5), p. 743-4. doi: 10.1177/152660280701400520.
- Nykänen, A., Haley, B. et Zamore, P. D. (2001) « ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. », *Cell*, 107(3), p. 309-21. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00547-5.
- Oglesby, I. K. *et al.* (2010) « miR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression. », *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(4), p. 1702-9. doi: 10.4049/jimmunol.0902669.
- Ohlsson Teague, E. M. C. *et al.* (2009) « MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. », *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 23(2), p. 265-75. doi: 10.1210/me.2008-0387.
- Oliver, G. (2004) « Lymphatic vasculature development. », *Nature reviews. Immunology*, 4(1), p. 35-45. doi: 10.1038/nri1258.
- Otsuka, M. *et al.* (2008) « Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. », *The Journal of clinical investigation*, 118(5), p. 1944-54. doi: 10.1172/JCI33680.
- Ouma, G. O. *et al.* (2013) « Therapeutic angiogenesis in critical limb ischemia. », *Angiology*, 64(6), p. 466-80. doi: 10.1177/0003319712464514.

- Park, J. Y. *et al.* (2017) « CCL11 promotes angiogenic activity by activating the PI3K/Akt pathway in HUVECs. », *Journal of receptor and signal transduction research*, 37(4), p. 416-421. doi: 10.1080/10799893.2017.1298132.
- Pawig, L. *et al.* (2015) « Diversity and inter-connections in the CXCR4 chemokine receptor/ligand family: Molecular perspectives », *Frontiers in Immunology*, 6(AUG), p. 1-23. doi: 10.3389/fimmu.2015.00429.
- Perollet, C. *et al.* (1998) « Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization », *Blood*, 91(9), p. 3289-3299.
- Pin, A.-L. *et al.* (2012) « miR-20a represses endothelial cell migration by targeting MKK3 and inhibiting p38 MAP kinase activation in response to VEGF. », *Angiogenesis*, 15(4), p. 593-608. doi: 10.1007/s10456-012-9283-z.
- Poissonnier, L. *et al.* (2014) « MiR126-5p repression of ALCAM and SetD5 in endothelial cells regulates leucocyte adhesion and transmigration », *Cardiovascular Research*, 102(3), p. 436-447. doi: 10.1093/cvr/cvu040.
- Poliseno, L. *et al.* (2006) « MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. », *Blood*, 108(9), p. 3068-71. doi: 10.1182/blood-2006-01-012369.
- Power, C. A. (2003) « Knock out models to dissect chemokine receptor function in vivo », *Journal of Immunological Methods*, 273(1-2), p. 73-82. doi: 10.1016/S0022-1759(02)00419-2.
- Pugh, C. W. et Ratcliffe, P. J. (2003) « Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. », *Nature medicine*, 9(6), p. 677-84. doi: 10.1038/nm0603-677.
- Qiang, B. *et al.* (2014) « Perlecan Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Critical Determinant of Angiogenesis in Response to Mouse Hind-Limb Ischemia », *Canadian Journal of Cardiology*. Canadian Cardiovascular Society, 30(11), p. 1444-1451. doi: 10.1016/j.cjca.2014.06.003.
- Qu, H. *et al.* (2015) « miRNA-558 promotes tumorigenesis and aggressiveness of neuroblastoma cells through activating the transcription of heparanase », *Human Molecular Genetics*, 24(9), p. 2539-2551. doi: 10.1093/hmg/ddv018.
- Qu, Q. *et al.* (2017) « Upregulation of miR-126-3p promotes human saphenous vein endothelial cell proliferation in vitro and prevents vein graft neointimal formation ex vivo and in vivo. », *Oncotarget*, 8(63), p. 106790-106806. doi: 10.18632/oncotarget.22365.
- Quintanar-Audelo, M. *et al.* (2011) « Sprouty-related Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein homology 1-domain-containing protein (SPRED1), a tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 (SHP2) substrate in the ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway », *Journal of Biological Chemistry*, 286(26), p. 23102-23112. doi: 10.1074/jbc.M110.212662.
- R. K. Jain (2005) « Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy », *Science*, 307(5706), p. 58-62.

- Rajagopal, S. *et al.* (2010) « Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2), p. 628-32. doi: 10.1073/pnas.0912852107.
- Rajagopalan, L. et Rajarathnam, K. (2006) « Structural basis of chemokine receptor function--a model for binding affinity and ligand selectivity. », *Bioscience reports*, 26(5), p. 325-39. doi: 10.1007/s10540-006-9025-9.
- Rajagopalan, S. *et al.* (2003) « Regional Angiogenesis With Vascular Endothelial Growth Factor in Peripheral Arterial Disease », *Circulation*, 108(16), p. 1933-1938. doi: 10.1161/01.cir.0000093398.16124.29.
- Ramachandran, V. et Chen, X. (2008) « Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. », *Science (New York, N.Y.)*, 321(5895), p. 1490-2. doi: 10.1126/science.1163728.
- Rehm, M. *et al.* (2007) « Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia », *Circulation*, 116(17), p. 1896-1906. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.684852.
- Reich, N. *et al.* (2011) « Microparticles stimulate angiogenesis by inducing ELR(+) CXC-chemokines in synovial fibroblasts. », *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(4), p. 756-62. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01051.x.
- Rek, A. *et al.* (2009) « A biophysical insight into the RANTES-glycosaminoglycan interaction. », *Biochimica et biophysica acta*, 1794(4), p. 577-82. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.01.001.
- Ridiandries, A., Tan, J. T. M. et Bursill, C. A. (2016) « The role of CC-chemokines in the regulation of angiogenesis », *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), p. 1-16. doi: 10.3390/ijms17111856.
- Rolland-Turner, M. *et al.* (2013) « Adenosine Stimulates the Migration of Human Endothelial Progenitor Cells. Role of CXCR4 and MicroRNA-150 », *PLoS ONE*, 8(1), p. 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0054135.
- Rosenberger, C. *et al.* (2003) « Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction », *Kidney International*, 64(3), p. 874-886. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00159.x.
- Rubin, J. B. (2008) « Chemokine Signaling in Cancer: One Hump or Two? » doi: 10.1016/j.semcancer.2008.10.001.
- Rueda, P. *et al.* (2008) « The CXCL12 γ chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins », *PLoS ONE*, 3(7). doi: 10.1371/journal.pone.0002543.
- Rueda, P. *et al.* (2012) « Homeostatic and tissue reparation defaults in mice carrying selective genetic invalidation of CXCL12/proteoglycan interactions », *Circulation*. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.113290.
- Ruhrberg, C. *et al.* (2002) « Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis », *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.242002.

- Ruth, J. H. *et al.* (2001) « Fractalkine, a novel chemokine in rheumatoid arthritis and in rat adjuvant-induced arthritis. », *Arthritis and rheumatism*, 44(7), p. 1568-81. doi: 10.1002/1529-0131(200107)44:7<1568::AID-ART280>3.0.CO;2-1.
- Sadir, R. *et al.* (2001) « Characterization of the Stromal Cell-derived Factor-1 α -Heparin Complex », *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), p. 8288-8296. doi: 10.1074/jbc.M008110200.
- Sahoo, S. *et al.* (2011) « Exosomes from human CD34+ stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity », *Circulation Research*, 109(7), p. 724-728. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.253286.
- Sakai, H. *et al.* (2018) « ELR+ chemokine-mediated neutrophil recruitment is involved in 2,4,6-trinitrochlorobenzene-induced contact hypersensitivity. », *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 45(1), p. 27-33. doi: 10.1111/1440-1681.12839.
- Salcedo, R. *et al.* (1999) « Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Induce Expression of CXCR4 on Human Endothelial Cells In Vivo Neovascularization Induced by Stromal-Derived », 154(4), p. 1125-1135.
- Salcedo, R. *et al.* (2000) « Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: Direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression », *Blood*, 96(1), p. 34-40.
- Sato, Y., Abe, M. et Takaki, R. (1990) « Platelet factor 4 blocks the binding of basic fibroblast growth factor to the receptor and inhibits the spontaneous migration of vascular endothelial cells. », *Biochemical and biophysical research communications*, 172(2), p. 595-600. doi: 10.1016/0006-291x(90)90715-y.
- Schioppa, T. *et al.* (2003) « Regulation of the Chemokine Receptor CXCR4 by Hypoxia », *The Journal of Experimental Medicine The Journal of Experimental Medicine* •, 198(9), p. 1391-1402. doi: 10.1084/jem.20030267.
- Schmidt, A., Brixius, K. et Bloch, W. (2007) « Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. », *Circulation research*, 101(2), p. 125-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.148932.
- Schober, A. *et al.* (2014) « MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1 », *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 20(4), p. 368-376. doi: 10.1038/nm.3487.
- Schwarz, D. S. *et al.* (2003) « Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. », *Cell*, 115(2), p. 199-208. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00759-1.
- Sessa, R. *et al.* (2012) « The miR-126 regulates Angiopoietin-1 signaling and vessel maturation by targeting p85 β », *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.07.011.
- Shellenberger, T. D. *et al.* (2004) « BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells. », *Cancer research*, 64(22), p. 8262-70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2056.

- Shenoy, S. K. et Lefkowitz, R. J. (2011) « B-Arrestin-Mediated Receptor Trafficking and Signal Transduction », *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(9), p. 521-533. doi: 10.1016/j.tips.2011.05.002.
- Shilo, S. *et al.* (2008) « Evidence for the involvement of miRNA in redox regulated angiogenic response of human microvascular endothelial cells. », *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(3), p. 471-7. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.160655.
- Shimizu, N. *et al.* (2000) *A Putative G Protein-Coupled Receptor, RDC1, Is a Novel Coreceptor for Human and Simian Immunodeficiency Viruses*, *JOURNAL OF VIROLOGY*.
- Shioda, T. *et al.* (1998) « Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) and SDF-1beta are abolished by CD26/dipeptidyl peptidase IV-mediated cleavage. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), p. 6331-6. doi: 10.1073/pnas.95.11.6331.
- Shirozu, M. *et al.* (1995) « Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene », *Genomics*, p. 495-500. doi: 10.1006/geno.1995.1180.
- Sierro, F. *et al.* (2007) *Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7*.
- Silvestre, J. S. *et al.* (2003) « Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis », *Circulation Research*, 93(2), p. 114-123. doi: 10.1161/01.RES.0000081594.21764.44.
- Simons, M. (2005) « Angiogenesis: Where do we stand now? », *Circulation*, 111(12), p. 1556-1566. doi: 10.1161/01.CIR.0000159345.00591.8F.
- Slovut, D. P. et Sullivan, T. M. (2008) « Critical limb ischemia: medical and surgical management. », *Vascular medicine (London, England)*, 13(3), p. 281-91. doi: 10.1177/1358863X08091485.
- Small, J. V. *et al.* (2002) « The lamellipodium: where motility begins. », *Trends in cell biology*, 12(3), p. 112-20. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.64.
- Smock, R. G. et Meijers, R. (2018) « Roles of glycosaminoglycans as regulators of ligand/receptor complexes. », *Open biology*, 8(10). doi: 10.1098/rsob.180026.
- Van Solingen, C. *et al.* (2009) « Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis », *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8 A), p. 1577-1585. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00613.x.
- Van Solingen, C. *et al.* (2011) « MicroRNA-126 modulates endothelial SDF-1 expression and mobilization of Sca-1+/Lin- progenitor cells in ischaemia », *Cardiovascular Research*, 92(3), p. 449-455. doi: 10.1093/cvr/cvr227.

- Speyer, C. L. et Ward, P. A. (2011) « Role of endothelial chemokines and their receptors during inflammation », *Journal of Investigative Surgery*, 24(1), p. 18-27. doi: 10.3109/08941939.2010.521232.
- Spinetti, G. *et al.* (2001) « The chemokine CXCL13 (BCA-1) inhibits FGF-2 effects on endothelial cells », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(1), p. 19-24. doi: 10.1006/bbrc.2001.5924.
- Steen, A. *et al.* (2014) « Biased and G protein-independent signaling of chemokine receptors », *Frontiers in Immunology*, 5(JUN), p. 1-13. doi: 10.3389/fimmu.2014.00277.
- Strange, P. G. (2008) « Signaling mechanisms of GPCR ligands. », *Current opinion in drug discovery & development*, 11(2), p. 196-202.
- Strasly, M. *et al.* (2004) « CCL16 activates an angiogenic program in vascular endothelial cells. », *Blood*, 103(1), p. 40-9. doi: 10.1182/blood-2003-05-1387.
- Strieter, R. M. *et al.* (2005) « CXC chemokines in angiogenesis », 16, p. 593-609. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.04.007.
- Struyf, S. *et al.* (2009) « Citrullination of CXCL12 differentially reduces CXCR4 and CXCR7 binding with loss of inflammatory and anti-HIV-1 activity via CXCR4. », *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(1), p. 666-74. doi: 10.4049/jimmunol.182.1.666.
- Suárez, Y. *et al.* (2007) « Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. », *Circulation research*, 100(8), p. 1164-73. doi: 10.1161/01.RES.0000265065.26744.17.
- Suárez, Y. *et al.* (2008) « Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37), p. 14082-7. doi: 10.1073/pnas.0804597105.
- Suchting, S. *et al.* (2007) « The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching », *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.0611177104.
- Sun, Y. *et al.* (2002) « Arrestin2 Is Critically Involved in CXCR4-mediated Chemotaxis, and This Is Mediated by Its Enhancement of p38 MAPK Activation* ». *JBC Papers in Press*. doi: 10.1074/jbc.M207294200.
- Sun, Z. *et al.* (2018) « Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications. », *Molecular cancer*, 17(1), p. 147. doi: 10.1186/s12943-018-0897-7.
- Sun, Z. *et al.* (2019) « YAP1-induced MALAT1 promotes epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis by sponging miR-126-5p in colorectal cancer. », *Oncogene*, 38(14), p. 2627-2644. doi: 10.1038/s41388-018-0628-y.
- Tachibana, K. *et al.* (1998) « The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. », *Nature*, 393(6685), p. 591-4. doi: 10.1038/31261.

- Taipale, J. et Keski-Oja, J. (1997) « Growth factors in the extracellular matrix. », *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(1), p. 51-9. doi: 10.1096/fasebj.11.1.9034166.
- Tavazoie, S. F. et al. (2008) « Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. », *Nature*, 451(7175), p. 147-52. doi: 10.1038/nature06487.
- Tirone, M. et al. (2018) « High mobility group box 1 orchestrates tissue regeneration via CXCR4 », *The Journal of Experimental Medicine*, 215(1), p. 303-318. doi: 10.1084/jem.20160217.
- Torán, J. L. et al. (2017) « CXCL6 is an important paracrine factor in the pro-angiogenic human cardiac progenitor-like cell secretome », *Scientific Reports*, 7(1), p. 1-14. doi: 10.1038/s41598-017-11976-6.
- Urbich, C. et Dimmeler, S. (2004) « Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. », *Circulation research*, 95(4), p. 343-53. doi: 10.1161/01.RES.0000137877.89448.78.
- Valdés, G. et al. (2008) « Angiogenic, hyperpermeability and vasodilator network in utero-placental units along pregnancy in the guinea-pig (*Cavia porcellus*) », *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6, p. 1-11. doi: 10.1186/1477-7827-6-13.
- Vila-Coro, A. J. et al. (1999) « The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. », *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(13), p. 1699-710.
- Villain, G. et al. (2018) « miR-126-5p promotes retinal endothelial cell survival through SetD5 regulation in neurons », *Development*, 145(1), p. dev156232. doi: 10.1242/dev.156232.
- Voellenkle, C. et al. (2010) « MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. », *Physiological genomics*, 42(3), p. 420-6. doi: 10.1152/physiolgenomics.00211.2009.
- van der Vorst, E. P. C., Döring, Y. et Weber, C. (2015) « MIF and CXCL12 in cardiovascular diseases: Functional differences and similarities », *Frontiers in Immunology*, 6(JUL), p. 1-13. doi: 10.3389/fimmu.2015.00373.
- Wang, C. et al. (2017) « miR-126-5p Restoration Promotes Cell Apoptosis in Cervical Cancer by Targeting Bcl2l2. », *Oncology research*, 25(4), p. 463-470. doi: 10.3727/096504016X14685034103879.
- Wang, J.-Q. et al. (2018) « Endothelial progenitor cell miR-126 promotes homing of endothelial progenitor cells within arterial thrombus in patients with cerebral infarction and its molecular mechanism. », *European review for medical and pharmacological sciences*, 22(4), p. 1078-1083. doi: 10.26355/eurrev_201802_14394.
- Wang, L.-H. et al. (2016) « CCL5 promotes VEGF-C production and induces lymphangiogenesis by suppressing miR-507 in human chondrosarcoma cells », *Oncotarget*, 7(24), p. 36896-36908. doi: 10.18632/oncotarget.9213.

- Wang, S. *et al.* (2008) « The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. », *Developmental cell*, 15(2), p. 261-71. doi: 10.1016/j.devcel.2008.07.002.
- Wang, S. et Olson, E. N. (2009) « AngiomiRs--key regulators of angiogenesis. », *Current opinion in genetics & development*, 19(3), p. 205-11. doi: 10.1016/j.gde.2009.04.002.
- Wang, Y. *et al.* (2017) « Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell-Secreted CXCL1 and CXCL8 Facilitate Breast Tumor Growth By Promoting Angiogenesis. », *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 35(9), p. 2060-2070. doi: 10.1002/stem.2643.
- Wang, Z. et Huang, H. (2013) « Platelet factor-4 (CXCL4/PF-4): An angiostatic chemokine for cancer therapy », *Cancer Letters*, 331(2), p. 147-153. doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.006.
- Wener Risau (1997) « Mechanisms of angiogenesis », *Nature*, 386(April), p. 671-674.
- Whalen, E. J., Rajagopal, S. et Lefkowitz, R. J. (2011) « Therapeutic potential of β -arrestin- and G protein-biased agonists. », *Trends in molecular medicine*, 17(3), p. 126-39. doi: 10.1016/j.molmed.2010.11.004.
- Wu, Z. *et al.* (2014) « MiR-126-5p regulates osteoclast differentiation and bone resorption in giant cell tumor through inhibition of MMP-13. », *Biochemical and biophysical research communications*, 443(3), p. 944-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.075.
- Würdinger, T. *et al.* (2008) « miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. », *Cancer cell*, 14(5), p. 382-93. doi: 10.1016/j.ccr.2008.10.005.
- Yamaguchi, J.-I. *et al.* (2003) « Stromal Cell-Derived Factor-1 Effects on Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cell Recruitment for Ischemic Neovascularization ». doi: 10.1161/01.CIR.0000055313.77510.22.
- Yanagishita, M. et Hascall, V. C. (1984) « Metabolism of proteoglycans in rat ovarian granulosa cell culture. Multiple intracellular degradative pathways and the effect of chloroquine. », *The Journal of biological chemistry*, 259(16), p. 10270-83.
- Yang, D. *et al.* (1999) « Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. », *Science (New York, N.Y.)*, 286(5439), p. 525-8. doi: 10.1126/science.286.5439.525.
- Yang, W. J. *et al.* (2005) « Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. », *The Journal of biological chemistry*, 280(10), p. 9330-5. doi: 10.1074/jbc.M413394200.
- Yao, L. *et al.* (2003) « Selective expression of stromal-derived factor-1 in the capillary vascular endothelium plays a role in Kaposi sarcoma pathogenesis ». doi: 10.1182/blood-2003-02-0641.

- Ye, P. *et al.* (2013) « Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulative effect on VEGF and MMP-9 expression », *International Journal of Medical Sciences*, 11(1), p. 17-23. doi: 10.7150/ijms.7329.
- Yi, J. et Gao, Z. F. (2019) « MicroRNA-9-5p promotes angiogenesis but inhibits apoptosis and inflammation of high glucose-induced injury in human umbilical vascular endothelial cells by targeting CXCR4 », *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 130, p. 1-9. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.003.
- Yoo, J. K. *et al.* (2013) « MiR-7641 modulates the expression of CXCL1 during endothelial differentiation derived from human embryonic stem cells », *Archives of Pharmacal Research*, 36(3), p. 353-358. doi: 10.1007/s12272-013-0067-9.
- Yoshida, T. *et al.* (2006) « Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors », *Oncogene*, 25, p. 6056-6066. doi: 10.1038/sj.onc.1209635.
- Yu, L. *et al.* (2006) « Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1 », *Gene*. doi: 10.1016/j.gene.2006.02.001.
- Zabel, B. A. *et al.* (2009) « Elucidation of CXCR7-Mediated Signaling Events and Inhibition of CXCR4-Mediated Tumor Cell Transendothelial Migration by CXCR7 Ligands », *The Journal of Immunology*, 183(5), p. 3204-3211. doi: 10.4049/jimmunol.0900269.
- Zampetaki, A. *et al.* (2010) « Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. », *Circulation research*, 107(6), p. 810-7. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.226357.
- Zhang, L. (2010) « Glycosaminoglycan (GAG) Biosynthesis and GAG-Binding Proteins », in *Progress in molecular biology and translational science*, p. 1-17. doi: 10.1016/S1877-1173(10)93001-9.
- Zhang, X.-F. *et al.* (2001) *Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells.*
- Zhang, Z. *et al.* (2012) « MicroRNA degradation and turnover: Regulating the regulators », *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(4), p. 593-600. doi: 10.1002/wrna.1114.
- Zhao, S. *et al.* (2011) « MicroRNA-126 regulates DNA methylation in CD4+ T cells and contributes to systemic lupus erythematosus by targeting DNA methyltransferase 1 », *Arthritis and Rheumatism*, 63(5), p. 1376-1386. doi: 10.1002/art.30196.
- Zhou, Q. *et al.* (2016) « Strand and cell type-specific function of microRNA-126 in angiogenesis », *Molecular Therapy*, 24(10), p. 1823-1835. doi: 10.1038/mt.2016.108.

- Zhou, Z., Schober, A. et Nazari-Jahantigh, M. (2018) « Dicer promotes endothelial recovery and limits lesion formation after vascular injury through miR-126-5p », *International Journal of Cardiology*. Elsevier B.V., 273(xxxx), p. 199-202. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.09.006.
- Zhu, H. et Fan, G. C. (2012) « Role of microRNAs in the reperfused myocardium towards post-infarct remodelling », *Cardiovascular Research*, 94(2), p. 284-292. doi: 10.1093/cvr/cvr291.
- Zhu, N. *et al.* (2011) « Endothelial-specific intron-derived miR-126 is down-regulated in human breast cancer and targets both VEGFA and PIK3R2. », *Molecular and cellular biochemistry*, 351(1-2), p. 157-64. doi: 10.1007/s11010-011-0723-7.
- Zidar, D. A. *et al.* (2009) « Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(24), p. 9649-54. doi: 10.1073/pnas.0904361106.
- Zweemer, A. J. M. *et al.* (2014) « Bias in chemokine receptor signalling. », *Trends in immunology*, 35(6), p. 243-52. doi: 10.1016/j.it.2014.02.004.

ANNEXES

Article

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

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

¹ Inserm U1148, LVTS, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Paris 75018, France; nicolas.marinval@inserm.fr (N.M.); 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.); khadijabenakrouit@hotmail.fr (K.B.A.); marc.lamydelachapelle@univ-paris13.fr (M.L.d.l.C.)

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

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

Academic Editor: Paola Laurienzo

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

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

Keywords: fucoidan; glycosaminoglycans; glycocalyx; angiogenesis; endocytosis

1. Introduction

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

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

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

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

2. Results

2.1. LMWF and MMWF Fractions Collection and Characterization

2.1.1. Fractionation and Composition of ASPHY, MMWF and LMWF

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

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

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

Fucoidans	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	I_p (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 O=S=O stretching vibration (with some contribution of carbohydrate vibrations) was founded around 1253 cm^{-1} in FT-IR and 1268 cm^{-1} in Raman, although symmetric O=S=O stretching of sulfate was founded at 1082 cm^{-1} in Raman [17]. The Raman spectra of the three samples of fucoidans showed that LMWF exhibited a strong vibration at 1082 cm^{-1} and 1268 cm^{-1} compared to MMWF. For both LMWF and MMWF spectra, the Raman band at 845 cm^{-1} was attributed to COS bending vibration of sulfate substituents at the axial C2 and the equatorial C4 positions [18], both the 722 cm^{-1} and 820 cm^{-1} bands were attributed to the angular deformations of CH bonds. Otherwise the Raman band at 577 cm^{-1} and 540 cm^{-1} were attributed to the asymmetric and symmetric O=S=O deformation of sulfates [19]. The FT-IR analysis in 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.

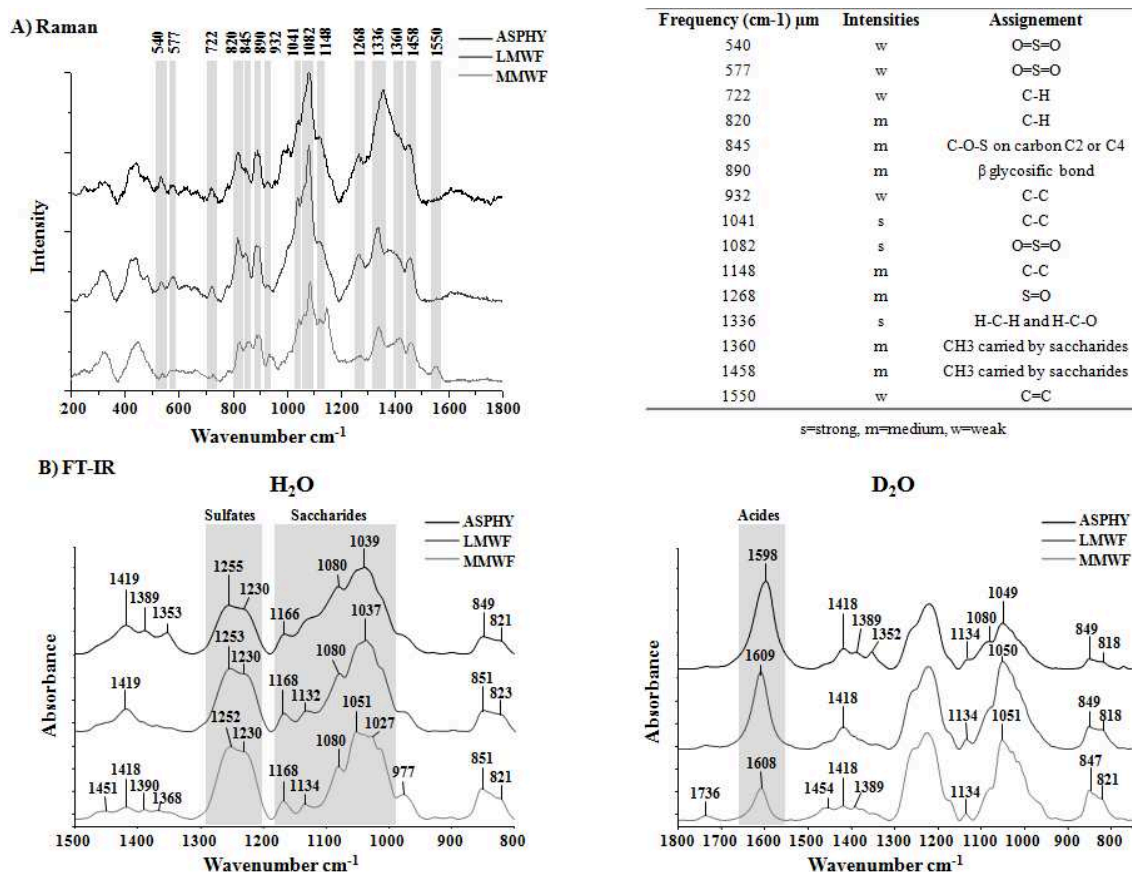


Figure 1. Raman and Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy analysis. Fucoidan spectra are represented in black for crude Ascophyscient (ASPHY), dark grey for the low molecular weight fucoidan (LMWF) and light grey for the medium molecular weight fucoidan (MMWF) for (A) Raman and (B) FT-IR (in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

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

2.2.1. LMWF and MMWF Affinities towards Heparin-Binding Proteins

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

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

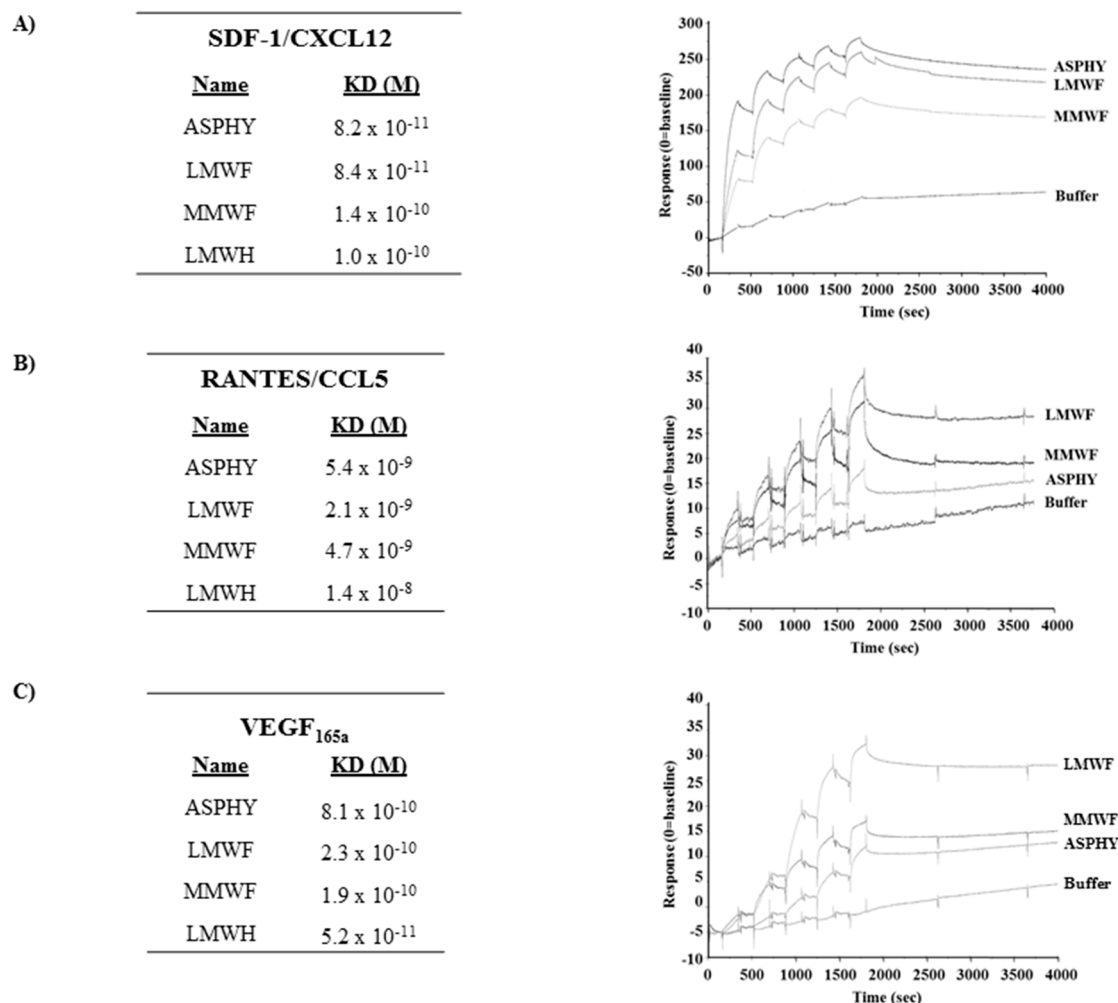


Figure 2. Affinity measurement of fucoidans to SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 and VEGF. The binding responses of ASPHY, MMWF, LMWF and low molecular weight heparin (LMWH) to SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5 and VEGF were measured by Surface Plasmon Resonance. We immobilized biotinylated SDF-1/CXCL12, RANTES/CCL5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

2.2.2. LMWF and MMWF Effects on Endothelial Cell Viability

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

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

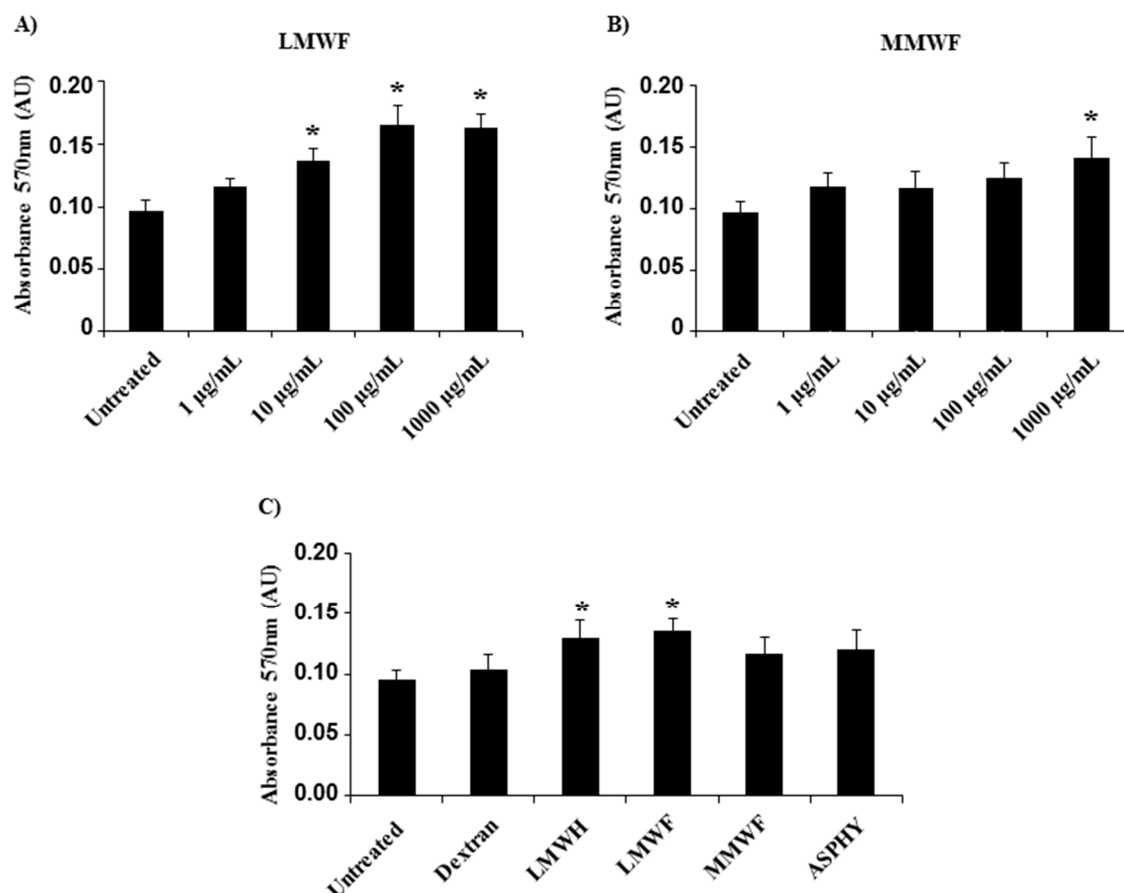


Figure 3. Effect of fucoidans on cell viability. The viability of HUVECs was analyzed by using MTT assay after fucoidan treatment for 24 h. The absorbance was read with a spectrophotometer (at 570 nm). HUVECs were incubated with (A) LMWF and (B) MMWF at increasing concentration (1, 10, 100, and 1000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

2.2.3. LMWF and MMWF Effects on Angiogenesis In Vitro

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

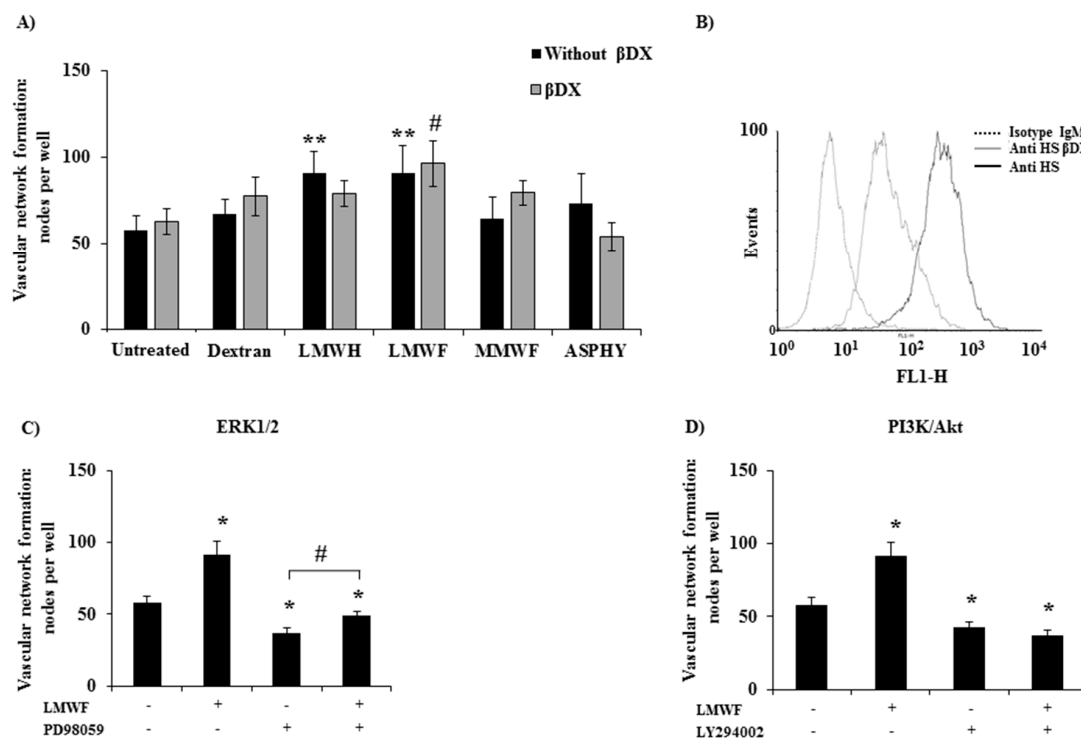


Figure 4. Pro-angiogenic potential of fucoidans on GAG-free HUVECs. (A) HUVECs pre-treated or not with β DX (4-Nitrophenyl- β -D-Xylopyranoside) were seeded on Matrigel and incubated with dextran, LMWH, LMWF, MMWF or ASPHY for 6 h. The cells were then stained with Hemalun Mayer's and photographed for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

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

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

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

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

2.2.4. LMWF and MMWF Effects on HUVEC Migration In Vitro

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

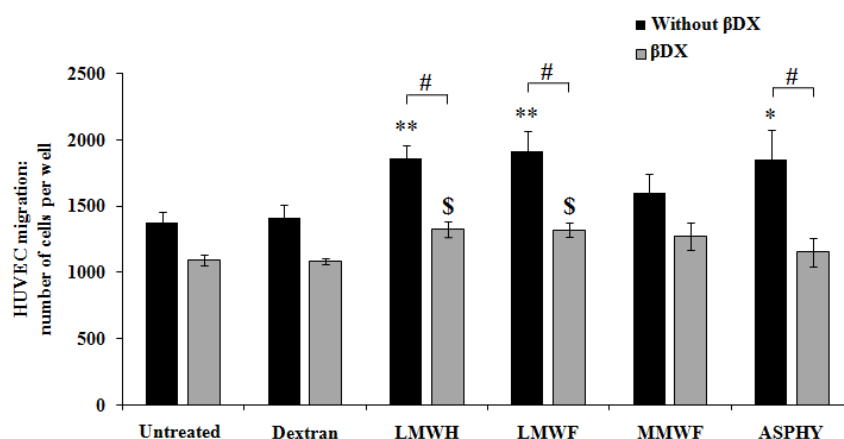


Figure 5. Pro-migratory potential of fucoidans on GAG-free HUVECs. HUVECs were seeded and incubated 24 h in the upper chamber with the polysaccharides dextran, LMWH, LMWF, MMWF or ASPHY at $10 \mu\text{g}/\text{mL}$. The basal migration was performed in complete medium with 12% FBS. In the aim to remove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

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

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

2.3. Cellular Uptake of LMWF-Alexa in Endothelial Cells

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

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

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

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

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

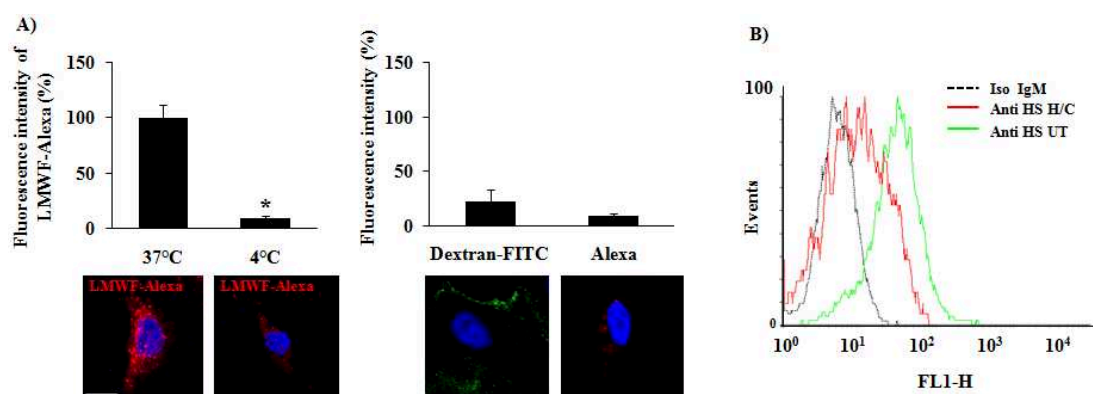


Figure 6. Cont.

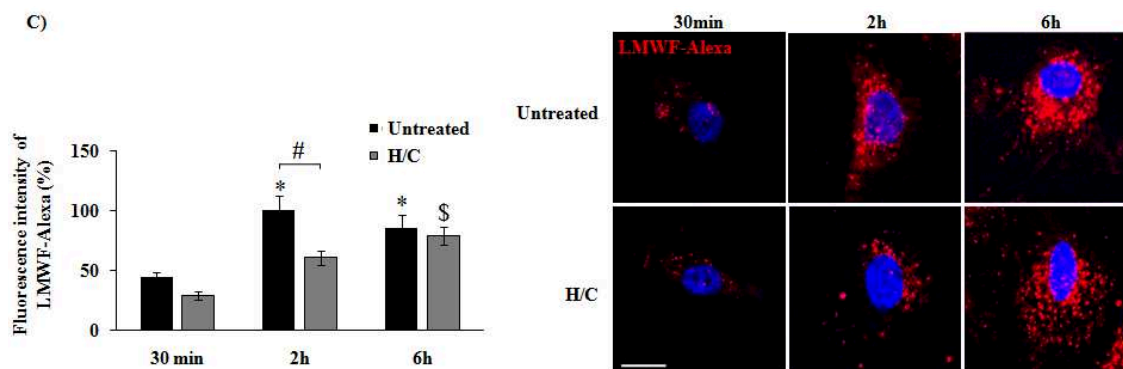


Figure 6. LMWF-Alexa localization in HUVECs by confocal microscopy. LMWF was previously coupled with the fluorophore Alexa Fluor 555. (A) LMWF-Alexa was added in HUVEC culture medium at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ during 2 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ and 4 $^{\circ}\text{C}$. Dextran-FITC and Alexa fluor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

2.3.2. Mechanism of LMWF Uptake: Implication of Clathrin

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

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

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

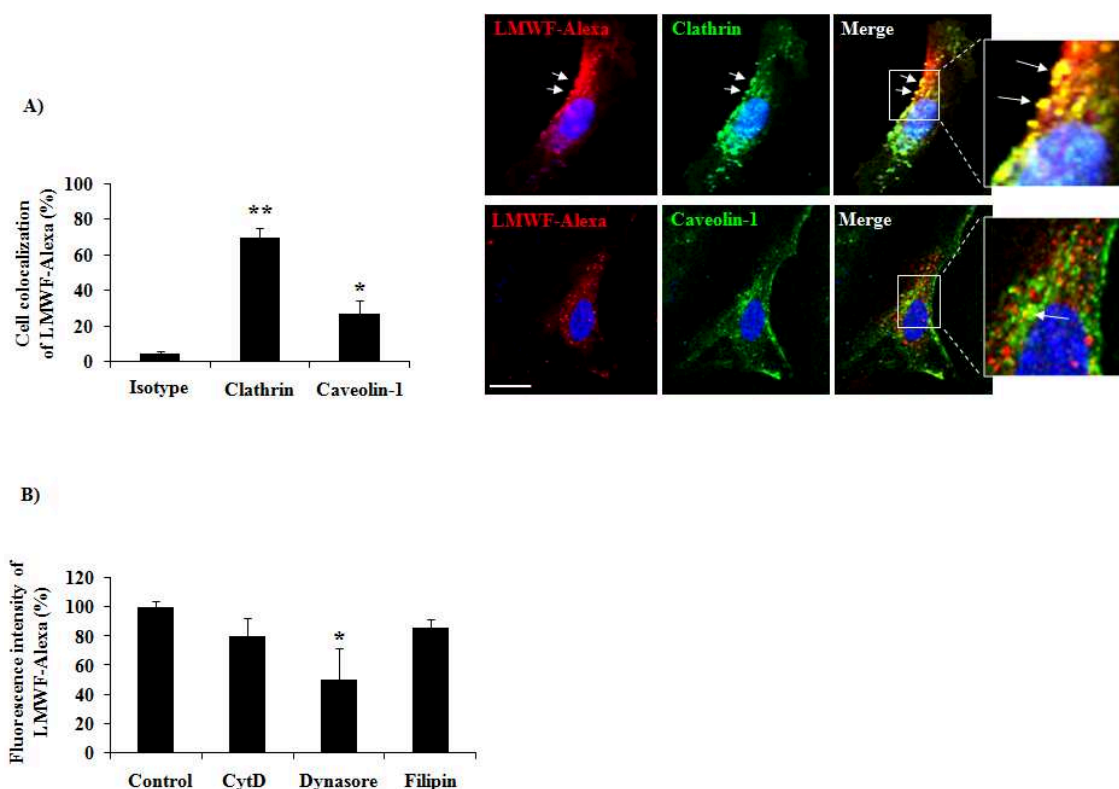


Figure 7. Internalization pathways of LMWF-Alexa in HUVECs analyzed by confocal microscopy. (A) HUVECs were incubated 2 h with LMWF-Alexa, fixed, permeabilized and the clathrin or caveolin-1 was revealed by immunofluorescence. A non-specific isotype of immunoglobulin was used as negative control (Isotype).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

3. Discussion

3.1. Structure-Function Correlation

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.3. Internalization of LMWF

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

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

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

4. Experimental Section

4.1. Reagents

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

4.2. Pharmacological Inhibitors

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

4.3. Enzymes and Glycosaminoglycan Substitute

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

4.4. Antibodies

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

4.5. Polysaccharides

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

4.6. Fractionation

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

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

4.7. Raman Spectroscopy

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

4.8. Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) spectra of the samples diluted either in D₂O (>99.8% purity, Euriso-Top, CEA, Saclay, France) or in H₂O solution were recorded on a Tensor 27 spectrophotometer (Bruker, Karlsruhe, Germany). Solutions were deposited between two ZnSe windows at a concentration of 333 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Experiments were performed by drying the samples and dissolving them in solution at pH ~7. Twenty scans were accumulated (spectral region 4000–400 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 μL of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{L}/\text{min}$ 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 °C), flow rate (30 $\mu\text{L}/\text{min}$), 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 ng/mL), hydrocortisone (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), VEGF (vascular endothelial growth factor, 0.5 ng/mL), bFGF (basic fibroblast growth factor, 10 ng/mL), R3 IGF-1 (insulin like growth factor, 20 ng/mL), ascorbic acid (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and antibiotics (penicillin-streptomycin, 1%, Invitrogen, Cergy, France) at 37 °C in 5% CO₂. 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. Peysseon, F.; Ricard-Blum, S. Heparin-protein interactions: From affinity and kinetics to biological roles. Application to an interaction network regulating angiogenesis. *Matrix Biol.* **2014**, *35*, 73–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Chevalier, F.; Arnaud, D.; Henault, E.; Guillevic, O.; Siñeriz, F.; Ponsen, A.C.; Papy-Garcia, D.; Barritault, D.; Letourneur, D.; Uzan, G.; et al. A fine structural modification of glycosaminoglycans is correlated with the progression of muscle regeneration after ischaemia: Towards a matrix-based therapy? *Eur. Cells Mater.* **2015**, *30*, 51–68.
7. Luyt, C.; Ho-tin-noe, B.; Collic-jouault, S.E.A.M.; Jacob, M.; Osborne-pellegrin, M.; Guezennec, J.; Louedec, L.; Herv, E.; Letourneur, D.; Michel, J. Low-Molecular-Weight Fucoidan Promotes Therapeutic Revascularization in a Rat Model of Critical Hindlimb Ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *305*, 24–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Deux, J.F.; Meddahi-Pellé, A.; le Blanche, A.F.; Feldman, L.J.; Collic-Jouault, S.; Brée, F.; Boudghène, F.; Michel, J.B.; Letourneur, D. Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia in rabbit iliac artery in-stent restenosis model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 1604–1609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Berteau, O.; Mulloy, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* **2003**, *13*, 29–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Matou, S.; Helley, D.; Chabut, D.; Bros, A.; Fischer, A. Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro. *Thromb. Res.* **2002**, *106*, 213–221. [[CrossRef](#)]
11. Boisson-Vidal, C.; Zemani, F.; Calliguirri, G.; Galy-Fauroux, I.; Collic-Jouault, S.; Helley, D.; Fischer, A.-M.; Caligiuri, G.; Galy-Fauroux, I.; Collic-Jouault, S.; et al. Neoangiogenesis induced by progenitor endothelial cells: Effect of fucoidan from marine algae. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **2007**, *5*, 67–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Haddad, O.; Guyot, E.; Marinval, N.; Chevalier, F.; Maillard, L.; Gadi, L.; Laguillier-Morizot, C.; Oudar, O.; Sutton, A.; Charnaux, N.; et al. Heparanase and Syndecan-4 Are Involved in Low Molecular Weight Fucoidan-Induced Angiogenesis. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 6588–6608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Purnama, A.; Aid-launais, R.; Haddad, O.; Maire, M.; Letourneur, D.; le Visage, C. Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2013**, *2*, 187–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

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

33. Chen, M.C.; Hsu, W.L.; Hwang, P.A.; Chou, T.C. Low Molecular Weight Fucoidan Inhibits Tumor Angiogenesis through Downregulation of HIF-1/VEGF Signaling under Hypoxia. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 4436–4451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cho, Y.; Cho, E.J.; Lee, J.H.; Yu, S.J.; Kim, Y.J.; Kim, C.Y.; Yoon, J.H. Fucoidan-induced ID-1 suppression inhibits the in vitro and in vivo invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 607–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Teng, H.; Yang, Y.; Wei, H.; Liu, Z.; 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/>).



Fucoidan/VEGF-based surface modification of decellularized pulmonary heart valve improves the antithrombotic and re-endothelialization potential of bioprostheses

N. Marival^a, M. Morenc^{b, c}, M.N. Labour^a, A. Samotus^b, A. Mzyk^e, V. Ollivier^a,
M. Maire^a, K. Jesse^b, K. Bassand^a, A. Niemiec-Cyganek^b, O. Haddad^a, M.P. Jacob^a,
F. Chaubet^a, N. Charnaux^{a, d}, P. Wilczek^{b, 1}, H. Hlawaty^{a, *, 1}

^a Laboratory for Vascular and Translational Science, INSERM U1148, Université Paris XIII, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^b Laboratory of Bioengineering, Foundation for Cardiac Surgery Development, Zabrze, Poland

^c University of Silesia, Katowice, Poland

^d Laboratoire de Biochimie, Hôpital Jean Verdier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bondy, France

^e Institute of Metallurgy and Materials Science of Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 April 2017

Received in revised form

29 January 2018

Accepted 29 January 2018

Available online 16 March 2018

Keywords:

Fucoidan

VEGF

Polyelectrolyte multilayer film

Re-endothelialization

Antithrombotic

Heart valve tissue-engineering

ABSTRACT

Decellularized porcine heart valves offer promising potential as biocompatible prostheses. However, this procedure alter matrix fibres and glycans, leading to lower biomechanical resistance and increased their thrombotic potential. Therefore, their durability is limited due to calcification and weak regeneration *in vivo*. Surface modifications are highly requested to improve the scaffolds re-endothelialization required to restore functional and haemocompatible heart valve. Fucoidan, a natural sulphated polysaccharide, carries antithrombotic and anti-inflammatory properties and is known to enhance endothelial adhesion and proliferation when associated with vascular endothelial growth factor (VEGF). Based on these features, we constructed fucoidan/VEGF polyelectrolyte multilayer film (PEM) coated valve scaffold in an attempt to develop functional heart valve bioprosthesis. We investigated the haemocompatibility of the PEM coated valve scaffolds, the adhesion and growth potential of endothelial cells (HUVECs) in flow, as well as long term culture with stem cells. Fucoidan/VEGF PEM coated scaffolds demonstrated antithrombotic and non-calcifying properties. The PEM application increased HUVECs adhesion in flow (6 h) and HUVECs viability over time (72 h). HUVECs were well spread and aligned in flow direction. Interestingly, stem cells infiltration was improved by the PEM coating at 21 days. Thus, the fucoidan/VEGF PEM is a promising surface modification to obtain valve bioprostheses for clinical applications with increased antithrombotic and re-endothelialization potential.

© 2018 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Disruption of heart valve function results in a reduction in quality of life for patients; furthermore, catastrophic failure of a valve ultimately results in death. Currently, patients who demonstrate heart valve failure are managed by surgical intervention, which involves replacing the failing valve with a prosthesis. In

* Corresponding author. Inserm U1148, LVTS Bio-ingénierie Cardiovasculaire, Groupe Biothérapies et Glycoconjugués, UFR SMBH, Université Paris XIII, Sorbonne Paris Cité, 74 rue Marcel Cachin, 93017, Bobigny Cedex, France.

E-mail address: hania.hlawaty@inserm.fr (H. Hlawaty).

¹ Contributed equally to this work.

2050, approximately 800,000 patients per year are estimated to require valve surgery worldwide [1]. The choice of prosthesis falls broadly into two categories: mechanical and biological. The life span of existing replacement mechanical valves is approximately 30 years [2]. However, the use of mechanical valves is associated with a high risk of thrombosis and therefore requires long-term anticoagulant therapy. This treatment has a severe side effect, as it promotes the occurrence of haemorrhage [3]. Mechanical valves are also prone to infections (prosthetic valve endocarditis) and failure or separation of valve elements [4]. Conversely, biological valves do not require anticoagulant therapy but suffer from a process of calcification and deterioration, decreasing their life span to approximately 15 years [2,5]. The short life span of the biological

valve leads to increased morbidity due to repeated surgical interventions. In many patients, the structural degeneration of the bioprosthesis starts approximately 5 years after implantation and progresses rapidly, particularly in paediatric patients for whom calcification and accelerated degeneration require early reoperation [6].

Currently used heart valves prostheses - mechanical and biological - do not have growth and remodelling capability, except for pulmonary autografts [4]. Tissue-engineered heart valve (TEHV) represents an alternative to actual therapies. TEHV strategies using decellularized valve are emerging in the quest for developing living, adaptive heart valve prostheses that can last a lifetime. One of the principal TEHV concepts is proper modification of the valve scaffold with biochemical factors to restore the natural function and microenvironment of the defective tissue or organ [5]. TEHV should be biocompatible with remodelling and growth abilities and should offer the same anticoagulant and haemodynamic properties as a native heart valve [7]. In this context, TEHV methods are designed to obtain a valve scaffold that can be repopulated with autologous cells either seeded *ex vivo* [8,9] or recruited *in vivo* [10,11]. The concept of modifying the valve scaffold surface in such a way that allow for cell adhesion *in vivo*, seems very attractive.

During the decellularization process, highly thrombogenic collagen structures are exposed [12], which may result in platelet adhesion and activation. One strategy for limiting platelet activation is to cover the scaffold with a monolayer of endothelial cells, which provide natural antithrombotic and anti-inflammatory protection. Nevertheless, endothelial cell growth can be limited by damages to the extracellular matrix that occur, resulting in cell adhesion decrease [13,14]. These changes may be particularly important in the cases of heart valves or vascular grafts, due to lack of endothelial cell ingrowths, even after years of implantation [15]. In addition, several studies indicated the problem of low biocompatibility, weak mechanical properties and insufficient recellularization capacity of decellularized xenogenic bioprosthesis [16–19].

To overcome these issues, TEHV surface modification strategies proposed the use of sulphated polysaccharides, such as heparin as cells carrier to promote repopulation [20]. Polyelectrolyte multilayer films (PEM) applied on the scaffolds surface are thought to improve cell adhesion and proliferation. The PEM based on heparin and vascular endothelial growth factor (VEGF) enhanced valve scaffold biocompatibility by increasing the adhesive and proliferative properties of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) on the surface [21]. In contrast, immune thrombocytopenia is a major limitation in the use of heparin for TEHV. For this reason, alternatives are sought; one of them is the application of marine polysaccharides such as fucoidan, which has antithrombotic and anticoagulant properties comparable to heparin but with lower haemorrhagic effects [22–25]. *In vitro*, fucoidan increases the adhesion, proliferation and spreading of endothelial cells [26]. Advances in the understanding of fucoidan as an anticoagulant and negatively charged component of the PEM have been achieved through previous studies [27,28]. Due to its polyanionic feature, fucoidan should maintain its adhesion to collagen and improve coverage of the valve scaffold. These results encouraged us to explore the concept that fucoidan could be used to re-endothelialize the decellularized scaffold and reduce the risk of thrombosis [29]. In addition, we elected to use VEGF, an agent known to promote endothelial proliferation and adhesion [30]. Fucoidan has a high affinity to VEGF ($K_D = 1.9 \times 10^{-10}$ M) [31]. Both have been used in bioengineering applications to develop porous scaffolds capable of promoting neovascularization in the context of subcutaneous implantation in mice [32]. The concept of a multilayer approach was selected to combine the properties of both

fucoidan and VEGF.

The aim of the present study is to demonstrate the proof-of-concept that the surface modification of valve scaffold by the application of fucoidan/VEGF PEM prevents thrombogenicity and calcification and improves re-endothelialization [33,34]. We assumed that the degradation of the PEM should occur by the continuous release of fucoidan and VEGF to induce progressive replacement by endothelial cells. In our study, we used scaffolds obtained from decellularized porcine pulmonary valves. We evidenced the influence of the fucoidan/VEGF-based PEM on biomechanics, thrombogenicity and calcification potential of the scaffolds and the behavior of HUVECs seeded on their surface in static and flow condition. Finally, the study opens a perspective on the repopulation potential by human stem cells in long term.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The fucoidan ($M_n = 26,600$, $M_w = 27,400$, $I_p = 1.0$) was prepared as previously described (Supplementary material 1) [31]. Heparin (tinzaparin sodium, $M_w = 6300$ g/mol) was obtained from Innohep (Ballerup, Denmark). Haematoxylin was purchased from Dako (Glostrup, Denmark); Eosine from POCH (Gliwice, Poland); Masson's Trichrome, Alcian blue and Verhoeff van Gieson were purchased from Bio-Optica (Milan, Italy); Alizarin red was purchased from Merck Millipore (Darmstadt, Germany); Azure A was furnished by Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). The primary antibodies, directed against CD45 (HI30, mouse IgG1 κ conjugated to PerCP or FITC), CD61 (VI-PL2, mouse IgG1 κ , conjugated to FITC) and CD62P (AK4, mouse IgG1 κ , conjugated to PE), were designed by BioLegend (San Diego, CA, USA). The primary antibodies directed against VEGF (ab46154, Abcam, Cambridge, UK), α -SMA (M0851, clone 1A4, Dako), CD31 (M-20, Santa Cruz, Dallas, TX, USA) and CD90 (555596, BD Biosciences, Bedford, MA, USA) and revealed by a secondary antibody coupled with 3, 3'-diaminobenzidine cleaved by horseradish peroxidase (EnVision Detection system, Rabbit/Mouse, Dako). Human recombinant VEGF was purchased from BD Biosciences (354107), fibrillar collagen I from Horm (Takeda, Linz, Austria), non-fibrillar collagen I from Corning (New York, NY, USA), Collagen I, from Millipore (Human Placenta, 234149, Billerica, MA, USA) and human fibronectin from Sigma (F2006).

2.2. Heart valve decellularization

2.2.1. Collection and decellularization

Fresh porcine hearts were collected and prepared as previously described [35]. For decellularization, the valves were incubated 48 h with trypsin/EDTA (porcine trypsin 1×0.5 g/L and EDTA 0.2 g/L) at 37 °C. Once digestion had proceeded to the desired level, the valves, considered as scaffolds, were placed for 30 min at room temperature in Ringer's solution containing detergent (SDS 0.5%). Three successive washing steps were necessary to remove the detergent and cell wastes. Each step of the decellularization procedure was prepared under a shaking condition. Valve scaffolds were stored in an antibiotic bath at 4 °C and used within a week.

2.2.2. Coating of the valve scaffold with a fucoidan/VEGF polyelectrolyte multilayer film (PEM)

The following protocol was based on previous reports describing some type of thin PEM coatings [36]. Scaffolds were punched to form circular samples of 15.5 cm diameter and placed in a 24-well plate. The coating was obtained by the application of three bilayers of fucoidan/VEGF to generate a PEM. Fucoidan and VEGF were diluted separately in saline buffer (PBS, pH = 7.4). The solution of

fucoidan (100 µg/mL) was applied manually as the first layer on the surface of the scaffold and incubated for 15 min at 37 °C. The surface-unbound fucoidan was then removed by rinsing three times for 5 min with saline buffer. The solution containing VEGF (0.1 µg/mL) was applied to obtain the second layer and incubated for 15 min at 37 °C. The free VEGF was then removed by rinsing three times with saline buffer. Each step to generate a bilayer of fucoidan/VEGF was repeated 3 times. VEGF constituted the outermost layer (Supplementary Fig. 1). The coating were performed in 24 wells-plate on valve scaffold fragments for static culture. For the whole valve, the scaffolds were installed in the bioreactors. The coating procedure was realized under spinning rotation (1 rpm) to obtain an optimal surface covering.

2.3. Characterization of scaffold surface modification by fucoidan/VEGF PEM

2.3.1. Topological and histological characterization of valve scaffolds

For surface morphology and topology analysis, the heart valve scaffolds were fixed in 2.5% glutaraldehyde for 20 min. The samples were observed using environmental scanning electron microscope (Phillips XL30 ESEM-FEG) at an accelerating voltage of 15 kV. For histology, valve samples were fixed in 4% formalin solution and embedded in paraffin. Tissue cross sections (5 µm) were obtained with a microtome (Leica RM 2125RT, Wetzlar, Germany). After histological staining, observations were performed under an optical microscope (Axio Vert A1, Zeiss Oberkochen, Germany) and photographed (Canon EOS 5D Mark II, Tokyo, Japan). Samples coated with PEM containing fluorescent fucoidan were preserved in freezing medium (Polysciences, Warrington, PA, USA) at –20 °C. Samples were cut using a cryostat (Tissue–Tek Cryo3, Sakura, Leiden, Netherlands) and observed under a fluorescent microscope (Axio Observer, Zeiss). Adsorbed VEGF on the scaffold was revealed by the use of primary and secondary antibodies and observed under optical microscopy.

2.3.2. In vitro measurement of fucoidan interaction with collagen

A 96-well plate was coated with non-fibrillar collagen I (50 µg/mL). Fluorescent fucoidan (100 µg/mL) was used and deposited onto the collagen-coated wells as described for the PEM, then generously rinsed with PBS. The intensity of fluorescence was measured by fluorimetry (Tecan, Männedorf, Switzerland). The fluorescence intensity of fucoidan in coated wells (I_{coated}) was compared to the intensity of the initial concentration of fucoidan in solution (I_{control}) to calculate the amount of fucoidan (µg) adsorbed per cm² by collagen ($F_{\text{adsorbed}} = I_{\text{coated}}/I_{\text{control}}$).

2.3.3. Analysis of the stability of the fucoidan coating

In order to determine fucoidan release from PEM, decellularized heart valves coated with 3 bilayers of fucoidan/VEGF were incubated in culture medium with the absence of VEGF and heparin. Samples for histology were taken after 0 h (control), 24 h, 48 h and 72 h of incubation. Images of representative regions were acquired in the same microscope settings and light conditions and saved as Tagged Image File Format (tiff). From each image an artefact free, representative, 200 × 200 pixel region was manually selected by the researcher. G. Landini's Color deconvolution plugin for ImageJ implementing color deconvolution method [37] for stain separation was used for both vector calibration and alcian blue stain optical density assessment. The vector determination was done with slides stained with only one dye (alcian blue or counterstain). Alcian blue images generated by the plugin were inverted so that higher pixel values corresponded with greater stain optical density. An average pixel values of alcian blue images were recorded and

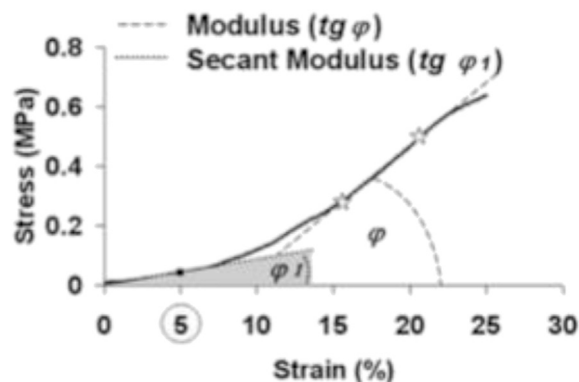
samples were classified.

2.3.4. Release of VEGF in supernatant

In order to determine VEGF release from PEM, the coated scaffolds were incubated in EGM-2 in absence of VEGF and heparin. The adsorption of VEGF contained in culture medium on the uncoated scaffold was evaluated by comparing the concentration of VEGF in basal medium incubated alone or with the uncoated samples. The supernatants were collected every 24 h at determined time points (24 h, 48 h and 72 h) and stored in –20 °C until test performance. The concentration of released VEGF was measured using commercial ELISA kits (Human VEGF Quantikine ELISA Kit R&D system, USA) according to the manufacturer's recommendations and read with a microplate absorbance reader (Dynex Technologies MRX, USA).

2.4. Biomechanics

Biomechanical tests were performed with a universal testing machine (Tytron 250 Microforce Testing System MTS, MTS Systems Corporation, Eden Prairie, MN, US) with a 250 N force transducer. The percent strain was measured with a video extensometer (Video Extensometer NG version 5.15.5.0 Messphysik equipped with the Blue FOX camera with the resolution of 5 megapixel). Before each test the video extensometer was calibrated according to the manufacturer's instructions. Samples were cut to achieve 1:5 width-to-length ratio. The thickness of the samples was measured with the thickness gauge and width was measured with caliper. The thickness and width were used as an input data, to automatically calculate the area of the sample. Two black and white targets for the video extensometer were placed on the sample. Prior to any test, the sample was preloaded to 0.25 N and 0.05 N for conduits and leaflets respectively. For the uniaxial tensile test the sample was stretched at a constant speed of 10 mm/min until failure. The data from the displacement and force sensor was recorded online on the personal computer. The strain was calculated from the initial length of the sample and its extension.



Description of the elastic moduli determination from the stress-strain curve. The modulus is calculated as tangent ϕ and the Secant modulus as $\text{tg} \phi_1$, which were measured in this case at the 5% strain point.

Elastic moduli was obtained from the slope of the initial linear section of the stress–strain curve ($\text{tg} \phi$) and was calculated according to the formula:

$$E = \frac{\text{tensile stress}}{\text{tensile strain}} = \frac{\sigma}{\epsilon} = \frac{F/A_0}{\Delta L/L_0} = \frac{FL_0}{A_0 \Delta L}$$

E is the Young's modulus (modulus of elasticity), F is the force

exerted on an object under tension, A_0 is the original cross-sectional area through which the force is applied, ΔL is the amount by which the length of the object changes, L_0 is the original length of the object after preload. Energy to peak was defined as the energy that had to be delivered to the sample to reach the maximum stress. The strain at peak was defined by the strain of the sample at the maximum stress. To test the viscoelastic response the stress-relaxation test was performed (hysteresis). Sample was loaded at constant speed of 10 mm/min, held for 60 s with constant strain and unloaded at the same speed. The value of energy in the loading and unloading phase was recorded and the percentage of energy dissipated between the loading and unloading phase was calculated according to the formula:

$$\%E = \frac{\Delta E}{E_{\text{loading}}} = \frac{E_{\text{loading}} - E_{\text{unloading}}}{E_{\text{loading}}}$$

$\%E$ is the percentage of the energy dissipated, E_{loading} is the energy of the loading phase and $E_{\text{unloading}}$ is the energy in the unloading phase. All the biomechanical parameters were tested in the longitudinal and circumferential direction. The acquisition and analysis of the tested parameter was performed with the use of TestWorks software (MTS Systems Corporation, Eden Prairie, MN, USA).

2.5. Thrombosis assays

2.5.1. Flow condition (ex vivo)

Human whole blood was collected at the Regional Blood Donation and Transfusion Center (Katowice, Poland). Native, uncoated and PEM coated whole valves were installed in the bioreactor in a closed-loop system (FKR, Zabrze, Poland). Flow through the valve lumen was generated during 15 min using a peristaltic pump (Ismatec, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Germany) at a rate of 40 mL/min. Blood aliquots were sampled before and after flow and analysed by flow cytometry (Cytomics FC 500 MPL Beckman Coulter). The expression of CD45 (leukocytes), CD61 (platelets) and CD62P (activated platelets) was quantified. In addition, the adhesion and aggregation of platelets and leukocytes on valve fragments dissected after flow and stained with CD45 and CD62P antibodies were observed under fluorescence microscopy (Axio Observer, Zeiss). The intensity of the staining was quantified by analysis software (ImageJ, Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2016).

2.5.2. Preparation of PRP and PFP from fresh human whole blood

Human whole blood was obtained from healthy volunteers exempt of medication for at least 10 days, after full informed consent was obtained, according to the Declaration of Helsinki. Blood was collected via venipuncture into siliconized Vacutainer™ tubes (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) containing buffered sodium citrate (0.129 M), with the first tube being discarded. Whole blood was centrifuged at 120 g for 15 min at room temperature to prepare platelet-rich plasma (PRP). Platelet counts in PRP were adjusted to the desired concentration by dilution with autologous platelet-free plasma (PFP). PFP was prepared by centrifugation of the blood at 2000 g for 15 min followed by 13,000 g centrifugation for 2 min to remove any remaining platelets.

2.5.3. Fucoidan activity on platelet aggregation and thrombin generation

Fibrillar collagen-I was used at a concentration of 1–5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in suspension. Fucoidan and heparin, as a positive control of platelets and thrombin inactivation, were used at a concentration of 1, 10 or

50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in suspension. Platelet aggregation was studied in PRP by light transmittance aggregometry as previously reported [38] after induction by collagen in the presence or absence of fucoidan and heparin. Thrombin generation was measured in freshly prepared PRP (1.5×10^8 platelets/mL) and PFP by means of the calibrated automated thrombogram (CAT) method (Thrombinoscope BV, Maastricht, Netherlands) [39]. Measurements were conducted with 80 μL of PRP or PFP in a total volume of 120 μL . Thrombin generation was performed in the absence of tissue factor. Samples spiked with 20 μL of thrombin calibrator (Diagnostica Stago, Asnières, France) were run in parallel with each cycle of the test sample. Thrombin generation was triggered by addition of 20 μL of FluCa (2.5 mM fluorogenic substrate Z-Gly-Gly-Arg-AMC, 87 mM calcium chloride). Fluorescence was quantified in a Fluoroskan Ascent reader (Thermo Labsystems) equipped with a 390/460 nm filter set, and thrombin generation curves were calculated using thrombinoscope software. The thrombin generation test was performed in the absence or presence of non-fibrillar collagen-I (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in suspension. Fucoidan was directly added to PRP and PFP immediately before starting thrombin generation. The velocity index (nM/min) was calculated as the following ratio: Peak/(time to Peak-LagTime); LagTime (LT) is related to the initiation phase of coagulation, and time to Peak (ttPeak) and Peak represent the amplification phase of coagulation.

2.6. Calcification assay

Twelve valve scaffolds (6 leaflets and 6 conduit fragments) from 6 individual animals were studied for each condition (native, uncoated and PEM coated). Glutaraldehyde-fixed (GA) scaffolds were used as positive control. Uncoated scaffold incubated in saline solution were used as negative control. Each sample was divided into 2 pieces. One piece was used as a control, while the other was placed in flacon filled with calcifying solution (0.065 g of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 0.079 g of $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.28 g CaCl_2 , 0.30 g of KCl, 8.19 g of NaCl, 1 g of NaN_3 and 5 g of albumin in 1 L of deionized water) using 5 mL for leaflets and 10 mL for conduits. The induction of calcification was achieved over 21 days of incubation at 37 °C. After this period, histological staining (Alizarin Red S) and observations were performed under an optical microscope. Samples were scored based on a scale of tissue calcification.

2.7. Cell seeding on scaffold and analysis

2.7.1. Cell culture

HUVECs (C2517A, Lonza, MD, USA) were cultured in complete medium containing 2% FBS without heparin (Lonza EGM-2, FBS 2%, hydrocortisone 0.2 mL, hFGF 2 mL, VEGF 0.5 mL, R3-IGF 0.5 mL, hEGF 0.5 mL, ascorbic acid 0.5 mL GA-1000 (gentamicin, amphotericin-B), Walkerville, MD, USA). Adipocytes-Derived Stem Cells (ADSCs, PT-5006, Lonza) were cultured in high glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4.5 g/mL glucose). Valve scaffolds were pre-incubated 24 h in culture medium at 37 °C. HUVECs (passage 3–6) were seeded at 0.1×10^6 cells/mL for the complete valve scaffold in bioreactor. For the flow condition, the seeding procedure was performed on complete valve scaffolds installed in bioreactors under rotation (3 rpm). The bioreactors were then directly connected to closed-loop system (Fig. 1) filled with culture medium (200 mL). Complete valve scaffolds were subjected to flow (40 mL/min) for 6 h and incubated at 37 °C. For the static condition, 1.5×10^5 cells resuspended in 200 μL of medium were seeded on valve scaffold fragments and incubated in 24-wells plates. After 1 h of incubation, 1 mL of culture medium was added to each well. The fragments were moved to larger chambers (12-well plates) after 6 h of incubation while maintaining their

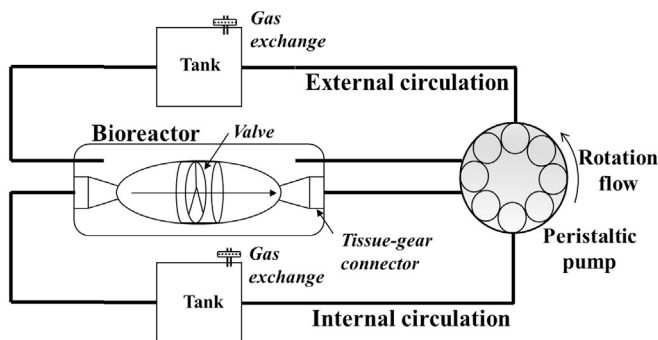


Fig. 1. Schema of Bioreactor closed-loop system. Whole valves scaffolds are sewed to tissue-gear connectors and submitted to flow generated by peristaltic pump.

medium complemented with 3 mL of fresh medium. HUVECs were cultured up to 72 h. ADSCs were cultured for 21 days.

2.7.2. Cell adhesion and viability

Endothelial cell adhesion was measured during the first 6 h of incubation after cell seeding. The viability of seeded HUVECs on valve scaffolds uncoated or coated with the PEM was measured after 6, 24, 48 and 72 h of incubation in static conditions and 6 h in flow conditions. The HUVECs viability was assessed by a living/dead assay. Samples were fixed in 4% formalin then, incubated with fluorescein diacetate for 15 min (1 mg/mL) and 2 min with propidium iodide (1 mg/mL). The staining was directly observed under fluorescent microscopy (Axio Observer Z1, Zeiss). Cells were photographed and counted by software analysis (ImageJ).

2.7.3. Endothelial secretome

Supernatant from HUVEC cultured on the scaffold surface was collected every 24, 48 and 72 h and stored at -20°C . The expression of 12 secreted proteins (VEGF, FGF, PDGF, MMP-1, MMP-2, MMP-9, RANTES/CCL5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , INF- γ) was performed with custom Luminex kit (LXASHM, R&D, Minneapolis, MN, USA). Each magnetic fluorescent microbead from the kit were designed to contain all the antibodies directed against every analyte. The analysis of fluorescent signals was realized on the Bio-plex platform (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The expression of TIMP-1, TIMP-2 and TGF- β were measured by ELISA assays (Duoset, R&D).

2.7.4. HUVECs adhesion strength under physiological shear stress

Silicon wafers (45.3 cm^2 , ITME, Warsaw) were treated with piranha solution, washed by deionized water, then pre-coated with human Collagen I (Collagen Type I, Human Placenta, 234149, Millipore, Billerica, USA) at $1.75\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and incubated at room temperature overnight. The collagen-coated discs were dried and covered or not with the PEMs fucoidan/VEGF in the same described conditions, then incubated 1 h with endothelial cell culture medium. HUVECs were seeded at a density of 35,000 cells per cm^2 and incubated overnight allowing spreading and optimal cell interaction and confluence. The next day, the cell confluence was evaluated at 90–100%. Endothelialized-wafers were installed and sealed in the radial flow chamber (Laboratory IMMS PAS, Krakow, Poland). The system was mounted as described elsewhere [40] and filled with PBS as the circulating liquid (Fig. 2).

The flow was generated for 20 min by peristaltic pump (Pump Drive 5001, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Germany) and maintained under shear stress in range of 0.1–90 Pa according to the Eq. (1):

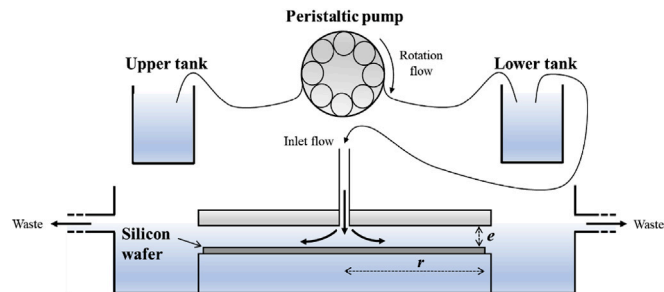


Fig. 2. Side view of the radial flow chamber system mounted system inspired from Décavé et al.

$$\sigma = \frac{3D\eta}{\pi re^2} \quad (1)$$

where σ (Pa) is the shear stress, D (mL/min) is the debit, η (mPa.s) is the dynamic viscosity, r (mm) is the radius of the plate and e (mm) the bottom-up distance allowing the liquid to flow on the plate. HUVECs were stained with vital dye (MitoTracker™ Red FM, Thermo Fisher Scientific) and visualized before flow assay under confocal laser scanning microscopy (LSM 5 Exciter, Zeiss, Germany). The silicon plate was scanned horizontally and vertically by a series of 64 pictures (objective $\times 5$) covering the whole diameter of the disc in two directions. After flow, HUVECs were fixed in 1% formalin and cell detachment was analysed and quantified by AxioVision Rel.4.8 software. The HUVECs detachment efficiency was calculated similar to the Décavé et al. computations. Cell morphology was assessed by staining the F-actin with fluorescent phalloidin (AlexaFluor® 488Phalloidin, Thermo Fisher Scientific). The experiment was performed in 3 replicates for each type of coating.

2.7.5. Stem cells culture and differentiation in long term

ADSCs localization and differentiation cultivated onto PEMs coated and uncoated scaffolds were assessed in parallel. The valve scaffolds were fixed in 4% formalin and dissected in two groups. The first group was stained with the couple phalloidin/Dapi to analyse the cell F-actin cytoskeleton and morphology. The surface and depth of each scaffold was analysed and photographed by using confocal microscopy (Zeiss LSM 510, Objectif $\times 40$). The pictures were taken in stacks. The Z projections in X and Y axes was assessed with ImageJ software to represent the cell infiltration trough the scaffold. Digital-slides of cross sections were acquired and analysed with a NanoZoomer® (Hamamatsu, Japan). NDP software (Hamamatsu, Japan) was used to compare results.

2.8. Statistical analysis

At least six donors were required for each condition of treatment for each *ex vivo* experiment to evaluate statistical significance depending on the samples population diversity. *In vitro* experiments were repeated at least 3 times. For the determination of statistical significance, an ANOVA/ANCOVA 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 for statistical significance.

3. Results

3.1. Characterization of TEHV with fucoidan/VEGF PEM coating

The decellularization efficiency and the microstructure of the

heart valves (leaflet and conduit) after decellularization treatment were analysed by histology. Native pulmonary valve and decellularized leaflets staining displayed a tri-laminar structure and characteristic elastin arrangement (Fig. 3A). Haematoxylin and eosin coloration revealed no evidence of cell nuclei in the decellularized scaffold confirming the absence of cells (Fig. 3B). The decellularization procedure decreased the content of glycosaminoglycans in every lamina (Fig. 3C). However, this method of decellularization did not alter the organization of the collagen and elastin fibres (Fig. 3D, A). Comparative observations were obtained on conduits with the same treatment (Supplementary Fig. 2).

After decellularization, the fucoidan/VEGF PEM deposition was performed on leaflets and conduits scaffolds and the interaction of the polyelectrolytes with the tissue-engineered heart valve (TEHV) was characterized in terms of surface morphology and stability. Environmental scanning electron microscopy (SEM) images showed the collagen structures at the surface of the scaffolds (Fig. 4A). The uncoated decellularized valve scaffolds displays a rough surface revealing microcavities throughout the luminal layer of decellularized scaffolds. After fucoidan/VEGF PEM coating, the surface appears smoother than the uncoated scaffold confirming the deposition of a coating at the TEHV surface. The valve scaffold hydration was then compared to native tissue. The decellularization significantly reduced the dry mass for the valve scaffold ($2.83 \pm 0.56 \mu\text{g}$) compared to native tissue ($13.0 \pm 2.67 \mu\text{g}$). In contrast, decellularized scaffolds presented a slightly higher water content ($95.56 \pm 1.33 \text{ wt } \%$) than native tissues ($92.36 \pm 0.46 \text{ wt } \%$). After PEM treatment the water content was slightly increased ($96.86 \pm 0.42 \text{ wt } \%$) suggesting that the coating brought a modest increase in hydration to the valve scaffold. The same trend was observed with conduit scaffolds in comparable proportions (Supplementary Fig. 3D). To confirm the presence of the PEM coating, a fluorescent fucoidan was used for histological observation and quantification. The fluorescent fucoidan was detected at the surface of the coated valve scaffolds using fluorescence

microscopy after cryosection of the tissues. The pictures showed a gradient of intensity of fluorescence from the lumen-exposed surface toward the core (Fig. 4B), and a homogenous distribution along the surface. The fluorescence intensity observed with the PEM coating was significantly higher than the uncoated scaffold. The fucoidan staining is clearly associated with the matrix fibres suggesting that the fucoidan is adsorbed on the collagen fibres. This observation was supported by Alcian blue colorations presenting a thin layer of polysaccharide on the surface of leaflets and conduits (Supplementary Fig. 3C). To confirm the interaction of the fucoidan with collagen we performed an indirect *in vitro* adsorption assay to non-fibrillar collagen I (Supplementary Fig. 3A). Although the collagen I presented a slight autofluorescence, the fluorescence intensity on fucoidan-coated wells was significantly higher (<5 fold above autofluorescence) demonstrating the adsorption of fucoidan onto collagen I. Using the intensity of fluorescence measured at the collagen surface and the mean fluorescence intensity of the initial fucoidan solution, the quantity of fucoidan bound to collagen I was evaluated at an approximate concentration of $9.95 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. In addition, the PEM stability in culture medium was evaluated in histological cross sections to estimate the polysaccharides content resulting from fucoidan adsorption. The optical density significantly decreased overtime from 100% at 0 h to $58.0 \pm 10.7\%$ at 24 h, $48.2 \pm 18.0\%$ at 48 h and $24.4 \pm 7.8\%$ at 72 h. This suggests that the quantity of fucoidan adsorbed on the scaffold is decreasing and therefore, the PEM coating would be progressively degraded (Fig. 4C).

In parallel, VEGF was observed by immunostaining on scaffolds cross-sections. The staining was detected on the whole depth of the coated scaffolds in contrast to uncoated ones where no staining was revealed (Fig. 4D). This result demonstrated the adsorption and penetration of VEGF through the coated scaffold. The *in vitro* release kinetics of VEGF was quantified in culture medium at 37°C for up to 72 h (Fig. 4E). The figure shows the release profile from scaffolds covered with one monolayer of VEGF (1 M), one bilayer of fucoidan/

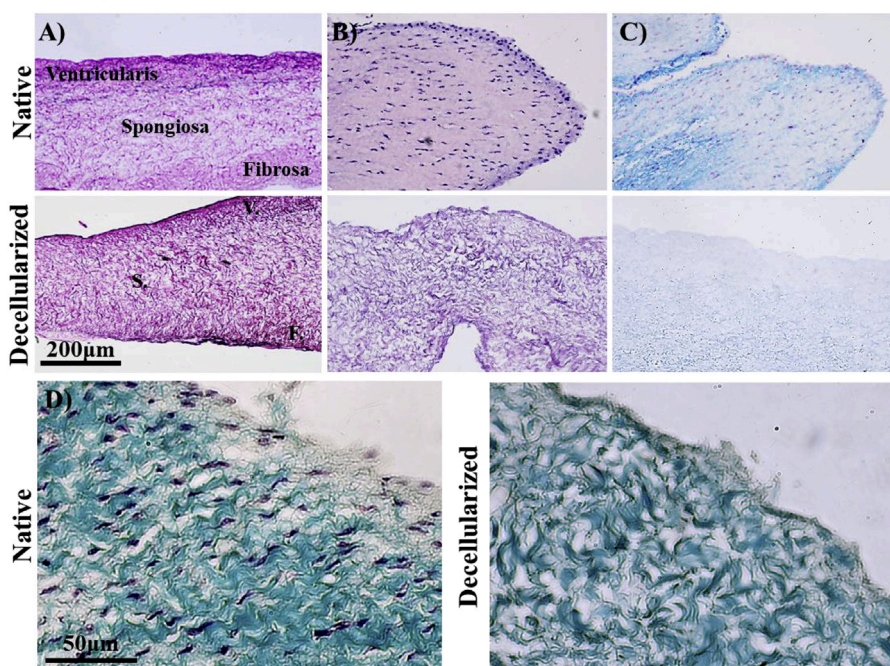


Fig. 3. Decellularization of porcine pulmonary valves. Cross sections of native and decellularized porcine leaflets were evidenced with histological staining. A) Verhoeff van Gieson: purple-elastin evidenced the tri-laminar structure (Fibrosa, Spongiosa, Ventricularis); B) Hematoxylin and Eosin: pink-connective tissue, purple-nuclei; C) Alcian blue: blue-glycosaminoglycans; D) Masson's Trichrome: green-collagen fibres at high magnification. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

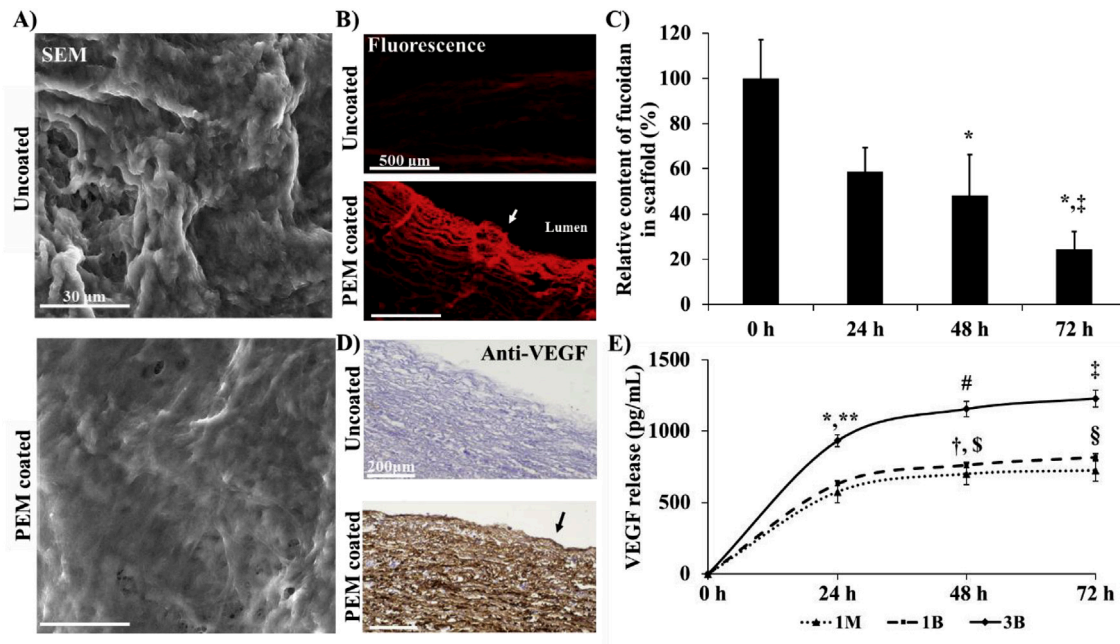


Fig. 4. Characterization of the fucoidan/VEGF PEM. A) Surface analysis of uncoated and PEM coated valve scaffold under SEM. B) Scaffolds cryosections uncoated or coated with PEM containing fluorescent-fucoidan and VEGF were observed under fluorescence microscopy. Uncoated decellularized leaflet represents autofluorescence. The arrow shows the fluorescent fucoidan. C) Relative content of fucoidan adsorbed on scaffold. Alcian blue staining intensity was quantified in luminal layer after incubation of samples in culture medium for 0, 24, 48 and 72 h. The results are expressed in percentage. $n = 6$, $*p \leq 0.006$ 0 h vs. 48 h and 72 h, $\#p \leq 0.02$ 24 h vs. 72 h. D) VEGF immunostaining (anti-VEGF) on uncoated and PEM coated scaffolds. The arrow shows the stained VEGF. E) VEGF release from scaffolds in culture medium quantified by ELISA at 24, 48 and 72 h (1 M = one monolayer of VEGF; 1B = one bilayer of fucoidan/VEGF; 3B = three bilayers of fucoidan/VEGF). The results are presented in pg/mL. $n = 6$, $*p \leq 0.0001$ 3B vs. 1M, $**p \leq 0.0001$ 3B vs. 1B, $\dagger p \leq 0.001$ 1M 48 h vs. 1M 24 h, $\$ p \leq 0.001$ 1B 48 h vs. 1B 24 h, $\#p \leq 0.001$ 3B 48 h vs. 3B 24 h, $\S p \leq 0.001$ 1B 72 h vs. 1B 48 h, $\ddagger p \leq 0.001$ 3B 72 h vs. 3B 48 h. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

VEGF (1B) and three bilayers of fucoidan/VEGF (3B). An initial important release of VEGF from the coated scaffolds was observed within 24 h with a higher amount for the 3B coated leaflets (574.5 ± 77.9 pg/mL for 1M, 631.9 ± 16.2 pg/mL for 1B and 932.2 ± 41.2 pg/mL for 3B). The VEGF release profile was accumulated over time and similar for 1M and 1B, while the 3B coating released considerably higher content of VEGF for every time point. VEGF release was increased slightly after 48 h and 72 h of incubation in all groups. The total amount of VEGF released during 72 h reached 724.7 ± 75.2 pg/mL for 1M, 818.6 ± 25.6 pg/mL for 1B and 1228.4 ± 59.7 pg/mL for 3B. Notably, higher proportion of VEGF was released after 24 h for the 1B and 3B coating (22.0% and 23.5%, respectively) unlike the 1M coating (9.0%). Leaflets appeared to release higher content of growth factors than conduits overtime (Supplementary Fig. 3B). All together, these data show that VEGF release is continuous and enhanced by layer-by-layer adsorption of fucoidan in a dose-dependent manner.

3.2. Biomechanical properties of TEHV

To analyse whether the decellularization and the PEM coating alter the mechanical properties of the valve leaflets and conduits, uniaxial tensile and hysteresis assays were performed. The uniaxial tensile assay was used to measure the stiffness by evaluating the resistance of the scaffolds until failure, while hysteresis assay recorded the elasticity features after elongation. Valve fragments were dissected longitudinally (parallel to blood flow) and circumferentially (perpendicular to blood flow) to analyse the mechanical properties in both directions.

The analysis of the uniaxial tensile stress performed in the longitudinal direction, showed a significant increase in the Young's modulus for uncoated scaffolds (3.79 ± 0.42 MPa) in contrast to

native leaflets (1.90 ± 0.18 MPa) (Fig. 5A–E). The application of the PEM coating on leaflets largely enhanced the modulus up to 17.90 ± 2.60 MPa. These data were supported by the peak stress analysis which followed the same profile (Fig. 5C), whereas no significant changes between all groups were recorded for the percent strain at peak and energy at failure (Fig. 5B,D). In the circumferential direction, the results showed that the Young's modulus of uncoated scaffolds (2.81 ± 0.75 MPa) was significantly lower than that of the native valve (19.65 ± 2.83 MPa). The PEM coating slightly increased the modulus value (5.20 ± 1.54 MPa for PEM coated) as for the peak stress following similar profile in this direction (Fig. 5A–E). Every time, the decellularization process decreased the percent strain at peak and energy at failure of valve scaffolds in comparison to native leaflets. However, the application of the PEM restored these values to similar level than native state by a significant increase.

In the hysteresis assay, no significant change in viscoelastic properties was found for leaflets in longitudinal direction in every group (Fig. 5F and G). In circumferential direction, the percent energy loss value was increased for uncoated and PEM coated scaffolds as compared to native. Taken together, the results showed that decellularization decreased the stiffness of heart valve scaffolds in both longitudinal and circumferential directions. Nevertheless, the modifications of the scaffolds evolved inversely in both directions. Surface modification of the scaffold by deposition of the PEM enhanced the modification of the stiffness induced by decellularization in longitudinal direction, although it tended to return to native state in the circumferential direction.

3.3. Calcification potential and haemocompatibility of TEHV

Calcification of the heart valve component is a major issue that

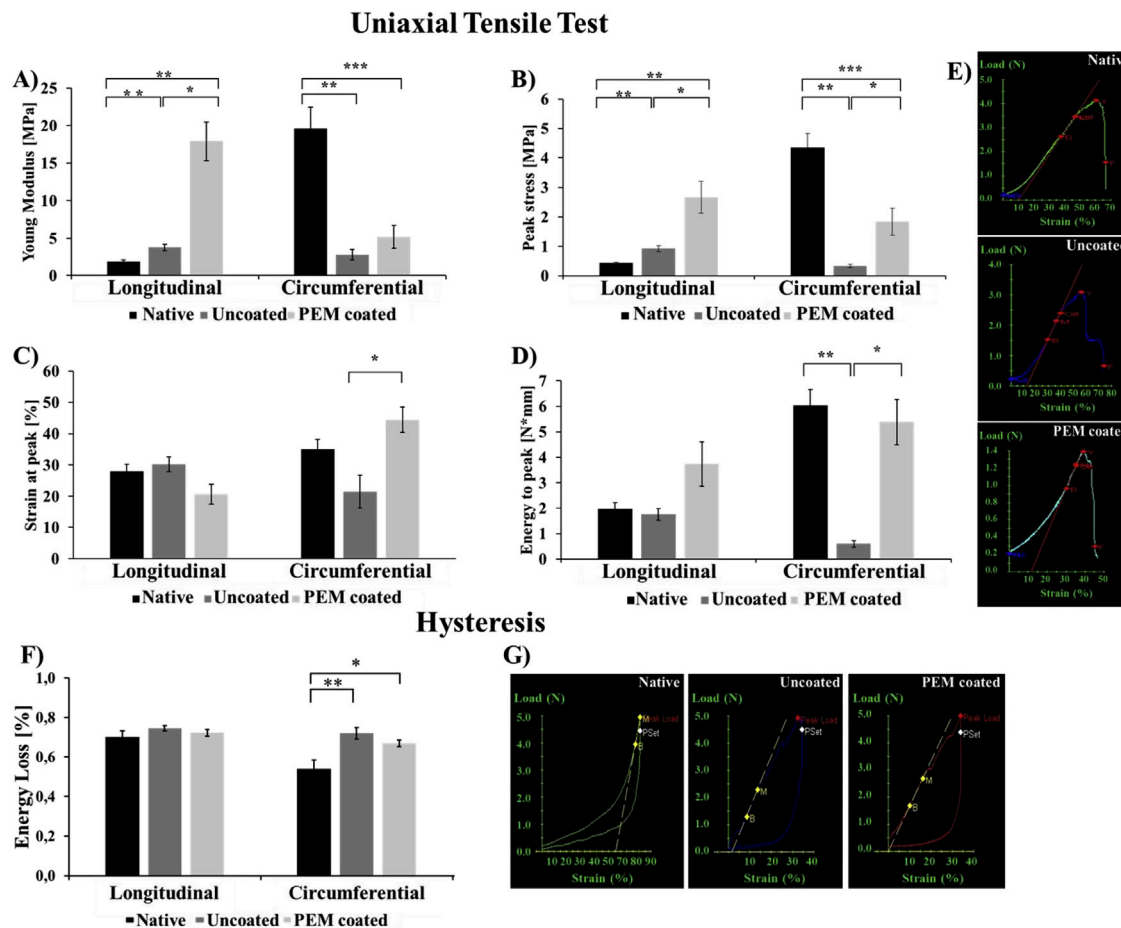


Fig. 5. Uniaxial tensile mechanical properties of valve leaflets A-E. A) The modulus (MPa), B) strain at peak (%), C) peak stress (MPa) and D) energy to peak (N*mm) were recorded for the native, uncoated and PEM coated scaffolds. E) Representative stress/strain curves are presented in lower panel. $n \geq 6$, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$. **Hysteresis properties of valve leaflets F-G.** The viscoelasticity of the samples (native, uncoated and PEM coated valve fragments) was measured in terms of hysteresis assay. F) The energy loss (%) was recorded and illustrates the elastic properties of the samples. G) Representative stress/strain curves are presented in lower panel.

TEHV strategies aim to overcome. Herein we evaluated the calcification potential of samples of heart valve scaffolds incubated in calcifying solution for 21 days. Glutaraldehyde fixed samples (GA) were used as positive control. Calcification was evaluated for each condition after alizarin red staining. Decellularized valve scaffolds showed a slight staining of calcification in comparison to GA for leaflets (Fig. 6A). The fucoidan/VEGF PEM coating did not significantly influenced the calcification of the decellularized valve scaffolds during the measured period.

In addition, the thrombogenicity and coagulation properties of the coated scaffolds were measured in *ex vivo* assays using whole valves cultured in contact with human blood under flow conditions. Native, decellularized uncoated and PEM coated whole valves were installed in bioreactors and incubated under flow with human whole blood. We measured platelet activation with P-selectin staining (CD62P), before and after flow. Flow cytometry analysis of the blood circulating in uncoated scaffold showed an increase in platelet activation (CD62P/CD61) after flow culture (Fig. 6B). However, with fucoidan/VEGF PEM scaffolds, platelet activation in blood was reduced in comparison to uncoated scaffolds and similar to that of native valve. These data were confirmed by microscopic observation of activated platelets adhesion level on the valve surface (Fig. 6C and D). The analysis of the fluorescence intensity revealed an increase of activated platelet adhesion on decellularized scaffolds, and this adhesion was sharply suppressed by the

application of the PEM. In parallel, we analysed the platelet–leukocyte aggregates (CD62P/CD45) by flow cytometry. The results showed an increase of aggregates formation in the decellularized valves relative to native controls (**Data not shown**). Similarly as platelets activation, on the PEM coated valves, aggregate generation was significantly reduced compared to uncoated samples.

In a second series of *in vitro* experiments, we analysed the potential of fucoidan in suspension to activate platelets or coagulation by measuring thrombin generation in platelet-rich-plasma (PRP) and platelet-free-plasma (PFP). We used fibrillar collagen I as a positive control and heparin as a negative control for thrombin activation. In the presence of collagen, thrombin generation was significantly increased (Peak = 143.96 nM in PRP and 38.35 nM in PFP) when compared to control (Peak = 121.03 nM in PRP and 33.72 nM in PFP), while in the presence of heparin, no thrombin generation occurred. Fucoidan inhibits thrombin generation in both PRP (Peak = 39.63 nM) and PFP (Peak = 18.26 nM) compared to controls without fucoidan (Supplementary Fig. 4A and B). The velocity index measured after fucoidan addition was dramatically reduced (3.10 nM/min in PRP and 3.54 nM/min in PFP) relative to the control (14.32 nM/min in PRP and 6.33 nM/min in PFP) and positive control with collagen (17.06 nM/min in PRP and 6.23 nM/min in PFP). We also measured the potential of fucoidan on platelet aggregation in PRP. The results showed that fibrillar collagen I in

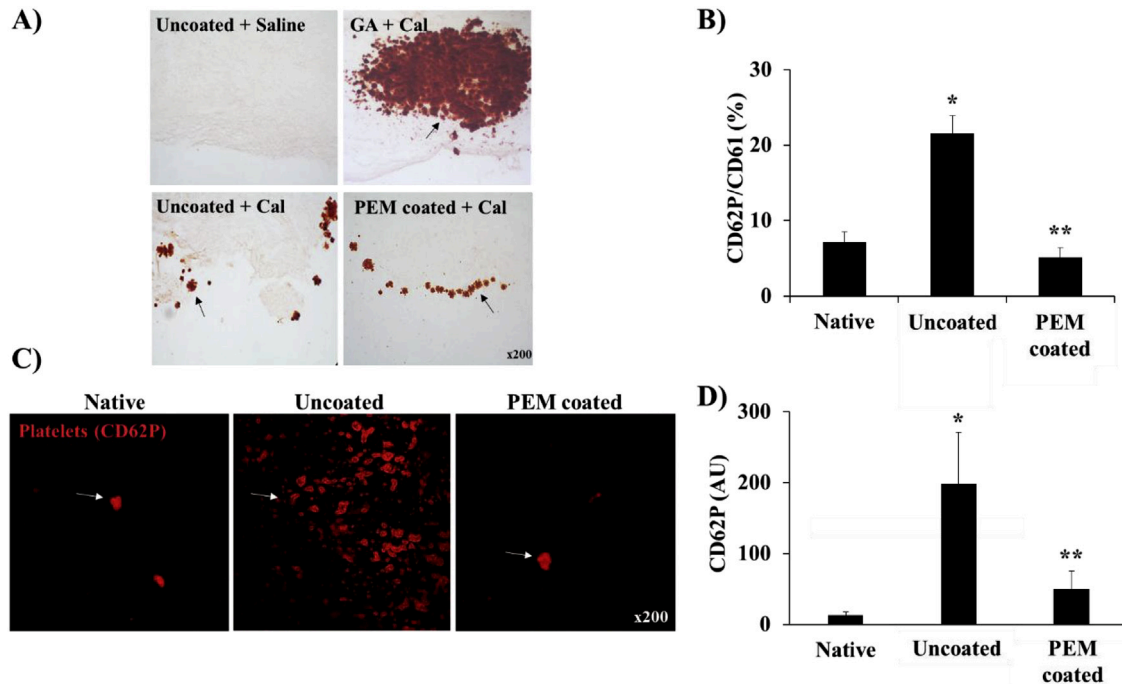


Fig. 6. Calcification and thrombogenicity assays. **A)** Calcification assay of decellularized valve scaffolds coated or not with the PEM. Scaffolds were incubated with a calcifying solution (Cal) and compared to negative (Uncoated in saline solution) and positive controls (glutaraldehyde-fixed scaffolds). Histological analysis (Alizarin red) was performed on cross sections. The arrows show the calcification. **B)** Platelets activation analysis under blood flow. Whole native, decellularized uncoated and PEM coated valves were submitted to human whole blood flow using a closed-loop bioreactor. Platelets were analysed in blood before and after flow by flow cytometry using immunocytochemistry (CD61 = total platelets; CD62P = activated platelets). The activation of platelets was quantified with the ratio CD62P/CD61 and expressed as a percentage. $n \geq 3$, * $p < 0.001$ uncoated vs. native; ** $p < 0.001$ PEM coated vs. uncoated. **C)** Luminal-activated platelet adhesion and aggregation to the valve surface after flow observed in fluorescent microscopy. The arrows show the adherent activated platelets (red). **D)** The quantification of activated platelets adhering to the valve surface was evaluated by fluorescence intensity. $n \geq 3$, * $p < 0.05$ uncoated vs. native; ** $p < 0.005$ PEM coated vs. uncoated. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

suspension leads to platelet aggregation in a dose-dependent manner with 49% of aggregation at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 84% aggregation at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Supplementary Fig. 4C). In the presence of fucoidan, (1–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), platelet aggregation was always 6% lower than in control conditions, confirming the *ex vivo* results. As expected, the fucoidan in suspension demonstrated strong antithrombin and anticoagulant features.

3.4. Re-endothelialization of TEHV in static conditions

To evaluate the potential of the valve scaffolds for re-endothelialization, HUVECs were cultured on leaflets and conduit fragments over time. Histological staining (Masson's Trichrome) on cross sections illustrated that endothelial cells spread in a monolayer on the surface of the decellularized valve and did not penetrate inside the matrix (Fig. 7A). HUVECs cultured on PEM coated valves were highly connective and presented a homogenous monolayer. The quantification of HUVECs on the surface showed that the number of adherent cells to the coated scaffold at 6 h was significantly higher than on the uncoated samples (Fig. 7B). Besides, adherent HUVECs were stained with fluorescent agents distinguishing living and dead cells in order to establish their viability up to 72 h of culture. The microscopic observations showed that the cells exhibited wider spreading and a cobblestone morphology on the coated samples relative to uncoated ones, which exhibited a round shape and sparse localization (Fig. 7C). After 24 h of incubation, a proportion of $161 \pm 20\%$ living cells per field were found for the PEM coated scaffolds in comparison to the HUVECs counted on uncoated scaffolds. In time, this proportion tended to increase at $172 \pm 23\%$ at 48 h and up to $217 \pm 78\%$ at 72 h (Fig. 7D). The living cell density on the surface was demonstrated to be higher for the

PEM coated scaffolds over time than uncoated. Similar results were found for leaflets and conduits (Data not shown).

To investigate the potential for *in situ* endothelialization, the secretion profile of HUVECs cultured on valve scaffolds was analysed in supernatant at 24 h, 48 h and 72 h of incubation. Different types of secreted proteins involved in proliferation (FGF-2, VEGF, PDGF and TGF- β), matrix remodelling (MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2) and inflammation (IL-6, IL-8, IL-10, RANTES/CCL5, INF- γ and TNF- α) were analysed. The results showed that the expression of PDGF was increased at 48 and 72 h in HUVECs supernatants cultured on PEM coated scaffolds (24 ± 8 and 39 ± 9 pg/mL, respectively) relative to uncoated scaffolds (11 ± 3 and 18 ± 8 pg/mL, respectively) (Fig. 8A). Although the expression of FGF-2 and VEGF was detected in supernatants but was not significantly different on coated and uncoated valve scaffolds, the expression of TGF- β was significantly higher at 72 h for the PEM coated scaffold (Fig. 8B–D). The matrix remodelling proteins MMP-1, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 were detected and their expression increased over time (Fig. 8E–H). Nevertheless, no significant change of their expression was measured in the coated samples relative to the uncoated samples. MMP-9 and the inflammatory cytokines IL-6, IL-8, IL-10, RANTES/CCL5, INF- γ and TNF- α were not detected in the supernatant in this assay (data not shown).

3.5. HUVECs adhesion strength and re-endothelialization of TEHV in flow conditions

The detachment efficiency e (σ) of HUVECs was determined on collagen uncoated or coated with the fucoidan/VEGF PEM under a shear stress range (0.1–20 Pa). The images represents cell density and their projected area before and after detachment experiment

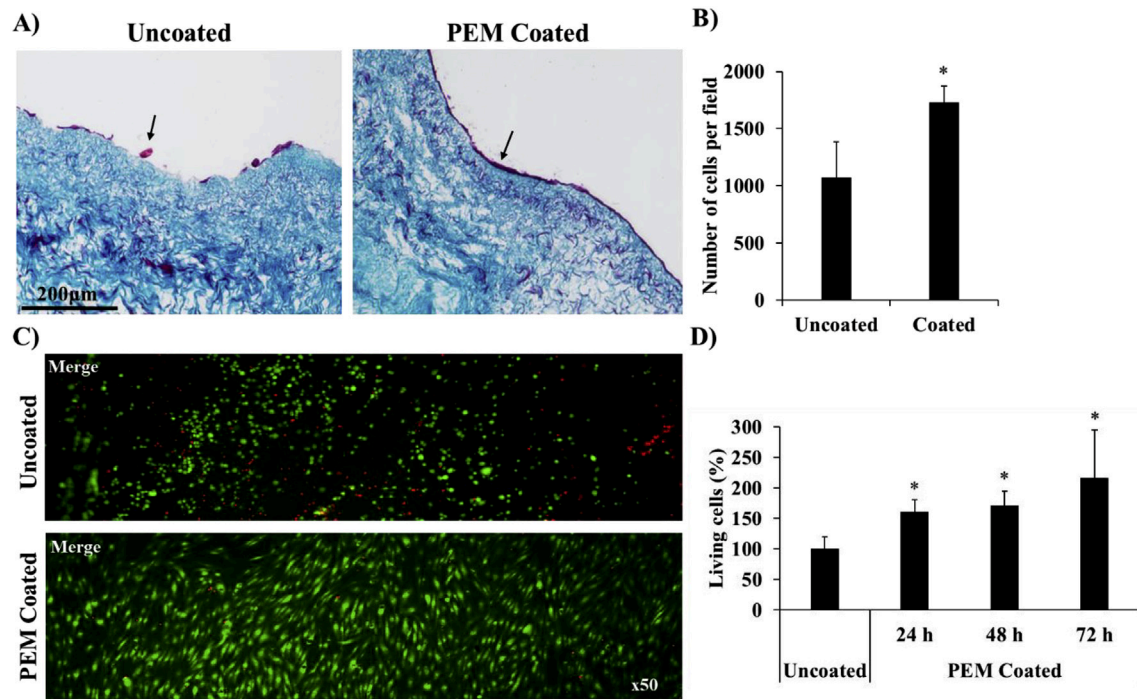


Fig. 7. HUVECs adhesion and viability on valve scaffold under static conditions. HUVECs were seeded on acellular scaffolds of uncoated or PEM coated valve scaffolds. **A)** Cross sections of the re-endothelialized valve scaffolds stained with Masson's Trichrome. Adherent HUVECs are colored in red-pink (arrows). **B)** HUVECs adhesion to scaffolds surface was quantified 6 h after seeding. $n \geq 6$, $*p < 0.01$. **C)** Living cells were stained at 24, 48 and 72 h after seeding with FDA (green) and dead cells revealed by PI (red) and observed under fluorescence microscopy. **D)** Living cells quantification was normalized based on the uncoated conditions in respect with time and expressed in percentage. Representative data are shown at all times. $n \geq 6$, $*p < 0.01$ PEM coated vs. uncoated. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

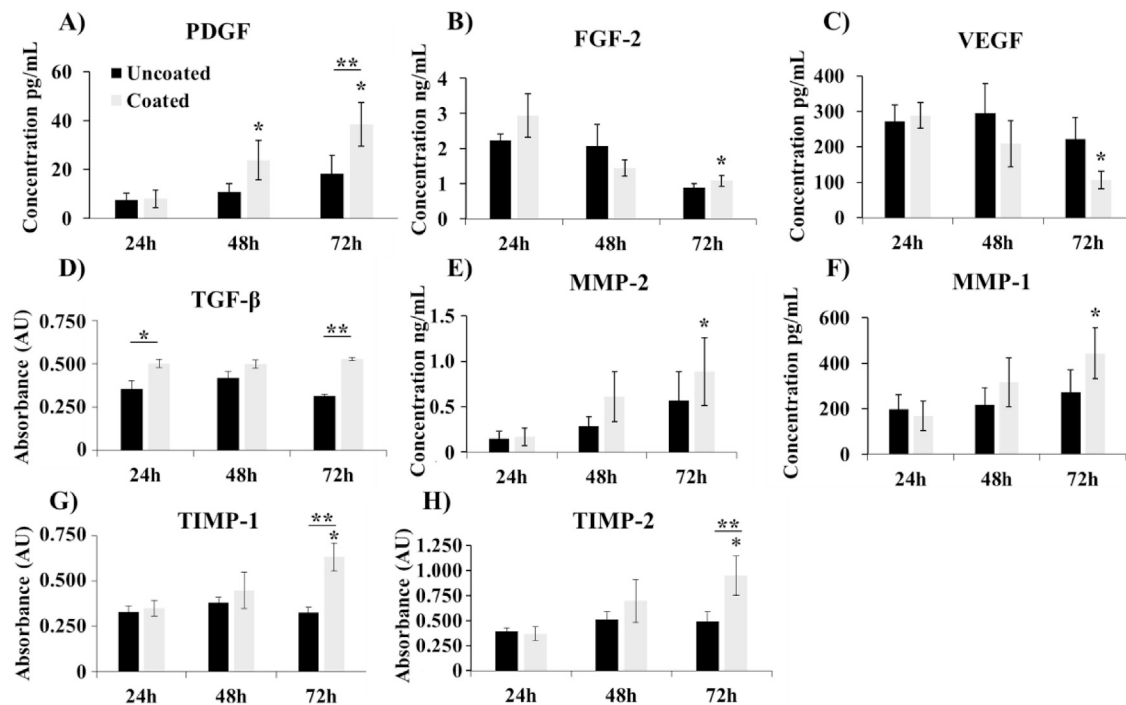


Fig. 8. Secretion profile of HUVECs cultured on valve scaffolds. The expression of secreted proteins: PDGF, FGF-2, VEGF, TGF- β , MMP-2, MMP-1, TIMP-1 and TIMP-2, was measured in the supernatant by luminex after 24, 48 and 72 h of culture (A-C and E) and ELISA (D, G and H). Data are expressed in pg/mL, or absorbance (AU = arbitrary units). $n \geq 6$, $*p < 0.01$ 72 h vs. 24 h; $**p < 0.001$ PEM coated vs. uncoated.

as a function of hydrodynamic stress (Fig. 9A). HUVECs greatly adhered on the collagen surface, whether uncoated or PEM coated in static conditions ($\sigma = 0$). The visualization of remaining cells at the certain positions regarding to shear stress distribution along the radius, shows that HUVECs area was lower than before flow exposition ($\sigma < \sigma_{1/2}$ and $\sigma > \sigma_{1/2}$). This observation occurred in both coating conditions. Mathematical quantification of HUVECs detachment showed that the e (σ) exhibits a threshold behavior below $\sigma_c = 0.97 \pm 0.02$ Pa, where negligible detachment occurs (<10%) for the uncoated collagen (Fig. 9B). At superior stress values, the detachment efficiency raises rapidly with increasing hydrodynamic stress. For the uncoated collagen, the $\sigma_{1/2}$ reached 1.90 ± 0.17 Pa. Above 3.78 ± 0.65 Pa, more than 90% of the cells have been detached from the surface. For the fucoidan/VEGF PEM coated collagen, the endothelial cell-substrate interaction analysis indicated higher threshold ($\sigma_c = 1.81 \pm 0.17$ Pa), as well as $\sigma_{1/2}$ which was equal to 3.52 ± 0.18 Pa, in contrast to uncoated. Shear stress above 6.83 ± 0.12 Pa, resulted in more than 90% of HUVECs detachment. The variance of threshold stress distribution function $\bar{\sigma}$ was constant for the both conditions ($\bar{\sigma} = 0.55 \pm 0.16$). Overall, these results showed that HUVECs were detached from the uncoated collagen under two fold lower shear stress than from the fucoidan/VEGF PEM coated one.

In order to confirm PEM coating advantage for endothelial cells attachment in flow, HUVECs adhesion assay was assessed in whole valve scaffold culture in closed-loop bioreactor. After 6 h of flow in physiological conditions (approximately 11.25 dynes/cm²), HUVECs morphology and actin cytoskeleton organization was observed (Fig. 9C). The images demonstrated that HUVECs were well attached and spread on both types of heart valve scaffolds. Endothelial cells tend towards alignment in the flow direction with an accumulation of F-actin in cortical region which was not found in static conditions (**data not shown**). HUVECs adhesion and viability was found significantly enhanced on the PEM coated scaffolds

(Number of living cells per field = 4549 ± 325), as compared to uncoated ones (Number of living cells per field = 3343 ± 292) (Fig. 9D).

3.6. Long term stem cells culture on TEHV

To investigate the repopulation potential of TEHV in long term, adipose-derived stem cells (ADSCs) were cultured onto valve scaffold and examined after 21 days. Confocal microscopic observations showed that ADSCs cultured on the uncoated scaffolds were widely spread adopting a connective endothelial-like morphology. Actin stress fibres were clearly noticeable (Fig. 10A). On the PEM coated scaffolds, the morphology was significantly different with smaller cells forming a confluent layer where actin is localised to the cell membrane predominantly. In numerous regions (30.85%), ADSCs infiltrated the PEMs coated valve scaffolds up to 200 μ m depth, while the stem cells infiltration was at very low level in uncoated scaffolds (7.06%) with lower depth measured at maximum 50 μ m (Fig. 10B). To determine whether these cell are yet committed to the endothelial or myoblast lineage, CD31 and α -SMA expression were analysed. Surface-aligned ADSCs were engaged in endothelial lineage by expressing CD31 (Fig. 10C). Interestingly the migrating and non-migrating ADSCs expressed α -SMA indicating a commitment to myofibroblast differentiation. This assays demonstrated that human stem cells were able to adopt endothelial behavior on the surface of the decellularized valves coated or not. In addition, the potential of tissue scaffold infiltration and repopulation by myoblasts was enhanced by the PEM surface coating.

4. Discussion and perspectives

Biological valves represent a promising alternative to currently used mechanical valves as they reduce the risk of thrombotic events. Therefore, tissue engineering methods have been

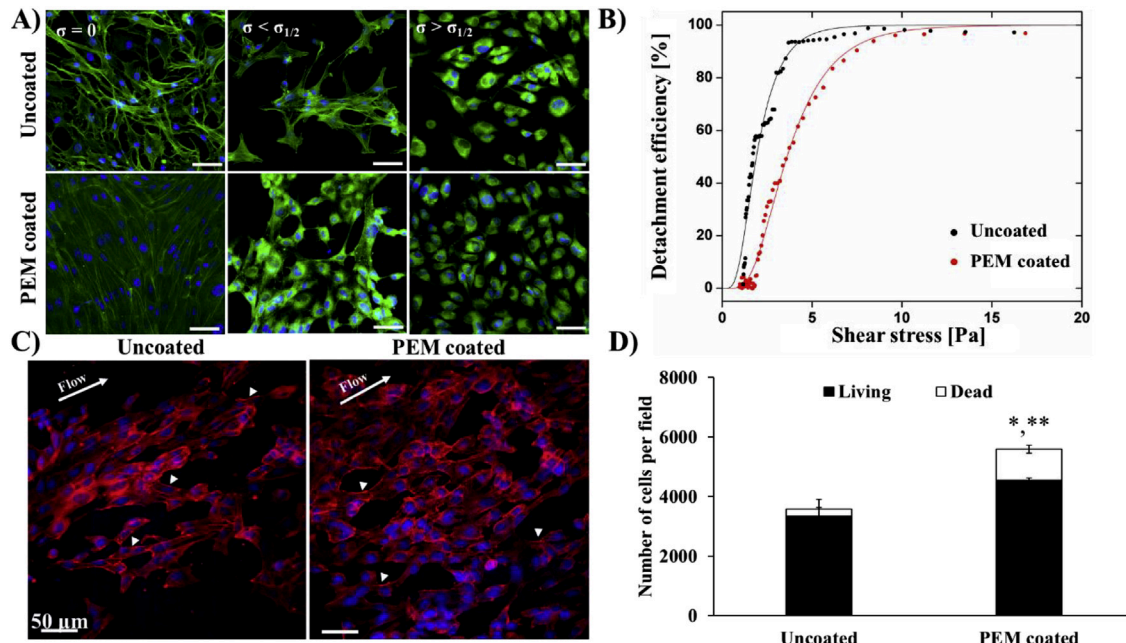


Fig. 9. HUVECs detachment assay and re-endothelialization of valve scaffolds in flow conditions. HUVECs strength attachment to uncoated and PEM coated collagen was measured on silicon wafer submitted to radial flow. **A)** Representative pictures of cell density and morphology before ($\sigma = 0$) and after flow at different values of applied shear stress: flow below $\sigma_{1/2}$ ($\sigma < \sigma_{1/2}$); and above $\sigma_{1/2}$ value ($\sigma > \sigma_{1/2}$). Bars: 50 μ m. **B)** Cell detachment is represented in graphics according to shear stress value. Cells detachment efficiency fitted with Eq. (1). Error bars are of the size of symbols. **C)** Whole valve scaffold were seeded with HUVECs in bioreactor under physiological flow and cultured for 6 h. The images shows HUVECs morphology and their alignment toward the flow direction (arrows). **D)** HUVECs viability (FDA/PI) on valve scaffolds was quantified on uncoated and PEM coated samples after flow culture. $n \geq 10$, * $p < 0.01$; ** $p < 0.0001$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

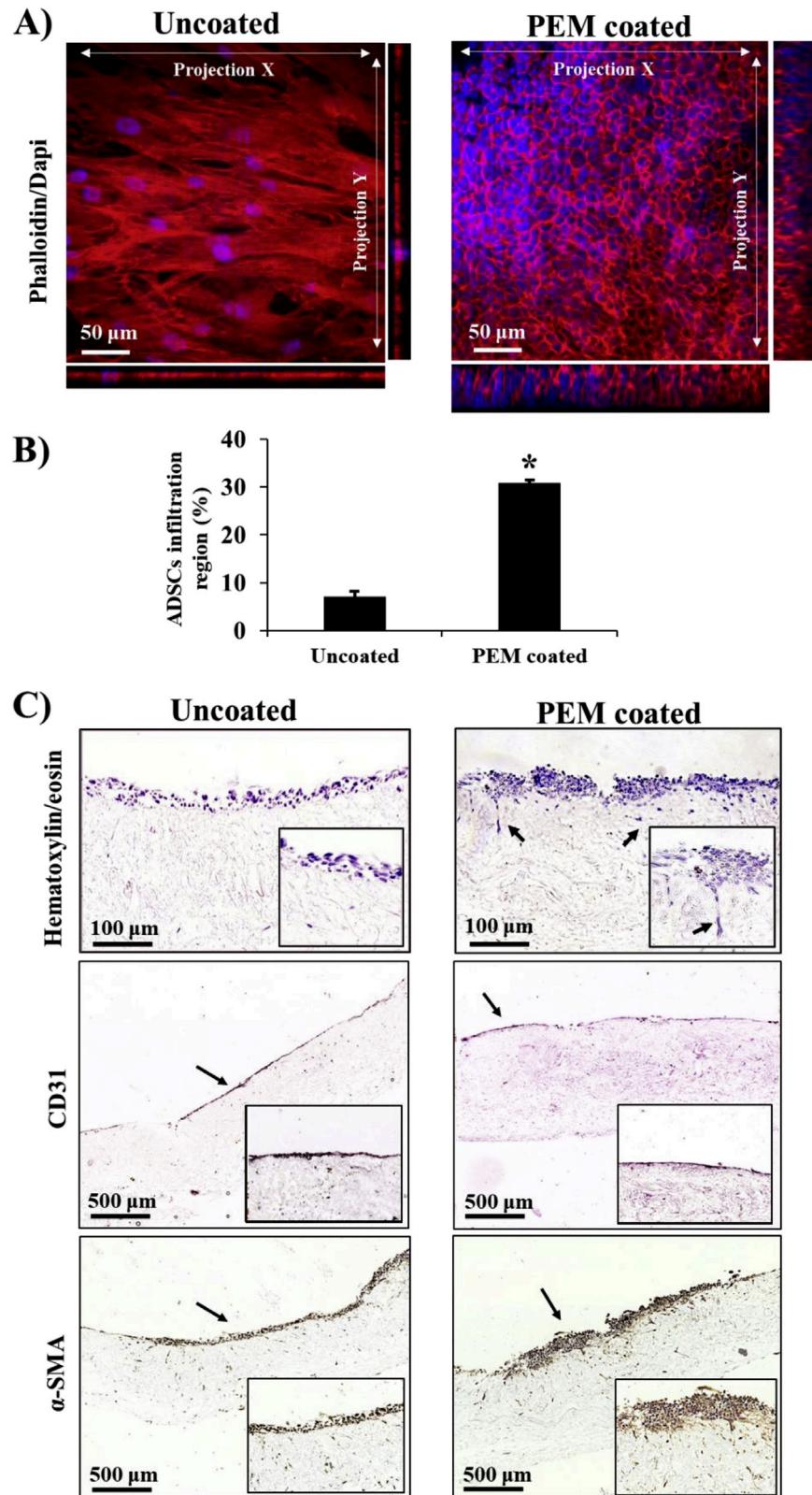


Fig. 10. Adipose-derived stem cells long term culture. ADSC were cultured 21 days on the uncoated and PEM coated valve scaffolds. **A)** Cell morphology was observed with phalloidin/dapi staining by confocal microscopy. The merge images represents the cell morphology at the surface of the scaffolds. The projections X and Y show the cellular infiltration in depth of field relative to each axis. **B)** ADSCs infiltration is represented in percentage of the surface regions per samples ($n \geq 6$, $*p < 0.01$ coated vs. uncoated). **C)** Histological analysis of ADSCs differentiation using Hematoxylin/eosin staining immunostaining against CD31 (endothelial lineage) and α -SMA (myoblasts).

increasingly used to develop functional biocompatible and non-thrombogenic bioprosthesis. Nevertheless, in several studies clot formation was witnessed after decellularization of cardiovascular scaffolds and interestingly more with collagen rich matrices compared to elastin [41,42]. Therefore, modification of the surface properties that play an important role in scaffold haemocompatibility *in vivo* are expected to reduce thrombogenicity. To that purpose, fucoidan a natural sulphated polysaccharide has been used in this study as it exhibits anticoagulant, antithrombotic [22,23,25] and anti-inflammatory properties [24]. Fucoidan has been used in PEM constructs [27], and is expected to form a layer-by-layer PEM with VEGF, as obtained with heparin in a similar mechanism [21,43]. The advantage of using fucoidan instead of heparin resides in its lower haemorrhagic effect while keeping haemocompatibility properties [24]. In the present study, the fucoidan/VEGF PEM was designed to allow a continuous release of VEGF along with the coating degradation, in order to stimulate re-endothelialization and subsequently heart valve regeneration. We opted to design our PEM coating based on the three bilayers to obtain significant release over time. Ye et al. tested multiple bilayer formulations of heparin/VEGF PEM on valve scaffolds and demonstrated dose-dependent responses in VEGF release, endothelial cell adhesion and proliferation starting from three bilayers [21]. Polysaccharide-based PEM belongs to a subgroup that provides specific advantages in biomaterials applications [44], particularly in the field of controlled release of bioactive molecules [43,45,46] and cell attachment [47,48]. Fucoidan used in scaffold constructs increased growth factor retention and improved cell adhesion, migration and mechanically stabilized the scaffold [32,49,50].

In our work, we used a fractionated fucoidan extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* (Supplementary Material 1). This selected fraction exhibits a large amount of fucose (36%) with high sulphate content (29%) and lower content of uronic acid (14%), as described in our previous study [31]. The unfractionated fucoidan, from which we obtained the fucoidan used in this study, exhibited the presence of acetyl groups in NMR spectroscopy [51]. Fucoidan-containing acetyl groups are capable of producing thinner, denser and smoother multilayers relative to acetyl-free fucoidan [27]. Ho et al. showed that the content of acetyl groups can increase the number of interaction with polycationic molecules by adding intramolecular hydrogen bonds as demonstrated with chitosan/fucoidan-based PEM. These physico-chemical properties are thought to optimize the interaction of fucoidan with VEGF and collagen, leading to the generation of a PEM on the valve scaffold. We showed in this study that the substantial interaction of fucoidan with collagen I matrix — the main component of the decellularized valve — was confirmed *in vitro* (Fig. 4). As a perspective, the full characterization and explanation of these interactions are needed for better understanding of fucoidan/VEGF PEM formation and physico-chemical properties. The valve scaffold observed in environmental electronic microscopy showed that the three bilayers fucoidan/VEGF PEM was effectively formed and covered the collagen fibres exposed at the surface. The decrease of the roughness was previously observed for comparable PEM construction on decellularized valve [34]. The observed gradient of fluorescent fucoidan through the scaffold is in accordance with literature showing a gradient of heparin-based PEM on decellularized scaffolds [21,43,52].

The localization of VEGF over the crosssection suggested its penetration through the decellularized valve, in agreement with previous observations on comparable scaffolds [43,53]. The VEGF release from the scaffold was examined over time. Based on the total release of VEGF in 72 h of incubation, the PEM constituted of three alternated layers of fucoidan ensured the higher growth factor retention than other tested constructs. As a result, the

significant differences observed in the release of VEGF continuing over time for the three bilayers construction, justified the use of fucoidan/VEGF multi-coating for the TEHV scaffolds. It was likewise established that fucoidan binds to VEGF with high affinity ($KD = 1.9$ nM) [31]. In addition, the fucoidan content in the scaffold was decreased over time, demonstrating the continuous degradation of the PEM. Fucoidan release was thought to sustain the protection against thrombogenicity and coagulation during the recellularization. These features were confirmed by *in vitro* studies in plasma in presence of fucoidan in suspension (Fig. 6). Fucoidan inhibited thrombin generation but also platelet activation and aggregation (Supplementary Fig. 4), as widely reported. These data suggest that our valve scaffold will allow a continuous delivery of VEGF along with a protection against thrombosis in order to promote endothelial cell recruitment and proliferation.

Functional valve bioprosthesis are expected to exhibit optimal resistance to mechanical stresses that occurs in fluid circulation. The biomechanical properties examination of the fucoidan/VEGF PEM-coated scaffold showed that the elastic modulus was greatly reduced in decellularized valves in circumferential direction, as described in our previous study [35]. Agents used for tissue decellularization are known to influence the composition of extracellular matrix and alter its structure and stiffness. Mechanical properties of the decellularized scaffolds therefore differ from the native tissue [54–56]. In this study, the fraction of energy loss during stress-relaxation test is slightly increased in general for the coated tissue compared to the native tissue. This could be explained by scaffold hydration which was increased after application of the PEM (Supplementary Fig. 3D). Indeed, tissues ability to absorb compressive loads, modulate shear stresses, and resist tissue buckling depends to some extent on the tissue hydration maintained by the GAGs [57]. In our study, the sulphate groups of fucoidan and its electrostatic interactions with VEGF and collagen may enhanced water retention and influence mechanical properties. Although the PEM does not restore native mechanical properties, it is expected to improve the scaffold resistance to mechanical stress after cell repopulation, as demonstrated with other PEM in tissue engineering [58,59].

The calcification of TEHV, which remains a major issue in heart valves bioprosthesis, was not induced in our scaffolds. This observation is thought to arise from the surface modification with fucoidan which could limit calcification, as observed on xenogenic decellularized valve scaffolds coated with heparin implanted in rat [60] and rabbit model [61]. In addition, the antithrombotic and anticoagulation properties observed for fucoidan were witnessed suggesting that the coated scaffold can be protected from platelet adhesion and activation after implantation of the bioprosthesis. The results obtained with *ex vivo* assays on whole valve scaffold cultured in bioreactor in flow condition [35] at physiological shear stresses confirms that the fucoidan/VEGF coating decreases platelet activation and adhesion. Taken together, these results indicate that the PEM coated scaffolds efficiently protect the TEHV against calcification, thrombogenicity and blood coagulation.

To demonstrate the re-endothelialization potential, HUVECs were cultured on the scaffolds in static and dynamic culture over time. The re-endothelialization of decellularized valve scaffolds achieved with HUVECs was previously reported for uncoated [59,62] and coated scaffold with heparin/VEGF PEM [21]. Kasimir et al. also demonstrated recovery of the re-endothelialized scaffold protection against platelet adhesion [63]. For dynamic culture, HUVECs adhesion to scaffold was measured with suspended cells in culture medium at shear stress which mimic physiological conditions. The flow culture trial was performed at increasing rates up to 250 mL/min corresponding to 11.25 dynes/cm² for 6 h. The flow culture model with progressive increased shear stress was shown

as the most suitable to observe endothelial cell adhesion *ex vivo* [59,62]. Modification of TEHV surface by fucoidan/VEGF coating improved the HUVECs adhesion on decellularized scaffolds in both static and dynamic culture. HUVECs alignment adopted in dynamic culture towards the flow direction is typical of HUVECs seeded in flow conditions as observed previously [59]. These results were always accompanied by enhanced cell density and viability in the case of PEM coated scaffolds.

In addition, the quality of HUVECs adhesion was assessed on PEM coated collagen. The radial flow chamber assay was applied as the *in vitro* model to investigate detachment kinetics of HUVECs under physiological range of shear stress. Hemodynamic shear stress regulates endothelial cell biochemical processes that govern cytoskeletal contractility, focal adhesion dynamics, and extracellular matrix assembly on a time scale of minutes [64]. Our study shows, that HUVECs grown on a surface modified by PEMs presented a greater resistance to detachment than cells grown on collagen alone. However for both surfaces, above the threshold stress, the cells detached gradually and were washed out from the chamber by the flow. Based on the observed detachment efficiency and cell projected area changes, we assume that the adhesive bonds break progressively with flow time and magnitude of applied stress. The mechanism of how flow triggers endothelial cell detachment from biomaterials is not clearly defined. An initial detachment of cells due to poor cell–material interaction is likely to occur shortly after shear stress exposition [65]. Based on the observed cytoskeletal re-organization with increasing shear stress, we assume that peeling of cells as an effect of shear stress is dependent on the biomaterial–cell interactions. The matrix–substrate anchorage influence on endothelial cells adhesion under flow has been reported [66]. Shear stress conditioning was shown to improve the resistance of endothelial cells to detachment from biomaterials [67]. Therefore it seems that the ability of a cell to adapt to its mechanical environment due to interaction with matrix may be a critical process promoting resistance to shear-induced detachment.

The functionality of endothelial cells cultured on valve scaffolds was demonstrated by the secretion of growth factors, enzymes and cytokines involved in proliferation, matrix remodelling and inflammation. For the PEM coated scaffold, PDGF and TGF- β secretion was increased, whereas VEGF and FGF-2 secretion was slightly decreased overtime. The difference of VEGF content between the uncoated and PEM coated groups can suggest both higher cellular uptake and lower secretion. Cell metabolic activity could be highly effective in presence of fucoidan, as demonstrated previously [31], resulting in enhanced cellular uptake. This uptake is also dependent on the cell density, which was demonstrated to be higher on coated scaffold. Finally, those results may be relativized considering the VEGF release profile from the PEM and the presence of VEGF and FGF-2 in the supplemented medium. FGF-2 and VEGF signalling crosstalk, can influence their secretion profiles [68]. Nevertheless, as demonstrated by the cell number after 72 h, VEGF released from the PEM appears sufficient to induce cell adhesion and maintain viability. In addition, the increase of secretion of the matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) may indicate that matrix remodelling activity occurs, which is an important step to regenerate the bioprosthesis. The absence of expression modulation in the inflammatory cytokines indicates that HUVECs were not stimulated by the PEM coated scaffold to activate inflammatory signalling. Fucoidan was demonstrated to have anti-inflammatory features *in vivo* [24]. These results strongly suggest that the bioprosthesis should carry an anti-inflammatory properties.

To confirm the potential of our scaffolds for re-endothelialization, we examined the behavior of adipose-derived

stem cells (ADSCs) after long term culture. Our results showed that ADSCs cultured on PEM coated scaffolds presented higher potential to infiltrate the scaffold. Their morphology was characteristic of migratory cells with round shape and diffuse actin in contrast to widely spread cells abundantly found at the surface of the uncoated tissues. ADSCs exhibited endothelial lineage commitment on the surface, whereas infiltrated cells were positive for α -SMA, an indicator for myoblast determination. ADSCs cultured on decellularized heart valves was described to potentially differentiate either in endothelial cell or myoblasts [69,70]. This advantage of stem cells infiltration and the potential to direct cell fate is particularly important for clinical application to promote bioprosthesis regeneration *in vivo*. One potential strategy may be to coat a scaffold with appropriate cell-signalling molecules in an effort to encourage stem cells and endothelial progenitor cells (EPCs) adhesion, proliferation and finally differentiation, as shown [71]. Furthermore, promising preclinical studies encourage the concept of auto-guided regeneration of implanted TEHVs with modified surface properties by bioactive molecules [72]. Experiments in large animal models focused on fucoidan-based modified TEHV bioprosthesis implantation are expected as the topic for supplementary material. Although further studies are required to confirm the *in vivo* potential of our scaffolds, given the antithrombotic, non-calcifying properties and the re-endothelialization and stem cells repopulation ability, this system is very promising for heart valve replacement with regeneration potential. Moreover, the coating method and formulation could be potentially applied to other mechanically resistant bioprosthesis to improve their haemocompatibility and cell repopulation.

5. Conclusion

In this presented work, we demonstrated that the PEM fucoidan/VEGF coating can be used to improve decellularized valve properties. These modifications lead to enhanced protection of the scaffold from thrombosis especially in flow conditions, without increasing calcification. The modified scaffold was not immunogenic and exhibited improved re-endothelialization by enhancing cell adhesion and viability in both classic and bioreactor cultures. Finally, PEM coated scaffolds demonstrated higher potential for stem cells repopulation. These promising results emphasize the potential of our scaffolds to improve cell growth and promote remodelling of implanted bioprostheses. This study demonstrates that the PEM fucoidan/VEGF coating could be an efficient approach to develop functional heart valve bioprostheses for clinical applications.

Acknowledgments

This work was supported in collaboration 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 (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) for the french part; and the Foundation for Cardiac Surgery Development and the University of Silesia for the polish part. This study was financially supported by the project No. PBS3/A7/17/2015 from the Development of innovative bioactive prosthetic heart valve of the Polish National Centre for Research and Development, respectively. N. Marinval was supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and University Paris 13 (SREI 2015 and Bourse de Mobilité Internationale 2016). We would like to particularly thank Liliane Loue-dec, Francesco Andreatta and Christine Choqueux from INSERM U1148; as well as the Physicochemical Analysis Service at the Compiègne University of Technology for their technical assistance

with histological preparations, and Luminex assay SEM observations respectively. We would also like to show our gratitude to Dr. Didier Letourneur director of LVTS (Laboratory for Vascular and Translational Science, INSERM U1148) and Dr. Roman Major director of vice-director Laboratory of Surface Engineering and Biomaterials at IMIM for allowing us to carry out this study at their facilities.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.054>.

References

- [1] S.P. Hoerstrup, B. Weber, Biological heart valves, *Eur. Heart J.* 36 (2015) 325–326.
- [2] W. Vongpatanasin, D. Hillis, R. Lange, Characteristics of prosthetic valves, *N. Engl. J. Med.* 335 (1996) 407–416.
- [3] J. Puvimanasinghe, E. Steyerberg, J. Takkenberg, M. Eijkemans, L. Herwerden, A. Bogers, J. Habbema, Prognosis after aortic valve replacement with a bio-prosthesis: predictions based on meta-analysis and microsimulation, *Circulation* 103 (2001) 1535–1541.
- [4] J. Usprech, W. Chen, K. Li, C. Simmons, Heart valve regeneration: the need for systems approaches, *WIREs Syst Biol Med* 8 (2016) 169–182.
- [5] S. Neuenschwander, S. Hoerstrup, Heart valve tissue engineering, *Transpl. Immunol.* 12 (2004) 359–365.
- [6] B. Alsoufi, C. Manlihot, B. McCrindle, C. Canver, A. Sallehuddin, S. Al-Oufi, M. Joufan, Z. Al-Halees, Aortic and mitral valve replacement in children: is there any role for biologic and bioprosthetic substitutes? *Eur. J. Cardio. Thorac. Surg.* 36 (2009) 84–90.
- [7] M. Harpa, I. Movileanu, L. Sierad, H. Cotoi, H. Suci, C. Sircuta, T. Preda, D. Nistor, K. Branzaniuc, R. Deac, M. Dandel, S. Gurzu, L. Harceaga, P. Olah, A. Simionescu, D. Simionescu, Pulmonary heart valve replacement using stabilized acellular xenogeneic scaffolds; effects of seeding with autologous stem cells, *Rev Rom Med Lab* 23 (2016) 415–429.
- [8] V. Sales, B. Mettler, G. Engelmayr, E. Aikawa, J. Bischoff, D. Martin, A. Exarhopoulos, M. Moses, F. Schoen, M. Sacks, J. Mayer, Endothelial progenitor cells as a sole source for ex vivo seeding of tissue-engineered heart valves, *Tissue Eng. A.* 16 (2010) 257–267.
- [9] B. Barrilleaux, D. Phinney, D. Prockop, K. O'Connor, Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells, *Tissue Eng.* 12 (2006) 3007–3019.
- [10] A. Heggen, A. Blois, C. Tiron, M. Hellesøy, D. Micklem, J. Nör, L. Aklsen, J. Lorens, Efficient in vivo vascularization of tissue engineering scaffolds, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 4 (2011) 52–62.
- [11] J. Kluijn, H. Talacua, A.I.P.M. Smits, M.Y. Emmert, M.C.P. Brugmans, E.S. Fioletta, P.E. Dijkman, S.H.M. Söntjens, R. Duijvelshoff, S. Dekker, et al., In situ heart valve tissue engineering using a bioresorbable elastomeric implant - from material design to 12 months follow-up in sheep, *Biomaterials* 125 (2017) 101–117.
- [12] C. Stamm, A. Khosravi, N. Grabow, K. Schmohl, N. Treckmann, A. Drechsel, M. Nan, K. Schmitz, A. Haubold, G. Steinhoff, Biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering, *Ann. Thorac. Surg.* 78 (2004) 2084–2092.
- [13] L. Soletti, A. Nieponice, J. Guan, J.J. Stankus, W.R. Wagner, D.A. Vorp, A seeding device for tissue engineered tubular structures, *Biomaterials* 27 (2006) 4863–4870.
- [14] M. Vitacolonna, D. Belharazem, P. Hohenberger, E.D. Roessner, Effect of Static Seeding Methods on the Distribution of Fibroblasts within Human Acellular Dermis, 2013, pp. 1–13.
- [15] Y. Weng, J. Chen, Q. Tu, Q. Li, M. Maitz, N. Huang, Biomimetic modification of metallic cardiovascular biomaterials: from function mimicking to endothelialization in vivo, *Interface Focus* 2 (2012) 356–365.
- [16] M. Heras, J.H. Chesebro, V. Fuster, W.J. Penny, D.E. Grill, K.R. Bailey, G.K. Danielson, T.A. Orszulak, J.R. Pluth, F.J. Puga, H.V. Schaff, J.J. Larsonkeller, High risk of thromboemboli early after bioprosthetic cardiac valve replacement, *J. Am. Coll. Cardiol.* 25 (1995) 1111–1119.
- [17] K.H. Hussein, K.M. Park, K.S. Kang, H.M. Woo, Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application, *Mater. Sci. Eng. C* 67 (2016) 766–778.
- [18] M. Namiri, M.K. Ashtiani, O. Mashinchian, M.M. Hasani-Sadrabadi, M. Mahmoudi, N. Aghdami, H. Baharvand, Engineering natural heart valves: possibilities and challenges, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2016) (n/a-n/a).
- [19] R. Roudaut, K. Serri, S. Lafitte, Thrombosis of prosthetic heart valves: diagnosis and therapeutic considerations, *Heart* 93 (2007) 137–142.
- [20] L. Bačáková, K. Novotná, M. Pažek, Polysaccharides as cell carriers for tissue engineering: the use of cellulose in vascular wall reconstruction, *Physiol. Res.* 63 (2014).
- [21] X. Ye, H. Wang, J. Zhou, H. Li, J. Liu, Z. Wang, A. Chen, Q. Zhao, The effect of heparin-VEGF multilayer on the biocompatibility of decellularized aortic valve with platelet and endothelial progenitor cells, *PLoS One* 8 (2013) e54622.
- [22] H. Thorlacius, B. Vollmar, U.T. Seyfert, D. Vestweber, M.D. Menger, The polysaccharide fucoidan inhibits microvascular thrombus formation independently from P- and L-selectin function in vivo, *Eur. J. Clin. Invest.* 30 (2000) 804–810.
- [23] S. Collic-Jouault, J. Millet, D. Helley, C.S. Inquin, A.M. Fischer, Effect of low-molecular-weight fucoidan on experimental arterial thrombosis in the rabbit and rat, *J. Thromb. Haemost.* 1 (2003) 1114–1115.6.
- [24] A. Cumashi, N. Ushakova, M. Preobrazhenskaya, A. D'Incecco, A. Piccoli, L. Totani, N. Tinari, G.E. Morozovich, A.E. Berman, M.I. Bilan, et al., A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds, *Glycobiology* 17 (2007) 541–552.
- [25] E. Durand, D. Helley, A. Al Haj Zen, C. Dujols, P. Bruneval, S. Collic-Jouault, A.M. Fischer, A. Lafont, Effect of low molecular weight fucoidan and low molecular weight heparin in a rabbit model of arterial thrombosis, *J. Vasc. Res.* 45 (2008) 529–537.
- [26] H. Hlawaty, N. Suffee, A. Sutton, O. Oudar, O. Haddad, V. Ollivier, C. Laguillier-morizot, L. Gattegno, D. Letourneur, N. Charnaux, Low molecular weight fucoidan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2 expression, *Biochem. Pharmacol.* 81 (2011) 233–243.
- [27] T.T.M. Ho, K.E. Bremmel, M. Krakowska, D.N. Striger, B. Thierry, D.A. Beattie, Tuning polyelectrolyte multilayer structure by exploiting natural variation in fucoidan chemistry, *Soft. Matter.* 11 (2015) 2110–2124.
- [28] T.H. Silva, A. Alves, B.M. Ferreira, J.M. Oliveira, L.L. Reys, R.F. Ferreira, et al., Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest, *Int. Mater. Rev.* 57 (2012) 276–306.
- [29] C. Ye, Y. Wang, H. Su, P. Yang, N. Huang, M. F. Maitz, A. Zhao, Construction of a fucoidan/laminin functional multilayer to direction vascular cell fate and promotion hemocompatibility, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 1 (2016) 236–242.
- [30] G. Neufel, T. Cohen, S. Gengrinovitch, Z. Poltorak, Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, *Faseb. J.* 13 (1999) 9–22.
- [31] N. Marinval, P. Saboural, O. Haddad, M. Maire, K. Bassand, F. Geinguenaud, N. Djaker, K. Ben Akrou, M.L. De La Chappelle, R. Robert, O. Oudar, E. Guyot, C. Laguillier-Morizot, A. Sutton, C. Chauvierre, F. Chaubet, N. Charnaux, H. Hlawaty, Identification of a pro-angiogenic potential of a low molecular weight highly sulfated fraction of fucoidan from *Asophyllum nodosum*, *Mar. Drugs* 14 (2016) 16.
- [32] A. Purnama, R. Aid-launais, O. Haddad, M. Maire, D. Letourneur, C. le Visage, Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice, *Drug Deliv. Transl. Res.* 2 (2013) 187–197.
- [33] K. Mendelson, F.J. Schoen, Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges, *Ann. Biomed. Eng.* 34 (2006) 1799–1819.
- [34] X. Ye, X. Hu, H. Wang, J. Liu, Q. Zhao, Polyelectrolyte multilayer film on decellularized porcine aortic valve can reduce the adhesion of blood cells without affecting the growth of human circulating progenitor cells, *Acta Biomater.* 8 (2012) 1057–1067.
- [35] P. Wilczek, R. Major, L. Lipinska, J. Lackner, A. Mzyk, Thrombogenicity and biocompatibility studies of reduced graphene oxide modified acellular pulmonary valve tissue, *Mater. Sci. Eng. C* 53 (2015) 310–321.
- [36] G. Decher, J.B. Schlenoff, *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*, second ed., Vol. 1.3, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.
- [37] A. Ruifrok, D. Johnston, Quantification of histochemical staining by color deconvolution, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 23 (4) (2001) 291–299.
- [38] N. Aizenberg, P. Aubry, M.G. Huisse, A. Cachier, W. El Amara, J.L. Feldman, D. Himbert, D. Baruch, M.C. Guillin, P.G. Steg, Enhanced shear-induced platelet aggregation in patients who experience subacute stent thrombosis: a case-control study, *J. Am. Coll. Cardiol.* 45 (2005) 1753–1756.
- [39] H.C. Hemker, P. Giesen, R. AlDieri, V. Regnault, E. de Smed, R. Wagenvoort, T. Lecompte, S. Béguin, The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability, *Pathophysiol Haemost Thromb* 32 (2002) 249–253.
- [40] E. Décavé, D. Garrivier, Y. Bréchet, B. Fourcade, F. Bruckert, Shear flow-induced detachment kinetics of Dictyostelium discoideum cells from solid substrate, *Biophys. J.* 82 (5) (2002) 2383–2395.
- [41] M.J. Robertson, J.L. Dries-Devlin, S.M. Kren, J.S. Burchfield, D.A. Taylor, Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix, *PLoS One* (2014) 9.
- [42] D.T. Simionescu, Q. Lu, Y. Song, S.L. Jeoung, T.N. Rosenbalm, C. Kelley, N.R. Vyavahare, Biocompatibility and remodeling potential of pure arterial elastin and collagen scaffolds, *Biomaterials* 27 (2006) 702–713.
- [43] L.J. De Cock, S. De Koker, F. De Vos, C. Vervae, J.P. Remon, B.G. De Geest, Layer-by-layer incorporation of growth factors in decellularized aortic heart valve leaflets, *Biomacromolecules* 11 (2010) 1002–1008.
- [44] T. Crouzier, T. Boudou, C. Picart, Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15 (2010) 417–426.
- [45] B.B. Hsu, S.R. Hagerman, K. Jamieson, J. Veselinovic, N. O'Neill, E. Holler, J.Y. Ljubimova, P.T. Hammond, Multilayer films assembled from naturally-derived materials for controlled protein release, *Biomacromolecules* 15 (2014) 2049–2057.

- [46] S. Nakamura, M. Nambu, T. Ishizuka, H. Hattori, Y. Kanatani, B. Takase, S. Kishimoto, Y. Amano, H. Aoki, T. Kiyosawa, 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.* 85 (2008) 619–627.
- [47] J. Almodovar, J. Mower, A. Banerjee, A.K. Sarkar, N.P. Ehrhart, M.J. Kipper, Chitosan-heparin polyelectrolyte multilayers on cortisol bone: periosteum-mimetic, cytophilic, anticacterial coatings, *Biotechnol. Bioeng.* 110 (2013) 609–618.
- [48] N. Saha, C. Monge, V. Dulong, C. Picart, K. Glinel, Influence of polyelectrolyte film stiffness on bacterial growth, *Biomacromolecules* 14 (2013) 520–528.
- [49] L.L. Reys, S.S. Silva, D.P. Soares, N.M. Oliveira, J.F. Mano, R.L. Reis, T.H. Silva, Fucoidan Hydrogels Photocrosslinked with Visible Radiation as Matrices for Cell Culture, 2016.
- [50] P.-O. Rujitanaroj, R. Aid-Launais, S.Y. Chew, C. Le Visage, Polysaccharide electrospun fibers with sulfated poly(fucose) promote endothelial cell migration and VEGF-mediated angiogenesis, *Biomater. Sci.* 2 (2014) 843–852.
- [51] P. Saboural, F. Chaubet, F. Rouzet, F. Al-Shoukr, R.B. Azzouna, N. Bouchemal, L. Picton, L. Louedec, M. Maire, L. Rolland, G. Potier, D. Le Guludec, D. Letourneur, C. Chauvierre, Purification of a low molecular weight fucoidan for SPECT molecular imaging of myocardial infarction, *Mar. Drugs* 12 (2014) 4851–4867.
- [52] J. Bao, Y. Shi, H. Sun, X. Yin, R. Yang, L. Li, X. Chen, H. Bu, Construction of a portal implantable functional tissue-engineered liver using perfusion-decellularized matrix and hepatocytes in rats, *Cell Transplant.* 20 (2011) 753–766.
- [53] Y.H. Shen, M.S. Shoichet, M. Radisic, Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells, *Acta Biomater.* 4 (2008) 477–489.
- [54] K. Schenke-Layland, O. Vasilevski, F. Opitz, K. König, I. Riemann, K.J. Halbhuber, T. Wahlers, U.A. Stock, Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves, *J. Struct. Biol.* 143 (2003) 201–208.
- [55] T.J. Keane, I.T. Swinehart, S.F. Badylak, Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance, *Methods* 84 (2015) 25–34.
- [56] H. Xu, B. Xu, Q. Yang, X. Li, X. Ma, Q. Xia, Y. Zhang, C. Zhang, Y. Wu, Y. Zhang, Comparison of Decellularization Protocols for Preparing a Decellularized Porcine Annulus Fibrosus Scaffold, 2014.
- [57] S.R. Shah, N.R. Vyavahare, The effect of glycosaminoglycan stabilization on tissue buckling in bioprosthetic heart valves, *Biomaterials* 29 (2008) 1645–1653.
- [58] C.J. Detzel, A.L. Larkin, P. Rajagopalan, Polyelectrolyte multilayers in tissue engineering, *Tissue Eng. B Rev.* 17 (2011) 101–113.
- [59] A. Weymann, B. Schmack, T. Okada, P. Soós, R. Istók, T. Radovits, B. Straub, E. Barnucz, S. Loganathan, I. Pätzold, N. Chaimow, C. Schies, S. Korkmaz, U. Tochtermann, M. Karck, G. Szabó, Reendothelialization of human heart valve neoscaffolds using umbilical cord-derived endothelial cells, *Circ. J.* 77 (2013) 207–216.
- [60] W.K. Lee, K.D. Park, Y.H. Kim, H. Suh, J.C. Park, J.E. Lee, K. Sun, M.J. Baek, H.M. Kim, S.H. Kim, Improved calcification resistance and biocompatibility of tissue patch grafted with sulfonated PEO or heparin after glutaraldehyde fixation, *J. Biomed. Mater. Res.* 58 (2001) 27–35.
- [61] M. Yang, Y.H. Lin, W.P. Shi, H.C. Shi, Y.J. Gu, Y.S. Shu, Surface heparin treatment of the decellularized porcine heart valve: effect on tissue calcification, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* (2015) 1–6.
- [62] A. Lichtenberg, I. Tudorache, S. Cebotari, S. Ringes-Lichtenberg, G. Sturz, K. Hoefler, C. Hurschler, G. Brandes, A. Hilfiker, A. Haverich, In vitro reendothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions, *Biomaterials* 27 (2006) 4221–4229.
- [63] M.T. Kasimir, G. Weigel, J. Sharma, E. Rieder, G. Seebacher, E. Wolner, P. Simon, The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering: platelet adhesion and activation, *Thromb. Haemost.* 94 (2005) 562–567.
- [64] R.E. Mott, B.P. Helmke, Mapping the dynamics of shear stress-induced structural changes in endothelial cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293 (5) (2007) C1616–C1626.
- [65] D.K. Macario, I. Entersz, J.P. Abboud, G.B. Nackman, Inhibition of apoptosis prevents shear-induced detachment of endothelial cells, *J. Surg. Res.* 147 (2) (2008) 282–289.
- [66] J. Teichmann, A. Morgenstern, J. Seebach, H.J. Schnittler, C. Werner, T. Pompe, The control of endothelial cell adhesion and migration by shear stress and matrix-substrate anchorage, *Biomaterials* 33 (7) (2012) 1959–1969.
- [67] H. Inoguchi, T. Tanaka, Y. Maehara, The effect of gradually graded shear stress on the morphological integrity of a HUVEC-seeded compliant small-diameter vascular graft, *Biomaterials* 28 (3) (2007) 486–495.
- [68] G. Seghezzi, S. Patel, C.J. Ren, A. Gualandris, G. Pintucci, E.S. Robbins, R.L. Shapiro, A.C. Galloway, D.B. Rifkin, P. Mignatti, Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis, *J. Cell Biol.* 141 (1998) 1659–1673.
- [69] F. Colazzo, P. Sarathchandra, R.T. Smolenski, A.H. Chester, Y.T. Tseng, J.T. Czernuszka, M.H. Yacoub, P.M. Taylor, Extracellular matrix production by adipose-derived stem cells: implications for heart valve tissue engineering, *Biomaterials* 32 (2011) 119–127.
- [70] S. Jana, R.T. Tranquillo, A. Lerman, Cells for tissue engineering of cardiac valves, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 10 (2015) 804–824.
- [71] T. Ota, Y. Sawa, S. Iwai, T. Kitajima, Y. Ueda, C. Coppin, H. Matsuda, Y. Okita, Fibronectin-hepatocyte growth factor enhances reendothelialization in tissue-engineered heart valve, *Ann. Thorac. Surg.* 80 (2005) 1794–1801.
- [72] L. Iop, G. Gerosa, Guided tissue regeneration in heart valve replacement: from preclinical Research to first-in-human trials, *BioMed Res. Int.* 2015 (2015) 1–13.

**New synthesized derivatives from *N*-substituted-4-Oxo-[1]
benzopyrano [4, 3-c] pyrazole influenced proliferation, viability,
spreading and invasion of human liver tumor cells**

Hela Guesmi^{1*}, Oualid Haddad², Kevin Bassand², Rafik Gharbi³, Moncef Msadek³, Frederic Chaubet⁴, Marc Lecouvey⁵, Raoui Mounir Maaroufi¹, Hanna Hlawaty²

¹Laboratory of Genetic, Biodiversity, and Bioresources Valorisation LR11ES41, Higher Institute of Biotechnology of Monastir, Avenue Tahar Haddad (Bp 74), Monastir 5000, Tunisia

²Inserm U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, UFR SMBH, Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, Groupe Biothérapies et Glycoconjugués, Bobigny, 93000, France.³Laboratory of Heterocyclic Synthesis and Chemistry of Natural Compounds LR11ES39, Faculty of Sciences of Monastir, University of Monastir, route de Kairouan, 5000 Monastir, Tunisia

⁴INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Institut Galilée, Paris 13 University of, Sorbonne Paris Cité, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, Villetaneuse, France

⁵CSPBAT, UMR 7244 CNRS, Paris 13 University, 93017 Bobigny, France

* Corresponding author

Abstract. *Background/Aim:* There is an unsatisfied clinical demand to develop new anticancer agents. The aim of the current study was to synthesize new coumarin derivatives using two different synthetic methodologies and to evaluate their anticancer activity. *Materials and methods:* Four coumarin derivatives were synthesized and evaluated for their anticancer activities. The structures of all compounds were confirmed by infrared (IR), UV-vis, Nuclear magnetic resonance (NMR) ^{13}C NMR, ^1H NMR, and high-resolution mass spectrometry (HRMS) analysis. All the synthesized compounds (**4**, **5**, **8** and **9**) were analyzed for their anti-proliferative (MTT and LDH assays and cell cycle studied with flow cytometry) and anti-invasive activity (spreading and invasion tests) on human hepatoma cell lines Huh-7 *in vitro*. Doxorubicin was used as control in order to compare their anti-tumoral effects. *Results.* All the synthesized compounds are potential inhibitors of proliferation, viability, spreading and invasion of human liver tumor cells with a 50% inhibitory Concentration range, $\text{IC}_{50}=10.37\ \mu\text{M}$ to $12.94\ \mu\text{M}$. *Conclusion.* This study could lead to the identification of a new target therapy for human Hepatocellular carcinoma (HCC) or other cancers.

Keywords: Coumarin derivatives, liver tumor Huh7 cells, cell proliferation, cell invasion.

Coumarins, natural or synthetic, have become an interesting subject of investigation for many researchers due to their biological properties and characteristics and conjugated molecular architecture. Coumarins have proven to have an interesting role in anticancer drug development since many of their derivatives have shown an antitumor activity on various cell lines [1]. Research conducted on these coumarins and their metabolites showed promising activity against several types of cancer such as lung, malignant melanoma, prostate, breast, leukemia, and hepatocellular carcinoma. Anticancer activity of coumarin derivatives has been previously shown [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7] and it has been shown that coumarins can act on various cancer cells by different mechanisms; they inhibit the protein kinase telomerase enzyme activity, down regulate oncogene expression or induce the caspase-9-mediated apoptosis, suppress tumor cell proliferation by arresting cell cycle in G0/G1 or G2/M phase in cancer cells [8, 9]. Some researches proved that 7-hydroxycoumarin can inhibit growth of human cancer cell lines [10], such as A549 (lung), ACHN (renal), H727 (lung), MCF7 (breast) and HL-60 (leukaemia) and in some clinical trials they exhibited anti-proliferative activity in prostate cancer [11], renal carcinoma [12] and malignant melanoma [13].

The invasion is one of the most important prerequisite for cancer progression and metastasis because the growth of the primary tumor is dependent on its invasive potential within the host tissue. For this reason the development of new coumarin derivatives able to inhibit tumor invasion is a logical continuation of the research of new anticancer products.

Knowing that cancer cells, including Human hepatoma cells Huh7, are capable of degrading the constituents of the extracellular matrix (ECM), and the basement membrane which is a highly cross-linked network composed mainly of type IV collagen, laminin and heparan sulfate-based proteoglycans [14]. This proteolysis involves enzymes secreted by the cancer cells and by stromal cells (fibroblasts) stimulated by soluble factors secreted by the cancer cells. These enzymes are in particular matrix metalloproteases. In addition, the process also involves a break in the equilibrium between these enzymes and their inhibitors and the chemokines, which are involved in cancer progression. Chemokines, chemotactic cytokines, like Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted (RANTES/CCL5) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2, play an important role in tumor biology because they may influence cell growth, angiogenesis, invasion and metastasis [15, 16, 17].

It has been previously shown that 4-hydroxycoumarin follow different pathways such as aromatase and sulphatase inhibition, cell cycle arrest and cell apoptosis induction [14]. However, coumarin itself also exhibited a cytotoxic effect against human epithelial cells which showed some typical characteristics of apoptosis with loss of membrane microvilli and nuclear DNA

fragmentation. These anticancer properties cited above encouraged us to synthesize a novel series of 4-substituted-4-hydroxycoumarin derivatives (HCD) obtained with two different synthesis processes from 4-hydroxycoumarin. Each process was performed in three steps and led to two regioisomers. The first process has been already reported in the literature for the preparation of 1-phenyl [1]benzopyrano[4,3-c]pyrazol-4(2*H*)-one (**4**) and 1-Benzyl [1]benzopyrano[4,3-c]pyrazol-4(2*H*)-one (**5**) [18], while the second one was realized for the first time in our team and led to the 2-phenyl[1]benzopyrano[4,3-c]pyrazol-4(2*H*)-one (**8**) and the 2-Benzyl[1]benzopyrano[4,3-c]pyrazol-4(2*H*)-one (**9**). These processes were chosen for their selective properties leading to the targeted regioisomers. The aim of our work was to synthesize the new 4-hydroxycoumarin derivatives, determine whether these new coumarin derivatives have anticancer effect and are involved in inhibition of hepatocellular carcinoma cells Huh7 proliferation, spreading, cell cycle and invasion.

Materials and methods

Reagents and materials.

The starting materials **6** and **7** were prepared according to the literature [19, 20]. All reactions were followed by TLC using aluminum sheets of Merck silica gel 60 F254, 0.2 mm and plates were revealed using a UV 254 light. Melting points were taken on a Buchi-510 capillary apparatus and are uncorrected. ¹H, ¹³C and two-dimensional NMR spectra were recorded with AC-400 Bruker spectrometer at room temperature (rt) in CDCl₃ or DMSO d-6 at 400 MHz and at 100 MHz, using residual non deuterated solvent peaks as internal reference. Coupling constants are given in Hz. IR spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum two FT-IR instrument with the Universal ATR Sampling Accessory. The HRMS spectra were acquired with an electrospray- time-of-flight (ESI-TOF, LCT Premier XE, and Waters) mass spectrometer in the positive ion mode.

General procedure for the preparation of 4-chloro-2-oxo-2H chromene-3-carbaldehyde (2)

To a stirred mixture of 4-hydroxycoumarin (2.2 g) in anhydrous DMF (15 ml) were added drop wise POCl₃ (15 ml) at -10 to -5°C. The reaction mixture was then stirred for 1 h at room temperature, heated, and stirred for 12 h at 60°C. After the reaction was completed, the mixture was poured onto crushed ice (100 g) under vigorous stirring. After storing the mixture overnight at 0°C, the pale yellow solid was collected by filtration and washed successively with aqueous Na₂CO₃ (5%) and water, and then was air-dried. Recrystallization from acetone gave 1.7 g (65%) of **2** as a pale yellow powder with mp 115–120 °C. IR (ATR, ν_{\max} cm⁻¹): 2920, 2874, 1720, 1702, 1603, 1587, 1541 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ H : 10.39 (1H, s, CH=O), 8.19–7.40 (4H,

m, Ar-H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 186.81, 158.44, 153.28, 153.27, 135.68, 127.65, 125.56, 118.39, 118.22, 117.20.

Synthesis of (E)-4-chloro-3-(2-phenylhydrazono)-2H-chromen-2-one (3a)

A mixture of phenylhydrazine hydrochloride (0.160 g, 1.1 mmol) and triethylamine (2.2 mmol) in (10 ml) of ethanol was slowly added drop wise to a stirred solution of 4-chloro-2-oxo-2H-chromene-3-carbaldehyde (0.208 g, 1.0 mmol) in (10 ml) ethanol at 60°C and the reaction was continued for another 15 min at same temperature. The reaction was monitored by TLC and an orange-red precipitate formation was observed. The reaction mixture was cooled to room temperature; precipitate was rapidly filtered off and then washed with cold water to afford (E)-4-chloro-3-((2-phenylhydrazono) methyl)-2H-chromen-2-one (**3a**) (0.275 g) as orange red color solid in 92% yield. M.p: 181-183°C; IR (ATR, $\nu_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$): 3284, 2921, 2851, 1696, 1596, 1521, 1488, 1447, 1280, 1253, 1084 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ_{H} : 11.11 (bs, 1H, NH), 8.16 (s, 1H, =CH_{imine}), 8.04 (d, 1H, $J = 8$ Hz, aromatic), 7.75 (t, 1H, $J = 8$ Hz, aromatic), 7.56 (t, 2H, $J = 4$ Hz, aromatic), 7.36 (t, 2H, $J = 8$ Hz, aromatic), 7.20 (d, 2H, $J = 8$ Hz, aromatic), 6.93 (t, 1H, $J = 4$ Hz, aromatic). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ_{C} : 158.7, 150.7, 144.8, 139.5, 132.6, 129.9, 129.7, 125.7, 125.6, 120.5, 120.2, 119.4, 116.8, 112.9. HRMS (ESI-TOF) for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}$]⁺: calcd, 299.0511 found 299.3011.

Synthesis of (E)-4-chloro-3-(2-benzylhydrazono)-2H-chromen-2-one (3b)

Benzylhydrazine dihydrochloride (0.422 g, 2.2 mmol) in mixture of H_2O and AcOH was added to a stirred solution of 4-chloro-2-oxo-2H-chromene-3-carbaldehyde **2** (0.416 g, 2.0 mmol) in methanol at 60 °C and the reaction was continued for another 30 min at same temperature. The reaction was monitored by TLC and an orange precipitate formation was observed. After completion of the reaction, the reaction mixture was cooled to room temperature, precipitate was filtered off, and the resulted precipitate was dissolved in ethyl acetate and washed with cold water to remove acetic acid. The organic layer was separated and dried over Na_2SO_4 , solvent was removed under reduced pressure afforded (E)-4-chloro-3-((2-benzylhydrazono) methyl)-2H-chromen-2-one (**3b**) (0.522 g) as orange color solid in 85% yield. M.p: 195-198°C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 11.11 (bs, 1H, NH), 8.16 (s, 1H, =CH_{imine}), 8.04 (t, 1H, $J = 4$ Hz, aromatic), 7.33-7.38 (m, 4H, aromatic), 7.21-7.25 (m, 2H, aromatic), 4.19 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 156.3, 151.8, 139.8, 138.0, 133.9, 130.0, 128.2, 127.2, 125.1, 123.4, 121.5, 117.3, 110.4, 107.7, 54.7. HRMS (ESI-TOF) for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}$]⁺: calcd, 313.0666 found 313.0671.

General procedure of the preparation of 1-phenylchromeno[4, 3-c]pyrazol-4(1H)-one (4) and 1-benzylchromeno[4,3-c]pyrazol-4(1H)-one (5)

Catalytic amount of piperidine was added to a stirred solution of 4-chloro-3-(N-substituted hydrazino)-2H-chromen-2-ones (1mmol) in pyridine (5mL), and contents were refluxed for 2 h. After completion of the reaction indicated by TLC and the formation of a dark red color, reaction mixture was cooled to room temperature and diluted with water (3 mL). Dilute chlorhydric acid was added to the crude mixture, to quench the excess of pyridine. The brown precipitate so-formed was filtered, washed with water and purified over silica gel (60-120) afforded compounds **4-5** as pale yellow color solids in 78-85% yield.

Preparation of 1-phenylchromeno [4, 3-c]pyrazol-4(1H)-one (4):

Yield: 78%, yellow color solid, mp = 192°C; IR(ATR, ν_{\max} cm⁻¹): 1753, 1535, 981cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ_{H} : 8.52 (s, 1H, H_{olefinic}), 7.65-7.71 (m, 5H, aromatic), 7.53-7.71 (m, 2H, aromatic), 7.20 (t, 1H, J = 8 Hz, aromatic), 7.00 (d, 1H, J = 8 Hz, aromatic). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ_{C} : 156.9; 152.9, 141.3, 139.9, 139.5, 132.1, 131.1, 130.5, 127.5, 124.8, 122.5, 118.3, 111.6, 108.3. HRMS (ESI-TOF) for C₁₆H₁₀N₂O₂ [M + H]⁺: calcd, 263.0741 found 263.0741.

Preparation of 1-benzylchromeno [4, 3-c] pyrazol-4(1H)-one (5):

yield: 85%, Yellow color solid, mp = 123°C; IR(ATR, ν_{\max} cm⁻¹): 1727, 1535, 1022 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ_{H} : 8.27 (s, 1H, H_{olefinic}), 7.7 (d, 1H, J = 8 Hz, aromatic), 7.49 (t, 1H, J = 8 Hz, aromatic), 7.44 (t, 1H, J = 8 Hz, aromatic), 7.29-7.36 (m, 3H, aromatic), 7.20 (t, 1H, J = 8 Hz, aromatic), 7.13 (d, 2H, J = 8 Hz, aromatic), 5.86 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ_{C} : 157.3, 152.8, 140.8, 139.0, 134.9, 131.0, 129.2, 128.3, 126.1, 124.5, 122.5, 118.3, 111.3, 108.7, 55.8. HRMS (ESI-TOF) for C₁₇H₁₂N₂O₂ [M + H]⁺: calcd, 277.0898 found 277.0905.

General procedure of the preparation of 2-phenylchromeno[4,3-c] pyrazol-4(1H)-one (8) and 2-benzylchromeno[4,3-c]pyrazol-4(1H)-one (9).

The starting material **1** was prepared according to the literature [21] using the two-step formylation/cyclisation reaction between 4-(2-hydroxyphenyl)-1, 5-benzodiazepin-2-one and excess of DMFDMA. For the synthesis of chromeno-pyrazolone derivatives: (10 mmol) of compound **1** and an excess of phenylhydrazine chlorhydrate or benzylhydrazine chlorhydrate (50 mmol) were dissolved in (5 ml) of glacial acetic acid, and refluxed for 2h. The reaction mixture was poured into ice and the precipitate filtered then washed successively with water then recrystallized from ethanol.

Preparation of 2-phenylchromeno [4, 3-c] pyrazol-4(1H)-one (8):

Yield: 70%, pale yellow color solid, mp = 225°C; IR(ATR, ν_{\max} cm⁻¹): 1733 (C=O), 1600 (C=N) 1461 (C=C arom), 1111 (C-O-C arom) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ_{H} : 9.61 (s, 1H, H_{olefinic}), 8.07-8.12 (m, 3H, aromatic), 7.58-7.63 (m, 3H, aromatic), 7.40-7.50 (m, 3H, aromatic), ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ_{C} : 157.2, 153.0, 149.2, 139.2, 132.0, 131.5, 130.2,

128.8, 125.3, 123.0, 120.4, 117.8, 114.5, 109.2 .HRMS (ESI-TOF) for C₁₆H₁₀N₂O₂ [M + H]⁺: calcd, 263.0742; found 263.0750.

Preparation of 2-benzylchromeno [4, 3-c] pyrazol-4(1H)-one (9):

Yield: 55%, White cottony, mp =169°C. IR(ATR, ν_{\max} cm⁻¹): 1744 (C=O),1622(C=N) 1464(C=C arom), 1089(C-O-C arom) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ _H: 9.01 (s, 1H, H_{olefenic}), 7.96 (d, 1H,*J* = 8 Hz, aromatic), 7.54 (t, 1H,*J* = 8 Hz, aromatic), 7.33–7.44 (m, 7H, aromatic), 5.59(s, 2H, CH₂).¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ _C: 157.3, 152.8, 148.8, 136.5, 134.5, 130.9; 129.2; 128.6, 128.4, 125.1, 122.8, 117.7, 114.8, 107.3, 56.4.HRMS (ESI-TOF) for C₁₇H₁₂N₂O₂ [M + H]⁺: calcd, 277.0899 ; found 277.0951.

Cell culture and reagents. Human hepatoma *Huh7* cells were obtained from ATCC (LGC Standards, Molsheim, France). These Cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal bovine serum (FBS), 2 mM l-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 U/ml streptomycin (all obtained from Life Technologies Inc.), at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells were subcultivated every 7 days. The medium was changed twice a week. All in vitro cell experiments (viability, spreading and invasion assays) were carried out at 37°C in a 5% CO₂ incubator [22].

Cell Viability Assay. The viability of the cancer cells line *Huh7* after treatment by our particles was demonstrated using MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma, St. Louis, MO) [23]. 5000 cells/well were seeded in a 96-wells plate for 24, 48 and 72 h with or without the different particles at increasing concentration (0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M). 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 at 570 nm (Bio-rad© Microplate reader, Model 680). Experiments were performed in quadruplicate. Dose–response curves were obtained allowing the determination of IC₅₀ values, which refer to the concentration inducing a response halfway between the baseline and the maximum plateau reached [24].

Measurement of lactate dehydrogenase (LDH) release.

The LDH assay was performed using the CytoTOX96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA), in accordance with the instructions of the manufacturer's protocol. Briefly, after treating *Huh7* at 90% confluence in 24-well plates with different prodrugs (0.01–100 μ M) for 24 h, culture medium was collected. The induced LDH release was measured as the absorbance at 490 nm using a standard 96-well plate reader. Cytotoxicity was expressed relative to basal LDH release in untreated control cells. One-way ANOVA was used for the

statistical analysis and significant differences in cell viability were determined by post comparisons of means [25].

Cell Spreading assay. Quantitative cell spreading assays were carried out in respective supplemented basal cell culture media. 6500 cells/well were seeded on the fibronectin (100 µg/mL; Corning)-coated LabTek chambers for 3h at 37C°, 5% CO₂. Then, the samples were rinsed with PBS then fixed with 150µl of PFA 1% for 20 min at 4C°, and followed with 150 µl of Triton 0.05% for 5 min at ambient temperature. Cells were stained subsequently with Alexa Fluor 546 phalloidin (dilution 1/100, Invitrogen, France) and DAPI (dilution 1/1000, Invitrogen, France) for 1h30 min in order to visualize filamentous actin and observed with a fluorescence microscope (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss France). Cells were photographed using digital camera fixed on top of the microscope (Nikon COOL PIX 8400, Japan) and ten fields of stained cells were photographed for each treatment. Cell areas expressed in square inches were evaluated on 30 individual cells, measured by Scion Image software (Scion Corporation) [26]. Histograms represent mean of cell areas ± SD of three different experiments.

Cell Invasion assay. Huh7 cell invasion was investigated using Boyden invasion chambers (Becton Dickinson) with 8 mm pore size filters coated with Matrigel membrane matrix (100 µg/ml; BD Bioscience PharMingen). 2.5×10^5 Huh7 cells with (0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM, 10 µM and 100 µM) of each compound (**4**, **5**, **8** and **9**) were seeded in the upper well of the Boyden chamber. Hepatocyte growth factor (HGF; 20 ng/mL) was used as a positive control [27]. After 24 h, non-migrated cells in the upper chamber were wiped with a cotton swab and the cells were fixed in methanol and stained with Mayer's hemalum, and counted. Cells invading the lower surface of the filter were counted in 10- fields using a Zeiss microscope. Results were expressed as a percentage relative to controls and therefore normalized to 100%. Experiments were performed in triplicate [28].

Flow cytometry analysis. To analyze the cell cycle of Huh7, 10^5 cells were seeded into 12- well plates and serum deprived during one night. Then, Huh7 were treated or not with the coumarinic derivatives products at 1 or 10 µM during 24h. Supernatant and trypsinated cells were then centrifuged during 5 minutes at 1500 rpm. Samples were fixed with pre-cooled 75% ethanol for 1h at 4°C. Finally, cells were incubated 15 minutes at room temperature with 10 µg/mL of propidium iodide (PI)-PBS for flow cytometry analysis. Data were analyzed using FACScalibur (Becton Dickinson, CA, USA).

Statistical Analysis. For the determination of statistical significance, an ANOVA test was performed with the Stat view software (Stat View 4.5 Abacus Concepts, Berkeley, USA). A *p* value of <0.05 was used as the criterion for statistical significance.

Results

Chemistry. The coumarin derivatives **4**, **5**, **8** and **9** were prepared using two general synthetic methods. The regioisomere **4** and **5** were prepared using the methodology outlined in Scheme 1 (**Pathway I**). 4-Hydroxycoumarin (**1**) was treated with POCl₃ and DMF, similarly to standard Vilsmeier-Haack conditions (at -10 to -5°C) [29]. After hydrolysis, 4-chloro-3-formylcoumarin (**2**) was generated. Condensation of **2** with hydrazine hydrochlorides derivatives in acidic or basic medium provided the corresponding (E)-4-chloro-3-((2-phenylhydrazono)-2*H*-chromen-2-one (**3a**) and (E)-4-chloro-3-((2-benzylhydrazono)-2*H*-chromen-2-one (**3b**) [30].

The compounds **4** and **5** were obtained by the regioselective cyclisation of their corresponding 2*H*-chromenohydrazones **3a** and **3b** at 100°C with a catalytic amount of piperidine in pyridine in high yields, .

As shown in Scheme 1 (**Pathway II**), analogues **8** and **9** were prepared using the second methodology. The condensation of one equivalent of [1]benzopyrano[4,3-*c*][1,5]benzodiazepin-7(8*H*)-one (**7**) [31] with an excess of hydrazine hydrochloride derivatives in boiling acetic acid has given the corresponding products. The starting material **7** was prepared according to the literature [32] using the two-step formylation/cyclisation reaction between 4-(2-hydroxyphenyl)-1, 5-benzodiazepin-2-one (**6**) and an excess of dimethylformamide dimethylacetal (DMF-DMA). The IR spectra of compound **4** chosen as an illustrative example, has shown absorption bands at 1753, , 1618, 1535 and 981 cm⁻¹ which corresponded respectively to the stretching vibrations of the (lactone >C=O), (pyrazol (C=N), aromatic (C=C), and (C-O-C) bonds ¹H NMR spectra recorded at 400 MHz in DMSO-d₆, displayed characteristic signals which can be, according to their multiplicity, readily assigned to olefinic proton (singlet at 8.53 ppm) and to aromatic protons (multiplets at 7.68 ppm and 7.58ppm, triplet at 7.2 ppm and doublet at 7 ppm). Compound **4** was further confirmed by ¹³C NMR and two-dimensional heteronuclear ¹H-¹³C HSQC and HMBC spectroscopy. The signal at d 156.9 ppm corresponded to coumarin carbonyl carbon C-2 and three separate signals at δ 141.3, 139.9 and 111.6 ppm corresponded in turn respectively to C-9b, C-3 and C-3a (Fig.2).

Biological assays.

Anti-proliferative activity analyzed by MTT assay. In order to analyze anti-proliferative properties of all the synthesized compounds, we evaluated their cytotoxicity with MTT assay.

The incubation of Human hepatoma Huh7 cell line with different concentrations (0.01 μ M-100 μ M) of all coumarinic derivatives was performed up to 48h. Doxorubicin was used as the reference drug. Our results showed that all compounds **4**, **5**, **8** and **9** displayed good cytotoxic effects on Huh7 with half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) between $10.37 \pm 0.05 \mu\text{M}$ and $12.94 \pm 0.04 \mu\text{M}$. These data are shown in **Table I**. It may be noted that the substituted benzyl ring compounds **5** showed a higher anti-proliferative activity ($IC_{50}=10.37 \pm 0.05 \mu\text{M}$) than the other compounds **9** ($IC_{50}= 12.94 \pm 0.04 \mu\text{M}$), **4** ($IC_{50}= 10.84 \pm 0.04 \mu\text{M}$) and **8** ($IC_{50}= 11.02 \pm 0.04 \mu\text{M}$).

In addition, the lipophilicity ($\log P$) of the compound may contribute to optimum anti-proliferative activity in as much as the higher partition coefficient means that the compound is more likely to penetrate into the membrane and bind with intracellular receptor [33]. Actually, according to **Table II**, the higher $\log P$ the more the compounds were active.

Structural integrity of cell membrane analyzed by LDH assay. The breakdown of membrane integrity is one of the characteristic features of the process of apoptosis and cell death. There by the cytotoxicity results in a phase of massive cell lysis. To monitor the evolution of the integrity of the cells we measured the release of the enzyme LDH in the supernatant of the cells treated or not by all our compounds after 24h, 48h and 72h of incubation (**Figure 2**).

The results showed that the LDH activity of each compound was statistically different from that of the control group. Thus, we note a significant liberation of LDH into the cell supernatant for the first 24h (**Figure 2a**) which increased significantly with the extension of time, indicating that the different derivatives had both time dependent effects which cause cell membrane damage (**Figure 2 a-c**). The maximum release of LDH was thus obtained after 72h of incubation with cytotoxicity higher than 65% for all the compounds. Under basal conditions, the LDH is already present in the cytoplasm. However, if the cell membrane is damaged, it will leak out of the cell. Therefore, the amount of LDH measured in a conditioned media can indirectly give an idea of the degree of damage of the cell membrane integrity. Furthermore, the compound **5** remains the most effective with a percentage of cytotoxicity of 50.64% (24h), 65.26% (48h), 66.14% (72h) at the concentration of 0.01 μM whereas for that of 1 μM the percentages are 58.17% (24h), 71.94% (48h), 78.63% (72h) and finally the percentages are 65.53% (24h), 84.85% (48h), 85.32% (72h) for the concentration of 100 μM .

Cell spreading assay. Cell spreading take part in cell movement and progression processes since before migration the cell must adhere well and spread to the surface [19, 20], During spreading, the cells undergo morphological changes involving the extension of lamellipodia along the extracellular matrix, formation of focal adhesion complexes, translocation of the cell body, and

posterior detachment from the extracellular matrix. Meanwhile, the cells drastically reorganize their cytoskeleton during this extremely dynamic process. The main visible feature is the increase of the surface area of contact between the cells and the extracellular matrix, which is accompanied by a significant flattening of the cell body and an increase in the total cell area [26]. Thus, it was interesting to measure the effectiveness of synthesized HCDs on the spreading of Huh7 liver cancer cells, which is a relevant step in tumor progression. Cell morphology was studied after 3h-incubation of Huh7 cells in the presence or absence of HCD by analysis of red labeling actin, a major cytoskeletal protein. After 3h of cell culture with compounds **4**, **5**, **8** and **9**. The results showed that the morphology of the cells cultured in the presence of HCD did not have the same morphology as those cultured in its absence and this depends on the concentration of HCD (0.01 μ M, 1 μ M and 100 μ M). The results obtained using fluorescent microscopy showed that the red labeled cytoskeleton in the cells pass from a spherical to a star-shaped form in the presence of all derivatives. The qualitative analysis of the morphology of the cells carried out by fluorescence microscopy was confirmed quantitatively by image analysis with Scion Image software and expressed in square inch. The cell areas were calculated in absence and in the presence of HCD at increasing concentrations (0.01 μ M, 1 μ M or 100 μ M). We consider a cell spread out as round and with a higher contrast. The areas representing aggregates or clusters of cells were excluded from the data set based on the evaluation of nuclear DAPI fluorescence, so that all tagged data were derived from individual cells. The percentage of inhibition of cell spreading was determined relative to the control group. All results are presented in the **Figure 3**.

In the absence of HCD, the cells spread out and the large spreading areas were observed, whereas in their presence the cell spreading areas were significantly decreased. As shown in **Figure 3-B**, Huh7 spreading was significantly decreased by 55% when the cells were incubated with 1 μ M of compound **5** as compared with untreated cells ($P < 0.005$, $n = 3$). Meanwhile, the other compounds **4**, **8** and **9** had less decreasing effect on Huh7 spreading by 53%, 51 % and 45 %, respectively, in the same experimental conditions (**Figure 3A, C and D**).

Cell invasion assay. The four compounds (**4**, **5**, **8** and **9**) were studied in an *in vitro* model of tumor invasion in modified Boyden chambers. This model makes it possible to evaluate the capacity of Huh7 cancer cells to pass through a filter covered with Matrigel, a biological element of extracellular matrix (ECM), in the presence of a chemotactic cytokine Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted (RANTES/CCL5). The results showed that all coumarin derivatives inhibited to some extent the basal invasion of Huh7 cells through the Matrigel. Only for Doxorubicin there was a significant and high inhibition of Huh7 invasion by 60 \pm 3 % in basal condition. RANTES/CCL5 was then used to stimulate chemotactic Huh7

invasion. The results indicated a significant increase in cell invasion by $41\pm 2\%$ in control condition. Interestingly, there was a significant decrease of RANTES/CCL5-induced invasion after Doxorubicin, **5** and **8** treatments, by 30%, 34% and 24%, respectively.

Cell cycle analyzed by flow cytometry. The cytostatic effect of the HCD compounds on the Huh7 was evaluated in order to confirm the inhibition of cell growth. Huh7 cells were treated with different HCDs at a concentration of 1 μM or 10 μM , then the cell were stained with propidium iodide and were analyzed by flow cytometer which detects early changes in apoptosis and provides a lucid picture on the nature of cell cycle progression. The cell cycle distribution was examined at various times and doses. The results indicate the percentage of living cells in sub-G1, G0/G1 and S/G2/M at a concentration of 1 or 10 μM . Our results showed that there was a significant increase of Huh7 cells at the sub-G1 position (Table III) after compounds **5** ($54.64\pm 17.29\%$) and **9** ($54.41\pm 10.35\%$) treatments at 10 μM , as compared to control untreated cells ($27.92\pm 11.38\%$). In addition, standard Doxorubicin (Dox) treatment led to significant increase of Huh7 cells at the sub-G1 position at 1 μM (67.42 ± 6.21) and at 10 μM (59.42 ± 7.46). In parallel we observe a significant decrease of cells in phase S and G2/M only for the Doxorubicin treatment for 1 μM ($11.13\pm 4.42\%$) and for 10 μM ($15.63\pm 3.91\%$) when compared to control untreated cells.

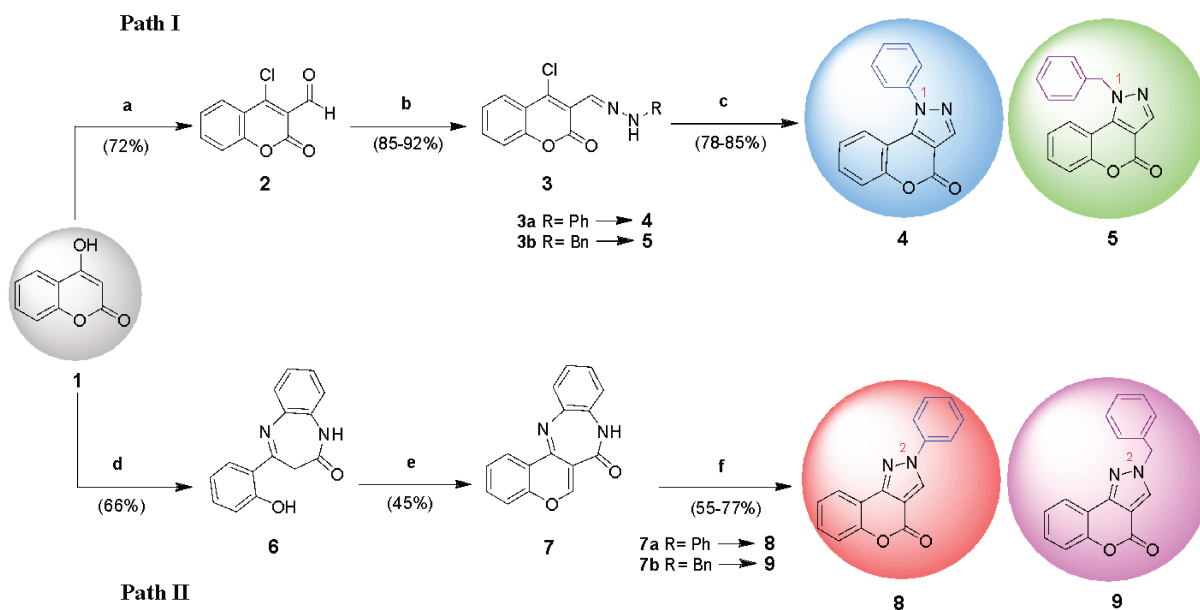
Discussion

A new versatile synthetic route to a new derivatives from *N*-substituted-4-Oxo-[1] benzopyrano [4, 3-*c*] pyrazole (**4**, **5**, **8** and **9**) by the treatment of 4-hydroxycoumarin with different reagents is described; the method is rapid and produced all compounds in good yields. The newly synthesized compounds were evaluated for their antitumoral activity against Huh7 cells. This series of derivatives were widely active in almost all bioassays. With regard to the Anti-proliferative activity analyzed by MTT assay all the title compounds are potent inhibitors and the compound **5** exhibited the most potent inhibitory activity ($\text{IC}_{50}=10.37\mu\text{M}$) against Huh7 cells. The cytotoxicity effect was dose-dependent and time-dependent. Indeed all compounds did affect significantly Huh7 spreading as compared to untreated control cells even at low concentrations (0.01 μM to 100 μM). The ability of derivatives (**4**, **5**, **8** and **9**) to inhibit cell spreading was concentration dependent. These results showed that the presence of each compound decrease cellular spreading and thus inhibited adhesion of Huh7 cancer cells *in vitro* and that their action was dependent on their concentration, confirming to some extent the results obtained by LDH assays. The mechanism of inhibition of cell spreading remains unknown, but

we can suppose that down-regulation of cell spreading by our compounds may involve effects on cytoskeletal processes required for cell spreading in as much as the observed impairment of the actin network forming the peripheral cytoskeleton of the cell is involved in both membrane integrity and integrin-mediated cell spreading. All of the derivatives (**4**, **5**, **8** and **9**) used in this study may thus function as tumor suppressors by causing the embrittlement of the membrane and by negatively regulating cell interactions with the extracellular matrix. For example, the compound **5** prevented cells from spreading at normal rates, and it reduced to about 38% the number of spread cells, at a concentration of 100 μ M, with altered morphology and impaired cytoskeletal formation. Also the cell viability of Huh7 cells treated with these derivatives and especially with the compound **9** was potentially reduced by 81.41 % in the G2 / M phase. So, the presence of apoptotic cells results in an increasing percentage at the sub-G1 position [22]. These results suggest that the cell cycle is stopped after treatment, and it may also confirm the induction of apoptosis in Huh7 cells by compounds **4**, **5**, **8** and **9** in a dose dependent manner. On the other hand, all derivatives inhibited to some extent the basal invasion of Huh7 cells through the Matrigel .This effect may involve actually either inhibition of the spreading of Huh7 cells to the Matrigel and therefore their interaction with the components of the MEC. Together, these results of the current study should be further confirmed by evaluating anti-cancer activity *in vivo* and may open new avenues for cancer treatment, leading to possible clinical applications.

Acknowledgment

The study was partly supported by fundings from the CMCU-PHC Utique research project (code 14G0808), University of Monastir, Tunisia and University Paris 13, France. We gratefully thank the directors and sanitary technicians of the LVTS laboratory at Galilée Institute, University of Paris 13, France, for technical assistance for sewage samples collection and the physico-chemical data.



Scheme 1: Synthesis of compounds **4-5** and **8-9** (a) Vilsmeier-Haack conditions: (DMF+POCl₃), -10 to -5°C. (b) R-NH-NH₂.HCl/Et₃N, EtOH, 60°C. (c) Piperidine (cat) Pyridine (solvent) 100°C. (d) 1, 2-diaminobenzene, Xylene reflux. (e) DMF-DMA, Toluene 100°C. (f) R-NH-NH₂.HCl, AcOH reflux. Synthesized compounds are:

4: 1-phenylchromeno [4, 3-c] pyrazol-4(1H)-one

5: 1-benzylchromeno [4, 3-c] pyrazol-4(1H)-one

8: 2-phenylchromeno [4, 3-c] pyrazol-4(1H)-one

9: 2-benzylchromeno [4, 3-c] pyrazol-4(1H)-one

Compound	IC ₅₀ (μM)
Dox	5.84±0.06
4	10.84±0.04
5	10.37±0.05
8	11.02±0.04
9	12.94±0.04

Table I. Anti-proliferative values IC₅₀ (μM) of the 4-Hydroxycoumarin derivatives. Huh7 were treated or not with our different compounds at concentrations from 0.01 to 100 μM for 48h. Cell viability was determined by a MTT assay and then the IC₅₀ was calculated. The table presents the IC₅₀ of the different compound ± SEM.

Table II. Log *P* (lipo-hydro partition coefficient) properties of anti-proliferative agents.

Compound	Log <i>P_a</i>
4	2.67
5	3.47
8	2.67
9	3.47

^aThe log *P* values were predicted using ChemBioDraw.

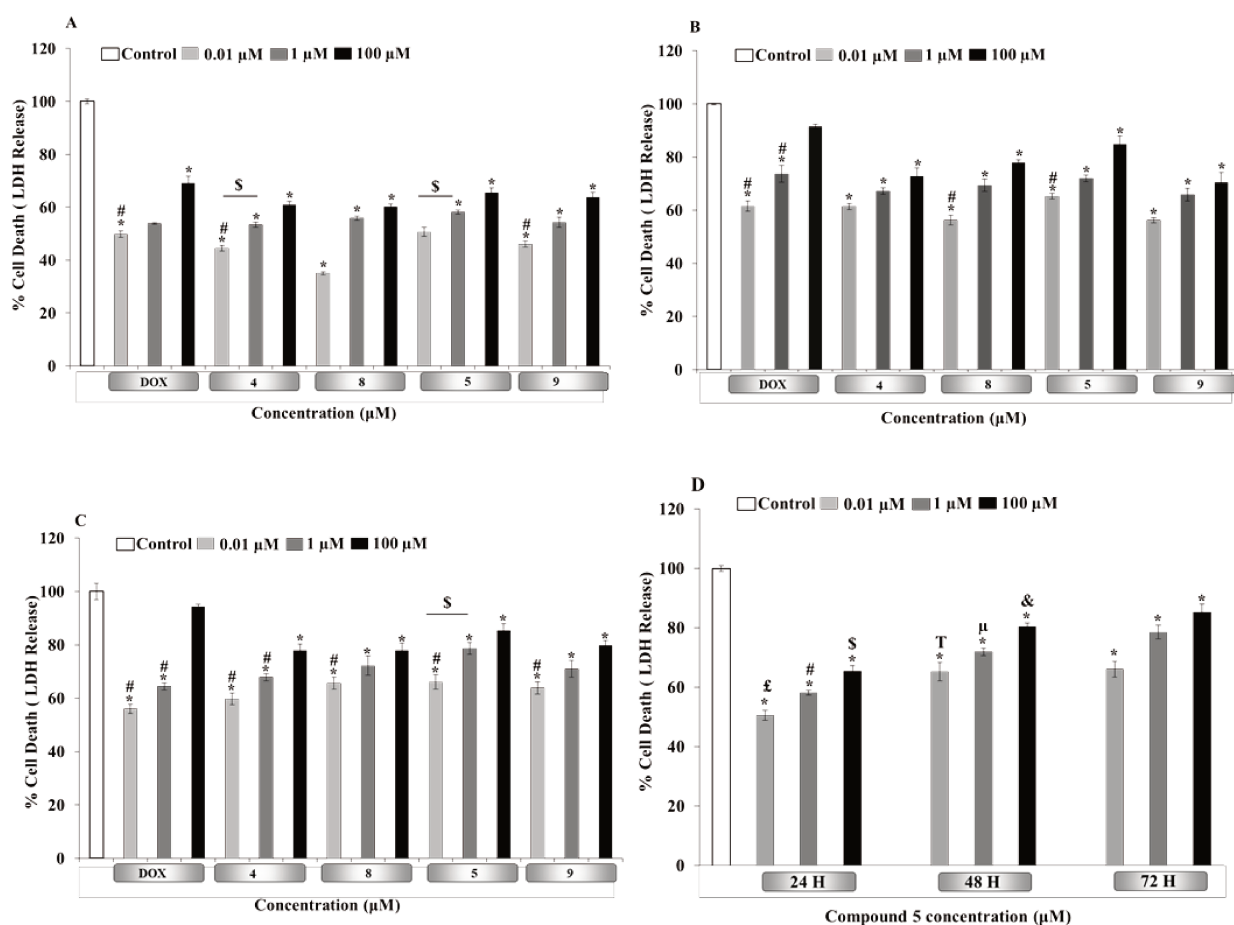


Figure 2. Effect of compounds 4, 5, 8 and 9 on LDH release induced by Huh7 cells (A, B, C). The addition of 100 μM , 1 μM and 0.01 μM was during 24h (A), 48h (B) and 72h (C). Results are represented as percent Huh7 death.

(A) * $P < 0.05$ versus compounds Dox, 4, 5, 8 and 9, \$ $P < 0.05$ versus the concentration of 1 μM of all compounds, # $P < 0.05$ versus the concentration of 100 μM of all compounds

(B) * $P < 0.05$ versus Dox, 4, 5, 8 and 9 except Dox 100 μM , # $P < 0.05$ versus the concentration 100 μM of all compounds

(C) * $P < 0.05$ versus Dox, 4, 5, 8 and 9 except Dox 100 μM , \$ $P < 0.001$ versus 0.01 μM

$P < 0.05$ versus the concentration 100 μM of all compounds.

(D): Effect of compound 5 only on LDH release for 24h, 48h and 72h. * $P < 0.001$ versus control, £ $P < 0.05$ versus 0.01 μM 48h and 0.01 μM 72h, # $P < 0.001$ versus 1 μM 48 h and 1 μM 72h, T $P < 0.05$ versus 0.01 μM 72h, μ $P < 0.05$ versus 1 μM 72h, & $P < 0.05$ versus 100 μM 72h.

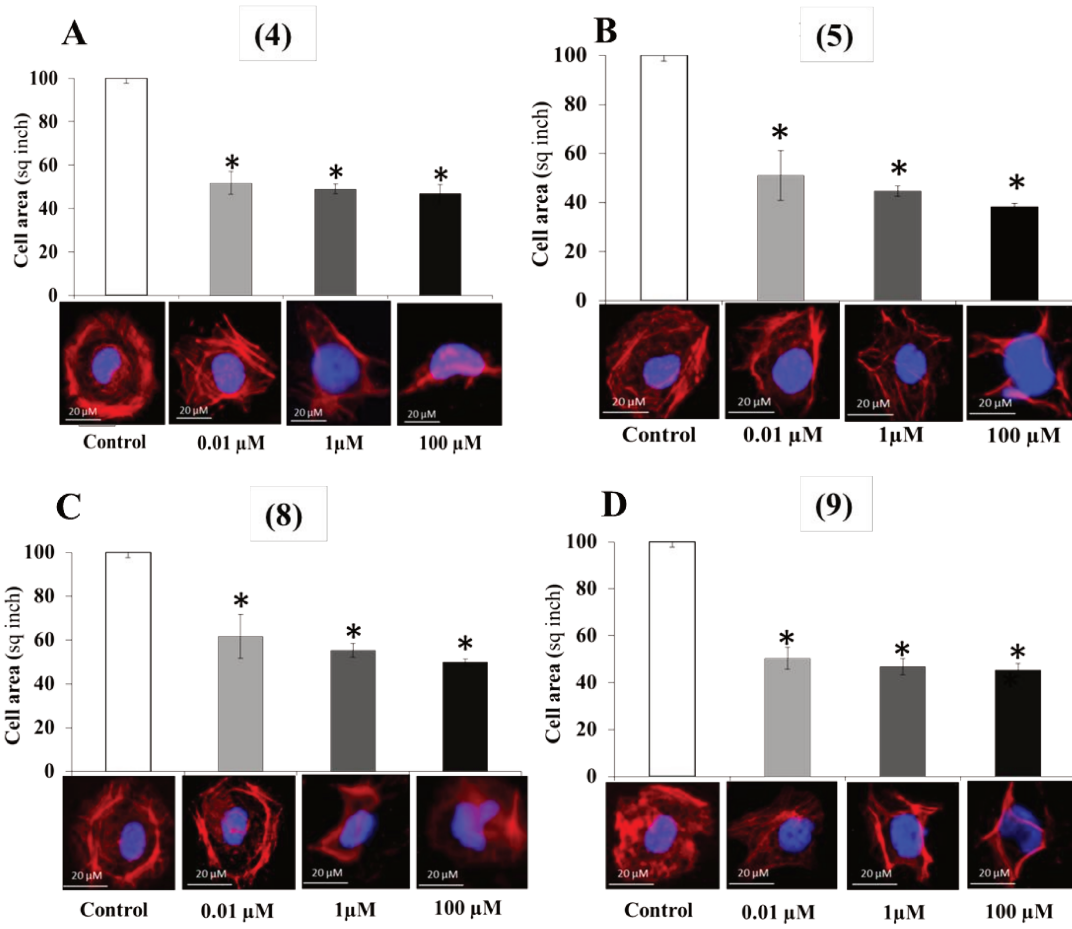


Figure 3. HCD inhibition of Huh7 cell spreading. In adequate time (3h) and for adequate concentration (0.01μM, 1μM and 100μM) 3000 cells/well were plated in glass LabTek, washed with PBS and fixed with 1% PFA. Huh7 were then stained with Phalloidin (F-actin: red) and DAPI (Nucleus: blue), then were imaged with fluorescence microscope. Cell spreading was quantified using Scion image software. High resolution zoom images of F-actin distribution in Huh7 cells. White scale bar = 20 μm. *P<0.0001 as compared to untreated control cells.

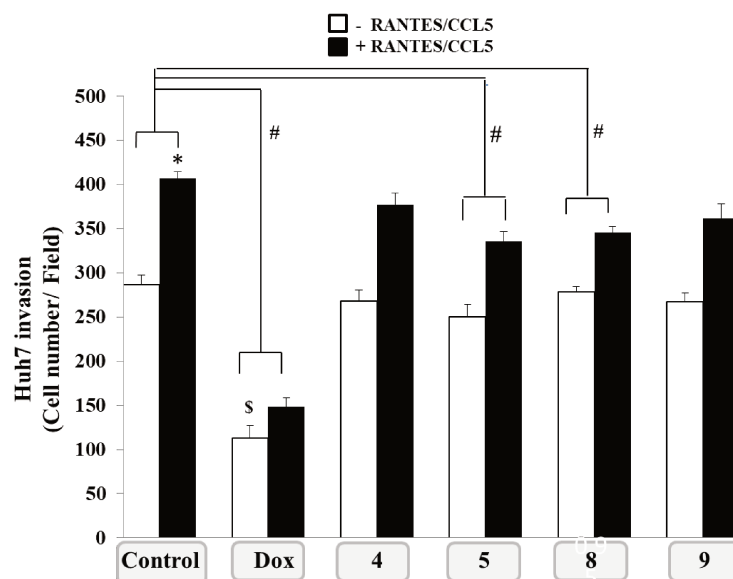


Figure 4: Invasiveness of Huh7 in presence of 4-hydroxycoumarin derivatives. Huh7 cell invasion was performed for 24h in presence of 1 μ M of compounds Dox, 4, 5, 8 and 9 and was chemoattracted by RANTES/CCL5 (+RANTES/CCL5) or not (- RANTES/CCL5). Results are indicated as cell number/field. * $P < 0.05$ versus control - RANTES/CCL5, \$ $P < 0.05$ versus control - RANTES/CCL5, # $P < 0.05$ versus induction by RANTES/CCL5 for control, $n=3$.

% of Huh7 in cell cycle phases (mean \pm SEM)

Treatments	Sub-G1	G0-G1	S+G2/M
Untreated cells	27,92 % \pm 11,38 %	37,50 % \pm 4,08 %	34,59 % \pm 9,73 %
Dox (1μM)	67,42 % \pm 6,21 % *	21,45 % \pm 10,57%	11,13 % \pm 4,42 % *
Dox (10μM)	59,42 % \pm 7,46 % *	24,96 % \pm 5,52 %	15,63 % \pm 3,91 % *
4 (1 μ M)	42,87 % \pm 11,93 %	31,46 % \pm 4,26 %	25,67 % \pm 8,40 %
4 (10 μ M)	35,31 % \pm 7,55 %	35,63 % \pm 1,58 %	29,06 % \pm 7,89 %
5 (1 μ M)	34,72 % \pm 3,49 %	35,91 % \pm 4,40 %	29,37 % \pm 3,50 %
5 (10μM)	54,64 % \pm 17,29 % *	22,11 % \pm 5,08 %	21,58 % \pm 10,6 %
8 (1 μ M)	37,40 % \pm 7,77 %	34,05 % \pm 1,27 %	28,55 % \pm 6,70 %
8 (10 μ M)	41,44 % \pm 5,70 %	33,76 % \pm 2,70 %	24,80 % \pm 8,01 %
9 (1 μ M)	34,00 % \pm 3,41 %	35,06 % \pm 2,88 %	30,94 % \pm 1,34 %
9 (10μM)	54,41 % \pm 10,35 % *	27,01 % \pm 5,33 %	18,59 % \pm 5,12 %

Table III. Effect of coumarinic derivatives products on Huh7 cell cycle progression. Huh7 were serum deprived for one night and treated or not with coumarinic derivatives or Doxorubicin for 24h at 1 or 10 μ M. Then, cells were stained with propidium iodide-PBS and analysis by flow cytometry. Cell histogram on FL2 was divided into three parts according to the cell cycle phases, sub-G₁, G₀-G₁ and S+G₂-M. Data are presented with the mean \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$ versus untreated cells.

References

- [1] World Health Organization: World Cancer Report. pp. Chapter 5.6: [ISBN 9283204298](#), 2014.
- [2] Poole SK, Poole CF: Thin-layer chromatographic method for the determination of the principal polar aromatic flavour compounds of the cinnamons of commerce. *Analyst* 119: 113-120, 1994.
- [3] Rosselli S, Maggio AM, Faraone N, Spadaro V, Morris-Natschke SL, KF Bastow, Lee KH, Bruno M: The cytotoxic properties of natural coumarins isolated from roots of *Ferulagocampestris* (Apiaceae) and of synthetic ester derivatives of aegelinol. *Nat Prod Commun* 4: 1701-1706, 2009.
- [4] Whang WK, Park HS, Ham I, Oh M, Namkoong H, Kim KH, Hwang DW, Hur SY, Kim TE, Park YG: Natural compounds, fraxin and chemicals structurally related to fraxin protect cells from oxidative stress. *Exp Mol Med* 37: 436-446, 2005.
- [5] Shin E, Choi KM, Yoo HS, Lee CK, Hwang BY, Lee MK: Inhibitory effects of coumarins from the stem barks of *Fraxinusrhynchophylla* on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Biol Pharm Bull* 33: 1610-1614, 2010.
- [6] Teng CM, Lin CH, Ko FN, Wu TS, Huang TF: The relaxant action of osthole isolated from *Angelica pubescens* in guinea-pig trachea, Schmiedeb. *Arch Pharmacol* 349: 202-208, 1994.
- [7] Crichton EG, Waterman PG, Dihydromammea c/ob: a new coumarin from the seed of *Mammea africana*. *Phytochemistry* 17: 1783-1786, 1978.
- [8] Baek NI, Ahn AM, Kim HY, Park YD: Furanocoumarins from the root of *Angelica dahurica*, *Arch Pharm Res* 23: 467-470, 2000.
- [9] Fort D, Rao K, Jolad S, Luo J, Carlson J, King S: Antihyperglycemic activity of *Teramnuslabialis* (Fabaceae). *Phytomedicine* 6: 465-467, 2000.
- [10] Piller N: A comparison of the effectiveness of some anti-inflammatory drugs on thermal oedema, *Br J Exp Pathol* 56: 554, 1975.
- [11] Patil AD, Freyer AJ, Eggleston DS, Haltiwanger RC, Bean MF, Taylor PB, Caranfa MJ, Breen AL, Bartus HR: The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophylluminophyllum* Linn. *J Med Chem* 36: 4131-4138, 1993.

- [12] Spino, Dodier M, Sotheeswaran S: Anti-HIV coumarins from *Calophyllum* seed oil, *Bioorg. Med Chem Lett* 8: 3475-3478, 1998.
- [13] Luo KW, Sun JG, Chan JW, Yang L, Wu SH, Fung KP, Liu FY: Anticancer effects of imperatorin isolated from *Angelica dahurica*: induction of apoptosis in HepG2 cells through both death-receptor-and mitochondria mediated pathways. *Chemotherapy* 57: 449-459, 2011.
- [14] Velasco-Velázquez MA, Agramonte-Hevia J, Barrera D, Jiménez-Orozco A, García-Mondragón MJ, Mendoza-Patiño N, Landa A, Mandoki J: 4-Hydroxycoumarin disorganizes the actin cytoskeleton in B16–F10 melanoma cells but not in B82 fibroblasts, decreasing their adhesion to extracellular matrix proteins and motility. *Cancer Lett* 198: 179–186, 2003.
- [15] Sutton A, Friand V, Papy-Garcia D, Dagouassat M, Martin L, Vassy R, Haddad O, Sainte-Catherine O, Kraemer M, Saffar L, Perret GY, Courty J, Gattegno L, Charnaux N: Glycosaminoglycans and their synthetic mimetics inhibit RANTES-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Mol Cancer Ther* 6: 2948–2958, 2007.
- [16] Gerard C, Rollins BJ.: Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2: 108–115, 2001.
- [17] Sutton A, Friand V, Brule-Donneger S, Chaigneau T, Ziol M, Sainte-Catherine O, Poire, A, Saffar L, Kraemer M, Vassy J, Nahon P, Salzmann JL, 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* 5: 21–33, 2007.
- [18] Kumar JA, Saidachary G, Mallesham G, Sridhar B, Jain N, Kalivendi SV, Jayathirtha Rao VJ, Raju BC: Synthesis, anticancer activity and photophysical properties of novel substituted 2-oxo-2H-chromenylpyrazolecarboxylates. *European Journal of Medicinal Chemistry* 65: 389-402, 2013.
- [19] Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM: Activation of Rac and Cdc42 by Integrins Mediates Cell Spreading. *Mol Biol Cell* 9(7): 1863–1871, 1998.
- [20] Kajstura M, Halicka HD, Pryjma J, Darzynkiewicz Z: Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. *J Cytometry Part A* 71: 125–131, 2007.
- [21] Kumar JA, Saidachary G, Mallesham G, Sridhar B, Jain N, Kalivendi SV, Rao VJ, Raju BC: Synthesis, anticancer activity and photophysical properties of novel substituted 2-oxo-2H-chromenylpyrazolecarboxylates *Eur J Med Chem* 65: 389-402, 2013.

- [22] Colotta V, Cecchi L, Filacchioni G, Melani F, Palazzino G, Martini C, Giannaccini G, Lucacchini A: Synthesis, binding studies, and structure activity relationships of 1-aryl- and 2-aryl[1]benzopyranopyrazol-4-ones, central benzodiazepine receptor ligands. *J Med Chem* 31(1): 1–3, 1988.
- [23] Hlawaty H, Suffee N, Sutton A, Oudar O, Haddad O, Olivier 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* 81(2): 233-43, 2011.
- [24] Abe K, Matsuki N: Measurement of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res* 38: 325-329, 2000.
- [25] Li R, Xie J, Wu H, Li G, Chen J, Chen Q, Wang L, Xu B: Syndecan-4 shedding impairs macrovascular angiogenesis in diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Comm* 474: 15-21, 2016.
- [26] Haddad O, Guyot E, Marival N, Chevalier F, L Maillard, Gadi L, Laguillier-Morizot C, Oudar O, Sutton A, Charnaux N, Hlawaty H: Heparanase and syndecan-4 are involved in low molecular weight fucoidan-induced angiogenesis. *Mar Drugs* 13: 6588–6608, 2015.
- [27] Sutton A, Friand V, Brule-Donneger S, Chaigneau T, Zioli M, Sainte-Catherine O, Poiré A, Saffar L, Kraemer M, Vassy J, Nahon P, Salzmann JL, Gattegno L, Charnaux N: Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 stimulates human hepatoma cell growth, migration and invasion. *Mol Cancer Res* 5 (1): 21–33, 2007.
- [28] Haddad O, Guyot E, Marival N, Chevalier F, Maillard L, Gadi L, Laguillier-Morizot L, Oudar L, Sutton A, Charnaux N, Hlawaty H: Heparanase and Syndecan-4 Are Involved in Low Molecular Weight Fucoidan-Induced Angiogenesis. *Mar Drugs* 13(11): 6588-6608, 2015.
- [29] Grover J, Kumar V, Sobhia ME, Jachak MS: Synthesis, biological evaluation and docking analysis of 3-methyl-1-phenylchromeno [4, 3-c] pyrazol-4(1H)-ones as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24: 4638–4642, 2014.
- [30] Hamdi N, Fischmeister C, Puerta MC, Valerga P: A rapid access to new coumarinylchalcone and substituted chromeno[4,3-c]pyrazol-4(1H)-ones and their antibacterial and DPPH radical scavenging activities. *Med Chem Res* 20: 522-530, 2011.

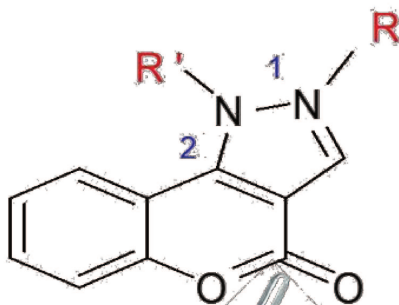
[31] Sun Z, Khan J, Makowska-Grzyska M, Zhang M, Cho JH, Suebsuwong C, Vo P, Gollapalli DR, Kim Y, Joachimiak A, Hedstrom L, Cuny GD: Synthesis, in Vitro Evaluation and Cocrystal Structure of 4-Oxo-[1]benzopyrano[4,3-c]pyrazole Cryptosporidium parvum Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase (CpIMPDH) Inhibitors. *J Med Chem* 57: 10544-10550, 2014.

[32] Manmohan Reddy Leleti, William D. Thomas, Penglie Zhang, Andrew M.K. Pennell, Inventors, Chemocentryx, Inc. Filed March 30th 2007, and issued October 11th 2007. Cxcr4 modulators. Patent n° WO 2007115232 A2.

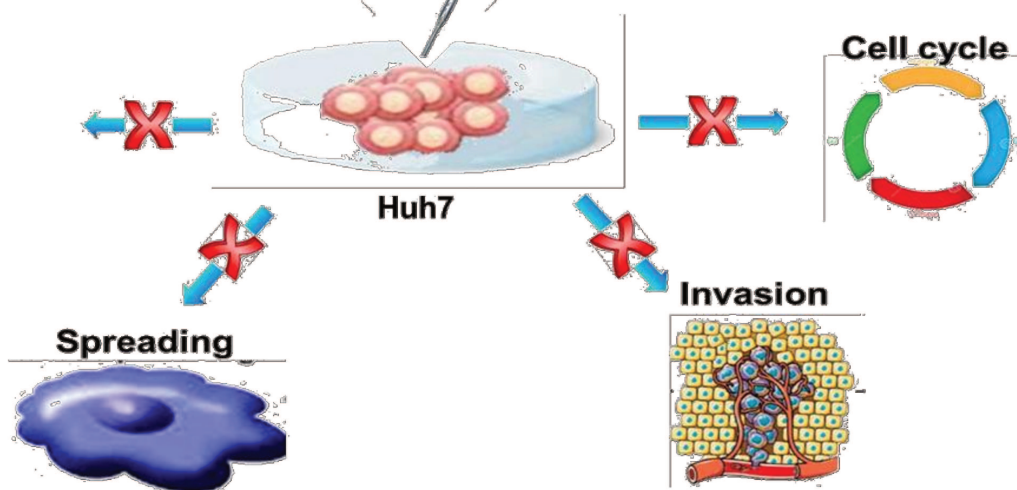
[33] Krauth F, Dahse H-M, Rüttinger H-H, Froberg P: Synthesis and characterization of novel 1, 2, 4-triazine derivatives with antiproliferative activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 10: 1816-1821, 2010.

Graphical abstract

IC₅₀= 10.84 μM
IC₅₀= 10.37 μM



IC₅₀=11.02 μM
IC₅₀= 12.94 μM



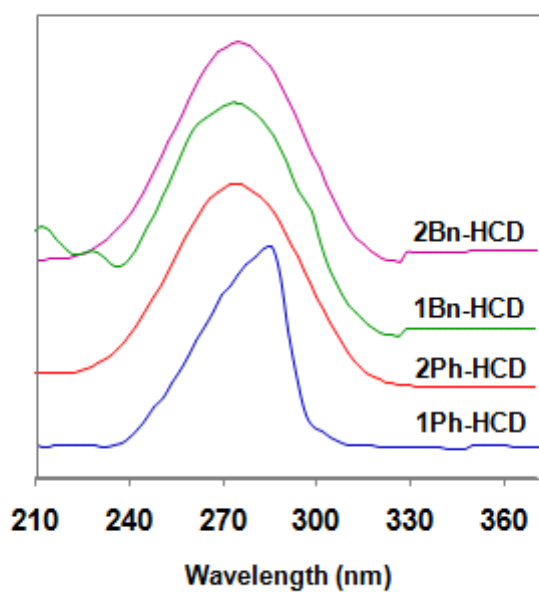
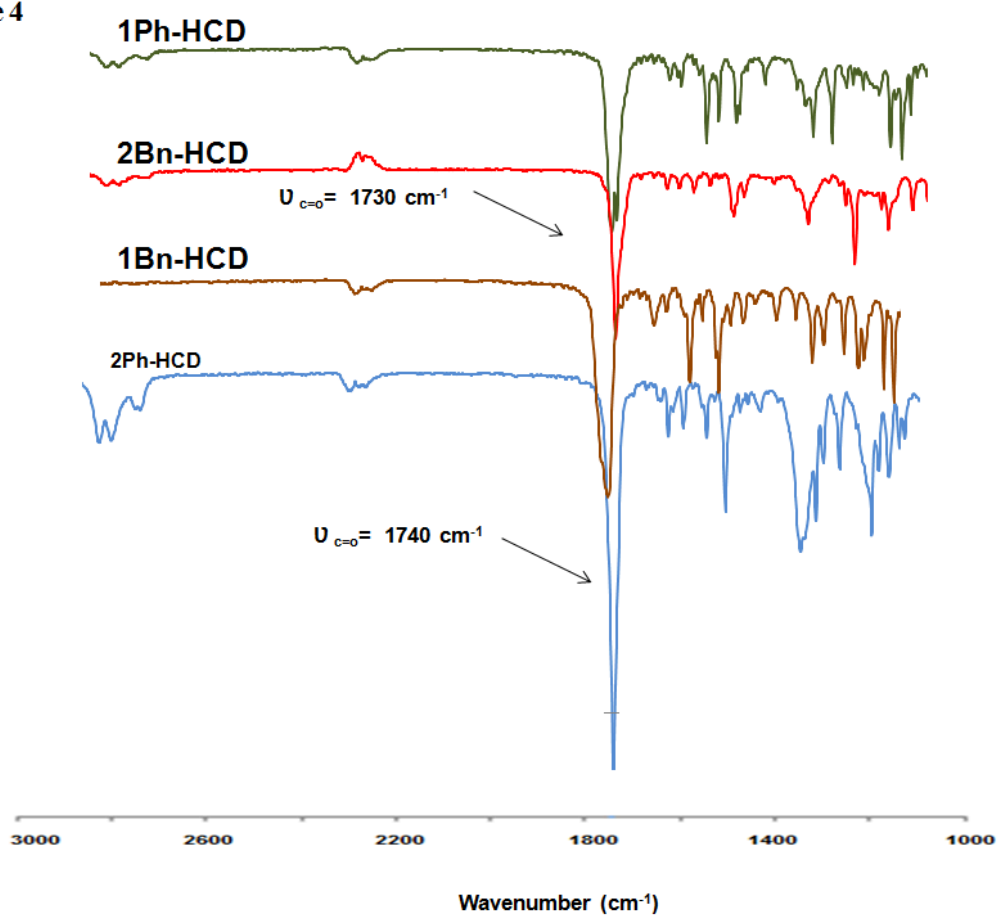
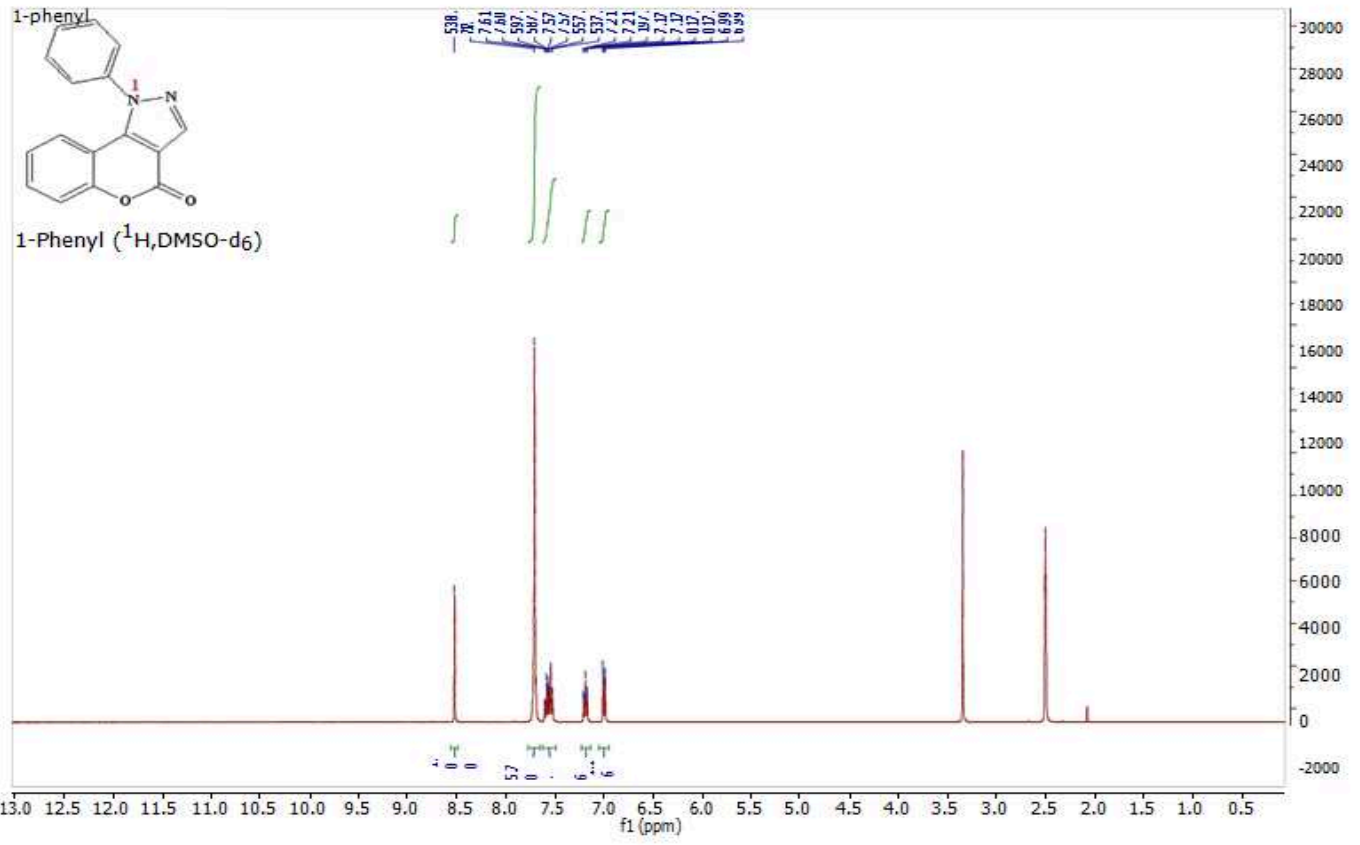
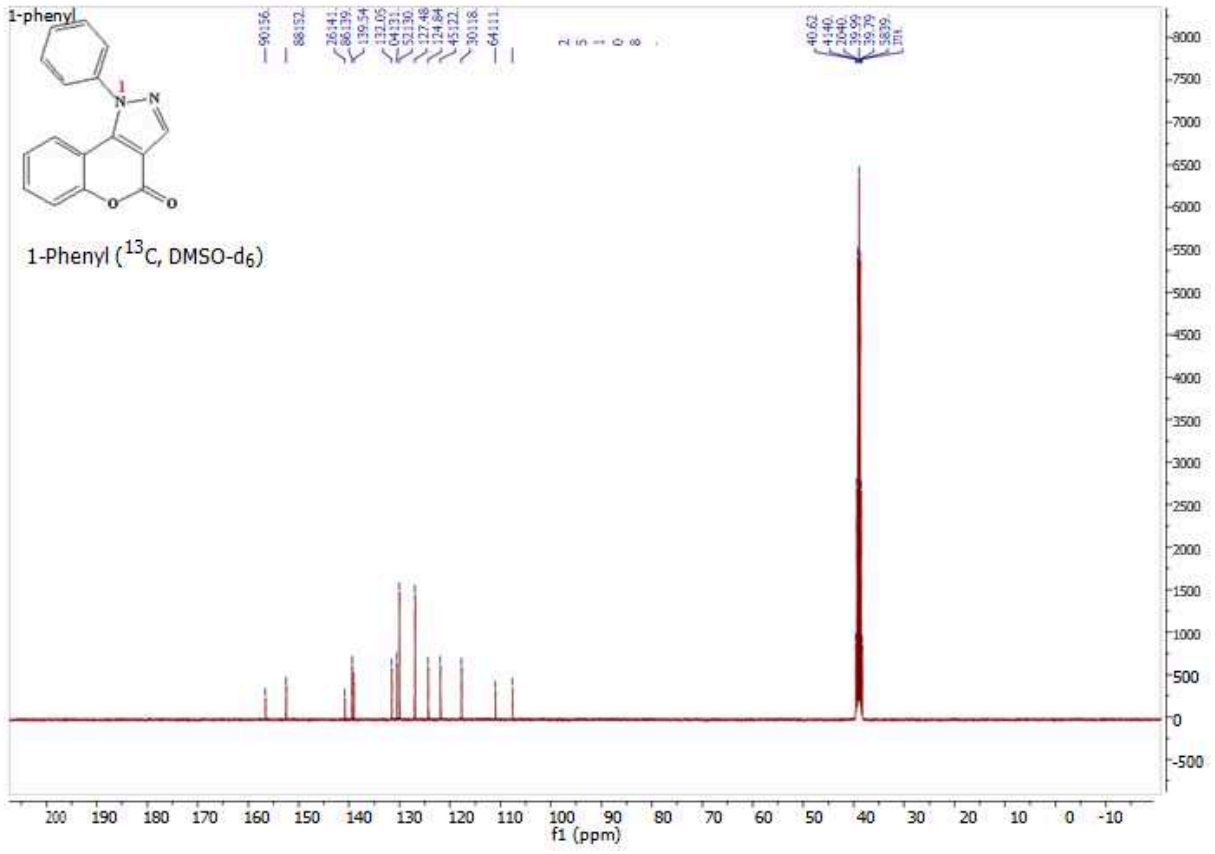


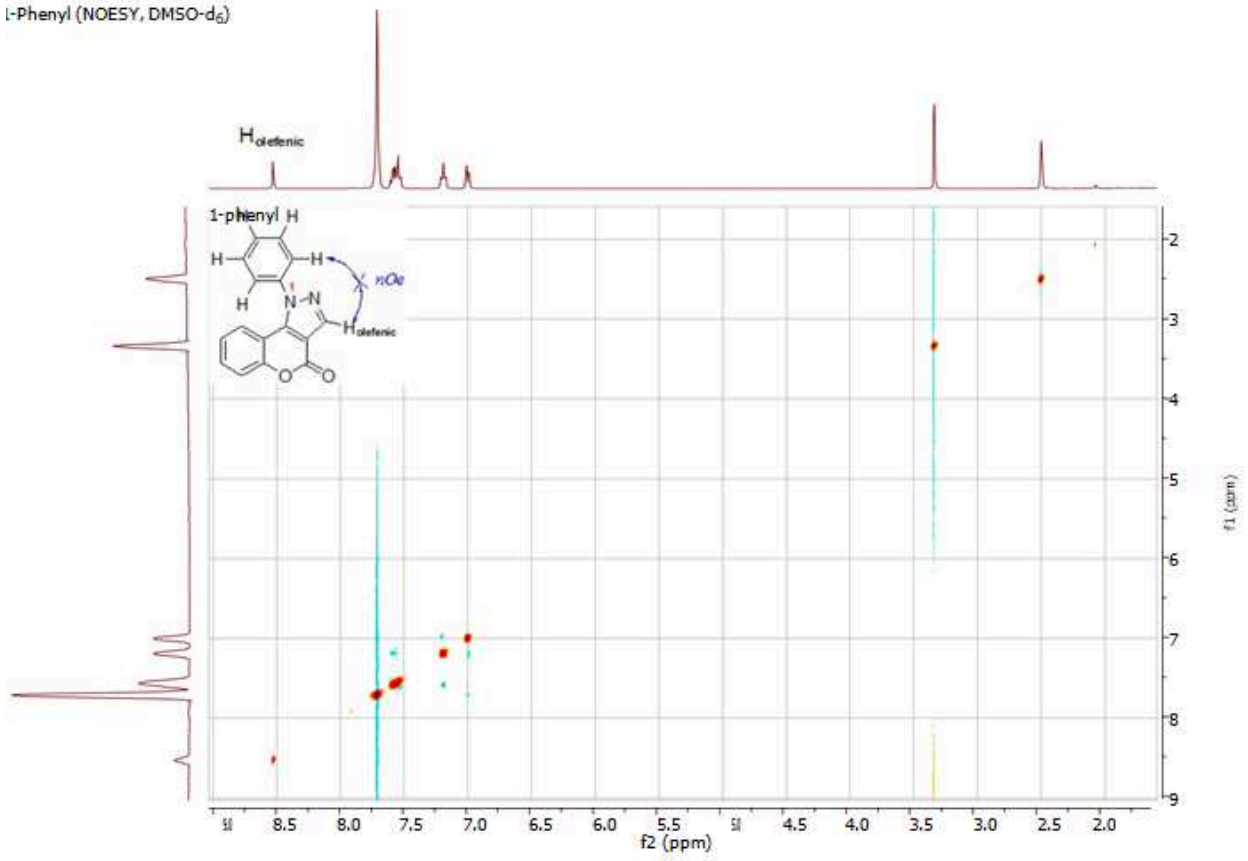
Figure 4

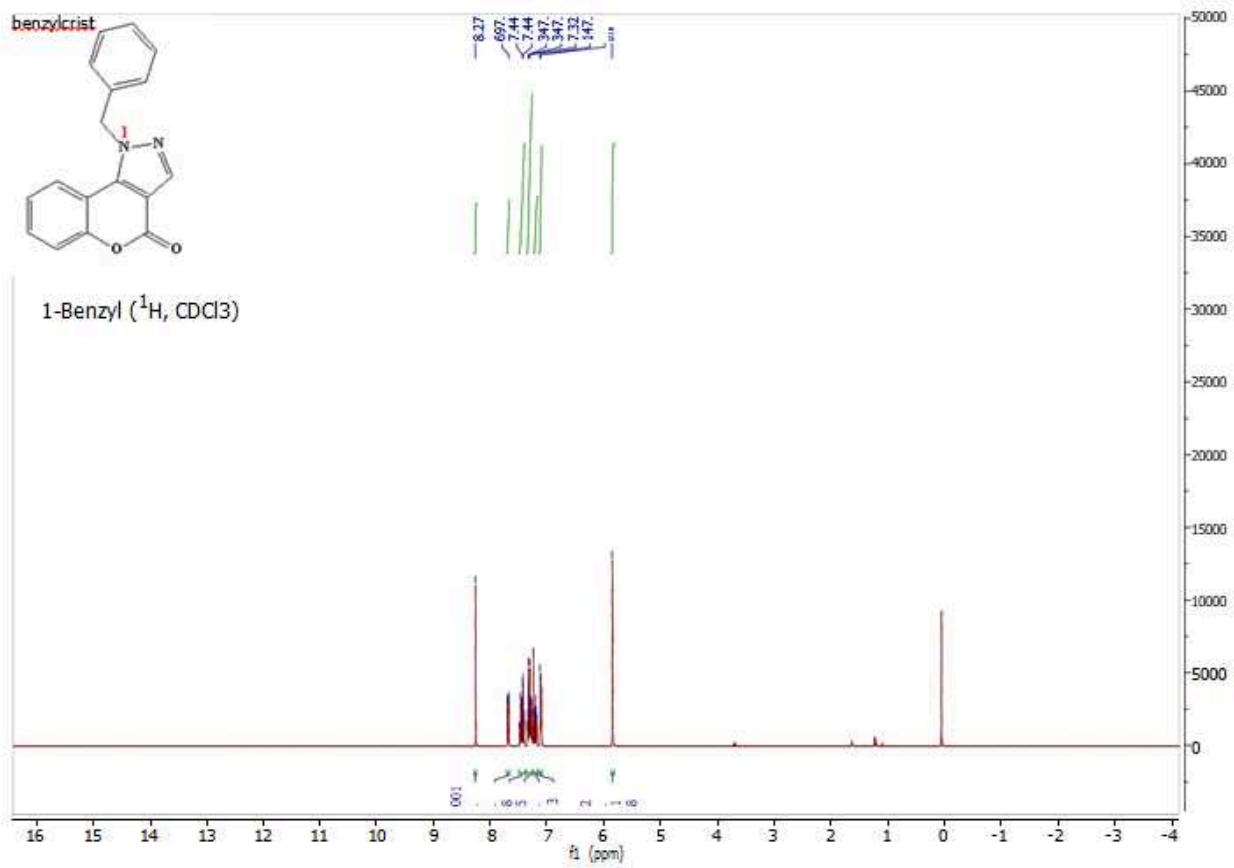


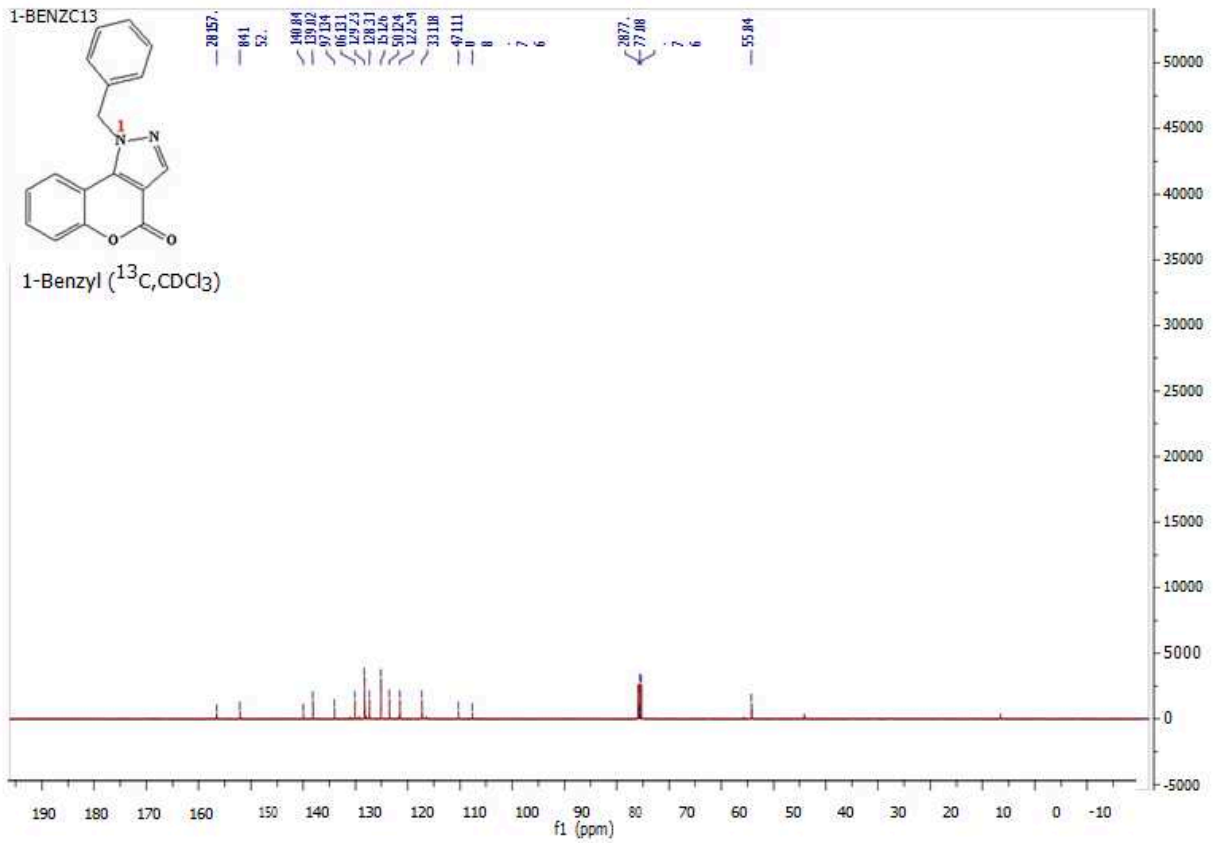


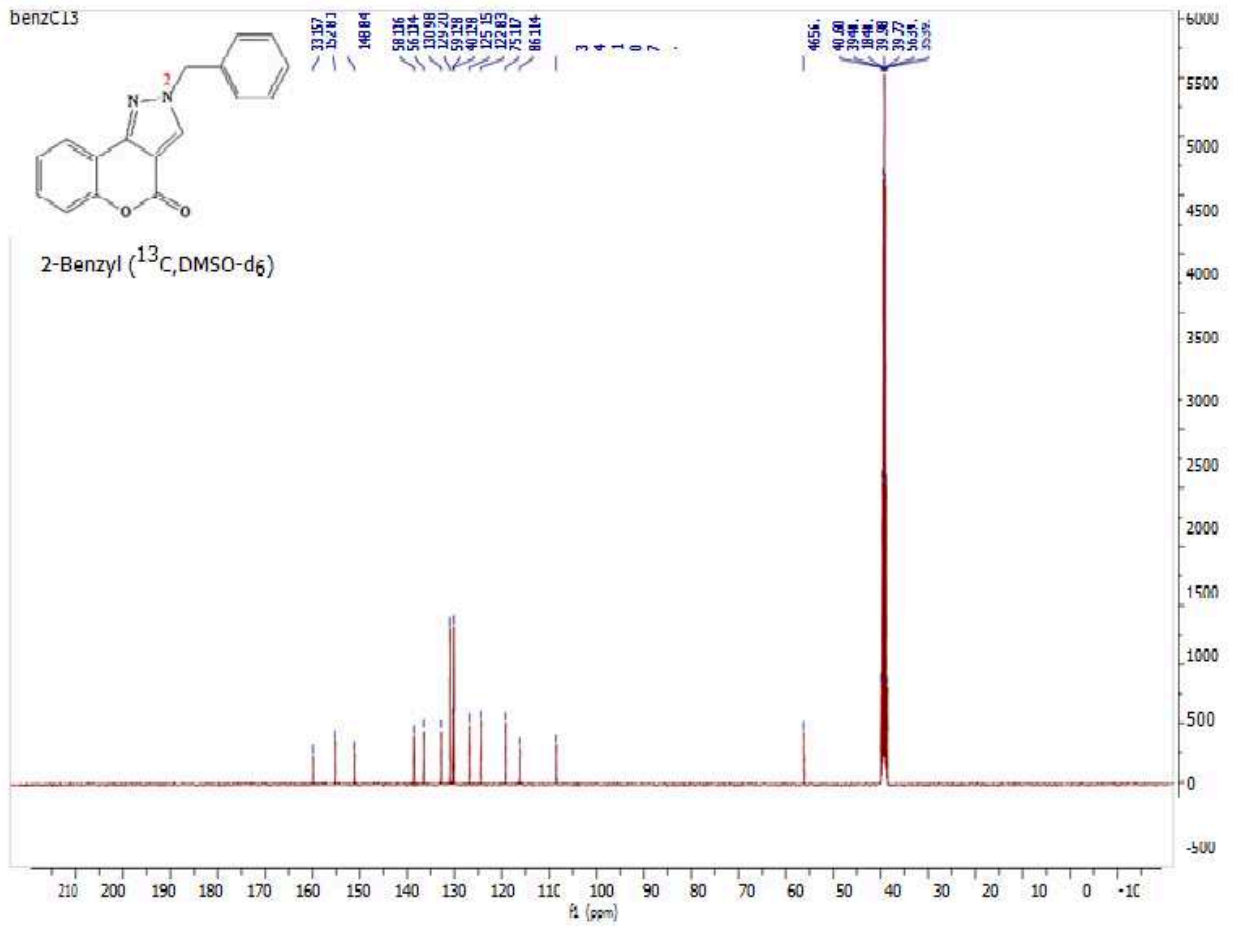


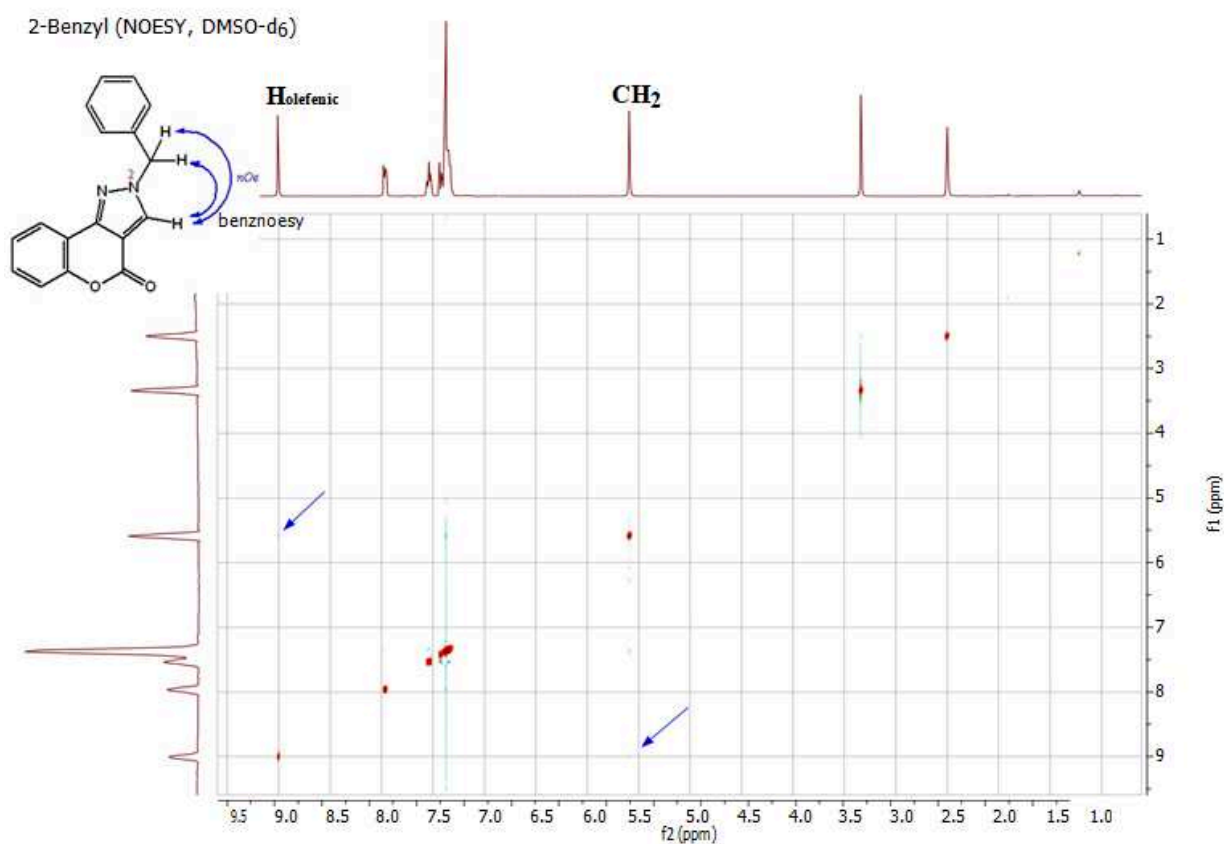
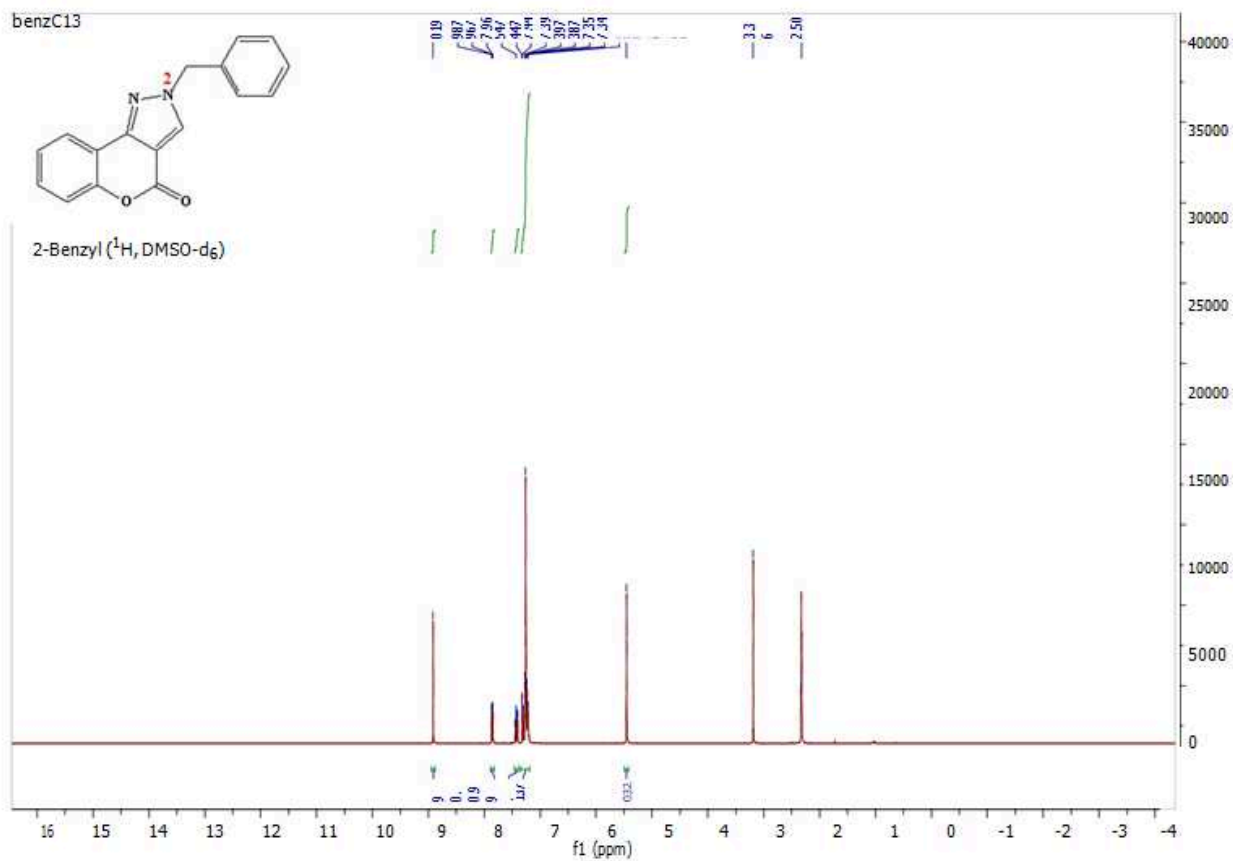
1-Phenyl (NOESY, DMSO-d₆)

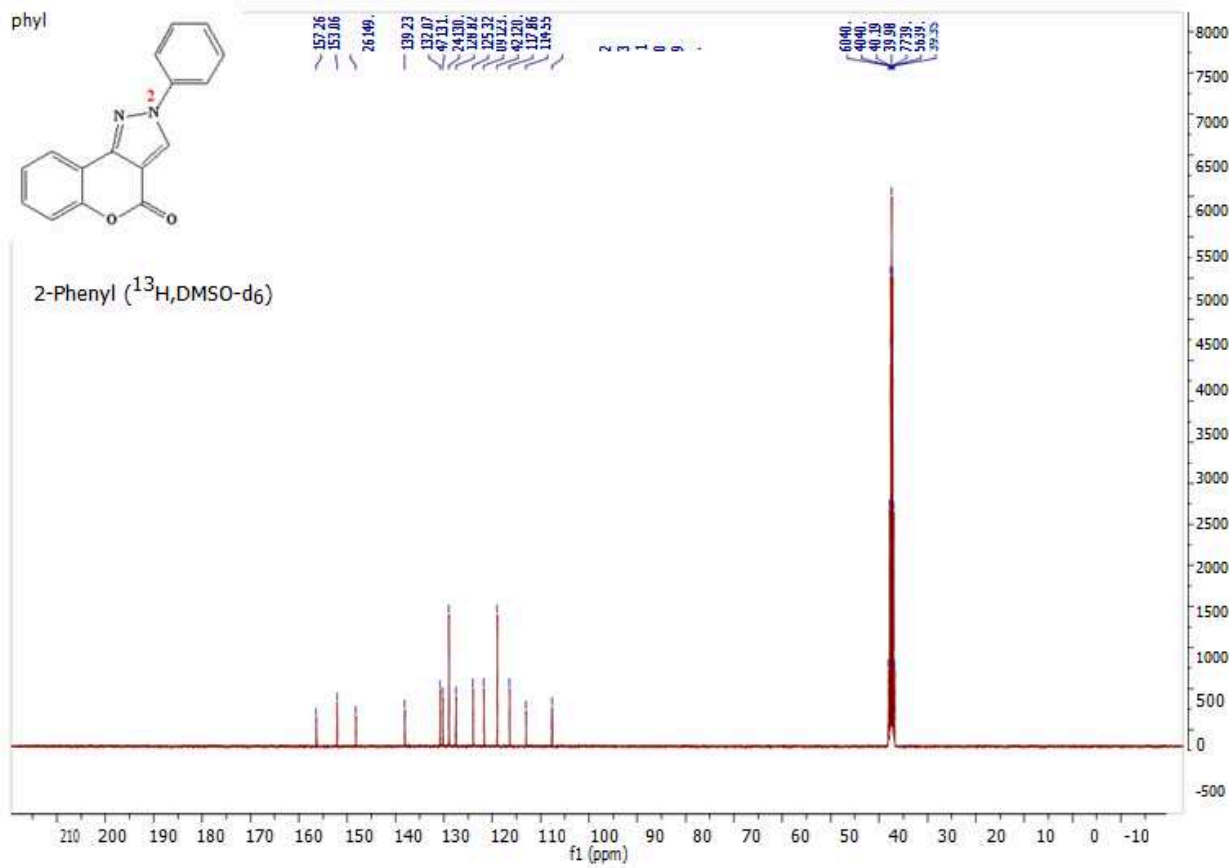
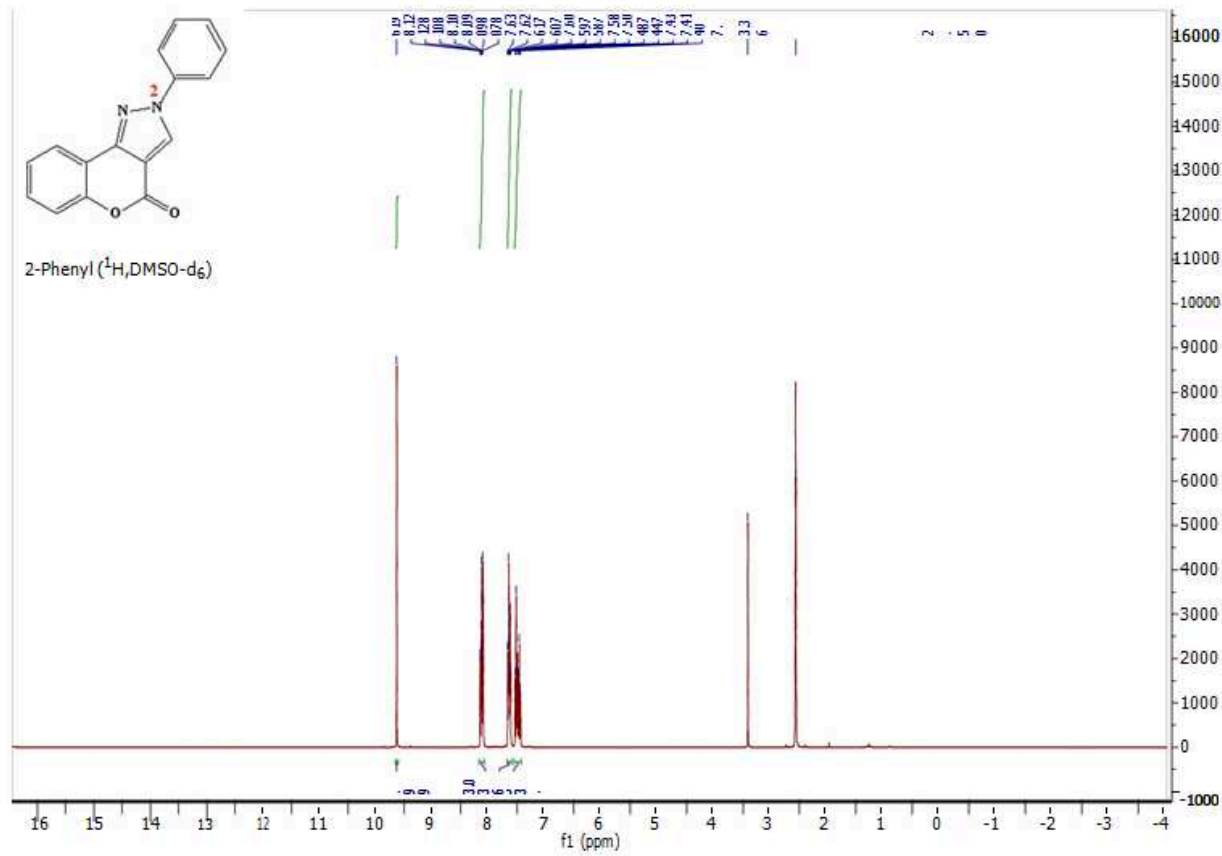




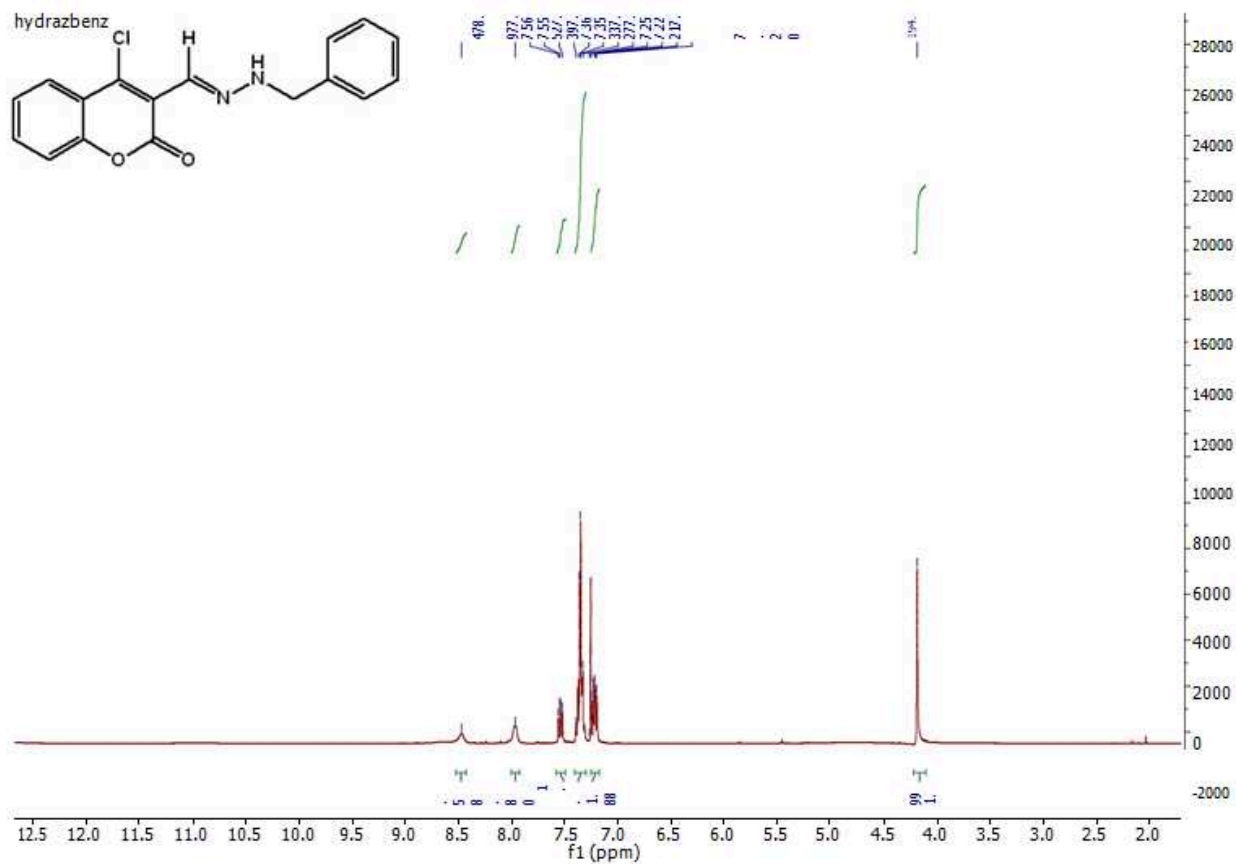
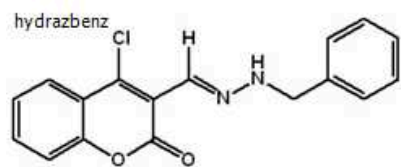
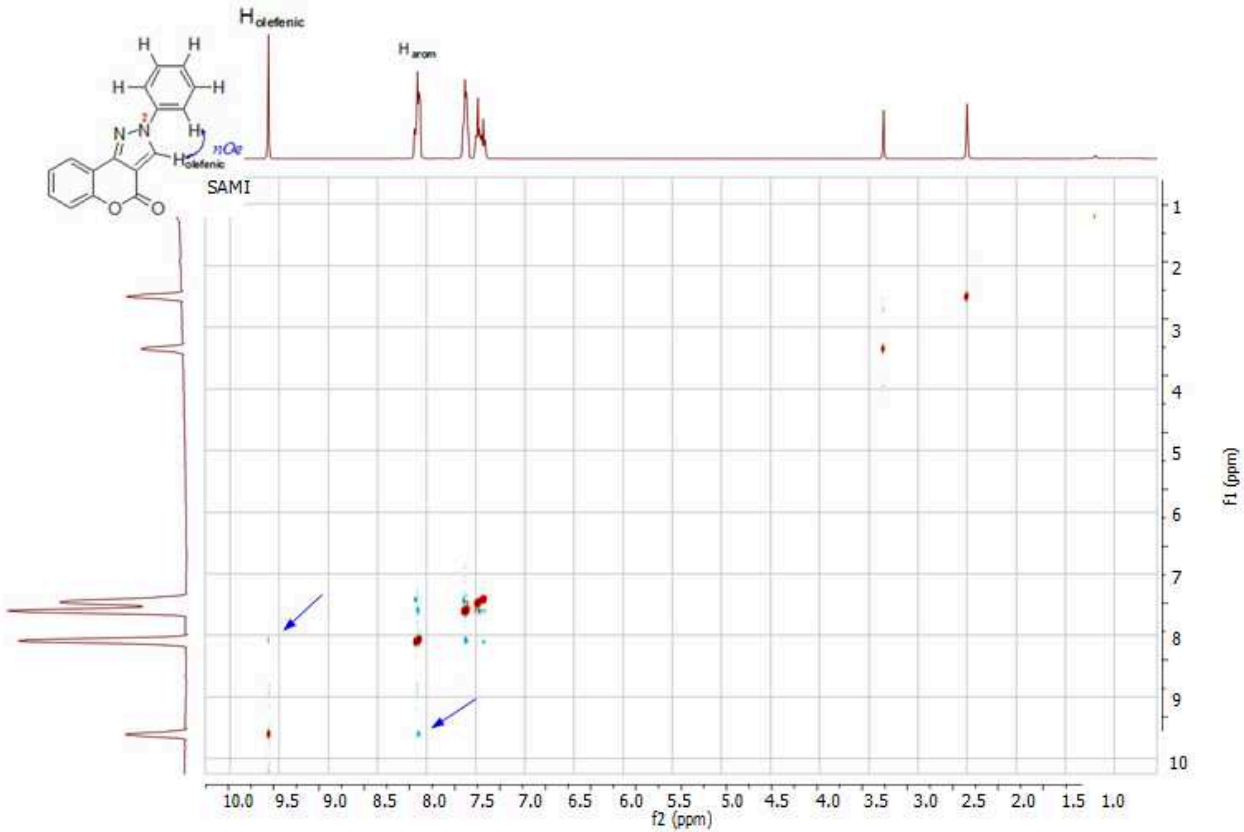




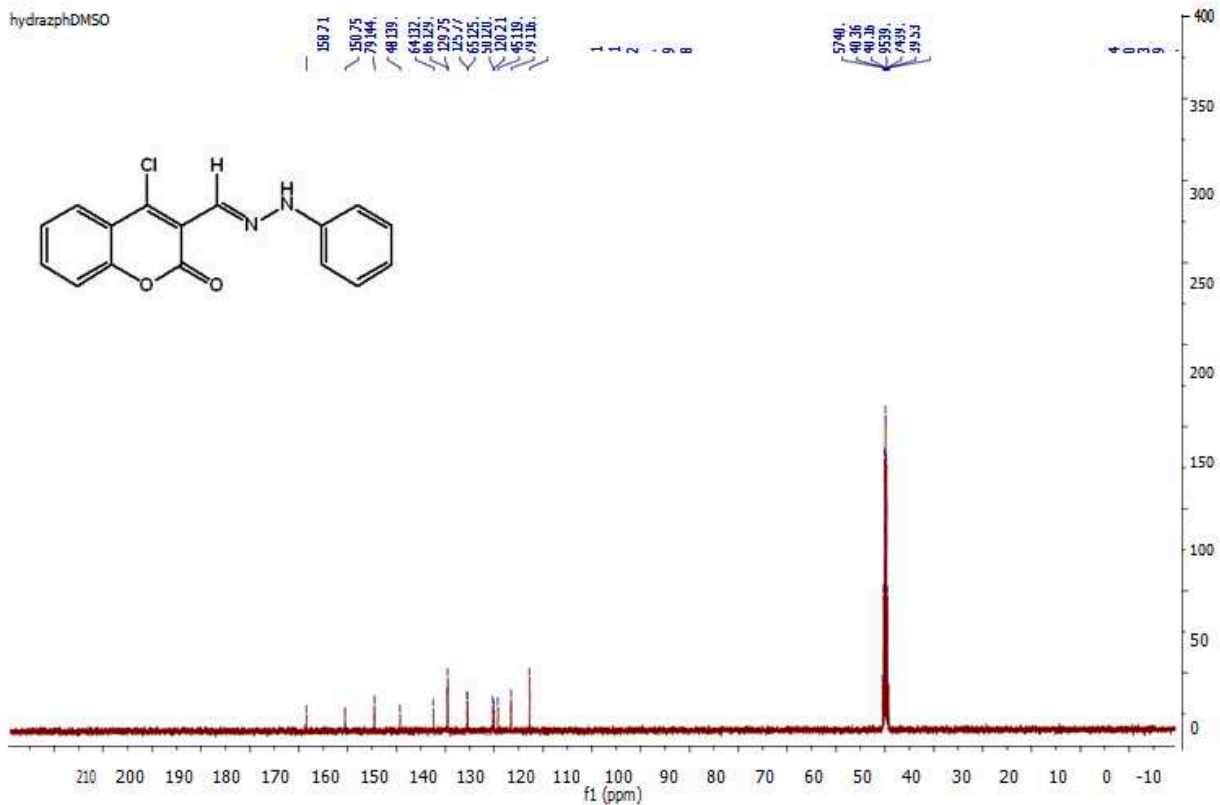




2-Phenyl (NOESY, DMSO-d₆)



hydrazphDMSO



Les pathologies ischémiques constituent l'une des principales causes de mortalité dans le monde. En situation ischémique, afin d'éviter une nécrose tissulaire, la stimulation de l'angiogenèse est permise par la synthèse de facteurs pro-angiogéniques comme des chimiokines ou des microARNs (miRs). CXCL12 (SDF-1 α), est une chimiokine exprimée par les cellules endothéliales en situation d'ischémie. Le miR-126 (miR-126-3p et miR-126-5p) est impliqué dans l'angiogenèse en accélérant le recrutement de progéniteurs endothéliaux attirés par CXCL12, en stimulant l'expression de ses récepteurs à la surface des cellules endothéliales. En revanche, le rôle de CXCL12 dans la régulation de l'expression des miR-126 et leur implication dans le processus angiogénique induite par cette dernière demeure inconnue. Durant ma thèse, je me suis intéressé à l'implication des miR-126 et des glycosaminoglycannes (GAGs) dans l'angiogenèse induite par CXCL12.

Nos résultats montrent pour la première fois que CXCL12 induit l'expression du miR-126-3p *in vitro* dans les cellules HUVEC et *ex vivo* dans des aortes de rats. De plus, le miR-126-3p est nécessaire à la formation de réseaux vasculaires (*in vitro* et *ex vivo*) et au processus de migration des HUVEC induite par CXCL12. Par ailleurs, nous montrons que CXCL12 induit une diminution de l'expression protéique de SPRED-1 (une cible connue du miR-126-3p) et cette inhibition stimule de façon plus importante la formation de réseaux vasculaires induite par CXCL12. Enfin, nous montrons que les GAGs sont nécessaires à la formation de réseaux vasculaires (*in vitro* et *ex vivo*) induite par CXCL12.

Ischemic diseases are one of the leading causes of death in the world. In ischemic tissue, in order to avoid tissue necrosis, angiogenesis is stimulated through pro-angiogenic factors synthesis such as chemokines or microRNAs (miRs). CXCL12 (SDF-1 α), is a pro-angiogenic chemokine expressed by endothelial cells in ischemic conditions. miR-126 (miR-126-3p and miR-126-5p) is involved in angiogenesis by accelerating endothelial progenitor's recruitment induced by CXCL12, by stimulating the expression of its receptors on the endothelial cells surface. On the other hand, the role of CXCL12 in miR-126 regulation and their involvement in angiogenic processes induced by CXCL12 remains unknown. During my thesis, I was interested in the involvement of miR-126 and glycosaminoglycans (GAGs) in CXCL12-induced angiogenesis.

Our results showed for the first time that CXCL12 induces miR-126-3p expression *in vitro* in HUVEC and *ex vivo* in rat aorta. In addition, miR-126-3p is necessary for the formation of vascular networks (*in vitro* and *ex vivo*) and for CXCL12-induced HUVEC migration process. In addition, we showed that CXCL12 induces a decrease of SPRED-1 protein expression (a known target of miR-126-3p) and this inhibition have stimulated the formation of vascular networks induced by CXCL12 more significantly. Finally, we showed that GAGs are necessary for the formation of vascular networks (*in vitro* and *ex vivo*) induced by CXCL12.

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Mots clés : CXCL12, miR-126, Angiogenèse, Glycosaminoglycannes, Cellules endothéliales
LVTS, INSERM U1148, Groupe Biothérapies et Glycoconjugués, Université Paris 13, UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin 93000, Bobigny, France