

N° d'ordre :

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

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ SORBONNE PARIS NORD**

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par :

**Meriem NAIM**

Le 8 Décembre 2022

*« Modèle des cellules endothéliales appauvries en glycosaminoglycannes : impact sur les processus cellulaires impliqués dans l'angiogenèse. »*

École doctorale : ED146 - Galilée

Unité de recherche : Inserm U1148 Laboratory for Vascular Translational Science

Groupe : Biothérapies et Glycoconjugués

Directrice de thèse : Pr SUTTON Angela

Co-encadrante de thèse: Dr HLAWATY Hanna

---

### JURY

Dr BIARD Denis (CR, HDR, CEA)

Dr BARANGER Kevin (CR, HDR, CNRS, Université de la Rochelle)

Dr DAGOUASSAT Maylis (MCF, Université Paris Est Créteil)

Pr LEDOUX Dominique (Pr, Université Sorbonne Paris Nord)

Dr HLAWATY Hanna (MCF, Université Sorbonne Paris Nord, IUF)

Pr SUTTON Angela (PU-PH, Université Sorbonne Paris Nord)

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Co-encadrante de thèse

Directrice de Thèse

## Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie le Dr Denis Biard pour son investissement et le temps accordé pour l'évaluation de ce travail. Je remercie le Dr Kévin Baranger de faire le déplacement depuis l'Université de la Rochelle et pour le temps accordé à l'évaluation de ma thèse. Je remercie le Dr Maylis Dagouassat pour avoir accepté d'examiner cette thèse et pour le temps accordé pour son évaluation. Je remercie le Pr Dominique LEDOUX pour avoir accepté d'examiner cette thèse et pour tout ce qu'il nous a apporté durant notre parcours, du Master au Doctorat.

Je tiens à remercier le **Pr Olivier Oudar** pour m'avoir aidée sans hésiter à différentes reprises lorsque j'en ai eu besoin. Merci pour tout le travail accompli pour les étudiants et pour toute votre bonne humeur et votre bienveillance.

**Angela**, la première fois que tu m'as aidée et écoutée, je n'étais pas encore ton étudiante mais tu l'as fait avec la plus grande bienveillance. Moins d'un an plus tard, j'ai intégré ton groupe et je te remercie de me l'avoir permis. Tu as été attentive à chaque fois, tu as su effacer mes doutes sur moi-même, sur la thèse et tout le reste à chaque fois que j'en ai eu. Je te remercie pour ton aide, ta patience, ton encadrement et toute la science que tu m'as transmise. A travers ces quelques mots, je voudrais te transmettre toute ma gratitude et mon profond respect, en te souhaitant une suite de carrière brillantissime et en espérant que nos chemins se recroisent.

**Hanna**, quelle aventure à tes côtés ! Des rires, des pleurs, des réussites et des moments de stress mais on a toujours su rebondir et faire de tout une force et une raison de faire mieux ! Tes conseils, ton soutien et ta bienveillance resteront à jamais gravés dans ma mémoire, depuis le premier jour et jusqu'aux derniers qui ont été riches en émotions. J'ai appris tellement de choses grâce à toi, le raisonnement scientifique, la pédagogie et toutes les choses que je n'aurais jamais pu deviner et que tu m'as transmises avec toute ta bienveillance. Je t'en remercie du fond du cœur et te souhaite une suite de carrière magnifique. J'espère et ferai en sorte que la fin de la thèse ne soit pas la fin de nos relations.

**Kévin**, au départ tu étais mon encadrant de stage, puis mon soutien indéfectible pendant les trois ans de thèse. Je te remercie pour tout, pour le M2, pour la thèse et pour l'après thèse puisque je n'oublierai pas ton soutien et ton aide à chacune de ces étapes. Je souhaite, à travers ces quelques lignes, te témoigner ma gratitude et toute mon estime. Je n'ai aucun doute sur le brio de ta suite de carrière et espère te garder parmi mes amis.

**Jessica**, j'ai été ravie de te connaître au labo et d'échanger avec toi concernant, la vie, la science, le travail et le perso. Merci pour tout le temps que tu m'as accordé à chaque fois, merci pour ta gentillesse et ta bienveillance. Je te souhaite d'aboutir à tous tes vœux professionnels et personnels.

**Oualid**, merci d'avoir été là, à chaque urgence, à chaque question mystérieuse et à chaque besoin ! Ton rôle pivot au labo, ta bienveillance, tes bons conseils et ton don de rassurer quel que soit la situation ont très positivement influencé ma vie au labo. Je te souhaite une très belle suite, digne de ton intelligence et de ton savoir-faire. Et encore très sincèrement, MERCI POUR TOUT.

Je remercie également les filles, sans qui ça aurait été moins drôle, moins agréable et moins GÉNIAL ! **Massa, Fahima et Divya**, je vous remercie pour toute la confiance que vous m'avez accordée dès votre arrivée. Vous m'avez aidée toutes les trois et chacune à sa manière, je vous en suis très reconnaissante.

Je remercie également le laboratoire Hypoxie et Poumon de m'avoir fait bénéficier de leurs animaux. Merci pour cette aide qui m'a permis de réaliser des expériences intéressantes. Je remercie aussi tous

les autres doctorants/ personnels de l'UFR SMBH et particulièrement le laboratoire SIMHEL Merci d'avoir égayé ma présence ici.

A tous les **big boss du B2A, Yoann, Rachel, Laureline, Marie-Paule, Rémy (le DZ), Tania, Riles et Jota**. Merci pour votre accueil, votre aide, et votre soutien. Vous avez tous, sans exception contribué, chacun à sa façon, à rendre cette fin et ce nouveau départ Géniaux ! Grace à vous, j'ai l'impression d'avoir toujours été là.

Je remercie également le Pr Bertrand Friguet, Dr Aurore L'honoré et Pr Khadija el Hadri-Zegouagh de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et de m'avoir permis d'enchaîner sur ce que j'aime le plus, l'enseignement et la recherche.

A **Amel**, plus qu'une amie, une sœur ! Tu comptes pour moi comme une sœur compte pour sa moitié, je serais toujours là pour toi comme tu l'as été et je te souhaite tout le bonheur qu'un magnifique être comme toi mérite, pour ta thèse, ta vie et tout ce qui te tient à cœur. A **Tata Ghania**, la deuxième maman qui m'a toujours rassurée, aidée, soutenue, aimée et sans qui rien n'aurait été pareil. Merci pour tout ma très chère tata. Tu as été là à des moments que je n'aurais peut-être pas surmonté toute seule. Je te porterai toujours dans mon cœur, et te souhaite tout le bonheur du monde.

A mes coucous, **Selma et Yasmine**, les sistas éternelles ! Déjà 12 ans et ça se voit sur nos cheveux blancs et ridules. Quoi vous dire de plus que : Je Vous Aime, et je vous remercie pour tout ce qu'on a vécu ensemble. Nos rires, nos pleures, nos moments d'amour et de chamailles sont tous gravés en moi. Merci pour tout et spécialement pour votre soutien ces trois dernières années. **Ismael**, Mon meilleur ami. C'est aussi pour toi, pour tout ce que tu m'as apporté et tout ton soutien, je te remercie et t'assure d'être toujours là.

A **Linda et Yamine**, une tante et un oncle ou plutôt une grande sœur et un grand frère. Linda, merci pour ton soutien, ton écoute et ton amour. Tu étais loin mais tu m'as toujours soutenue. Yamine, mon grand frère et mon soutien, te savoir pas loin m'a toujours rassurée et je te remercie du fond du cœur pour tout ce que tu es et tout ce que tu fais.

**Papa, Maman ;** Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, depuis ma naissance et jusqu'à aujourd'hui, merci pour votre patience durant mes phases insupportables, merci pour votre amour omniprésent et pour votre soutien indéfectible ! Je vous aime du plus profond de mon âme. Votre bonheur compte plus que le mien et je me lève chaque matin pour vous rendre fiers. Je n'ai qu'un seul souhait, vous voir heureux et en bonne santé pendant des années encore ! Sans vous, je n'aurais jamais été ce que je suis aujourd'hui, vous êtes tout pour moi et je ne vous remercierai jamais assez. Toutes les pages de ce manuscrit ne suffiront pas pour vous exprimer mon amour et ma gratitude ! Chacun de vous a une histoire et un combat derrière lui, qui m'ont toujours inspirée et dans lesquels j'ai puisé ma force, notamment pendant les années de séparation que la distance et la Covid nous ont imposés! Papa il y a plus de 25ans tu me mentionnais dans ta thèse et aujourd'hui je suis très heureuse de te le rendre. Maman, je décrocherai la lune pour toi ! Je vous aime et vous aimerai éternellement.

A toi, qui depuis 11 ans m'apporte bonheur, amour, soutien et assurance. Les mots n'ont jamais été notre fort mais nous les disons sans voix, c'est aussi pour toi...

A tous ceux qui sont loin de moi et pour qui je me suis battue jusqu'à la fin, ma famille et mes amis, d'ici et d'ailleurs !

Je dédie cette thèse à  
tout ce que j'ai de plus cher,  
*mes parents*



# Sommaire

<b>Remerciements.....</b>	<b>2</b>
<b>Liste des illustrations .....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>8</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>9</b>
<b>Avant-propos.....</b>	<b>11</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>12</b>
<b>I. Les maladies cardiovasculaires .....</b>	<b>13</b>
1. Généralités.....	13
2. Le système cardiovasculaire .....	13
a) Introduction.....	13
b) Structure des vaisseaux sanguins .....	14
3. L'ischémie .....	15
a) Définition.....	15
b) Physiopathologie de l'ischémie .....	16
c) Dysfonctionnements de l'endothélium dans la physiopathologie de l'ischémie.....	17
4. Altération du glycocalyx de l'endothélium vasculaire au cours de l'ischémie.....	19
a) Définition.....	19
b) Fonction physiologique .....	20
c) Altération du glycocalyx au cours de l'ischémie .....	23
<b>II. Le glycocalyx de l'endothélium vasculaire : relation structure-fonction .....</b>	<b>26</b>
1. Les glycosaminoglycannes .....	26
a) Généralités .....	26
b) Les différentes familles de GAG.....	26
c) Biosynthèse des GAG .....	28
d) Catabolisme des GAG.....	31
e) Fonction des GAG .....	33
f) Défaut de synthèse des GAG : conséquences physiopathologiques.....	36
2. Les protéoglycannes .....	40
a) Généralités .....	40
b) Biosynthèse des PG.....	40
c) Les différents types de PG .....	41
i. Les PG intracellulaires.....	41
ii. Les PG matriciels : exemples du perlécane, de la décorine et du versicane .....	44
iii. Les protéoglycannes membranaires.....	49
<b>III. Les facteurs proangiogéniques et leur liaison au glycocalyx de l'endothélium .....</b>	<b>67</b>
1. Les mécanismes de formation de vaisseaux sanguins .....	67
a) Définition.....	67
2. L'angiogenèse .....	68
a) Généralités .....	68
b) Stimulation de l'angiogenèse .....	69
c) Types d'angiogenèse.....	71
3. Étapes de l'angiogenèse .....	73
4. Les facteurs pro-angiogéniques .....	77
a) Le VEGF .....	78
b) La chimiokine CXCL12 .....	79
5. Interaction entre les glycosaminoglycannes et les facteurs pro-angiogéniques .....	81
a) Interaction GAG-VEGF.....	82
b) Interaction GAG-CXCL12 .....	83

c) Interaction entre GAG et autres facteurs pro-angiogéniques .....	84
<b>Contexte et but de l'étude.....</b>	<b>85</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>88</b>
<b>Article 1: Absence of glycosaminoglycans affects the endothelial cells responses involved in angiogenesis.....</b>	<b>89</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>125</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>141</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>142</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>145</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>168</b>
Annexe1: miR-126-3p is essential for CXCL12-induced angiogenesis .....	169
Annexe 2: Novelty in the development of biodegradable polymer coatings for biomedical devices: paclitaxel grafting on PDMMLA derivatives .....	184
Annexe 3 : Liste des communications .....	196

## Liste des illustrations

FIGURE 1. STRUCTURE D'UN VAISSEAU SANGUIN.....	15
FIGURE 2. ÉTAPES DE DEVELOPPEMENT DE LA PLAQUE D'ATHEROME. ....	17
FIGURE 3. EFFETS DES LIPOPROTEINES OXYDEES DE BASSE DENSITE (OxLDL) SUR L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE. .....	18
FIGURE 4. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GLYCOCALYX ENDOTHELIAL.....	20
FIGURE 5. MODELES DE FLUX ET DE CONTRAINTES DE CISAILLEMENTS AUX BIFURCATIONS ARTERIELLES, CONDUISANT A UN DYSFONCTIONNEMENT ENDOTHELIAL ET AU DEVELOPPEMENT DE LA PLAQUE ATHEROSCLEROTIQUE.....	22
FIGURE 6. LESION ENDOTHELIALE ENTRAINANT LA DEGRADATION DU GLYCOCALYX.....	24
FIGURE 7. STRUCTURE ET COMPOSITION DES DIFFERENTS TYPES DE GLYCOSAMINOGLYCANNES. ....	28
FIGURE 8. BIOSYNTHESE ET MATURATION DES GLYCOSAMINOGLYCANNES.....	31
FIGURE 9. FONCTIONS DE LA SERGLYCINE. ....	44
FIGURE 10. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA DOUBLE ACTIVITE DU PERLECANNE.....	46
FIGURE 11. LES PROTEOGLYCANNES TRANSMEMBRANAIRES. ....	51
FIGURE 12. LE SHEDDING DES GLYPICANNES. ....	53
FIGURE 13. EFFETS OPPOSES DU GLYPICANNE-3 ET DU GLYPICANNE-5 SUR LA SIGNALISATION HEDGEHOG.....	55
FIGURE 14. ROLE DU GLYPICANNE-3 DANS LA MODULATION DE LA SIGNALISATION WNT DANS LE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE.....	56
FIGURE 15. STRUCTURE DES SYNDECANNES. ....	58
FIGURE 16. DIFFERENTS SITES DE CLIVAGE DE L'ECTODOMAINE DES SYNDECANNES. ....	61
FIGURE 17. LES DIVERSES CARACTERISTIQUES STRUCTURELLES DES SYNDECANNES CONFERENT UNE DIVERSITE FONCTIONNELLE.....	66
FIGURE 18. VASCULOGENESE, ANGIOGENESE ET ARTERIOGENESE. ....	68
FIGURE 19. REPRESENTATION DES DIFFERENTES ETAPES DE L'ANGIOGENESE PAR BOURGEONNEMENT. ..	72

<b>FIGURE 20. LE VEGF ET L'ACTIVATION DE LA SIGNALISATION NOTCH PAR DLL4 REGULENT LA SPECIFICATION DES CELLULES ENDOTHELIALES EN TIP CELLS ET STALK CELLS AU COURS DE L'ANGIOGENESE. ....</b>	<b>74</b>
<b>FIGURE 21. MECANISMES DE FORMATION DE LA LUMIERE VASCULAIRE, MODELES DU CREUSEMENT CELLULAIRE ET DU CREUSEMENT DU CORDON VASCULAIRE. ....</b>	<b>76</b>
<b>FIGURE 22. TRANSDUCTION DU SIGNAL PAR LA FAMILLE DES VEGF. ....</b>	<b>79</b>
<b>FIGURE 23. REGULATION DE L'ANGIOGENESE PAR CXCL12. ....</b>	<b>81</b>
<b>FIGURE 24. BUT DES TRAVAUX DE THESE. ....</b>	<b>87</b>
<b>FIGURE 25. STRUCTURE DU 4-NITROPHENYL-B-D-XYLOPYRANOSIDE. ....</b>	<b>129</b>
<b>FIGURE 26. SCHEMA RECAPITULATIF DE L'ETUDE. ....</b>	<b>140</b>

## Liste des tableaux

<b>TABLEAU 1. : CLASSIFICATION DES MUCOPOLYSACCHARIDOSES. ....</b>	<b>39</b>
<b>TABLEAU 2. CARACTERISTIQUES DES PROTEINES CENTRALES ET DES GAG CONSTITUTIFS DES PROTEOGLYCANNES PRESENTS DANS LE GLYCOALYX ENDOTHELIAL VASCULAIRE. ....</b>	<b>41</b>

## Liste des abréviations

**ACKR:** Atypical Chemokine Receptors  
**ADAM :** La famille des désintégrines, des métalloprotéases  
**ADAMST :** A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1  
**ANG-1:** Angiopoïétine-1  
**CaD:** calcium dobesilate  
**CD26 :** Cluster de différenciation 26  
**CE :** cellule endothéliale  
**CHC :** carcinome hépatocellulaire  
**CML :** cellules musculaires lisses  
**CS :** chondroïtine sulfate  
**DLL4:** Delta-like Notch ligand 4  
**DS:** Dermatan sulfate  
**SOD3 :** Superoxyde dismutase 3  
**EDSMC :** syndromes d'Ehlers-Danlos musculocontracturaux  
**EGFR :** Epithelial growth factor receptor  
**eNOS :** NO synthase endothéliale  
**EPC :** Cellule endothéliale progénitrice  
**ERK:** Extracellular Signal-Regulated Kinase  
**EXT:** Exostosine  
**EXTL:** Exostosine like  
**FAK:** Focal adhesion kinase  
**FGF:** Fibroblast growth factor  
**G-CSF :** Facteur de stimulation des colonies de granulocytes  
**GAG :** Glycosaminoglycane  
**GalNAc:** N-acétylgalactosamine  
**GlcA :** Acide D-glucuronique  
**GlcNAc:** N-acétylgalactosamine  
**GPC:** Glypicane  
**GPI:** glycosyl-phosphatidylinositol  
**HA:** Acide hyaluronique  
**HGF:** Hepatocyte growth factor  
**Hh:** Hedgehog  
**HIF:** Hypoxia inductible factor  
**HPSE :** Héparanase  
**HS :** Héparane sulfate  
**HSPG :** Protéoglycane à héparane sulfate  
**IdoA :** Acide L-iduronique  
**IL-8:** Interleukine 8  
**kDa:** Kilodalton  
**KS :** Kératane sulfate  
**LDL :** lipoprotéines de faible densité

**LRR:** Leucine Rich Repeats  
**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase  
**MCV :** Maladie cardiovasculaire  
**MEC :** Matrice extracellulaire  
**MMP :** Métalloprotéase matricielle  
**MPS :** Mucopolysaccharidose  
**NA :** N-acétyl  
**NG2 :** le Neural/glial antigène 2  
**NO:** Oxyde nitrique  
**NRARP:** Notch regulated ankyrin repeat protein  
**NRP-1 :** Neuropiline  
**NS :** N-sulfate  
**OST :** O-sulfotransférase  
**oxLDL :** lipoprotéines de faible densité oxydé  
**PAPS :** 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate  
**PDGF :** Facteur de croissance dérivé des plaquettes  
**PDGFR :** Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes  
**PG:** Protéoglycane  
**PI3K:** Phosphoinositide 3-kinase  
**PIP2:** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate  
**PLC :** Phospholipase C  
**RCPG :** Récepteur couplé aux protéines G  
**RE :** Réticulum endoplasmique  
**RTK :** Récepteur à activité tyrosine kinase  
**SDC:** Syndécanne  
**SLRP:** small leucine rich proteoglycans  
**Srgn:** Serglycine  
**TFPI:** Tissue factor pathway inhibitor  
**TGF:** Transforming growth factor  
**TNF- $\alpha$  :** Tumor necrosis factor  
**TRPC:** transient receptor potential canonical  
**VEGF :** Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire  
**VEGFR :** Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire  
**XylIT:** xylosyl-transférase

## Avant-propos

En 2019, j'ai obtenu une allocation doctorale ministérielle suite au concours de l'école doctorale Galilée (Université Sorbonne Paris Nord). J'ai donc entamé ma thèse sous la direction du Pr Angela SUTTON et le co-encadrement du Dr Hanna HLAWATY, au sien du laboratoire de recherche vasculaire translationnelle, groupe biothérapies et glycoconjugués. L'expertise de notre laboratoire dans le domaine de la glycobiologie et sa connaissance du rôle des glycosaminoglycannes (GAG) dans la régulation de différents processus cellulaires nous a mené vers la décision de travailler sur la mise au point d'un modèle de cellules endothéliales appauvries en GAG et d'évaluer l'impact de cet appauvrissement sur les processus cellulaires impliqués dans l'angiogenèse. De plus, il est aujourd'hui connu que la dégradation du glycocalyx est l'un des évènements précoces qui surviennent dans différentes pathologies et notamment les maladies cardiovasculaires et l'ischémie. Nous avons donc évalué l'impact de l'appauvrissement en GAG dans les cellules endothéliales sur leur capacité de migration, d'adhérence/étalement et de formation de réseaux vasculaires. Ce travail nous a permis d'affirmer l'importance des GAG et donc de l'intégrité du glycocalyx endothélial dans l'angiogenèse. Au cours de ma thèse, j'ai participé à d'autres projets de recherche qui ont enrichi mes connaissances scientifiques et techniques. J'ai participé à la publication d'un article qui porte sur les travaux de thèse de Kévin BASSAND. Cet article ou je suis co-deuxième auteur est publié dans *Journal of cellular and molecular medicine* et porte le titre « *miR-126 is essential for CXCL12-induced angiogenesis* ». J'ai également participé à la publication d'un article ou je suis deuxième auteur réalisé dans le cadre de la thèse de Elnaz Gholizadeha et publié dans *Designed monomers and polymers et porte le titre* « *Novelty in the development of biodegradable polymer coatings for biomedical zdevices : paclitaxel grafting on PDMMLA derivatives* ». Enfin, mes travaux de thèse ont pu être valorisés durant 4 évènements scientifiques nationaux et internationaux (European Atherosclerosis Society (EAS, 2021), la Société Française d'Angiogenèse (SFA2019 et 2021) et la Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose (NSFA 2021).

# Introduction





# I. Les maladies cardiovasculaires

## 1. Généralités

Les maladies cardiovasculaires (MCV) regroupent l'ensemble des pathologies affectant le cœur et les vaisseaux sanguins, telles que l'insuffisance cardiaque, les artériopathies périphériques et l'athérosclérose. Ces maladies exposent à de nombreuses complications comme l'infarctus du myocarde, les embolies pulmonaires ou les accidents vasculaires cérébraux. Parmi les déterminants du risque cardiovasculaire on retrouve les facteurs environnementaux tels que le cadre de vie, le travail et la pollution atmosphérique, les facteurs métaboliques tels que le diabète et l'hyperlipidémie et les facteurs comportementaux tels que le tabagisme, la consommation excessive d'alcool et la sédentarité. Certains de ces facteurs sont liés et leur association augmente le risque de MCV. Malgré les multiples mesures de prévention qui sont mises en place, les MCV demeurent à la première place des causes de mortalité mondiales et la deuxième en France, précédées par les cancers. En 2019, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estimait à 17,9 millions le nombre de décès dus aux MCV, représentant 32% de l'ensemble des décès dans le monde.

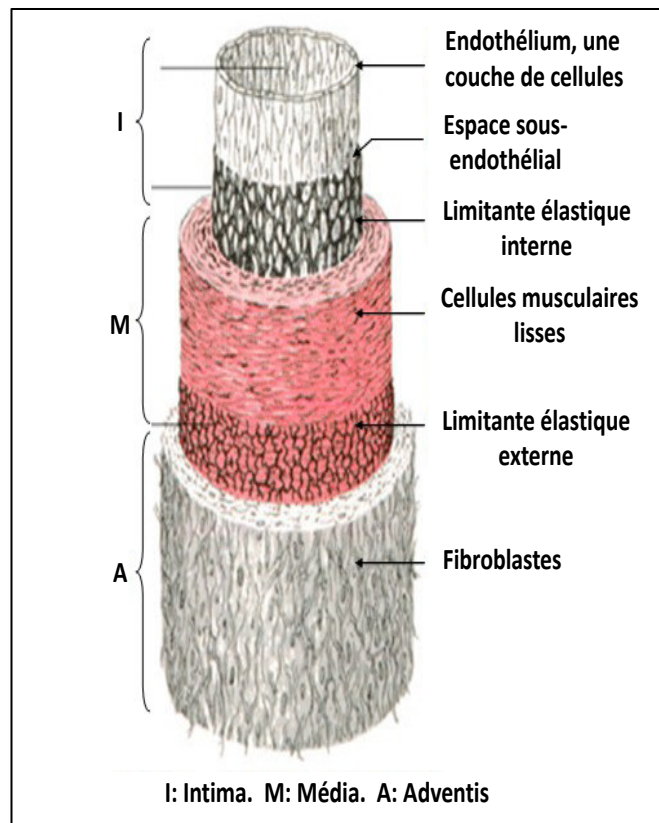
## 2. Le système cardiovasculaire

### a) Introduction

Le système cardiovasculaire a pour fonction de véhiculer le sang, permettant un apport en oxygène et en nutriments dans l'ensemble de l'organisme. Il est constitué du cœur et des vaisseaux sanguins (artères, veines, capillaires). Le cœur propulse le sang chargé en oxygène dans les artères qui alimentent le reste de l'organisme (muscle, cerveau, organes), les capillaires assurent les échanges nutritifs et gazeux au niveau tissulaire. Ensuite, les veines récupèrent le sang appauvri en oxygène provenant des organes et le ramène vers le cœur. Le sang est alors expulsé vers les poumons afin de remplacer le dioxyde de carbone par l'oxygène avant de retourner vers le cœur et être distribué dans l'ensemble de l'organisme.

## **b) Structure des vaisseaux sanguins**

Les vaisseaux sanguins sont composés de trois couches cellulaires qui délimitent une lumière où circule le sang. La couche interne, nommée, intima, est composée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) formant l'endothélium vasculaire. Elle repose sur une lame basale principalement composée de collagène et de glucides tels que des glycosaminoglycanes (GAG). La face apicale de l'endothélium vasculaire, en contact avec le flux sanguin, est tapissée d'un réseau de glucides liés à des protéines appelé glycocalyx. La couche intermédiaire, nommée média, est séparée de l'intima par une limitante élastique interne. Elle est composée de cellules musculaires lisses (CML) et de fibres élastiques permettant l'élasticité du vaisseau (Figure 1). La couche externe, nommée adventice est séparée de la média par une limitante élastique externe. Elle est composée de fibroblastes et de collagène et reçoit les terminaisons nerveuses. Les différents types de vaisseaux sanguins partagent globalement cette même architecture, mais l'épaisseur de chaque couche peut varier d'un vaisseau à un autre, selon sa fonction et son emplacement dans l'arbre vasculaire.



**Figure 1. Structure d'un vaisseau sanguin.**

Schéma représentatif d'un vaisseau sanguin composé de trois couches, : l'intima, la média et l'adventice séparées par des limitantes élastique (1)

### 3. L'ischémie

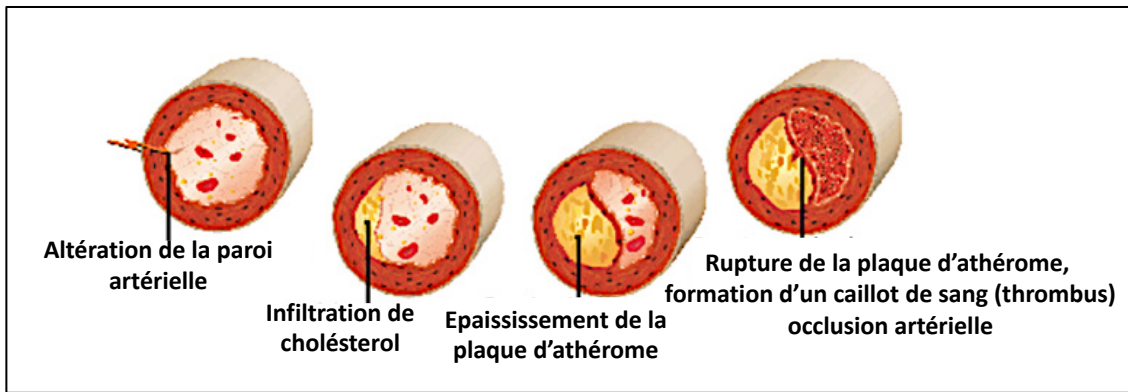
#### a) Définition

L'ischémie désigne une diminution (ischémie relative) ou arrêt (ischémie complète) du flux sanguin, entraînant une insuffisance en oxygène (hypoxie) et en nutriments dans un territoire donné (organes, muscles). Elle résulte d'une sténose, définie comme étant un rétrécissement de la lumière des vaisseaux à l'origine de la perturbation du flux sanguin (2). L'importance des dommages causés par l'ischémie dépend de la rapidité de sa prise en charge. Lorsque l'ischémie est relative et rapidement prise en charge, les conséquences sur l'organe sont limitées et réversibles. En revanche, lorsqu'elle est complète et prolongée, elle aboutit à une nécrose des cellules, une mort tissulaire et un dysfonctionnement de l'organe concerné. On recense différentes pathologies ischémiques, selon l'organe/zone touché par l'ischémie. Parmi elles, les cardiopathies ischémiques se manifestent au niveau du cœur

suite à l'obstruction des artères coronaires et causent les infarctus du myocarde. L'ischémie cérébrale touche le cerveau et résulte d'une l'obstruction des artères cérébrales pouvant provoquer les accidents vasculaires cérébraux.

## **b) Physiopathologie de l'ischémie**

L'obstruction des artères caractérisant l'ischémie est due au dépôt d'une plaque d'athérome principalement composée de lipides de type LDL-cholestérol (lipoprotéines de faible densité) (3). Cette plaque s'installe sur la face interne des vaisseaux sanguins et entraîne une inflammation, une perturbation de l'architecture vasculaire et des lésions de la paroi artérielle (sclérose). Ce processus pathologique débute par l'accumulation de LDL. Le LDL s'oxyde (4) et entraîne la production de médiateurs inflammatoires recrutant ainsi des monocytes qui se différencient en macrophages (5). Les macrophages internalisent de grandes quantités de LDL oxydés (OxLDL) suite à leur reconnaissance par les récepteurs scavengers (éboueurs), et se transforment en cellules spumeuses (6). Dans un deuxième cas, les macrophages recrutés pour éliminer les OxLDL meurent par apoptose et sont piégés localement, faisant croître la plaque d'athérome. En réaction, les CML vont migrer vers l'intima afin d'isoler ces amas de débris et forment une chape fibreuse principalement composée de collagène, qui stabilise la plaque et limite les risques de rupture (7,8) . Dans certains cas, les macrophages sécrètent des protéases qui vont dégrader la chape fibreuse fragilisant la paroi interne jusqu'à sa fissure, permettant le recrutement de plaquettes sanguines pour former un thrombus ou un caillot.



**Figure 2. Étapes de développement de la plaque d'athérome.**

*L'obstruction des artères débute par une altération de la paroi artérielle permettant l'infiltration du cholestérol et son accumulation, donnant naissance à une plaque d'athérome. Cette plaque s'épaissit et fini par se rompre, provoquant l'infiltration des plaquettes et la formation du thrombus. (D'après Jonasson et al., 1986) (9)*

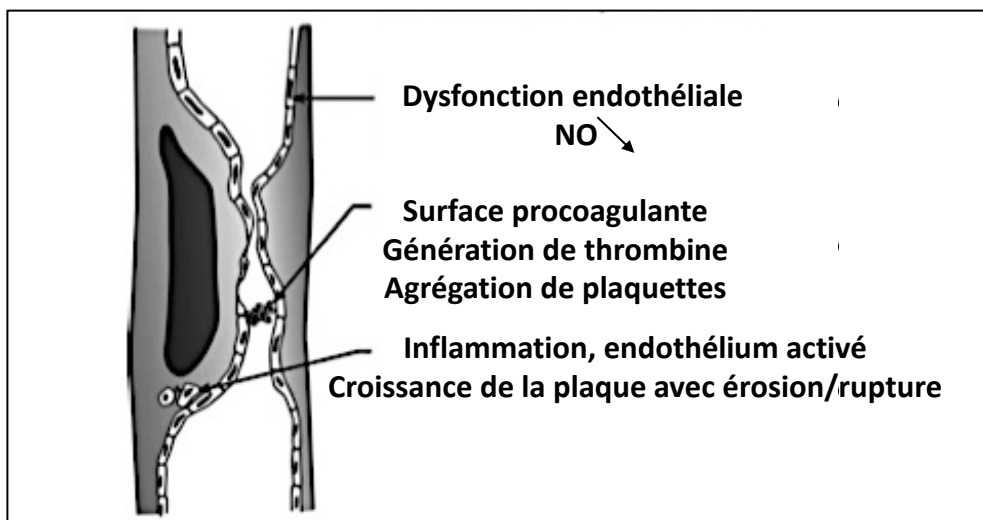
### **c) Dysfonctionnements de l'endothélium dans la physiopathologie de l'ischémie**

L'endothélium vasculaire est un organe dynamique qui forme une monocouche de cellules entre la lumière vasculaire et les cellules musculaires lisses de la paroi du vaisseau. Cette couche contrôle localement le tonus, la croissance et la perméabilité vasculaires, ainsi que la thrombose et l'inflammation (10,11).

Les lipides athérogènes sont responsables d'un large éventail de dysfonctionnements cellulaires au sein de la paroi vasculaire (Figure 3). Les effets sur les cellules endothéliales perturbent le contrôle normal de la fonction vasomotrice (12), avec une réduction de l'activité efficace du monoxyde d'azote (NO) (13), le développement d'une surface pro-coagulante (14), et une inflammation chronique (15). Ces changements jouent un rôle central non seulement dans le développement de l'athérosclérose mais aussi dans l'évolution des syndromes ischémiques.

Le NO joue un rôle capital dans la régulation du tonus vasomoteur. Un flux sanguin normal stimule la production de NO par l'action de la NO synthase endothéliale (eNOS), enzyme exprimée de façon constitutive par l'endothélium vasculaire. Cette enzyme catalyse la transformation de la L-arginine en citrulline et NO. La vasomotricité est régulée par un échange entre l'endothélium et les CML. Le NO produit par les cellules endothéliales diffuse

et stimule les CML et provoque une diminution du calcium libre et une relaxation des CML, aboutissant à une vasodilatation (16). En dehors de son rôle vasorelaxant, le NO possède des propriétés anti-agrégantes. En effet, dans un endothélium sain, l'agrégation plaquettaire stimule la production locale de NO, qui une fois libéré, va inhiber l'agrégation et induire la vasodilatation et l'élimination de l'agrégat (17). En revanche, lors d'une situation ischémique, une réduction de la biodisponibilité du NO est observée et représente une caractéristique précoce de la dysfonction endothéliale. Cette diminution de la disponibilité du NO semble être provoquée par les oxLDL. En effet, l'exposition de cellules oxLDL entraîne une diminution de l'activité de la NOS par l'inhibition de la transcription de cette enzyme ainsi que par la déstabilisation de l'ARNm post-transcriptionnel (18). En conséquence, la vasodilatation NO-dépendante est remplacée par une vasoconstriction, et l'agrégation plaquettaire favorisée.



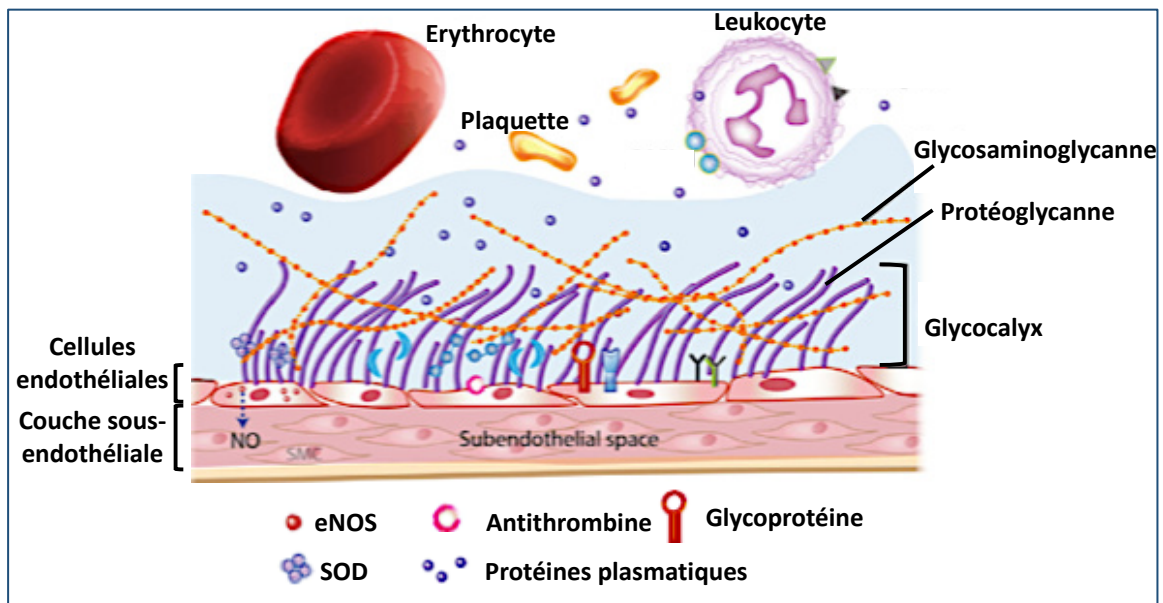
**Figure 3. Effets des lipoprotéines oxydées de basse densité (OxLDL) sur l'endothélium vasculaire.**

Les OxLDL provoquent des dysfonctionnements cellulaires au sein de la paroi vasculaire qui sont au cœur du développement des syndromes ischémiques aigus et chroniques. L'oxLDL réduit la disponibilité du monoxyde d'azote (NO), qui peut provoquer une vasoconstriction au niveau des sténoses. L'oxLDL active les cellules endothéliales pour produire une surface pro-coagulante. L'oxLDL augmente également l'agrégation plaquettaire et active le système inflammatoire. (D'après Adams et al., 2000) (19)

#### **4. Altération du glycocalyx de l'endothélium vasculaire au cours de l'ischémie**

##### **a) Définition**

Le glycocalyx endothélial est une couche riche en glucides qui tapisse les cellules de l'endothélium vasculaire. Il est relié à l'endothélium par plusieurs molécules, principalement des protéoglycannes (PG) qui sont des protéines liées à des chaînes polysaccharidiques appelées glycosaminoglycannes (GAG), des GAG qui peuvent être libres et non rattachés à une protéine, et des glycoprotéines (Les PG et les GAG sont détaillés dans le chapitre II). Ces éléments forment un réseau dans lequel sont incorporées des molécules solubles, issues du plasma ou de l'endothélium, liées de manière directe ou par l'intermédiaire de PG et/ou de GAG (Figure 4). L'équilibre dynamique existe entre cette couche de composants solubles et le flux sanguin, affecte continuellement la composition et l'épaisseur du glycocalyx. En outre, le glycocalyx est soumis à des clivages enzymatiques ou induits par les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin. L'équilibre dynamique entre la biosynthèse et le clivage rend difficile la définition géométrique du glycocalyx. La composition du maillage membranaire de PG, de glycoprotéines et de GAG et la composition des protéines plasmatiques associées ne peuvent être considérées comme une image statique. Bien au contraire, c'est une structure complexe et dynamique. L'élimination enzymatique de l'un de ses constituants affecte considérablement les propriétés du glycocalyx, ce qui montre l'importance de considérer l'interaction synergique de tous les constituants du glycocalyx comme un ensemble en constante évolution.



**Figure 4. Représentation schématique du glycocalyx endothélial.**

Le glycocalyx endothélial peut être observé *in vivo* comme une zone d'exclusion des globules rouges, située sur la face luminale de l'endothélium vasculaire. Il est constitué de molécules membranaires et solubles. Les PGs, avec de longues chaînes latérales non ramifiées de GAG et les glycoprotéines sont liés à la membrane endothéliale. Les composants solubles dérivés du plasma et de l'endothélium sont incorporés dans ce réseau, telles que la superoxyde dismutase extracellulaire (ec-SOD) et l'antithrombine III (AT III). Ensemble, ces composants forment le glycocalyx endothélial qui fonctionne comme une barrière entre le plasma sanguin et l'endothélium et exerce divers rôles dans l'homéostasie vasculaire. (D'après Gaudette et al., 2020) (20).

## b) Fonction physiologique

Situé entre le flux sanguin et l'endothélium, le glycocalyx endothélial est un déterminant important de la perméabilité vasculaire (21,22). Étant chargé négativement en raison des groupements sulfates sur les chaînes des glucides, il est capable de limiter l'accès de certaines molécules à la membrane des cellules endothéliales de manière sélective. En effet, l'accès des molécules à l'endothélium dépend de leur capacité à franchir le glycocalyx, impliquant leur charge, leur poids moléculaire et leur structure. Vink et coll. ont démontré que le dextran anionique dépassant les 70 kDa n'accède pas à la surface endothéliale, tandis que le dextran neutre de 40 kDa atteint l'endothélium en 1 minute. Cependant, la même molécule chargée négativement met beaucoup plus de temps à atteindre l'endothélium (22). En plus de sa taille et de l'encombrement stérique qu'il exerce, le glycocalyx a une charge globale négative qui lui confère un rôle dans la perméabilité vasculaire. Sa neutralisation induit une augmentation de l'absorption d'albumine par les cellules endothéliales en culture (23).

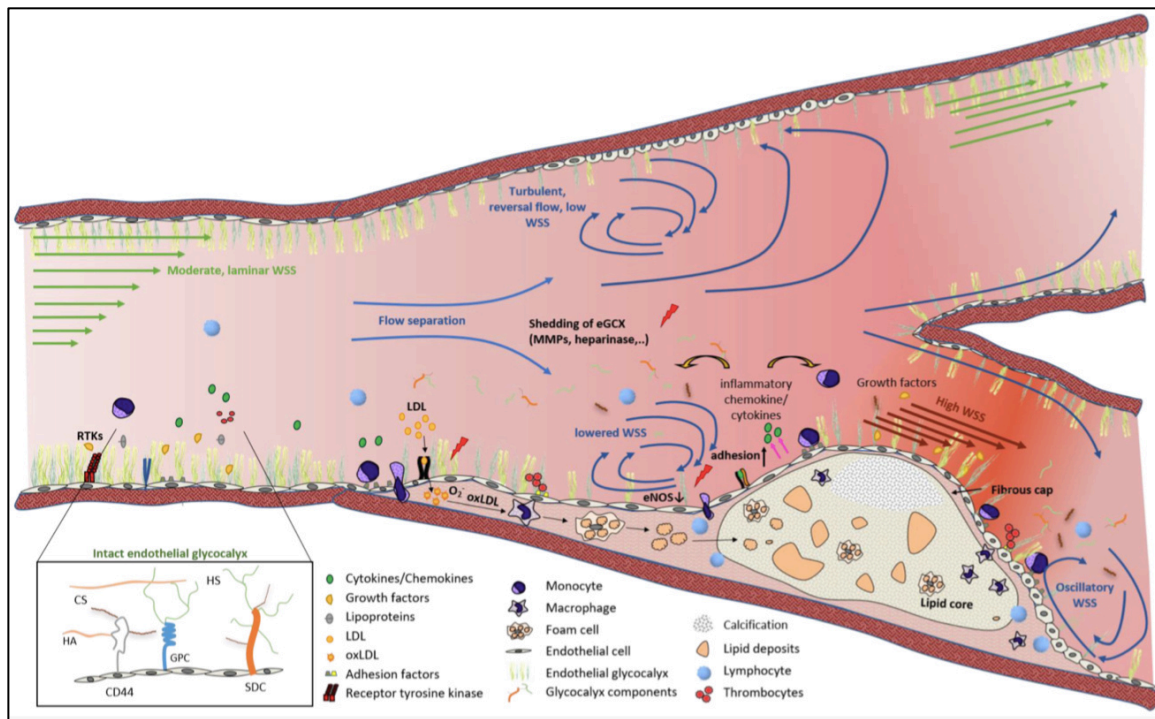


Le glycocalyx joue un rôle important dans l'interaction entre les éléments figurés du sang et la paroi vasculaire. Il délimite une zone d'exclusion des globules rouges et des plaquettes, leur permettant de traverser le vaisseau sanguin sans interagir ou se lier à la surface endothéliale (24). Concernant les leucocytes, en condition physiologique, les molécules d'adhésion leucocytaires exprimées par les CE semblent être dissimulées par le glycocalyx. En revanche, sous certains stimuli qui dégradent ou desserrent le maillage du glycocalyx, tels que l'action des cytokines (TNF- $\alpha$ ) (25) ou l'ischémie-reperfusion, les leucocytes traversent le glycocalyx et interagissent avec l'endothélium (26).

Le glycocalyx intervient également dans la mécanotransduction. Les CE sont exposées à des forces mécaniques exercées par le flux sanguin, notamment les contraintes de cisaillement qui déterminent leur morphologie et leur fonction (27,28). En réponse à ces tensions, les CE produisent du NO (29) qui, outre son rôle de vasodilatateur, va intervenir dans le remodelage vasculaire induit par les contraintes de cisaillement. Ces tensions mécaniques interviennent dans le processus athérogène. L'implication des forces de cisaillement dans le développement de la plaque d'athérome a déjà été démontrée il y a plusieurs décennies dans des échantillons issus d'autopsie de bifurcations carotidiennes humaines, dans lesquelles les lésions athérosclérotiques se produisent principalement dans des régions caractérisées par de faibles contraintes de cisaillement et une séparation des flux (Figure 5). Les résultats observés ont conduit à l'hypothèse selon laquelle les forces mécaniques des fluides pourraient être impliquées dans le développement de l'athérosclérose (30). En effet, Zhang et coll, 2017 (31) ont démontré dans un modèle d'athérosclérose induit chez le lapin par un régime riche en graisse, que la contrainte de cisaillement de l'artère carotide de lapin diminue avec l'augmentation des lipides sanguins. Cette diminution apparaît avant le début de l'hyperplasie intimale et de la croissance de l'intima-média. En conclusion, cette étude a confirmé que la diminution des contraintes de cisaillement peut prédire l'apparition de l'athérosclérose.

Différentes études ont mis en évidence l'effet délétère d'un flux sanguin perturbé sur l'intégrité du glycocalyx. Harding et coll, 2018 ont étudié cet effet chez la souris, dans un modèle de ligature partielle de l'artère carotide gauche. Les artères ligaturées et non ligaturées ont été prélevées après une semaine de la ligature, et des études histologiques ont montré une dégradation accrue du glycocalyx aux sites de perturbation du flux, associée

à une activation endothéliale accrue et une diminution des niveaux de la NO synthase (32). En revanche, les CE exposées à des forces de cisaillement modérées ou élevées ont un glycocalyx intact comparé à celles exposées à un cisaillement oscillant. Comme le glycocalyx joue un rôle clé dans la mécanosensibilité (33), sa dégradation pourrait être impliquée dans l'induction de la mécanotransduction proathérogène dans des conditions de flux perturbées.



**Figure 5. Modèles de flux et de contraintes de cisaillements aux bifurcations artérielles, conduisant à un dysfonctionnement endothélial et au développement de la plaque athérosclérotique.**

Dans les segments de vaisseaux droits, les contraintes physiologiques avec un flux laminaire conduit à un phénotype EC quiescent avec un glycocalyx intact. Aux sites de bifurcation, la séparation de l'écoulement provoque un écoulement turbulent et inversé avec des cisaillements réduits au niveau de la paroi externe du vaisseau et des régions d'épaule de la plaque, tandis qu'un cisaillement élevé se produit au niveau de la gorge de la plaque. Ces différents schémas d'écoulement et le gradient de cisaillement qui en résulte entraînent une dégradation du glycocalyx et un dysfonctionnement endothélial, caractérisés par l'induction de cascades de signalisation inflammatoires, favorisant ainsi la progression de la plaque. CS : chondroïtine sulfate, GPC : glypicanne, HA : acide hyaluronique, HS : heparan sulfate, RTK : récepteur tyrosine kinase, SDC : syndécanne. (D'après Urshel et al., 2021) (34).

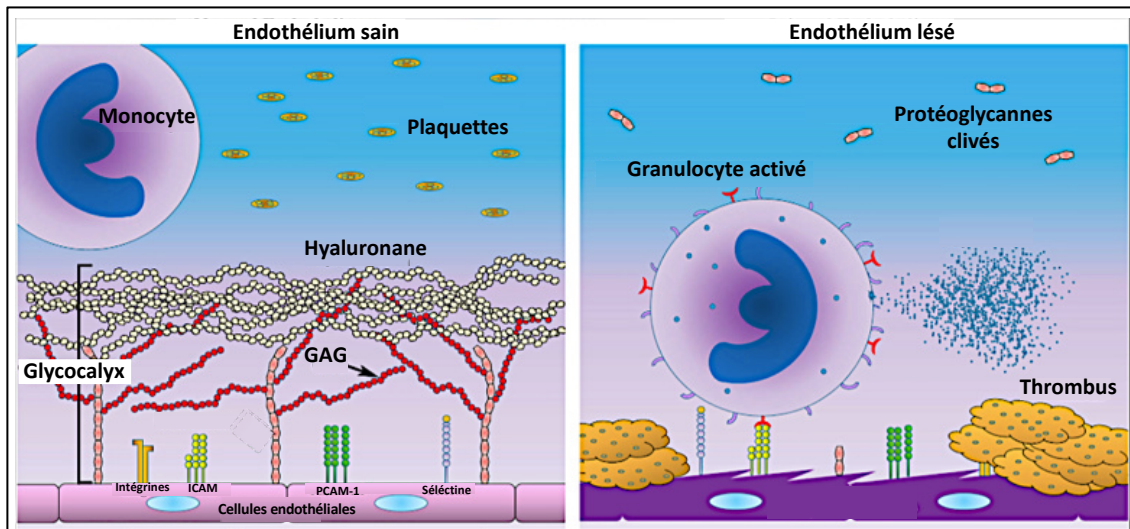
De manière intéressante, des CE mises en culture et exposées à des forces de cisaillement augmentent la production de hyaluronane qui appartient à la famille des GAG (35). De plus, le clivage enzymatique de certains types de GAG (héparanes sulfates et acides hyaluroniques), inhibe la production de NO flux-dépendante (36,37).

Dans la régulation de la coagulation, les PG du glycocalyx jouent un rôle important en se liant à des médiateurs anticoagulants tels que l'antithrombine III, le cofacteur II de l'héparine, la thrombomoduline ou l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) (38). En effet, l'antithrombine III, un inhibiteur de la thrombine (enzyme de coagulation), se fixe au glycocalyx et cette fixation majore sa fonction d'anticoagulant (39). La fixation du cofacteur II de l'héparine aux dermatanes sulfates présents dans le glycocalyx permet son activation et, par conséquent, l'inhibition de la protéase thrombine (40) . Les PG présents dans le glycocalyx contribuent fortement à son importance fonctionnelle, notamment à travers leur capacité à lier différentes molécules et réguler leurs fonctions. Les chaînes de GAG portées par les protéines centrales des PG présentent une grande variabilité résultant de l'épimérisation, de l'élongation et surtout de la sulfatation des chaînes, ce qui donne lieu à une surface hétérogène à laquelle de nombreuses molécules peuvent se fixer. Le rôle anticoagulant du glycocalyx cité plus haut repose justement sur sa capacité à lier des molécules anticoagulantes telles que la thrombomoduline. La signalisation propre au facteur de croissance des fibroblastes (FGF) dépend fortement de sa liaison aux GAG et la formation d'un complexe ternaire FGF-récepteur-GAG (41). De même, le glycocalyx intervient dans le processus lipolytique en liant à la fois la lipase et son ligand le LDL (42) . Le glycocalyx permet également de limiter le processus inflammatoire en fixant les cytokines circulantes, réduisant ainsi leur liaison à leurs récepteurs membranaires. La suppression des GAG de type héparane sulfate augmente l'activation des CE par les cytokines (43). Un autre aspect du rôle fonctionnel du glycocalyx via sa liaison à différentes classes de molécules concerne son affinité pour la superoxyde dismutase extracellulaire (SOD3, anciennement nomée ecSOD). La SOD3 est souvent localisée à la surface des CML et son taux dépend du niveau d'expression de GAG (44). sa liaison aux GAG du glycocalyx permet de réduire le taux des radicaux libres, de ré-équilibrer l'homéostasie rédox et d'augmenter la biodisponibilité du NO, prévenant ainsi les dysfonctions endothéliales (45).

### **c) Altération du glycocalyx au cours de l'ischémie**

L'altération du glycocalyx endothélial est un événement décrit dans différentes pathologies telles que le sepsis (46), l'inflammation (25), l'athérosclérose (47) et, plus

récemment, l'infection au Sars-coV-2 (46). Cette altération affecte sa fonction de barrière vasculaire et entraîne une extravasation de protéines, un œdème tissulaire, une perte de flux sanguin nutritionnel et une augmentation de l'adhérence des plaquettes et des leucocytes (Figure 6).



**Figure 6. Lésion endothéliale entraînant la dégradation du glycocalyx.**

A gauche, l'endothélium sain et les protéines membranaires qu'il exprime sont recouverts par le glycocalyx. A droite, lors d'une lésion endothéliale provoquée par différents facteurs tels qu'une tempête cytokinique, le glycocalyx est dégradé, l'endothélium et ses protéines de surface sont exposés au lumen. Les granulocytes et les plaquettes adhèrent aux cellules endothéliales pouvant causer un thrombus (D'après Okada et al., 2020) (48)

Au cours de l'ischémie, on retrouve également une dégradation du glycocalyx endothélial. Plusieurs scénarios expliquent les conditions de cette dégradation. Vink et coll. 2000 ont démontré que des concentrations élevées de oxLDL dans le muscle crémaster du hamster ont non seulement détérioré le glycocalyx mais aussi augmenté l'adhérence plaquettaire à l'endothélium, suggérant que l'altération du glycocalyx survient à des stades précoces du développement de l'ischémie (49). D'autre part, il a été conclu par Van Der Berg et coll. 2009, que la dégradation du glycocalyx endothélial au niveau de la bifurcation de l'artère carotide chez la souris, contribue fortement à l'accumulation de LDL dans cette zone (50). Le glycocalyx est plus particulièrement affecté par les schémas de circulation sanguine. Ainsi, le long des parois des vaisseaux exposés à un sang uniforme, le glycocalyx est robuste, protégeant ainsi l'endothélium (51). Par contre, dans les vaisseaux à géométrie complexe où des parties de la paroi sont exposées à des schémas d'écoulement non uniformes et

prédisposées à l'athérogenèse, il a été constaté un amincissement du glycocalyx endothélial (52).

De nombreux traitements commerciaux standards sont utilisés pour réduire l'athérosclérose et les événements cardiovasculaires. Ils sont en grande partie axés sur la réduction de l'hyperlipidémie tels que les statines (Pravastatine) (53) . Une nouvelle approche très prometteuse consiste à développer des thérapies qui favoriseront l'intégrité du glycocalyx afin d'inverser le dysfonctionnement endothélial, une caractéristique précoce de l'athérosclérose. Ces approches sont basées sur l'utilisation de GAG exogènes tel que le Suloxide commercial, qui contient une combinaison d'héparine (80%) et de dermatanes sulfates (20%) et résiste à la dégradation par l'héparanase, enzyme qui clive les GAG de type héparane sulfate (54). Une fois la structure et la fonction du glycocalyx stabilisées, il peut être suggéré que les CE bloqueront les dépôts de LDL et leur absorption par les macrophages dans la paroi des vaisseaux sanguins, freinant ainsi la progression de la plaque de manière précoce. En outre, la restauration du glycocalyx pourrait stimuler la communication intercellulaire anti-athérosclérose des CE et les voies de signalisation du NO. Une thérapie ciblée sur le glycocalyx permettrait un traitement précoce de l'athérosclérose. Des équipes de recherche ont réussi à restaurer la fonction barrière du glycocalyx *in vitro*, en ajoutant des héparanes sulfates et à rendre les CE imperméables aux petites particules (10 nm de taille), contrebalançant ainsi l'effet des enzymes de dégradation du glycocalyx auxquelles les CE étaient préalablement exposées (les CE étaient perméables aux petites particules lors du traitement avec des enzymes de dégradation du glycocalyx) (55). Il a également été démontré que l'utilisation du sulodexide entraîne la restauration de la fonction de barrière de l'endothélium, l'inhibition des enzymes de dégradation du glycocalyx, la limitation de l'activité inflammatoire et le ralentissement de la détérioration des CE liée à l'âge et de la mort cellulaire programmée (56,57). Une étude récente sur un modèle de souris obèses athérosclérotiques induite par un régime riche en graisses, a mis en évidence que l'utilisation des GAG de type chondroïtine sulfate, inhibait l'expression des cytokines pro-inflammatoires, diminuait le nombre de monocytes migrant vers les cellules endothéliales inflammatoires et réduit la présence de macrophages dans les plaques artérielles (58). Ces

stratégies de remplacement des GAG sont toutes des approches prometteuses pour prévenir l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires associées.

## **II. Le glycocalyx de l'endothélium vasculaire : relation structure-fonction**

Après avoir défini le glycocalyx endothélial, discuté ses différentes fonctions physiologiques et son état de dégradation au cours de l'ischémie, cette partie détaillera la structure et la fonction des éléments majeurs qui le composent et qui sont au cœur de mon travail de thèse : les glycosaminoglycannes et les protéoglycannes.

### **1. Les glycosaminoglycannes**

#### **a) Généralités**

Les glycosaminoglycannes sont une famille de polysaccharides complexes et linéaires (non ramifiés). Les GAG sont présents à la surface cellulaire mais également dans la matrice extracellulaire (MEC), créant ainsi un microenvironnement autour de la cellule. Grâce à leur capacité à lier différentes molécules telles que les facteurs de croissance et les chimiokines, ils interviennent dans la régulation d'une multitude de processus biologiques (59). Les différents membres de la famille des GAG partagent une organisation structurale commune qui correspond à une répétition d'une unité disaccharidique comprenant une hexosamine N-acétylée qui peut être soit la N-acétylglucosamine (GalNAc) ou la N-acétylgalactosamine (GlcNAc) associée à un acide uronique, soit l'acide L-iduronique (IdoA), soit l'acide D-glucuronique (GlcA) ou les deux. Les kératanes sulfates (KS) qui ne possèdent pas d'acide uronique, ne se trouvent pas dans cette structure.

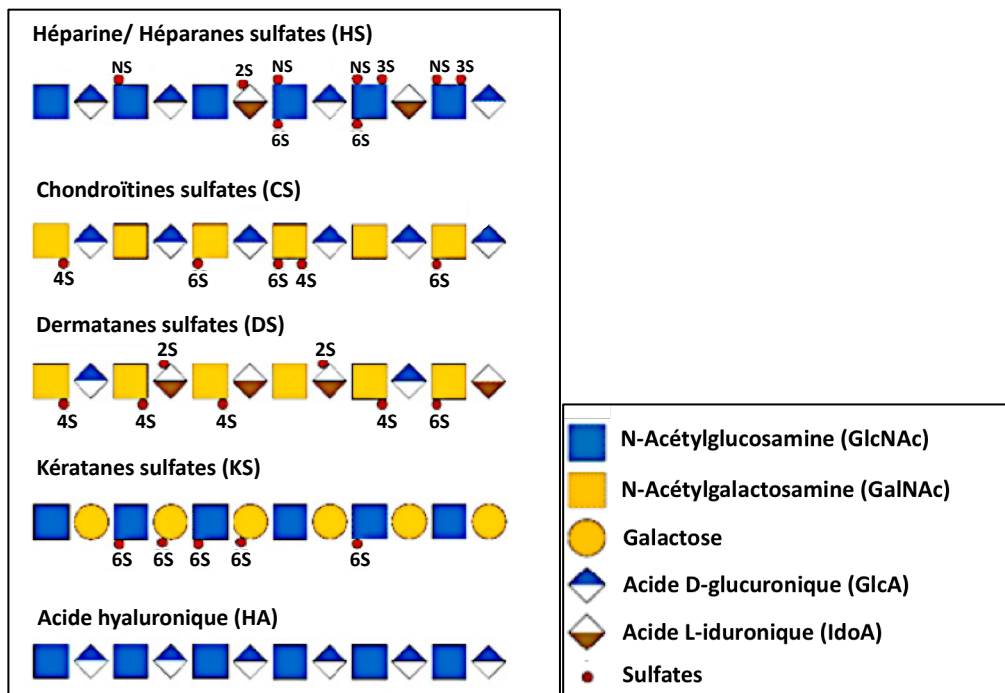
#### **b) Les différentes familles de GAG**

Les différents types de GAG sont déterminés par la nature des polymères glucidiques qui les composent et par les liaisons glycosidiques qui constituent ces chaînes. On dénombre 6 types de GAG classés en 2 sous-familles :

- Les galactosaminoglycannes qui rassemblent les chondroïtines sulfates (CS) et les dermatanes sulfates (DS); leur hétérosaccharide est une GalNAc associée à un GlcA exclusivement pour les CS et un GlcA ou IdoA pour les DS.
- Les glucosaminoglycannes qui rassemblent les héparanes sulfates (HS), l'héparine et l'acide hyaluronique (HA) ; leur hétérosaccharide est une GlcNAc associée à un GlcA ou IdoA pour les HS et l'héparine et exclusivement un GlcA pour le HA.

Les KS se distinguent des autres GAG par l'absence d'acide uronique. Il est constitué d'une répétition de N-acétylglucosamine et galactose. Une autre particularité des chaînes KS est la présence de ramifications. En effet, les glucosamines de sa chaîne polysaccharidique peuvent être fucosylées, l'acide sialique peut également être retrouvé à l'extrémité des chaînes KS.

Les GAG peuvent être également classés selon qu'ils sont ou non sulfatés. Les HS, CS, DS et l'héparine font partie des GAG sulfatés, tandis que le HA ne porte pas de groupements sulfates. Les CS sont O-sulfatés au niveau de leur galactosamine en position C-4 ou C-6 (plus rarement une di-sulfatation). Les DS sont O-sulfatés grâce à l'épimérisation du GlcA en IdoA, qui permet une sulfatation en C2 de ce dernier. L'héparine et les chaînes HS se caractérisent par un haut degré de sulfatation. Le résidu glucosamine de ces GAG peut être N-sulfaté mais également O-sulfaté en position C-6 (avec de rares sulfatations en position C-3). Leur acide uronique peut également être sulfaté en position C-2. L'ensemble de ces combinaisons (épimérisation du GlcA en IdoA, les N-sulfatations et les O-sulfatations) génèrent 48 motifs disaccharidiques différents, contribuant à la diversité des chaînes HS et de leurs interactions. Les KS peuvent être sulfatés en position C-6 sur les deux sucres de leur unité disaccharidique, la glucosamine et le galactose (Figure 7). La présence de groupements carboxyliques, d'acide uronique et d'éventuels groupements sulfates, confère aux GAG une charge globale négative qui leur permet d'interagir avec les différentes molécules de manière électrostatique.



**Figure 7. Structure et composition des différents types de glycosaminoglycannes.**

Les GAG sont composés d'une succession d'unités disaccharidiques, composées d'une héxoamine acétylée en position C2 pouvant être une glucosamine ou une galactosamine associée à un acide uronique pouvant être un acide D-glucuronique ou un acide L-iduronique. Les GAG peuvent être sulfatés à différentes positions, 4-O et 6-O pour la galactosamine, 3-O et 6-O pour la glucosamine et 2-O pour l'acide iduronique. (D'après Lindahl et al., 2015). (60)

### c) Biosynthèse des GAG

Les différents types de GAG suivent tous le même schéma de biosynthèse à travers trois étapes principales : 1) formation du tétrasaccharide de liaison « linker », 2) élongation de la chaîne polysaccharidique, 3) maturation.

- **Formation du tétrasaccharide de liaison « linker »**

La biosynthèse débute par la formation d'un tétrasaccharide commun à tous les types de GAG, dont la séquence est Xyl-Gal-Gal-GlcA (Xylose, galactose, galatose, acide glucuronique). Cette séquence permet l'attachement des GAG au core protéique des PG (Voir partie protéoglycannes). Au commencement, les xylosyl-transférases (XylIT-1, XylIT-2) se chargent du transfert d'un xylose d'un UDP-xylose donneur vers un résidu sérine receveur (plus rarement thréonine) du core protéique (61). Cette étape est suivie par l'ajout de deux



résidus galactose par deux galactosyl-transférases, puis l'ajout d'un GlcA par la glucuronyl-transférase A (GlcAT-I).

- **Élongation de la chaîne saccharidique**

La nature de l'héxoamine ajoutée au tétrasaccharide linker (glucosamine ou galactosamine) détermine la voie d'assemblage vers les CS/DS ou vers les HS. Les mécanismes qui déterminent l'héxoamine et ainsi la voie choisie sont encore mal connus mais la nature des acides aminés proches du site d'ancrage sur le core protéique semble impliquée. Par exemple, la présence de groupements d'acides aminés hydrophobes ou acides à proximité de la sérine semble intervenir dans l'orientation de la synthèse vers la voie d'assemblage des HS (61,62). De manière semblable, il a été démontré que la présence de certains motifs de sulfatation au niveau du tétrasaccharide de liaison, contribue à déterminer la voie d'assemblage. Dans ce sens, il a été démontré que les résidus Gal-4S ne sont présents que dans les tétrasaccharides de chaînes CS, et sont impliqués dans l'inhibition de la glucosaminyl-transférase (52,53). La présence de sulfatations en position C6 ou C4 sur les résidus galactose du tétrasaccharide de liaison, oriente la biosynthèse des GAG vers les chaînes CS. Ces sulfatations augmentent l'activité de la N-acétylgalactosaminyltransférase I qui catalyse l'ajout de l'hexosamine GalNAc contribuant ainsi à l'orientation de la synthèse vers les CS (26).

L'ajout de la première hexosamine est pris en charge par différentes enzymes de type exostosin-like (EXTL2 et EXTL3) pour l'ajout de glucosamine, GalNAcT-1 et GalNAcT-2 pour l'ajout d'une galactosamine. Par la suite, les exostosines (EXT), des glycosyl-transférases (famille d'enzymes de 1 à 5, dont seule 1 et 2 semblent impliquées chez l'homme), poursuivent l'élongation des chaînes polysaccharidiques (63).

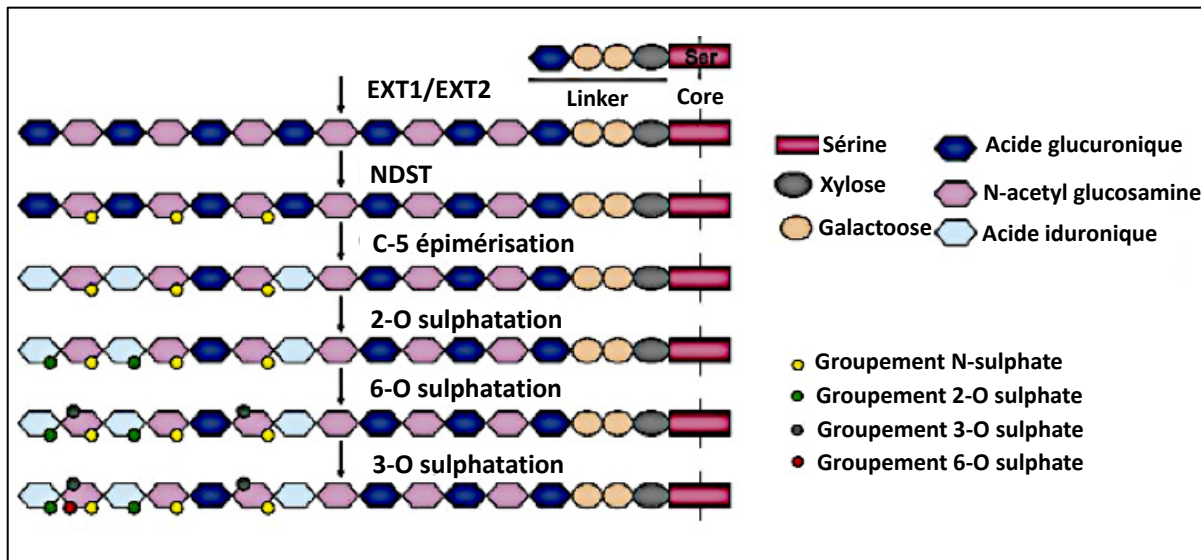
- **Maturation de la chaîne saccharidique**

Trois principales réactions interviennent dans la maturation des chaînes de GAG. La première est la N-déacétylation/N-sulfatation des glucosamines, catalysée par les N-déacétylases/N-sulfotransférases (NDST 1-4, enzymes à double fonction). Cette réaction est considérée comme étant la plus importante de la chaîne de maturation. Etant en amont de toutes les autres, elle contribuera en grande partie à la détermination des domaines S des

chaînes HS (domaines héparane sulfates hautement sulfatés). Elle participe aussi au point de divergence entre les chaînes HS et l'héparine, en déterminant leur taux de N-acétylation qui est le principal critère de distinction entre les deux polysaccharides. Les sulfatations générées par ces enzymes contribuent à conférer aux GAG leur capacité à lier différentes protéines. Ces ligands protéiques peuvent interagir avec des domaines N-sulfatés (NS) uniques, riches en groupements O-sulfate comme c'est le cas pour le FGF ou avec deux domaines NS séparés par des résidus disaccharides N-acétylés (NA), appelés domaines SAS (64) comme cela a été démontré pour le facteur de croissance angiogénique VEGF-A<sub>165</sub> (65), l'interleukine-8 (66) et l'interféron- $\gamma$  (67). Par la suite, une C5-épimérase procède à l'épimérisation du GlcA en IdoA pour les HS, l'héparine et les DS.

Les GAG sont ensuite sulfatés à différentes positions par les O-sulfotransférases (OST) qui transfèrent un groupement sulfate d'un donneur qui est le 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS), vers les résidus osidiques des GAG. Ces sulfatations prennent place en position 2-O pour l'IdoA, 3-O et 6-O pour les GlcNAc, 4-O et 6-O pour les GalNAc (Figure 8).

Ces modifications post-synthèse déterminent l'organisation moléculaire spécifique des GAG qui régule hautement leur activité. Les GAG se présentent sous forme d'alternance entre domaines peu ou pas substitués et relativement homogènes et des domaines substitués et hautement sulfatés appelés « domaines S » qui sont hypervariables et constituent des motifs de reconnaissance et d'affinité pour les ligands.



**Figure 8. Biosynthèse et maturation des glycosaminoglycannes.**

Les GAG sont biosynthétisés à partir d'un tétrasaccharide de liaison (linker) lié à une sérine la protéine centrale lorsque les GAG font partie d'un protéoglycane. Les exostosines (EXT) assurent l'élongation de la chaîne qui sera ensuite prise en charge par les N-déacétylases/N-sulfotransférases (NDST) qui remplacent les groupements N-acétylés par des groupements N-sulfatés. L'acide glucuronique peut subir une épimérisation en position C-5 pour donner l'acide iduronique. Les GAG sont ensuite O-sulfatés à différentes positions (2-O, 3-O, 6-O).

#### d) Catabolisme des GAG

La synthèse et la dégradation des GAG sont étroitement régulées afin de maintenir une concentration constante dans les tissus, certains GAG tels que les HS sont recyclés très rapidement avec un temps de demi-vie de 3 à 4h (68) . Les GAG sont internalisés par endocytose. Des endoenzymes dépolymérisent les chaînes polysaccharidiques en oligosaccharides, puis des exoenzymes les transforment en monosaccharides et en sulfates inorganiques. La dégradation ciblée des GAG en fragments plus petits, ou l'élimination de sulfates spécifiques, modifie l'activité biologique de la chaîne de GAG. Par conséquent, certains de ces événements peuvent être considérés comme une étape de modification fonctionnelle plutôt que de dégradation réelle. Des enzymes de dégradation peuvent avoir une activité extracellulaire et intervenir dans ces modifications fonctionnelles.

- **L'héparanase**

L'héparanase (HPSE) est une endo- $\beta$ -D-glycosidase, synthétisée sous forme de précurseur qui subit un clivage protéolytique donnant une enzyme mature. Elle est active à pH acide et localisée dans les endosomes/lysosomes. Lorsqu'elle est sécrétée dans la MEC

sous certains stimuli tels que les cytokines pro-inflammatoires, l'HPSE clive les chaînes HS au niveau des GlcA, générant des fragments fonctionnels d'environ 20 unités disaccharidiques. Ainsi, l'HPSE intervient dans le remodelage matriciel au cours de l'angiogenèse (69), de l'inflammation (70) et de différents autres processus physiopathologiques. Son action sur les GAG matriciels permet de libérer des facteurs de croissance et des chimiokines qui étaient séquestrés dans la MEC, leur permettant d'induire différents processus cellulaires (prolifération, migration). L'heparanase représente aujourd'hui une vraie cible thérapeutique dans certains cancers pour son rôle dans la croissance tumorale et le processus métastatique (71). L'inactivation du gène de l'HPSE chez des souris n'a pas entraîné d'anomalies du développement, fonctionnelles ou anatomiques apparentes. Cependant, une accumulation de longues chaînes HS a été observée avec une surexpression des métalloprotéases matricielles qui pourrait compenser l'absence de HPSE (72). Une augmentation du taux sérique de l'HPSE est corrélée au potentiel métastatique des cellules tumorales. En effet, la surexpression de l'HPSE dans un modèle cellulaire de myélome démontre que l'activité de l'HPSE peut conduire à des niveaux accrus de protéases qui sont connues pour jouer des rôles importants dans le comportement agressif des tumeurs de myélome. En plus de ses autres rôles biologiques connus, l'HPSE agit donc comme un régulateur principal du phénotype tumoral agressif en régulant à la hausse l'expression et l'activité des protéases dans le microenvironnement tumoral (72).

- **Les sulfatases**

Les sulfatases (Sulf) sont des enzymes qui catalysent la désulfatation de composés sulfatés. Elles sont impliquées dans le catabolisme des GAG dans le lysosme. Leur mutation conduit à l'accumulation de ces substrats et est à l'origine de différentes maladies de surcharge lysosomale telles que les mucopolysaccharidoses (MPS). Une classe de sulfatases portant le nom de Sulfs (Sulf-1 et Sulf-2) a été identifiée et a la particularité d'agir en milieu extracellulaire, à la surface des cellules ou dans la MEC. Ces deux enzymes sont synthétisées à partir d'un peptide précurseur, clivé en deux sous-unités (75 kDa et 50 kDa) liées par des ponts disulfures. Le site catalytique se trouve au niveau de la sous-unité de 75 kDa mais les deux sous-unités sont nécessaires à leur activité (73). Les Sulfs catalysent la 6-O-désulfatation des chaînes HS et de l'héparine sur des motifs spécifiques qui sont des

disaccharides tri-sulfatés [GlcA/IdoA(2S)-GlcNS(6S)] abondamment présents dans les domaines S de ces GAG (74). Si l'on considère la charge globale du polysaccharide, les Sulfs n'apportent qu'une mince réduction de sulfatation (4 à 5%). Mais pourtant, les modifications fonctionnelles qui en résultent semblent conséquentes. En effet, leur action affecte fortement la signalisation du FGF régulant négativement l'activité mitogénique en empêchant la formation du complexe ternaire FGF-HS-FGFR (75). Il a également été démontré que l'activité des Sulfs peut avoir un effet pro ou anti-tumoral selon les modèles biologiques et les voies de signalisation impliquées. La surexpression des Sulfs dans un modèle murin de myélome, induit une inhibition significative de la croissance tumorale (76). A l'inverse, sa sous-expression dans des lignées cellulaires de carcinome pulmonaire humain, a induit une augmentation de 6-O sulfatations à la surface des cellules, a inhibé la signalisation Wnt autocrine et fortement atténué la formation de tumeurs par xénogreffe chez la souris nude. Inversement, l'expression de Sulf-2 dans des cellules épithéliales bronchiques non malignes a produit un phénotype partiellement transformé (77).

#### **e) Fonction des GAG**

Le caractère dynamique de la structure des GAG (longueur des chaînes, degré et position de sulfatation) intimement lié à leur fonction, fait du paysage glycanique un élément déterminant dans la réponse cellulaire à différents stimuli. Ce paysage est hautement régulé en fonction du microenvironnement cellulaire et intervient dans la régulation d'un grand nombre de processus physiopathologiques.

- **Les GAG induisent des changements conformationnels**

Au-delà des phénomènes de capture/séquestration des ligands, l'interaction des GAG avec les molécules peut avoir différents effets. C'est le cas pour l'antithrombine, dont la liaison aux GAG induit un changement conformationnel lui permettant de lier le facteur Xa de la coagulation ce qui conduit à son inactivation.

- **Rôle de corécepteurs des GAG**

Les GAG peuvent être des corécepteurs indispensables à la fonction de différentes protéines. Pour les chimiokines, cette fonction a été étudiée il y a déjà des années. Il a été

démontré que des mutants des chimiokines RANTES/CCL5, MIP-1 $\beta$ , et MCP-1, ayant une capacité réduite de liaison aux GAG témoignent d'une chimiotaxie robuste *in vitro*. Cependant, lorsqu'ils ont été testés *in vivo*, les mutants n'ont pas pu induire de migration cellulaire, même à une dose 10 000 fois supérieure à la dose à laquelle les variants de type sauvage ont induit un recrutement cellulaire statistiquement significatif. Ces données confirment que RANTES/CCL5, MIP-1 $\beta$ , et MCP-1 doivent interagir avec les GAG pour induire la migration cellulaire *in vivo* (78).

L'interaction fonctionnelle avec les GAG concerne aussi pour les facteurs de croissance. La liaison du FGF à des motifs 6-O sulfatés des chaînes HS est une condition essentielle à sa fonction via la formation d'un complexe ternaire, FGF-HS-FGFR induisant des effets biologiques tels que la prolifération (67).

- **Les GAG stabilisent les gradients chimiotactiques**

Les chimiokines sont des petites cytokines dont la fonction est principalement liée au chimiotactisme, c'est-à-dire, l'attraction et l'orientation du déplacement des cellules. Les interactions avec les GAG facilitent la formation de gradients de chimiokines, qui fournissent des repères directionnels aux cellules en migration. Au niveau vasculaire, l'interaction de la chimiokine CXCL12 avec les GAG, aboutit à la mise en place d'un gradient de concentration de cette chimiokine, qui permet le recrutement des cellules progénitrices endothéliales. Une inflammation comme celle observée lors d'une ischémie-reperfusion peut induire le clivage des GAG de la surface des CE, qui peuvent alors lier et séquestrer les chimiokines dans le sang et réduire la migration des leucocytes (79,80). Lors de la régénération du glycocalyx, la régulation à la hausse de l'expression des enzymes NDST augmente l'étendue de la N-sulfatation, qui à son tour augmente le potentiel de l'endothélium à lier et à présenter les chimiokines pro-inflammatoires (81). Ceci met en évidence la flexibilité et la régulation variée des GAG endothéliaux et leur capacité à moduler la fixation des chimiokines et la migration des leucocytes qui s'ensuit.

Cependant, cette fonction des GAG semble être à la fois tissu- et chimiokine-dépendante. En effet, l'absence de chaînes HS dans les CE de l'endothélium lymphatique n'a entraîné qu'une modeste diminution des niveaux de la chimiokine CCL21 au niveau des capillaires lymphatiques et n'a pas affecté la forme du gradient interstitiel de CCL21 ni la migration des

cellules dendritiques vers les capillaires lymphatiques. Ainsi, les HS localisés au niveau de l'endothélium lymphatique ne sont pas nécessaires à la formation d'un gradient fonctionnel de CCL21(82). En revanche, le marquage fluorescent de la chimiokine CCL21 à la surface de cellules d'ovaire de hamster (CHO) dépendait de la présence du récepteur CCR7 mais également des GAG. En effet, le blocage du récepteur avec des anticorps anti-CCR7, le traitement avec de l'héparitinase ou l'utilisation de cellules déficientes dans la synthèse des GAG, ont tous provoqué une réduction significative de la présence de CCL21 à la surface des cellules. Cette étude a donc caractérisé CCR7 et les chaînes HS comme corécepteurs pour l'accumulation de CCL21 sur les CHO et la formation d'un gradient chimiotactique (83). De plus, des études ont montré que la chimiokine CXCL8 se fixe à son récepteur spécifique CXCR1 sous forme monomérique. Sous forme dimérique, CXCL8 se lie aux GAG, mais présente alors beaucoup moins d'affinité pour le récepteur CXCR1. Cela suggère que CXCL8, lorsqu'il est lié aux GAG, ne peut pas accéder au récepteur (84). La liaison de CXCL8 aux GAG est médiée par les résidus basiques Arg, Lys, His (85). La substitution ciblée de ces résidus de base par des résidus non chargés comme l'alanine réduit ce recrutement *in vivo* des neutrophiles dans le péritoine (86), mais augmente le recrutement dans les poumons(87). Ces différents schémas de recrutement des neutrophiles en réponse à CXCL8 entre le péritoine de la souris par rapport au poumon pourraient être attribués à des différences dans les gradients de chimiokines dues à des structures et compositions de GAG différentes entre ces tissus, et par des différences dans la cinétique de liaison ou les taux de diffusion, ce qui ajoute une complexité supplémentaire à ce sujet.

- **Les GAG protègent contre la protéolyse**

La dégradation protéolytique est un mécanisme de régulation de l'activité des chimiokines. Une enzyme qui s'est avérée provoquer la protéolyse de l'extrémité NH<sub>2</sub> de diverses chimiokines est la dipeptidyl peptidase IV ou CD26. Selon la chimiokine ciblée, cette protéolyse peut entraîner une augmentation ou une diminution de l'activité biologique. La liaison de CXCL12 aux GAG la protège de cette dégradation par le complexe CD26 protégeant sa fonction. Il a été rapporté que l'héparine et les HS empêchent spécifiquement la protéolyse de CXCL12 par la CD26 exprimée par les cellules d'adénocarcinome colorectal,

Caco-2. Le niveau de clivage augmente avec le niveau de différenciation de ces cellules, ce qui est corrélé avec une augmentation de l'activité de la CD26. Un mutant de CXCL12 qui n'interagit pas avec les HS est facilement clivé par la CD26, ce qui démontre qu'une interaction productive entre les HS et CXCL12 est nécessaire à cette protection. Les mécanismes par lesquels les HS régulent l'activité de CXCL12 peuvent donc inclure, en plus de leur capacité à concentrer localement la chimiokine à la surface des cellules, un contrôle des événements de clivage sélectif par les protéases qui affectent directement l'activité de la chimiokine (88). C'est également le cas pour l'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) qui présente deux domaines D1 et D2 sujets à la protéolyse. Les GAG fixent le domaine D1 et le protègent contre la dégradation, la protéine tronquée (sans domaine D2) est plus stable et présente une plus forte activité (89). En outre, il a été démontré que la liaison à l'héparine *in vivo* protège CCL11 contre la protéolyse médiée par la plasmine, la cathepsine G et l'élastine et affecte positivement l'activité chimiotactique de la chimiokine (90).

#### **f) Défaut de synthèse des GAG : conséquences physiopathologiques**

Les avancées récentes de la glycobiochimie ont mis en évidence l'importance des glucides. Les GAG ont des effets étendus sur la signalisation cellulaire, le développement embryonnaire, la biologie des tissus conjonctifs, la coagulation et une multitude d'autres processus biologiques. Les GAG sont synthétisés par une machinerie moléculaire très complexe. Bien que les molécules impliquées dans leurs voies de biosynthèse soient identifiées, la caractérisation fonctionnelle de chacune d'elle reste encore à explorer. Néanmoins, ces dernières années différentes pathologies ont été identifiées et qui seraient dues à un défaut de biosynthèse des GAG. À ce jour, une vingtaine d'affections causées par 16 protéines impliquées dans la biosynthèse des GAG ont été répertoriées. Un plus grand nombre de pathologies semblent avoir cette origine mais cette causalité n'est pas encore prouvée. Par exemple, des mutations hétérozygotes du gène *GALNT1*, codant pour la GalNAcT-I transférase, ont été trouvées chez deux patients atteints de neuropathie motrice et sensorielle (91). Cependant, il n'y avait aucune preuve directe d'une relation de cause à effet entre cette mutation et la pathologie. L'association entre l'expression des gènes codant les enzymes de biosynthèse de l'HA et le cancer est bien décrite. La surexpression de l'une des trois HA synthases, qui augmente le taux d'HA, a été associée à l'accélération de la



croissance tumorale et à la formation de métastases (92). À l'inverse, la surexpression des hyaluronidases, enzymes qui dégradent le HA, est également retrouvée dans le cancer (93). Par conséquent, un équilibre entre la production et la dégradation de l'HA est peut-être impliqué dans la protection contre le développement tumoral, mais le mécanisme est inconnu.

- **Pathologies dues à une biosynthèse défectueuse du tétrasaccharide de liaison**

Six affections connues à ce jour résultent de défauts enzymatiques dans la biosynthèse du tétrasaccharide de liaison commune, qui est nécessaire à la synthèse des HS, de l'héparine, des CS et des DS. Le premier sucre est fixé par les xylosyl transférases (XylT) I et II, codées par *XYLT1* et *XYLT2*, respectivement. Les XylTI et XylTII ont des fonctions très similaires et sont co-exprimées dans de nombreux tissus avec quelques différences spatio-temporelles et tissu-spécifiques qui peuvent expliquer les phénotypes cliniques distincts (94). Le phénotype associé à la déficience en XylT-I décrit la dysplasie de Desbuquois de type 2, une affection autosomique récessive caractérisée par une laxité, une chondrodysplasie, et une dislocation des grandes articulations, un retard de croissance pré et postnatal sévère et un visage plat avec des yeux proéminents (95). Les patients présentant une déficience en XylT-II montrent des cataractes, un syndrome spondylo-oculaire, des fractures induites par l'ostéoporose, une perte auditive neurosensorielle et des anomalies cardiaques (96). Des anomalies de GalT-I et GalT-II, les enzymes qui ajoutent les deuxième et troisième sucres, présentent des phénotypes cliniques presque identiques : la forme progéroïde de type I et II du syndrome d'Ehlers-Danlos. Les principales caractéristiques de ces deux troubles autosomiques récessifs sont une atteinte des os, des articulations et de la peau avec des caractéristiques progéroïdes, un retard de croissance et de développement et des vaisseaux fragiles (97). Enfin, la déficience en GlcAT-1, l'enzyme qui achève la synthèse du tétrasaccharide de liaison par l'ajout du quatrième et dernier sucre, provoque le syndrome de Larsen. Cette affection autosomique récessive est caractérisée par une scoliose, une ostéopénie, une laxité et une dislocation, en particulier des grandes articulations (genou, hanche, coude), et par des caractéristiques dysmorphiques (98,99).

- **Pathologies dues à une sulfatation et une épimérisation défectueuses des GAG**

La synthèse des GAG, à l'exception de l'HA, est complétée par une sulfatation importante à des positions spécifiques, catalysée par de multiples sulfotransférases. Des mutations des gènes des sulfotransférases ont été associées à plusieurs syndromes. De plus, des désordres ont été associés à des mutations dans les gènes codant pour la PAPS synthase 2 et dans les gènes codant pour des GAG épimérases. Des phénotypes cliniques très similaires ont été décrits concernant des mutations de gènes codant des sulfotransférases et des épimérases. En effet, les syndromes d'Ehlers-Danlos, musculocontracturaux de type 1 et 2 (EDSMC1 et 2) sont dus à une déficience d'une enzyme biosynthétique des chaînes DS : la dermatane 4 sulfotransférase (D4ST) dans l'EDSMC1 et la DS épimérase dans l'EDSMC2. Les deux syndromes présentent des atteintes pulmonaires, osseuses, cutanées, articulaires et cardiaques (100,101). La dysplasie spondyloépiphysaire avec dislocations articulaires congénitales est due à un déficit en chondroïtine 6 sulfotransférase (C6ST), une autre enzyme de la sulfatation des CS. Elle est caractérisée par des atteintes de la colonne vertébrale et des membres auxquelles s'ajoutent une dislocation congénitale des articulations mais également une atteinte des valves cardiaques (102,103).

- **Pathologies dues à une défaillance du catabolisme des GAG**

Lorsque les enzymes de catabolisme des GAG sont défaillantes, des pathologies dites de surcharge lysosomale peuvent apparaître. Ces maladies sont communément connues sous le nom de mucopolysaccharidoses (MPS) et peuvent être classées en sept catégories principales [1], comprenant la MPS I (Hurler, Hurler-Scheie, syndrome de Scheie), MPS II (syndrome de Hunter), MPS III (syndrome de Sanfilippo), MPS IV (syndrome de Morquio), MPS VI (syndrome de Maroteaux-Lamy), MPS VII (syndrome de Sly) et MPS IX (syndrome de Natowicz, déficit en hyaluronidase) (Tableau 1)(104,105). L'accumulation de GAG non dégradés affecte les fonctions de divers tissus et organes. Les patients atteints de MPS présentent des phénotypes cliniques caractéristiques tels que des traits faciaux grossiers, des anomalies squelettiques, une hépatosplénomégalie, des infections fréquentes telles que des sinusites ou des otites, une peau épaisse, une atteinte cardiaque et des problèmes respiratoires et une espérance de vie réduite. L'expression de ces symptômes varie en

fonction du type de MPS. Les types de MPS, l'enzyme à l'origine de l'affection ainsi que les types de GAG accumulés sont présentés dans ce tableau 1.

**Tableau 1. : Classification des mucopolysaccharidoses.**

Type clinique	I	II	III	IV	VI	VII	IX
Syndrome	Hurler, Scheie	Hunter	Sanfilippo	Morquio	Maroteaux, Lamy	Sly	Natowicz
Enzyme défailante	IDUA	IDS	SGSH NAGLU HGSNAT GNS	GALNS $\beta$ GAL	ARSB	GUSB	HD
Type de GAG accumulé	DS/HS	DS/HS	HS	KS/C6S	DS/C4S	DS/HS/C4,6 S	HA

**IDS** : iduronate sulfatase, **IDUA** :  $\alpha$ -L-iduronidase, **SGSH** : N-sulfoglucosamine sulfhydrolase, **NAGLU** : N-acetylglucosaminidase, **HGSNAT** : héparane- $\alpha$ -glucosaminide N-acétyltransférase, **GNS** : N-acétyl glucosamine-6-sulfatase, **GALNS** : N-acétylgalactosamine 6-sulfatase,  **$\beta$ GAL** :  $\beta$ -galactosidase, **ARSB** : arylsulfatase B, **GUSB** :  $\beta$ -glucuronodase, **DS** : dermatane sulfate, **HS** : héparane sulfate, **C4S** : chondroïtine 4-sulfate, **C6S** : chondroïtine 6-sulfate, **C4,6S** : Chondroïtine 4- et 6-sulfate, **HA** : acide hyaluronique.

Le stockage lysosomal peut empêcher la fusion des autophagosomes avec les lysosomes, entraînant une accumulation des autophagosomes, des dysfonctionnement mitochondriaux et la mort cellulaire (106). Des études ont démontré le lien existant entre l'altération de l'autophagie et les pathologies neuronales. Les maladies amyloïdes sont des troubles liés à un mauvais repliement des protéines qui forment des dépôts fibrillaires et s'accumulent dans différents tissus. Il a été démontré dans un modèle murin de MPS de type III, que l'inhibition de l'auto-assemblage des protéines amyloïdes réduit l'élargissement des lysosomes et réactivé le flux d'autophagie. La restauration de l'Autophagie était associée à une réduction de la neuroinflammation et à une amélioration des déficits de mémoire (107).

- **Dépistage**

Devant la complexité et la diversité des voies de biosynthèse et de métabolisme des GAG, il est encore difficile de dresser une liste exhaustive de toutes les maladies résultant de la défaillance de cette machinerie. Malgré le caractère assez rare des pathologies dont

l'association à un défaut de biosynthèse des GAG a été prouvée, la sévérité des phénotypes cliniques qui en résultent font du dépistage et du suivi de ces maladies un enjeu majeur. À ce jour, les méthodes de dépistage restent laborieuses. Elles reposent sur une recherche génétique des mutations et une évaluation des GAG à partir des échantillons du patient. Le séquençage du génome permet d'identifier les variantes éventuellement pathogènes dans les gènes associés à la biosynthèse et au métabolisme des GAG. Des fibroblastes provenant de biopsies de peau sont cultivés avec des substrats radiomarqués et la radioactivité mesurée dans les extraits cellulaires reflète les capacités de biosynthèse des GAG. Les fibroblastes sont également utilisés pour des analyses fonctionnelles mesurant l'activité de l'enzyme ou du transporteur soupçonné d'être défectueux. Dans le sang et l'urine, les GAG peuvent être évalués en analysant les disaccharides purifiés et libérés à l'aide de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/MS) (108).

## **2. Les protéoglycannes**

### **a) Généralités**

A l'exception de l'HA, les GAG présents dans le glycocalyx endothélial peuvent être liés de manière covalente à des protéines, formant les PG. Les PG se distinguent des glycoprotéines par UNE fraction glucidique plus imposante que leur fraction protéique. Ils sont exprimés chez les eucaryotes de manière ubiquitaire mais de façon différentielle entre les types cellulaires (109).

### **b) Biosynthèse des PG**

La biosynthèse des PG débute après la translocation des composants protéiques des ribosomes vers le réticulum endoplasmique (RE). La glycosylation est ensuite initiée sur la protéine centrale du PG dans l'appareil de Golgi ou à l'interface RE-Golgi. Une liaison O-glycosidique lie la protéine centrale et les chaînes GAG. Elle s'établit entre le groupement OH d'une sérine de la protéine, située dans un motif particulier « sérine-glycine », et le xylose du tétrasaccharide de liaison des chaînes GAG (110). Puis, la biosynthèse des GAG se poursuit dans la lumière de l'appareil de Golgi, suivant les étapes décrites précédemment. Pour les PG portant des chaînes KS, la liaison entre la protéine centrale et les chaînes GAG est de type GlcNAc–Asparagine or GalNAc–sérine/thréonine.

### c) Les différents types de PG

Les PG présentent des variations qui concernent la taille de leurs protéines centrales, le nombre de chaînes de GAG qui y sont attachées et leur liaison ou non à la membrane des CE. Les principaux PG présents dans le glycocalyx endothélial sont représentés dans le Tableau 2.

**Tableau 2. Caractéristiques des protéines centrales et des GAG constitutifs des PG présents dans le glycocalyx endothélial vasculaire.**

Groupe de protéine centrale	Taille de la protéine centrale (kDa)	Nombre de sous types	Nombre de chaînes GAG liées	Type de chaînes GAG liées	Attachement à la membrane cellulaire
Syndécanne	19–35	4	5	HS/CS	Transmembranaire
Glypicanne	57–69	6	3	HS/CS	Ancre GPI
Perlécane	400	1	3	HS/CS	Secrété
Versicane	370	1	10–30	CS/DS	Secrété
Décorine	40	1	1	CS/DS	Secrété
Biglycane	40	1	2	CS/DS	Secrété
Mimécane	35	1	2–3	KS	Secrété

*Le glycocalyx endothélial vasculaire est composé de différents types de PG, qui diffèrent par la taille de leurs protéines centrales et le nombre de chaînes de GAG attachées. Ces PG peuvent être attachés à la membrane cellulaire par un domaine transmembranaire ou par une ancre GPI. (D'après Reitsma S et al., 2007) (38)*

Les PG sont retrouvés au niveau intracellulaire, membranaire, péricellulaire et extracellulaire (111). Ces différentes localisations, associées à leur diversité structurale, leur permettent de participer à une grande variété de processus cellulaires. Alors que la protéine centrale des PG dirige la localisation des PG, leurs chaînes de GAG semblent être responsables de la plupart de leurs fonctions biologiques.

#### i. Les PG intracellulaires

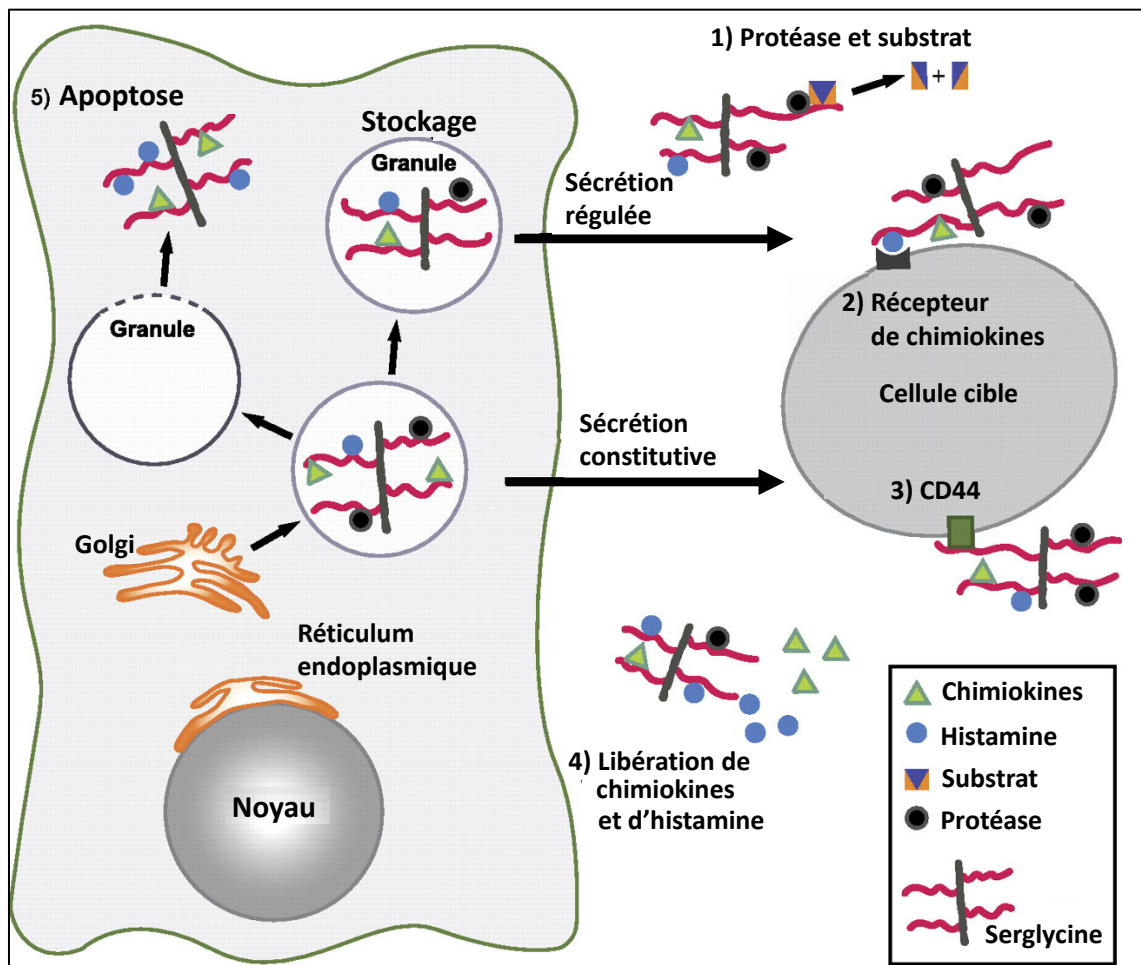
Jusqu'à présent, on a accordé moins d'attention aux PG situés dans les compartiments intracellulaires, bien que plusieurs rapports suggèrent que ceux-ci ont des

fonctions biologiques dans les granules de stockage, le noyau et d'autres organites intracellulaires. Le seul PG intracellulaire connu aujourd'hui est la serglycine (Srgn).

- **La serglycine** fut le premier PG dont le gène a été séquencé. Elle occupe une classe à part dans la mesure où elle est le seul PG substitué de manière covalente à l'héparine en raison de ses répétitions Ser-Gly consécutives et uniques qui lui donnent son nom. Le type et la sulfatation des chaînes de GAG qui décorent la Srgn sont des éléments dépendants du type cellulaire : les mastocytes du tissu conjonctif décorent la Srgn avec de l'héparine (112), tandis que les mastocytes du tissu muqueux décorent la Srgn avec des chaînes CS(113), les neutrophiles et les plaquettes décorent la Srgn avec des chaînes CS, et les macrophages décorent la serglycine avec des CS et des HS (114). La Serglycine est principalement utilisée par les mastocytes pour l'assemblage et le conditionnement de nombreuses protéases libérées lors d'une inflammation (115). Les défauts de formation des granules des mastocytes retrouvés chez des souris *Srgn<sup>-/-</sup>* sont les mêmes retrouvés chez les souris *NSDT2<sup>-/-</sup>* (enzyme impliquée dans la sulfatation des chaînes d'héparine) (115), suggérant que la Srgn, favorise le stockage granulaire via l'interaction de ses chaînes d'héparine anioniques avec les résidus basiques des protéases des granules sécrétoires. Cependant, Les granules sécrétoires des mastocytes contiennent de grandes quantités de protéases entièrement actives liées à la Srgn. L'endommagement de la membrane du granule entraîne la libération de la Serglycine et des protéases liées à la Srgn dans le cytosol, ce qui pourrait conduire à l'activation protéolytique de composés pro-apoptotiques cytosoliques. En effet, les mastocytes de type sauvage sont très sensibles à l'apoptose induite par la perméabilisation des granules, alors que les cellules déficientes en Serglycine y sont largement résistantes. La sensibilité réduite des cellules *Srgn<sup>-/-</sup>* à l'apoptose s'accompagne d'une réduction des dommages causés aux granules, d'une réduction de la libération des protéases dans le cytosol et d'une activation défectueuse de la caspase-3 (116).

Initialement, la Srgn était décrite comme un PG propre aux lignées hématopoïétiques mais il a été récemment démontré que ce PG était exprimé par d'autres types cellulaires tels que les CE, où la Srgn est impliquée dans la sécrétion d'une cytokine pro-inflammatoire (CXCL1) (117) et les chondrocytes, où la Srgn a été co-localisée avec la MMP-13 dans une configuration granulaire cytoplasmique. Sa liaison à la MMP-13 suggère un rôle dans la

régulation de la dégradation du cartilage (118). La Srgn est sécrétée soit de manière constitutive, soit de manière régulée sous certains stimuli inflammatoires tels que le TNF (119) et le LPS (120). Lorsqu'elle est sécrétée, la Srgn agit comme un véhicule pour la livraison extracellulaire de composés qui y sont complexés. Après la sécrétion, certains des composés associés à la Srgn, par exemple l'histamine, seront libérés de la Srgn en raison de l'augmentation du pH du milieu extracellulaire, tandis que d'autres peuvent rester attachés même après l'exocytose. Une association avec la Srgn après la sécrétion peut avoir des conséquences fonctionnelles considérables. Par exemple, la Srgn peut protéger contre la protéolyse, faciliter la présentation des substrats aux protéases liées à la Srgn, servir de médiateur pour le transport de composés vers d'autres sites anatomiques (121), ou aider à la présentation de molécules, par exemple, les chimiokines à leurs cellules cibles (117,122). La Srgn peut avoir un effet immunomodulateur en liant et en séquestrant les composés inflammatoires dans le milieu extracellulaire. Il a également été démontré que la Srgn sécrétée se lie aux surfaces cellulaires en interagissant avec CD44 (Figure 9) (123).



**Figure 9. Fonctions de la serglycine.**

Selon le type cellulaire, la Serglycine (Srgn) est soit sécrétée de manière constitutive, soit transportée vers des vésicules sécrétoires (granules) pour une sécrétion régulée. Plusieurs types de composés sont liés à la Srgn et sont libérés complexés au PG : 1) La Srgn se lie aux protéases et permet une meilleure présentation du substrat; 2) la Srgn peut faciliter le transport, par exemple, des chimiokines vers leurs cellules cibles et aider à leur présentation aux récepteurs; 3) après la sécrétion, la Srgn peut interagir avec les surfaces cellulaires, soit par l'intermédiaire du CD44, soit par d'autres partenaires ; 4) certains des composés liés à la Srgn seront détachés de la Srgn après la sécrétion, tandis que d'autres resteront attachés à la Srgn ; et 5) en cas de perforation des granules sécrétoires, les complexes Srgn-protéase sont libérés dans le cytosol et peuvent provoquer l'apoptose. (D'après Kolset S.O et al., 2011) (112) .

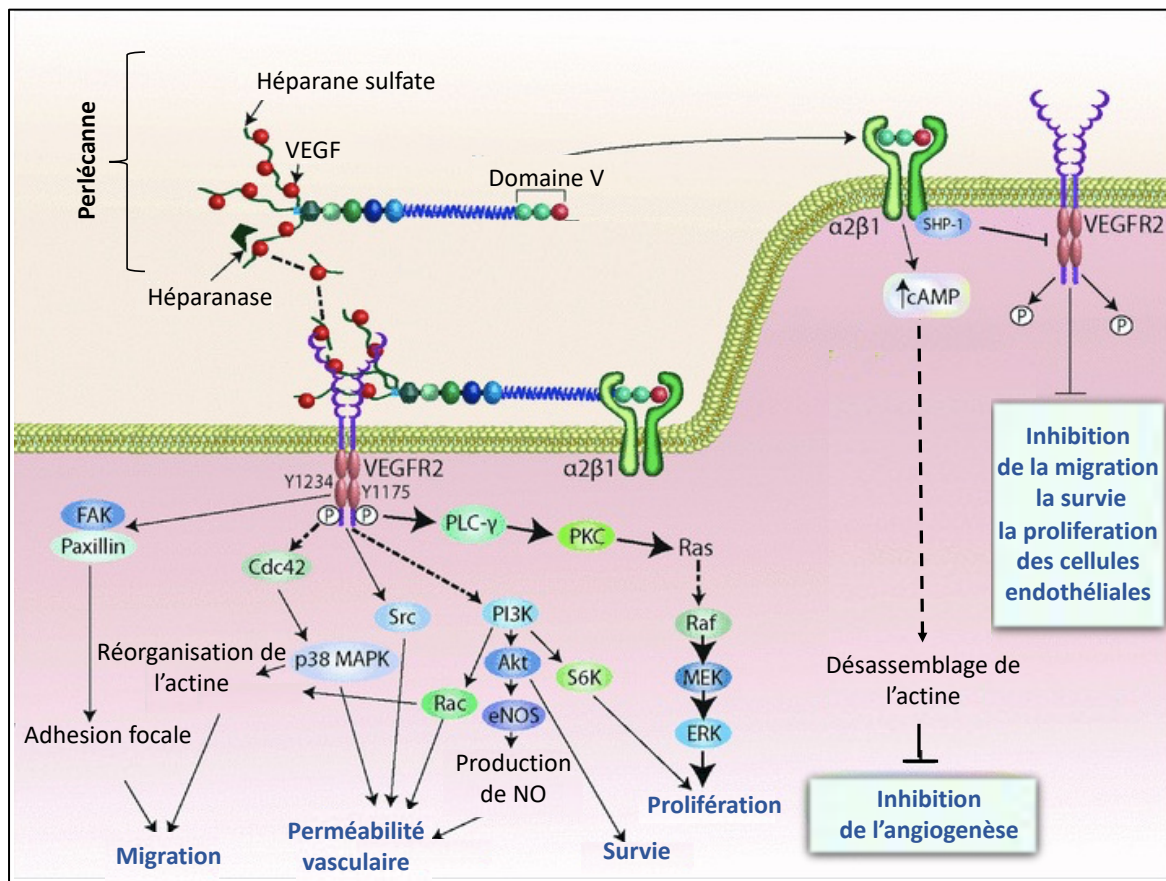
## ii. Les PG matriciels : exemples du perlécane, de la décorine et du versicane

Les PG sont les composants majoritaires de la MEC. Ils se lient à d'autres composés pour former la lame basale ou le tissu conjonctif. Leur architecture structurale complexe ne fait pas seulement office d'échafaudage soutenant les cellules, mais influence également les processus biologiques tels que la différenciation, la survie, la prolifération et le mouvement



des cellules. Les PG matriciels sont classés en trois groupes : les PG de la membrane basale tel que le perlécane, les PG riches en leucine ou SLRP « small leucine rich proteoglycans » comme la décorine et les hyalectannes comme le versicane et l'aggrécane.

- **Le perlécane** est un PG principalement retrouvé dans la membrane basale. Sa protéine centrale est caractérisée par une structure complexe composée de 5 domaines différents (I à V) pouvant porter 1 à 3 chaînes HS (124). Les chaînes HS du perlécane peuvent réguler différentes fonctions cellulaires en servant de corécepteur à des facteurs de croissance, intervenant ainsi dans l'induction de la signalisation cellulaire. En effet, il a été démontré que le perlécane se lie au VEGF-A (125) de manière dépendante des chaînes HS. Cette liaison augmente l'activation du VEGFR2 par le VEGF dans les CE humaines entraînant une augmentation de la signalisation et de la formation de tubes vasculaires *in vitro* (126). De plus, il a été démontré, dans un modèle de CE microvasculaires cérébrales humaines, que le VEGF induit l'expression du perlécane, suggérant l'existence d'une boucle de rétroaction positive pour ce PG dans la cascade de signalisation angiogénique (127). Les effets proangiogéniques du perlécane sont exercés principalement par sa partie N-terminale où se trouve le domaine I, porteur des chaînes HS. Cependant, lorsque sa partie C-terminale est clivée par des protéases telles que la cathépsine, son domaine V est libéré et agit de manière contraire à savoir qu'il inhibe l'angiogenèse et la migration des CE (128). Un des mécanismes qui expliquent cet effet, est la capacité du domaine V à agir comme un inhibiteur allostérique du VEGFR ou via son interaction avec les intégrines, ce qui conduit à la perturbation du cytosquelette d'actine, mais aussi à l'activation de la phosphatase SHP-1 qui déphosphoryle le VEGFR, inhibant son activation (129). (Figure 10)



**Figure 10. Représentation schématique de la double activité du perlécane.**

Le perlécane peut agir comme un puissant facteur pro-angiogénique, soit en présentant directement le VEGFA au VEGFR2, soit indirectement à la suite du clivage partiel par l'héparanase des chaînes héparane sulfate. Les deux peuvent déclencher la signalisation du VEGFR2 avec une stimulation de la migration, de la perméabilité vasculaire, de la survie et de la prolifération. Le perlécane peut également agir comme un puissant facteur anti-angiogénique à la suite du clivage de son domaine V. Ce fragment C-terminal se lie avec une grande affinité à l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  déclenchant une cascade de signaux qui conduit à la perturbation du cytosquelette endothélial et de la motilité des cellules endothéliales. Ce fragment active également la tyrosine phosphatase SHP-1 qui est liée au domaine cytoplasmique de l'intégrine. SHP-1 déphosphoryle alors un certain nombre de RTKs dont le VEGFR2, bloquant ainsi la migration, la survie et la prolifération des cellules endothéliales. (D'après Iozzo RV et al., 2011) (130).

- **La décorine** est un PG faisant partie des SLRP, des PG de faible poids moléculaire, portant des domaines riches en résidus leucine (LRR : *Leucine Rich Repeats*), dont la séquence d'acides aminés est composée de « LxxLxLxxNxL ». Le L est un résidu Leucine, le N est une asparagine et le X peut être n'importe quel acide aminé (131). Ces LRR peuvent contenir des sites de liaison des chaînes DS/CS comme ceux de la décorine ou des chaînes KS pour le lumicanne. Ces PG interviennent dans la fibrillogenèse du collagène, s'impliquant ainsi dans l'organisation structurale de la MEC (132). D'ailleurs, la décorine a longtemps été

considérée comme un PG intervenant exclusivement dans la structure de la MEC, compte tenu de son rôle dans l'orientation et l'assemblage des fibres de collagène (133). Mais plus tard, la capacité de ses chaînes CS/DS à lier des molécules effectrices solubles, lui a attribué un rôle fonctionnel dans la modulation de l'activité de ces molécules et de leurs récepteurs. La première observation du rôle de la décorine dans la modulation de la bioactivité des facteurs de croissance provient d'études utilisant des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) dont la croissance dépend du TGF- $\beta$ . Les CHO exprimant la décorine forment une monocouche plus ordonnée et croissent jusqu'à une densité de saturation plus faible que les cellules dépourvues de décorine. Ces changements sont corrélés avec les niveaux d'expression de la décorine (134). Par la suite, il a été démontré que le TGF- $\beta$  sécrété agissant de manière autocrine sur la prolifération des CHO, induit l'expression de la décorine qui se lie au facteur de croissance et module son effet prolifératif sur les CHO. La décorine sert donc de moyen de régulation négative de la fonction du TGF- $\beta$  (135). La décorine régule les processus biologiques également via un effet antagoniste sur les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), notamment en induisant leur internalisation. L'EGFR (*Epithelial growth factor receptor*) a été identifié comme partenaire d'interaction de la décorine, le PG interagit avec l'EGFR sur un site de liaison qui chevauche partiellement avec celui de l'EGF mais qui reste distinct (136). Cette liaison induit l'internalisation du récepteur par endocytose cavéolaire alors que l'EGF induit l'internalisation de son récepteur par la voie des clathrines (137). Cette internalisation induite par la décorine aboutit à une régulation négative physique du récepteur EGFR et une diminution considérable de sa présence à la surface cellulaire (138). Ainsi, son rôle dans la régulation de la prolifération fait de la décorine un candidat intéressant pour les thérapies cancéreuses. Il a été démontré que la transfection de lignées cellulaires de cancer du sein métastatique, MDA-MB-231 par un vecteur cytomégaloviral contenant le gène de la décorine, entraîne une forte réduction de la croissance cellulaire, et de la motilité. L'incidence et l'étendue des métastases osseuses ont également été réduites de 90% (139). De même, l'administration systémique de la décorine ou de sa protéine centrale inhibe la croissance tumorale dans divers modèles de xénogreffes, y compris les carcinomes squameux, du sein et de la prostate (140–142). Les effets *in vivo* de la décorine, montrent une régulation négative concomitante de l'EGFR dans

les xénogreffes tumorales et une induction de l'apoptose, principalement par l'activation de la caspase-3 (141).

- **Le versicanne** fait partie de la famille des hyaléctannes également connus sous le nom de lecticanes. Ce sont des PG qui se fixent à l'HA au niveau N-terminal et participent à l'organisation de la MEC. Le versicanne est un gros PG dont le poids moléculaire peut dépasser les 1000 kDa. Il porte des chaînes CS/DS et comprend 3 isoformes issues de l'épissage alternatif des exons codant pour les régions d'attachement des GAG, GAG- $\alpha$  et GAG- $\beta$ . L'isoforme V0 contient les deux régions GAG- $\alpha$  et GAG- $\beta$ , le V1 ne contient que la région GAG- $\beta$ , la V2 que la région GAG- $\alpha$ , la V4 contient uniquement une partie de la région GAG- $\beta$ , tandis que la V3 ne contient aucune de ces régions et est plutôt considéré comme une glycoprotéine (143–145). Les isoformes V0 et V1 sont largement exprimées dans tout l'organisme tandis que les isoformes V2 et V3 sont principalement exprimées dans le système nerveux central (143,146,147). L'expression de V4 reste mal caractérisée (145).  
Lorsqu'il se lie au HA, le versicanne intervient dans le remodelage cellulaire et la rétention d'eau (148). Le remodelage et la perturbation de la MEC sont des facteurs clés de la progression tumorale et le versicanne semble y avoir un rôle important. Il a été démontré que le versicanne est surexprimé dans une multitude de cancers comprenant le cancer du sein (145), de la prostate (149), de l'ovaire (150) et du pancréas (151). De plus, l'expression du versicanne dans des lignées cellulaires de cancer du sein a favorisé la croissance tumorale et augmenté les métastases à distance, ce qui est corrélé avec des niveaux accrus d'EGFR à la surface des cellules (152). Dans les CE, le versicanne est peu exprimé mais son expression est régulée à la hausse lors de l'activation des CE par des facteurs de croissance ou des cytokines. En effet, les CE isolées de différentes sources tissulaires transcrivent plusieurs isoformes de versicanne mais ne parviennent pas à traduire ces ARNm en protéoglycannes détectables. Cependant, si elles sont stimulées par le TNF- $\alpha$  ou le VEGF, elles modifient leur expression du versicanne en transcrivant *de novo* l'isoforme V3 et en présentant une production modérée de V1/V2. La synthèse de versicanne induite et l'expression de novo de V3 ont également été observées dans les CE dont la migration a été induite dans un modèle de test de blessure *in vitro* et dans les CE angiogéniques formant des tubes vasculaires sur Matrigel (153).

### iii. Les protéoglycannes membranaires

- **Les principaux PG membranaires**

Le positionnement des PG membranaires à l'interface entre la cellule et la MEC, leur attribue des fonctions majeures dans les interactions entre la cellule et son environnement, la transduction des signaux et ainsi, la modulation de processus cellulaires induits par des stimuli externes. Ils détiennent un rôle majeur dans différents processus physiopathologiques tels que l'adhérence, la migration cellulaires et l'angiogenèse (119, 120). La majorité des PG membranaires sont des PG à chaînes HS (HSPG). Les glypicannes (GPC) et les syndécannes (SDC) sont les deux grandes familles de HSPG membranaires. Ils se distinguent par la nature de leurs protéines centrales et leur mode d'ancrage à la membrane cellulaire. Les SDC se lient à la membrane via leur domaine transmembranaire, tandis que les GPC ont un domaine d'ancrage à la membrane de type glycosyl-phosphatidylinositol (GPI).

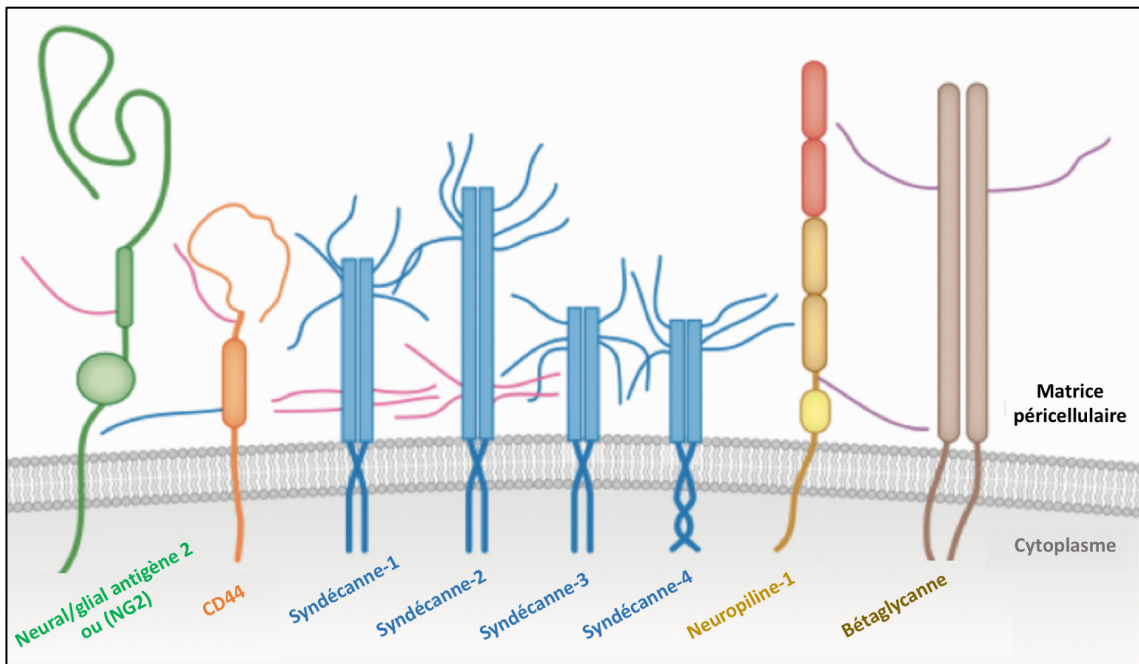
- **D'autres PG membranaires**

En dehors des SDC et des GPC, des chaînes GAG ont été retrouvées sur d'autres protéines membranaires qui ont donc été classées parmi les PG. C'est le cas du CD44, de la neuropiline-1 et du récepteur 3 du TGF- $\beta$  appelé bétaglycane. Il s'agit de PG à temps partiel, car ils peuvent apparaître sous forme de PG ou de glycoprotéines dépourvues de GAG. Les chaînes GAG associées à ces PG peuvent être des HS, des DS ou des CS. Ces PG ont un rôle de corécepteur.

**Le bétaglycane** interagit avec le TGF- $\beta$  via sa protéine centrale et avec le FGF via ses chaînes HS (154) . En plus d'être le récepteur membranaire du hyaluronane (155), **le CD44** constitue un corécepteur pour plusieurs facteurs de croissance tel que le facteur de croissance des hépatocytes (HGF). En effet, Dans une lignée cellulaire de lymphome de Burkitt dépourvue à la fois de CD44 et du récepteur du HGF « Met », la transfection du récepteur Met seul n'était pas suffisante pour qu'il soit activé par son ligand (HGF). Cette activation nécessite la co-transfection du CD44 (156) . Le CD44 intervient également dans l'angiogenèse (157). Par exemple, le CD44 se lie à la chimiokine pro-angiogénique RANTES sur les cellules endothéliales progénitrices, intervenant dans l'angiogenèse induite par cette

chimiokine. En effet, l'utilisation d'anticorps anti-CD44a diminué la fixation de RANTES à la surface des CE progénitrices, et a également diminué l'étalement, la migration et la formation de réseaux vasculaires induits par RANTES (158). Le CD44 agit dans le développement de l'athérosclérose en médiant le recrutement des cellules inflammatoires et l'activation des cellules vasculaires (159) . Quant à **la neuropiline-1**, c'est une protéine membranaire qui intervient dans l'immunité cellulaire (160) et dans l'embryogenèse du système cardiovasculaire (161). Elle est également connue pour son rôle de corécepteur du VEGF. Dans les CE au sein desquelles on observe une substitution de la neuropiline-1 par des chaînes HS, la signalisation en réponse au VEGF est renforcée (162) . En revanche, une grande partie de la neuropiline-1 des CML vasculaires est substituée par des CS, et les réponses au VEGF sont réduites, ce qui suggère que ces formes peuvent constituer des récepteurs leurres (163). Il a également été démontré que la neuropiline-1 est impliquée dans le remodelage pathologique des CML dans les pathologies vasculoprolifératives telles que l'athérosclérose. Ceci a été observé dans un modèle de lésion de la carotide chez le rat, dans lequel la lésion induit une hyperplasie intimale impliquant la prolifération et la migration des CML. Le knockout de la neuropiline-1 dans ce modèle, a permis de réduire l'hyperplasie en inhibant la migration et l'accumulation des CML (164).

Enfin, **le Neural/glial antigène 2 (NG2)** est un PG également connu sous le nom de PG à chondroïtine sulfate de mélanome (MCSP) chez l'homme. Ce PG porte une seule chaîne de CS (165). NG2 est un marqueur des cellules murales vasculaires (CML et péricytes). NG2 est également présent dans les cellules prolifératives et est régulé à la hausse dans de nombreux types de tumeurs ; la forme humaine tire son nom du mélanome à partir duquel elle a été caractérisée (166). Comme les SDC et les GPC, le MCSP/NG2 est un PG à temps plein car il porte des chaînes GAG de manière constante.



**Figure 11. Les protéoglycannes transmembranaires.**

Les quatre syndécannes au centre sont des PG à temps plein qui sont généralement substitués par des chaînes HS (bleu foncé) vers leurs extrémités N-terminale. Les syndécannes-1 et -3 possèdent parfois des chaînes de chondroïtine sulfatée supplémentaires (rose). Le PG de chondroïtine sulfatée de mélanome/NG2 (vert) possède une chaîne de chondroïtine sulfatée et est également un PG à temps plein. Les autres sont des protéoglycannes à temps partiel. Le segment extracellulaire du CD44 peut porter une chaîne HS. La neuropiline-1 et le bétaglycane peuvent porter de l'héparane ou de la chondroïtine/dermatane sulfatée (violet). (D'après Couchman et al., 2010). (155)

- **Les glypicannes**

- **Structure**

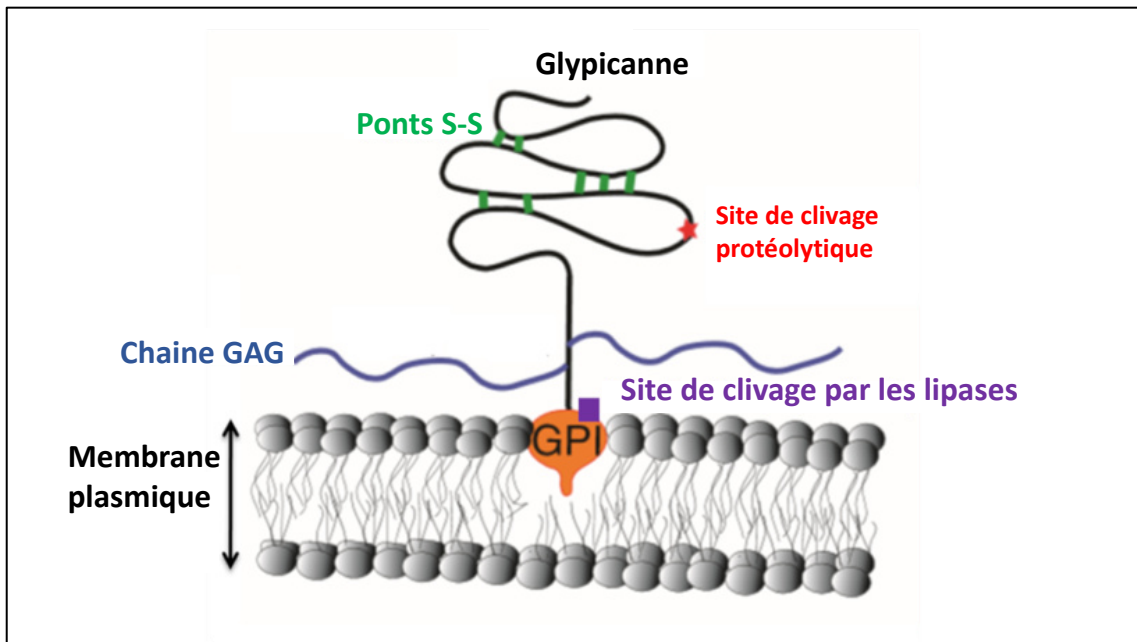
Les GPC sont des PG reliés à la membrane cellulaire au niveau des rafts lipidiques par l'intermédiaire d'une ancre GPI. Ils ont un poids moléculaire de 60 à 70k Da et sont au nombre de 6 chez les mammifères. Leur structure est très conservée entre les espèces et est constituée d'un domaine extracellulaire contenant la partie N-terminale, un domaine globulaire riche en résidus cystéine, un domaine d'attachement des GAG et enfin un domaine C-terminal lié à l'ancre GPI (167). Les 6 GPC sont porteurs de chaînes HS, le GPC-5 porte également des chaînes CS/DS (168).

- **Clivage des glypicannes**

En plus du clivage des chaînes GAG par leurs enzymes de modification, les PG peuvent être clivés au niveau du domaine extracellulaire ou « ectodomaine » de la protéine centrale. Ce phénomène est appelé « shedding » et est pris en charge par des enzymes appelées « sheddases » comme les métalloprotéases matricielles (MMP) les métalloprotéases de la famille des ADAM, les sérine protéases et les désintégrines. Le shedding peut être induit par différents stimuli tels que l'intervention de facteurs de croissance (EGF, FGF) (169) de cytokines (TNF- $\alpha$ , CXCL12) (170–172). Une fois clivés, les PG sont transformés en effecteurs solubles capables d'agir de manière autocrine ou paracrine, en liant des molécules pour les présenter à leurs récepteurs spécifiques, régulant positivement leurs fonctions, ou en fixant ces molécules dans la MEC, limitant leur interaction avec les récepteurs spécifiques (173). De plus en plus d'études suggèrent que le shedding des PG est un mécanisme post-traductionnel important qui régule les processus physiopathologiques (Figure 12). Par exemple, on retrouve un taux élevé de l'ectodomaine du SDC-1 dans le sang des patients atteints de sepsis (174,175), d'ischémie-reperfusion (176), de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) (177) et de divers cancers (178,179) , ainsi que dans d'autres fluides provenant de tissus blessés, inflammés ou cancéreux (180,181).

Les GPC peuvent subir des clivages par des protéases de type furine (182), ce shedding génère deux fragments, un fragment N-terminal formé de deux sous-unités liées par des ponts disulfure, qui une fois libéré peut se retrouver dans la circulation sanguine, et un fragment C-terminal, qui reste lié à la membrane et peut être libéré par un clivage de l'ancre GPI par des lipases (183).





**Figure 12. Le shedding des glypicannes.**

Les GPC sont des PG liés à la membrane cellulaire par une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Ils sont constitués d'une partie N-terminale caractérisée par un domaine globulaire riche en cystéines qui forment des ponts disulfures. Les chaînes GAG portées par les GPC peuvent être de type héparane sulfate, chondroïtine sulfate ou dermatane sulfate. Les GPC sont soumis au clivage par deux types d'enzymes, les protéases de type furine qui clivent les GPC au niveau de la partie N-terminale et les lipases qui clivent l'ancre GPI. (D'après Filmus, Capurro, et Rast 2008). (184)

- **Fonction des glypicannes**

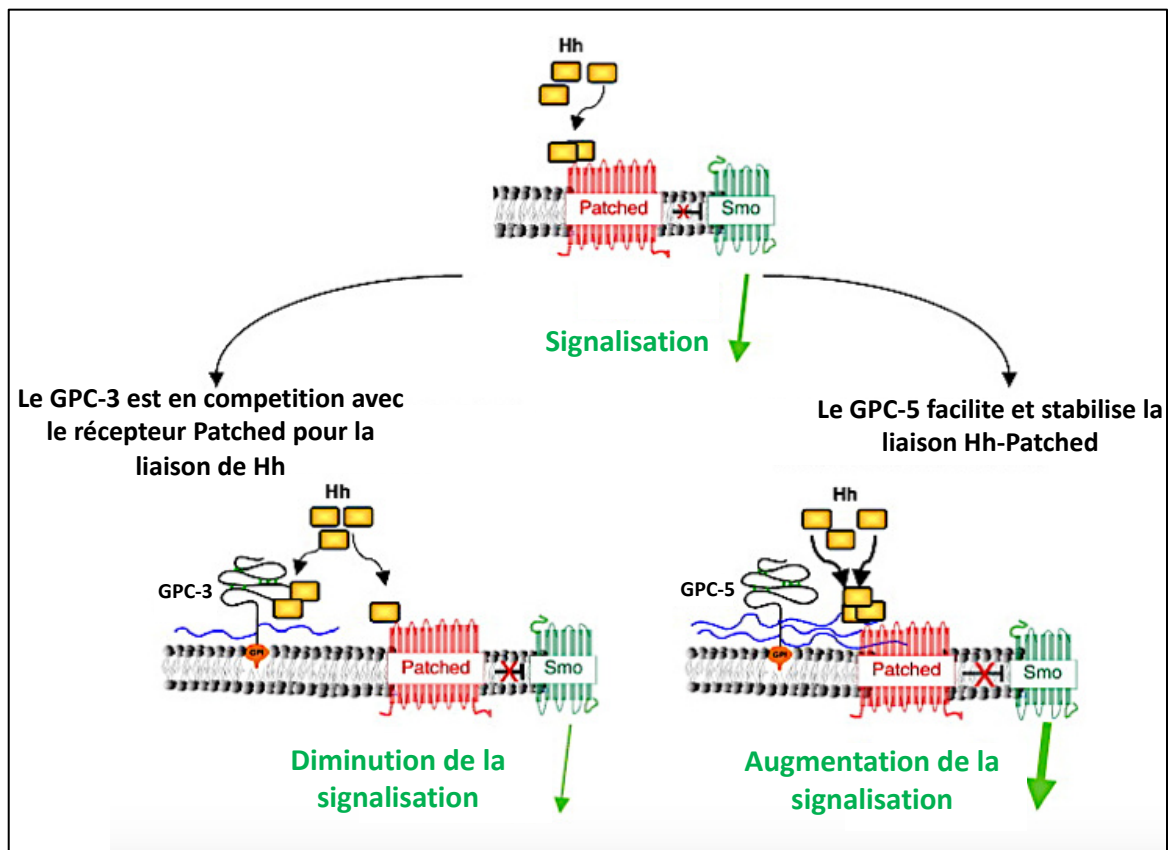
- **Les GPC dans le développement**

Les GPC sont exprimés pendant la morphogenèse et régulent les processus cellulaires en réponse à différents facteurs de croissance. Ils sont exprimés dans différents tissus en développement. Le GPC-1 présente des niveaux d'expression élevés dans le neuroépithélium en développement, et dans le système squelettique (185). Il est intéressant de noter que les cardiomyocytes embryonnaires expriment peu ou pas le GPC-1 (185) malgré sa forte expression dans les cardiomyocytes néonataux et adultes (186). En revanche, l'expression du GPC-3 semble inhiber la prolifération cellulaire au cours du développement embryonnaire. Pilia et ses collaborateurs (187) ont été les premiers à signaler une mutation du GPC-3 chez les patients atteints du syndrome de Simpson - Golabi - Behmel (SGBS). Il s'agit d'un trouble lié au chromosome X qui se caractérise par une croissance excessive avant et après la naissance. Certains des dysmorphismes observés dans ce syndrome pourraient être le résultat d'une inhibition déficiente de la croissance ou de l'apoptose au cours du

développement, due à la mutation du GPC-3. En effet, des souris GPC-3<sup>-/-</sup> ont montré les mêmes caractéristiques phénotypiques que celle observées dans le SGBS (188).

- **Les GPC dans la signalisation cellulaire**

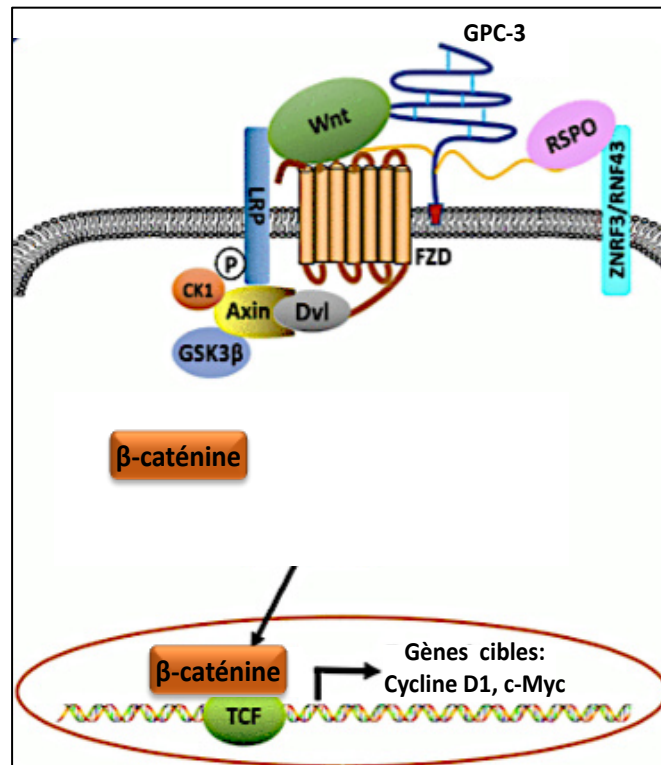
Les GPC interviennent également dans la régulation des voies de signalisation telles que Hedgehog (Hh) et Wnt (Figure 13). La voie de signalisation Hh joue un rôle essentiel dans la morphogenèse embryonnaire (189). En outre, il a été montré que l'hyperactivation de cette voie favorise la progression de divers types de cancer (190). Il a été démontré que le GPC-5 est surexprimé dans le rhabdomyosarcome (RMS) (191). Il s'agit d'un sarcome des tissus mous qui touche principalement les enfants et les adolescents. Cette tumeur a été associée à l'hyperactivation de la signalisation Hh (192). Plus tard, il a été rapporté que le GPC-5 stimule la prolifération des cellules du RMS en activant la signalisation Hh et ce, en augmentant la liaison de Hh à son récepteur de signalisation Patched (193). Le GPC-3 semble tenir un rôle inverse à celui du GPC-5 dans la régulation de cette voie. En effet, le GPC-3 se lie à la protéine Hh, empêchant sa liaison à son récepteur spécifique, cette interaction induit l'internalisation du complexe GPC-3-Hh par endocytose clathrine-dépendante, et ainsi sa dégradation (194,195).



**Figure 13. Effets opposés du glypicanne-3 et du glypicanne-5 sur la signalisation Hedgehog.**

Le glypicanne-3 (GPC-3) à la membrane cellulaire se lie au ligand Hedgehog (Hh), réduisant ainsi la quantité de Hh disponible pour se lier à Patched avec pour conséquence une diminution de la signalisation (gauche). Le glypicanne-5 (GPC-5) à la membrane cellulaire interagit à la fois avec Hh et Patched, facilitant ou stabilisant l'interaction Hh-Patched avec pour conséquence une augmentation de la signalisation (droite). (D'après Filmus J, Capurro M., 2014) (196)

A l'inverse de son rôle dans la voie Hh, le GPC-3 régule positivement la voie Wnt/  $\beta$ -caténine (Figure 14). En effet, on retrouve une surexpression du GPC-3 concomitante à l'accumulation de la  $\beta$ -caténine dans diverses maladies telles que le carcinome épidermoïde pulmonaire (197) et le carcinome hépatocellulaire (CHC) (198), dans lesquels le GPC-3 participe à l'accélération de la progression tumorale de manière  $\beta$ -caténine-dépendante. Le GPC-3 régule positivement la voie Wnt/  $\beta$ -caténine en interagissant avec la protéine Wnt pour la présenter à son récepteur spécifique. L'activation de la voie, aboutit à la translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau, et l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire au cours de la carcinogénèse.



**Figure 14. Rôle du Glypicanne-3 dans la modulation de la signalisation Wnt dans le carcinome hépatocellulaire.**

Le GPC-3 fonctionne comme corécepteur pour Wnt par le biais de ses chaînes héparane sulfate, il stabilise le complexe tertiaire Wnt/GPC3/Frizzled (FZD), ce qui déclenche une cascade aboutissant à la translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau et l'activation de gènes impliqués dans la carcinogenèse. (D'après Li N et al., 2020) (198).

#### ▪ Glypicannes et pathologies vasculaires

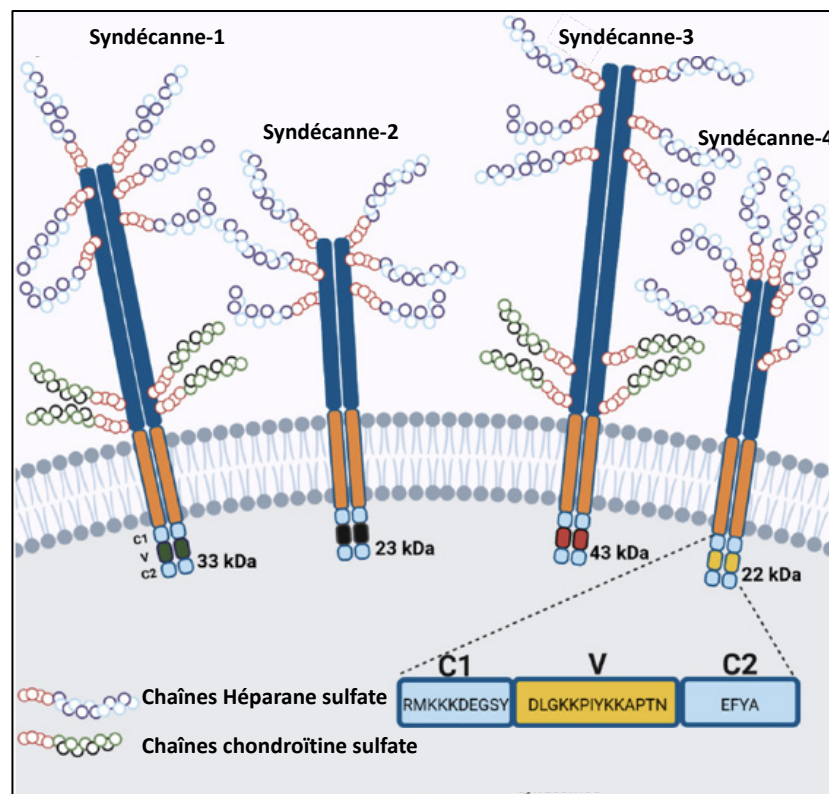
Différents facteurs de risque peuvent être à l'origine des MCV, dont la rigidité artérielle. C'est une perte de l'élasticité des vaisseaux qui diminue leur capacité à se contracter et à se dilater, causant une perturbation du flux sanguin et un dysfonctionnement endothélial, participant ainsi à l'athérogenèse. Le rôle du glycocalyx endothélial dans la protection de l'endothélium contre les dysfonctionnements causés par la rigidité artérielle n'est pas encore bien défini. Cependant, plusieurs hypothèses suggèrent une implication des PG et notamment les GPC. En effet, il a récemment été démontré que l'absence de GPC-1 contribue à favoriser le dysfonctionnement endothélial en conséquence de la rigidité artérielle. Dans un modèle de rigidité liée à l'âge, les souris âgées présentaient une expression réduite de GPC-1 et un dysfonctionnement accru des CE par rapport aux souris

jeunes. La délétion du gène *GPC-1* chez les souris knock-out (*GPC1<sup>-/-</sup>*) a exacerbé le dysfonctionnement endothélial chez les jeunes souris, qui présentaient normalement une forte expression endothéliale de GPC-1 (125). De plus, le traitement par les GPC améliore les résultats anatomiques, histologiques et fonctionnels dans la phase chronique d'un accident vasculaire cérébral expérimental chez le rat avec notamment une augmentation de l'expression de FGF2 et de la croissance des neurites (199). Cependant, le taux sérique de GPC-4 s'est positivement corrélé à l'incidence des événements cardiovasculaires indésirables majeurs (MACE), la mortalité vasculaire et la mortalité toutes causes confondues dans une cohorte de patients ayant subi une coronarographie. Une forte association a été retrouvée entre les taux sériques élevés de GPC-4 et ces paramètres, suggérant un rôle majeur de ce PG dans le développement et l'évolution des MCV (200). Le GPC-6 semble également être impliqué dans l'évolution des MCV. Sa participation dans la progression de l'insuffisance cardiaque expérimentale a été démontrée chez des souris soumises à une surcharge de pression par cerclage aortique, des niveaux élevés de GPC-6 ont été retrouvés au cours du remodelage hypertrophique et l'insuffisance cardiaque dilatée au stade terminal. De même, l'ARNm du GPC-6 était élevé dans le myocarde du ventricule gauche de cœurs explantés de patients souffrant d'insuffisance cardiaque dilatée au stade terminal avec fraction d'éjection réduite. Des niveaux de GPC-6 ont été corrélés négativement avec la fraction d'éjection du ventricule gauche chez ces patients. *In vitro*, la surexpression du GPC-6 dans des cardiomyocytes en culture, a augmenté l'expression de gènes pro-hypertrophiques tels que ACTA1 et a induit la phosphorylation de la protéine kinase ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase). Le cotraitement avec l'inhibiteur de ERK1/2 a atténué l'augmentation de l'expression des gènes pro-hypertrophiques induite par le GPC-6, suggérant que ce PG participe à la progression de l'insuffisance cardiaque, en partie en induisant l'expression de gènes pro-hypertrophiques de manière ERK-dépendante (201). Toutes ces données suggèrent une implication différente des GPC dans le développement et l'évolution des MCV, les proposant comme cible thérapeutique intéressante. Cependant, il est important de bien comprendre la nature de leur contribution, en faveur ou contre la pathogenèse et son évolution, et leurs mécanismes d'action afin de pouvoir adapter les stratégies thérapeutiques.

- Les syndécannes

- Structure

Les SDC sont une famille de PG transmembranaires de 4 membres. Le poids moléculaire de leurs protéines centrales varie entre 20 et 40 kDa (173). Ils sont composés d'un domaine extracellulaire ou ectodomaine, d'un court domaine cytoplasmique contenant des régions constantes C1 et C2, dites respectivement régions proximales et distales par rapport au domaine transmembranaire. Ces deux régions sont séparées par une région variable « V » (Figure 15). Les chaînes GAG sont attachées à l'ectodomaine des SDC. Les 4 membres portent des chaînes HS mais le SDC-1 et le SDC-3 portent également des chaînes CS (202).



**Figure 15. Structure des syndécannes.**

Les syndécannes (SDC) sont une famille de protéoglycannes composée de 4 membres. Ils sont constitués de différents domaines, un domaine extracellulaire portant les chaînes de GAG qui sont de type héparane sulfate pour le SDC-2 et le SDC-4, tandis que le SDC-1 et le SDC-4 portent également des chaînes chondroïtine sulfate. Le domaine transmembranaire par lequel les SDC sont liés à la membrane est suivi d'un domaine intracellulaire composé de deux régions conservées C1 et C2 séparées par une région variable V. (D'après Keller-Pinter A et al., 2021) (203).

### ○ Expression des SDC

Les SDC sont exprimés par la plupart des cellules de mammifères. Toutefois, chaque membre de la famille des SDC présente un schéma d'expression temporel et spatial distinct et tissu-dépendant. Le SDC-1 est exprimé principalement dans les tissus épithéliaux et mésenchymateux, le SDC-2 dans les cellules d'origine mésenchymateuse et les cellules neuronales et épithéliales, et le SDC-3 presque exclusivement dans les tissus neuronaux et musculo-squelettiques, tandis que le SDC-4 est présent dans pratiquement tous les types cellulaires (204) . Compte tenu de leur rôle dans la régulation de différents processus cellulaires, l'expression des SDC est étroitement régulée. Les facteurs de croissance jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des SDC. Ainsi, le TNF- $\alpha$  régule à la hausse le SDC-2 et à la baisse le SDC-1 dans les CE (205). De même, le TGF- $\beta$ 2 régule à la hausse le SDC-4 et à la baisse le SDC-1 dans les cellules épithéliales (206). Dans les CML de l'aorte, le FGF2 induit l'expression du SDC-4 mais pas celle du SDC-1 ou du SDC-2 (207). Les niveaux de SDC-4 sont fortement régulés à la hausse dans plusieurs états pathologiques, y compris les lésions artérielles (208) et l'infarctus aigu du myocarde (209).

### ○ Les SDC dans le système vasculaire

Comme décrit précédemment, l'expression des différents membres de la famille des SDC est tissu-dépendante. De ce fait, l'invalidation de leur expression provoque des conséquences différentes selon le SDC invalidé. Ces invalidations ne semblent pas être létales mais induisent différentes anomalies. Des souris Knock-out (KO) pour le SDC-1 sont viables mais montrent un défaut de cicatrisation et une augmentation de l'interaction entre les leucocytes et les CE, soutenant le rôle du SDC-1 présent dans le glycocalyx endothélial dans la régulation de l'homéostasie vasculaire (210,211).

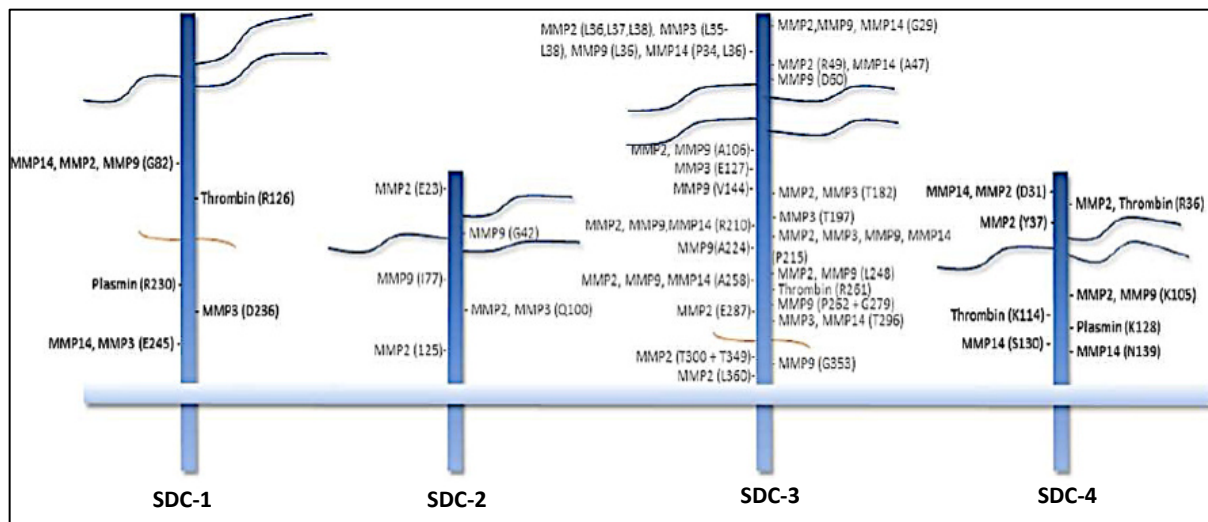
L'expression d'un SDC-2 tronqué dans un modèle de xénope induit des troubles du développement embryonnaire avec une perte de la répartition normale des organes (212) . Des souris KO pour le SDC-3 ont montré un trouble du comportement alimentaire, des troubles de la mémorisation (hippocampe) et une dystrophie musculaire (213). Enfin, des souris KO pour le SDC-4 ont présenté une forte diminution de la néo-angiogenèse pendant la cicatrisation, des anomalies des contacts focaux qui sont les points d'interaction entre les

cellules et la MEC (214). Le SDC-4 est également lié à l'infarctus du myocarde. Bien que les souris déficientes en SDC-4 présentent un cœur normal d'un point de vue fonctionnel et morphologique, elles montrent une fonction cardiaque altérée suite à un infarctus du myocarde. Le SDC-4 retrouvé dans la région de l'infarctus semble être impliqué dans la réponse inflammatoire et la formation du tissu de granulation. Il préviendrait ainsi la rupture et le dysfonctionnement cardiaques après un infarctus (215). De manière intéressante, l'ensemble de ces études montrent que le SDC-1 et le SDC-4 sont les plus impliqués dans le système vasculaire.

- **Clivage de l'ectodomaine des SDC**

L'ectodomaine des SDC contient des sites de clivage protéolytique et peut donc être libéré dans le milieu extracellulaire. Plusieurs sheddases catalysent ce clivage dont les MMP (216), les ADAM (217), dont les ADAM contenant des domaines thrombospondines (218) ainsi que la plasmine et la thrombine pour le SDC-1 et le SDC-4 (Figure 16) (173,219). Le clivage des SDC est régulé par le contexte biologique et moléculaire, il peut être provoqué par des stimuli externes (chimiokines, facteurs de croissance) ou par certains processus pathologiques tels que les cancers (220), les lésions traumatiques cérébrales (221), et l'ischémie-reperfusion qui augmente le shedding du SDC-1 (222) et du SDC-4(223). L'augmentation du shedding du SDC-1 au cours de l'ischémie-reperfusion participe au développement de lésions rénales principalement en séquestrant le HGF empêchant sa liaison à son récepteur c-Met, induisant ainsi une inflammation et une apoptose cellulaire. Dans ce contexte, l'inhibition du shedding du SDC-1 aboutit à une augmentation de l'activation de la voie de signalisation c-Met, une atténuation de l'inflammation et une diminution de l'apoptose tubulaire (222). Le SDC-1 clivé est impliqué également dans le cancer. Il peut transloquer vers le noyau des cellules cancéreuses où il inhibe l'activité de l'histone acétyltransférase et délivre des facteurs de croissance tels que le HGF (224). Le stress oxydant augmente le shedding du SDC-4 dans les CE dysfonctionnelles et participe au développement de la fibrose rénale (225).





**Figure 16. Différents sites de clivage de l'ectodomain des syndécannes.**

Le domaine extracellulaire des SDC présente différents sites de clivage protéolytique. Ce clivage est assuré par différentes enzymes telles que les métalloprotéases matricielles (MMP) et la thrombine. L'ectodomain des SDC, attaché ou non aux GAG est libéré dans le milieu extracellulaire et adopte différentes nouvelles fonctions. (D'après Bertrand et Bollman, 2019) (226) .

- **Les SDC : relation structure-fonction**

Compte tenu de l'étendue des interactions que peuvent avoir les GAG avec diverses molécules et de la multitude de processus biologiques impliquant les différentes parties structurales des PG, il s'avère impossible de dresser une liste exhaustive de leurs fonctions. Cependant, il est intéressant de noter certains principaux exemples qui informent sur l'importance fonctionnelle des PG.

- **Le domaine extracellulaire**

Plusieurs études ont démontré que la diversité des séquences d'acides aminés des domaines extracellulaires des PG induit des fonctions cellulaires distinctes (227,228). A cela s'ajoute la diversité des chaînes GAG portées par ce domaine. Elles varient au niveau de leur longueur, charge, composition saccharidique, sulfatation et le degré de modification qu'elles peuvent subir. La majorité des molécules qui se lient aux SDC interagissent avec les chaînes GAG et un certain nombre avec la protéine centrale. Contrairement aux autres récepteurs, comme ceux des facteurs de croissance ou des chimiokines, les SDC possèdent un large répertoire de ligands. La combinaison de données d'interactions tirées de multiples études antérieures, d'interrogation de bases de données d'interactions telles que MatrixDB (229,230) et IntAct (231), et de l'ensemble de données à grande échelle obtenu par

spectrométrie de masse à haut débit permet de connaître aujourd'hui le réseau d'interaction des SDC, mais aussi leurs sites d'interaction. Les quatre SDC ont au total 351 partenaires qui peuvent être exclusifs à un seul SDC ou communs entre les différents membres. Les SDC-1, 2 et 4 se lient à un nombre élevé de partenaires (131, 103 et 84 respectivement), alors que le SDC-3 n'a que 33 partenaires. Le SDC-3 a une distribution plus restreinte que les autres SDC, ce qui pourrait expliquer en partie le nombre plus faible de ses partenaires. La majorité des ligands de liaison des SDC sont des protéines membranaires et extracellulaires impliquées dans la communication cellulaire, la transduction du signal et les interactions de surface impliquant la famille des intégrines. Leur capacité à lier différentes molécules de signalisation cellulaire comme les chimiokines et les facteurs de croissance, fait des SDC de vrais régulateurs dans différents processus cellulaires tels que la migration, la prolifération et l'angiogenèse. En effet, il a été démontré que les SDC interviennent dans la progression de différents cancers. Dans le myélome multiple, la liaison du HGF au SDC-1 permet sa présentation à son récepteur spécifique c-Met intervenant dans l'activation des voies de signalisation qui aboutissent à la survie et la prolifération cellulaire (232). Dans ce même cancer, le SDC-1 augmente la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine en présentant Wnt à son récepteur, induisant la translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau et l'activation de la transcription du gène de la cycline D1, régulant ainsi positivement la prolifération cellulaire (233). Les SDC interviennent également dans la formation de complexes ternaires indispensables à la fonction de certains facteurs de croissance tels que les FGF-2. Pour induire la prolifération cellulaire, le FGF-2 se lie à son récepteur spécifique FGF-R et aussi aux chaînes HS du SDC-4. Ce complexe ternaire permet l'activation de la voie Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) aboutissant à la prolifération cellulaire. D'autre part, la formation de ce complexe active la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) - Akt aboutissant à la survie cellulaire. Il induit également la migration cellulaire en activant la phosphoinositide phospholipase C (PLC- $\gamma$ ) (234). Une autre voie est activée par ce complexe et passe par la kinase Src et Janus kinase 2 (JAK2) qui, par l'activation du facteur de transcription STAT-5, conduit à l'angiogenèse *in vivo* (235).

Les SDC interviennent également dans l'adhérence des cellules à la MEC à travers l'interaction entre leur ectodomaine et les composants de la MEC. Le domaine extracellulaire du SDC-4 interagit avec la fibronectine et la laminine permettant l'ancrage de

la cellule à la MEC (236). L'ectodomaine du SDC-2 interagit avec la fibronectine, favorisant la formation de fibrilles de fibronectine permettant à la cellule de rester fixée à la MEC (237) .

- **Le domaine transmembranaire**

Le domaine transmembranaire est une région conservée qui contient un motif « GXXXG » commun à tous les SDC, dans lequel deux résidus glycine sont séparés par 3 acides aminés quelconques. Ce motif est indispensable à l'homodimérisation et l'hétérodimérisation des SDC. En effet, la mutation de la première glycine diminue l'affinité des domaines transmembranaires, et la mutation de la deuxième glycine empêche l'oligomérisation (238). Cette oligomérisation est importante pour la fonction des SDC. Elle leur permet de se rapprocher des récepteurs des facteurs de croissance ou des chimiokines pour assurer leur rôle de corécepteurs de ces molécules mais aussi de créer un large réseau d'interaction avec d'autres protéines comme les intégrines, qui interviennent dans l'adhérence cellulaire (238). L'homo-oligomérisation des SDC semble être importante pour leur fonction. En effet, il a été démontré que le degré d'oligomérisation du SDC-4 est corrélé à son activité. Seule la protéine centrale multimérique recombinante du SDC-4 a été capable de potentialiser l'activation de la PKC $\alpha$ , la protéine centrale monomérique n'ayant pas montré cette capacité (239). Le SDC-4 est connu pour être un composant des adhésions focales qui sont de grands complexes moléculaires dynamiques, à travers lesquels la cellule connecte son cytosquelette à la MEC (240). Au cours de cet événement, le SDC-4 groupé à la surface de la cellule interagit avec la PKC $\alpha$  et le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) pour transmettre en aval des signaux destinés à l'organisation du cytosquelette (241). Dans ce contexte, il a été montré que l'oligomérisation du SDC-4 joue un rôle critique dans son interaction avec la PKC $\alpha$ , pour réguler les signaux impliqués dans la formation d'adhésions focales et de fibres de stress d'actine (242). Les mutants de SDC-4 présentant une oligomérisation défectueuse montrent une diminution de la formation d'adhérence focale médiée par le SDC-4, et une réduction de l'interaction et de l'activation de la PKC $\alpha$  (243,244). Dans une autre étude, il est démontré que le domaine cytoplasmique du SDC-4 interagit avec l' $\alpha$ -actinine. Cette interaction est régulée par le statut d'oligomérisation du SDC-4 (245).

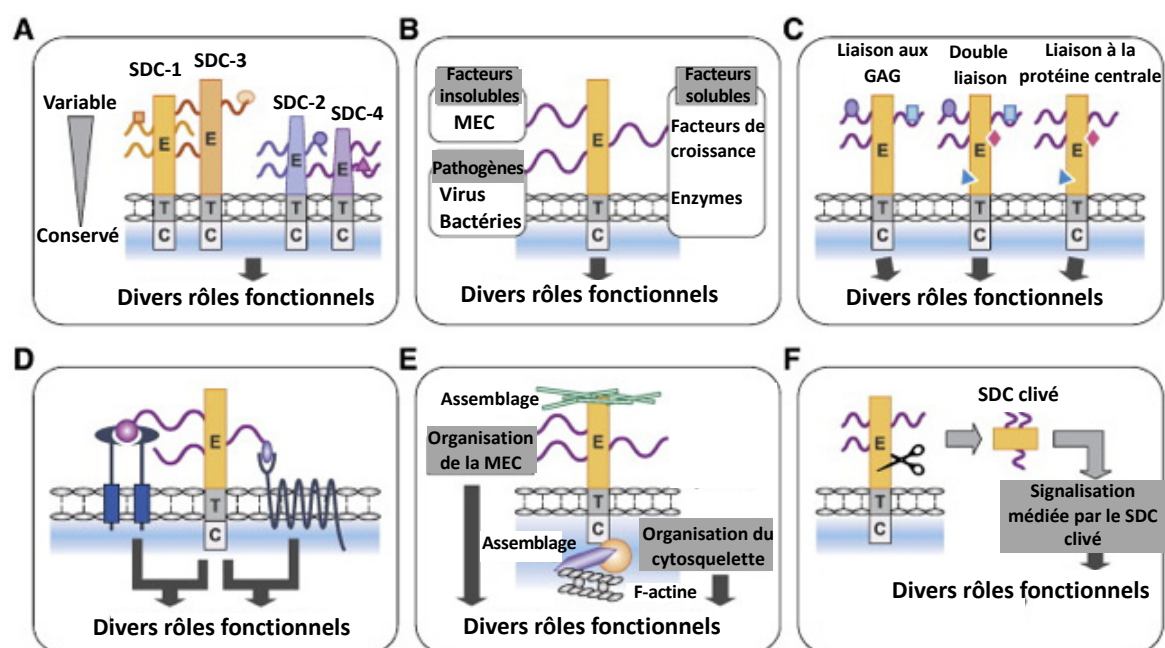
L'hétérodimérisation des SDC semble aussi jouer un rôle crucial dans leurs fonctions communes. Des données biochimiques et structurales ont révélé que les SDC-2 et -4 recombinants forment des interactions *in vitro*, et que le motif GXXXG du domaine transmembranaire constitue le médiateur de cette interaction. Lorsqu'ils sont exprimés de manière exogène dans des fibroblastes embryonnaires de rat, le SDC-2 interagit avec le SDC-4 et vice versa. De plus, un test basé sur la complémentarité de fluorescence bimoléculaire a démontré des interactions hétéromoléculaires spécifiques entre les SDC-2 et -4, soutenant la formation d'hétéro-oligomères de SDC *in vivo*. De manière intéressante, l'hétéro-oligomérisation a réduit de manière significative les processus cellulaires médiés par le SDC-4, tels que l'activation de la PKC $\alpha$  et l'adhérence cellulaire médiée par la PKC $\alpha$ , et les activités tumorigènes (migration et croissance cellulaires) médiées par le SDC-2 dans les cellules cancéreuses du côlon. Dans l'ensemble, ces données montrent que l'hétéro-oligomérisation produit des effets synchrones distincts et intervient dans la régulation de la fonction des SDC (246).

- **Le domaine cytoplasmique**

Le domaine cytoplasmique des SDC est composé d'une région C1 dite proximale, proche du domaine transmembranaire et d'une région C2 dites distale, proche de l'extrémité C-terminale. Les régions C1 et C2 sont très conservées et sont séparées par une région variable V. La région V du SDC-4 est caractérisée par une très faible homologie entre les différents SDC mais est assez conservée entre les espèces (Figure 17). Elle est impliquée dans les fonctions individuelles des SDC. Pour le SDC-4, la région V intervient dans la fixation de la PKC et du PIP2 lors de la formation de complexes d'adhérence focale (247). Les régions C1 et C2 interviennent plutôt dans les fonctions communes aux différents membres de la famille des SDC. La région C1 porte un site de liaison pour les composants des complexes d'adhérence focale et les éléments du cytosquelette telles que Src, la tubuline, la contractine, la vinculine, l' $\alpha$ -actinine et des protéines de signalisation tel que la kinase d'adhérence focale (FAK). Grâce à cette capacité, le SDC-4 permet la stabilisation des points de contact focaux, en formant des complexes intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1/SDC-4/ $\alpha$ -actinine/cytosquelette, cette stabilisation passe par l'activation de la kinase FAK (248). Quant à la région C2, son motif EYFA (acide glutamique, phénylalanine, tyrosine et

alanine) lui permet d'interagir avec des protéines à domaine PDZ telles que la synténine (249) et CASK/ LIN-2 (250).

L'implication des SDC dans le processus d'adhérence, leur confère un rôle important dans la modulation d'un certain nombre de processus physiopathologiques. Une étude a révélé que le SDC-1 réduit la migration cellulaire dans l'épithélium pulmonaire par l'activation de Rap1, qui ralentit le désassemblage de l'adhésion focale (251). La liaison de la synectine au SDC-4 peut moduler la migration cellulaire. En effet, il a été démontré que la synectine interagit avec le SDC-4 via son domaine PDZ. L'expression de la synectine a eu un effet profond sur la migration dans un test de blessure sur culture cellulaire de CE ECV304. Le niveau d'expression de la synectine était inversement proportionnel au degré d'inhibition de la migration. (252). De même, l'adhésion des cellules à la fibronectine est régulée par l'interaction du SDC-1 avec le domaine PDZ du « T cells lymphoma invasion and metastasis gene1 protein » (Tiam1) (253). Une étude des neurones de l'hippocampe a révélé que la synbindine est un ligand physiologique du SDC-2 au niveau des épines dendritiques et que le SDC-2 induit la formation des épines en recrutant des vésicules intracellulaires POUR les sites postsynaptiques par le biais de l'interaction avec la synbindine (254).



**Figure 17. Les diverses caractéristiques structurales des syndécannes confèrent une diversité fonctionnelle.**

Les six schémas résument les caractéristiques uniques des SDC qui soutiennent leurs divers rôles fonctionnels : A. domaine extracellulaire divergent, mais domaine transmembranaire et cytoplasmique conservé, B. diverses interactions avec les ligands, C. coopérativité de la protéine centrale et des chaînes de GAG, D. diverses fonctions des SDC en tant que corécepteurs, E. double rôle régulateur des SDC dans l'organisation de l'ECM et du cytosquelette, et F. clivage du domaine extracellulaire des SDC. GAG, glycosaminoglycane ; SDC, syndécane ; E, domaine extracellulaire ; T, domaine transmembranaire ; et C, domaine cytoplasmique. (D'après Choi Y et al., 2011)(255).

Dans le cadre du contexte physiopathologique de cette étude, à savoir les MCV et notamment l'ischémie, nous avons souligné le rôle du glycocalyx dans l'homéostasie vasculaire mais également dans différents processus cellulaires, physiologiques et pathologiques, en particulier à travers la capacité des chaînes GAG à interagir avec des molécules effectrices. Pour rappel, cette thèse propose une étude du rôle des GAG dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ce processus est appelé angiogenèse et représente la réponse de l'organisme à l'ischémie. Les néo-vaisseaux permettent au tissu endommagé par l'ischémie d'être restauré, en assurant de nouveau un apport en oxygène et en nutriments. Cependant, la dégradation du glycocalyx au cours de l'ischémie, amène à s'interroger sur les conséquences de l'absence des GAG, sur la capacité des CE à médier les différents mécanismes cellulaires impliqués dans l'angiogenèse. Les parties suivantes vont détailler le processus d'angiogenèse, en expliquant les différentes étapes de ce phénomène

biologique et les facteurs qui y sont impliqués. Et enfin, une partie qui va présenter quelques éléments intéressants de la littérature scientifique autour du rôle des GAG dans ce contexte.

### **III. Les facteurs proangiogéniques et leur liaison au glycocalyx de l'endothélium**

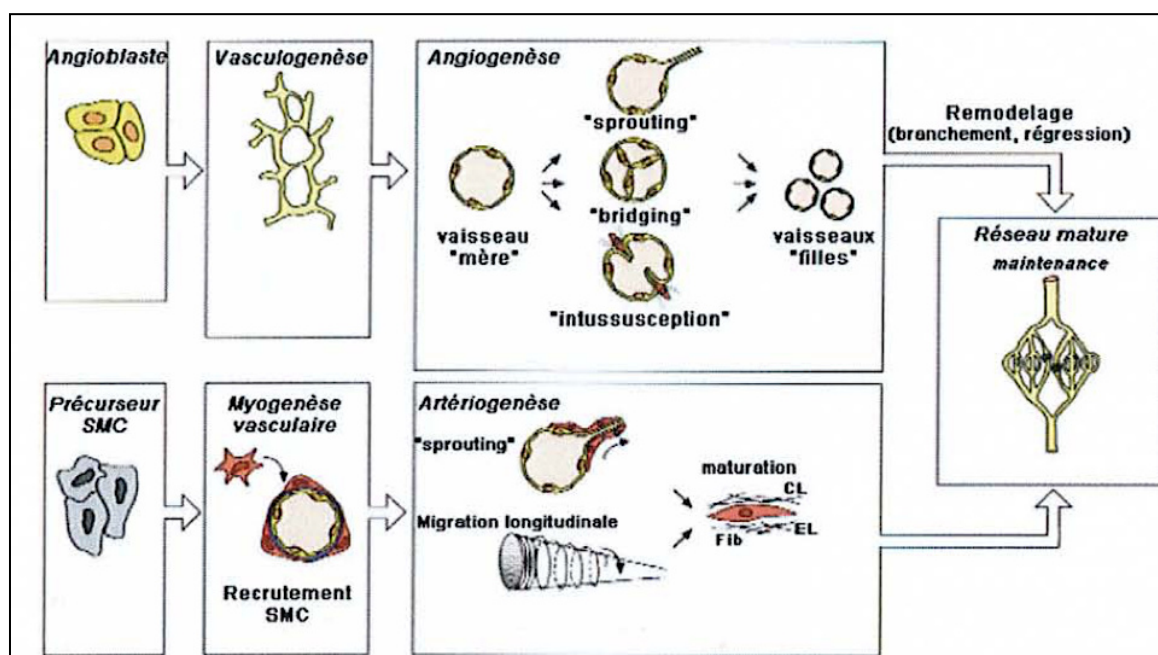
#### **1. Les mécanismes de formation de vaisseaux sanguins**

##### **a) Définition**

Trois mécanismes permettent la formation de vaisseaux sanguins, l'angiogenèse, la vasculogenèse et l'artériogenèse (Figure 18). L'angiogenèse désigne l'extension de la vascularisation déjà formée par le bourgeonnement des réseaux capillaires (256). Par conséquent, de nouveaux vaisseaux sont formés à partir de ceux préexistants, par la migration et la prolifération de cellules endothéliales déjà différenciées (257). L'angiogenèse est à distinguer de la vasculogenèse et l'artériogenèse. La vasculogenèse est décrite comme une différenciation de cellules précurseurs appelées angioblastes en CE et la formation *de novo* d'un réseau vasculaire primitif (258). En principe, les cellules progénitrices endothéliales (PEC) ou angioblastes migrent et fusionnent avec d'autres PEC et se différencient en cellules endothéliales tout en formant de nouveaux vaisseaux capillaires *in situ* (259). La vasculogenèse est normalement impliquée dans le développement de l'arbre vasculaire à l'état embryonnaire. Pendant des années, la vasculogenèse a été considérée comme limitée au développement embryonnaire, tandis que l'angiogenèse était considérée comme le seul processus de néovascularisation chez l'adulte. Cependant, des études ont révélé l'existence d'une vasculogenèse postnatale, car les cellules précurseurs endothéliales recrutées dans la moelle osseuse peuvent circuler dans le sang périphérique et s'incorporer dans les sites de néovascularisation active. Selon le dogme actuel, la néovascularisation chez l'adulte ne se limite pas à l'angiogenèse, mais implique plutôt des mécanismes à la fois angiogéniques et vasculogéniques (260). Quant à l'artériogenèse, elle est considérée comme un processus d'adaptation des vaisseaux au flux sanguin. Elle résulte d'un remodelage vasculaire suivant le débit de perfusion. Lorsque les vaisseaux ne sont pas perfusés de manière permanente, ils ont tendance à régresser, tandis que lorsque la perfusion est

chronique et à haut débit, les vaisseaux sanguins ont leur calibre augmenté et leur paroi épaissit.

Ce processus est appelé artériogénèse. L'augmentation des contraintes de cisaillement active les CE, la sécrétion de chimiokines telles que la « monocyte chemoattractant protein 1 » (MCP-1) permet le recrutement de monocytes qui infiltrent la média. Les monocytes et les CE vont ensuite sécréter des protéases (MMP-1, -2, -3 et -9) qui dégradent la MEC, libérant des facteurs de croissance tels que le FGF qui vont activer la prolifération des CML, ce qui va provoquer un élargissement de l'artériole préexistante (261).



**Figure 18. Vasculogenèse, angiogenèse et artériogenèse.**

Au cours du développement embryonnaire, les cellules précurseurs endothéliales (angioblastes) s'assemblent pour former un réseau primitif. L'angiogenèse intervient dans le développement et le remodelage du réseau primitif, c'est une formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux préexistants. Enfin, durant l'artériogenèse, les cellules musculaires lisses sont recrutées et permettent l'élargissement des vaisseaux et leur stabilisation/maturation. (D'après Carmeliet, 2000). (262). CL : collagène ; EL : élastine ; Fib : fibrilline ; SML : smooth muscle cells = cellules musculaires lisses (CML)

## 2. L'angiogenèse

### a) Généralités

L'angiogenèse est donc un processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins, à partir de ceux préexistants. Elle implique plusieurs étapes : la dégradation de la MEC sous-



jacente à l'endothélium ; la migration, l'adhérence, la prolifération des CE, et enfin, la formation et la maturation d'une structure tubulaire tridimensionnelle pour soutenir le flux sanguin (Figure 19). De nombreux éléments stimulent l'angiogenèse et peuvent influencer chaque étape du processus. En théorie, la modification du processus à l'une ou l'autre de ces étapes peut conférer la capacité de contrôler l'angiogenèse et d'exploiter les effets qui en résultent pour traiter les zones ischémiées. L'angiogenèse joue un rôle primordial en situations physiologiques et pathologiques. Dans le premier cas, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins intervient entre autres dans le développement embryonnaire, lors des menstruations pour la transformation cyclique de l'endomètre, lors de l'exercice physique et de la cicatrisation. Certaines conditions pathologiques telles que l'ischémie et le cancer stimulent l'angiogenèse. Cependant, lors du développement tumoral et des métastases, l'angiogenèse est dérégulée, les vaisseaux formés par la tumeur sont structurellement imparfaits et défectueux, avec notamment une bordure endothéliale incomplète, des CML et des péricytes raréfiés et une efficacité de perfusion médiocre.

## **b) Stimulation de l'angiogenèse**

### **• Les stimulants mécaniques**

L'hémodynamique et les contraintes de cisaillement sont les deux facteurs mécaniques pouvant stimuler l'angiogenèse. Il a été démontré que l'augmentation du débit sanguin pendant l'exercice (263), l'état d'hyperthyroïdie et l'administration de certains médicaments stimulent la germination vasculaire (256,264). La contrainte de cisaillement peut entraîner la régulation à la hausse des molécules d'adhésion dans l'endothélium (265), l'attraction des cellules inflammatoires (266,267) et la stimulation des CE pour la production de facteurs de croissance (268,269). Les CE peuvent être considérées comme des mécanorécepteurs et jouent un rôle important dans la mise en relation des influences mécaniques avec les signaux moléculaires de l'angiogenèse.

### **• Les stimulants moléculaires**

De plus en plus d'études prouvent le lien entre l'inflammation et l'angiogenèse. Les deux processus jouent un rôle coopératif dans diverses pathologies et l'hypoxie semble capable

de stimuler chacun d'eux (270). Lors d'une inflammation, les tissus sont riches en cellules inflammatoires, macrophages ou autres cellules immunitaires, qui produisent des facteurs de croissance proangiogéniques (271). L'angiogenèse à son tour, soutient l'inflammation en fournissant oxygène et nutriments aux sites inflammatoires (270). D'autres facteurs, notamment les facteurs de croissance et les chimiokines, sont des stimulants moléculaires. L'existence de facteurs angiogéniques a été constatée pour la première fois suite à l'isolement d'un facteur tumoral qui s'est avéré être mitogène pour les CE et qui s'est ensuite révélé être un membre de la famille des FGF (272). Plusieurs autres facteurs, dont le rôle pro-angiogénique a été prouvé, ont par la suite été identifiés incluant le VEGF, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le HGF, le TGF- $\alpha$  et le TGF- $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF), l'interleukine-8 (IL-8) et diverses chimiokines (272). Des facteurs non peptidiques ont également été identifiés tels que l'adénosine, dont le rôle dans l'augmentation de la densité des réseaux vasculaires a été démontré dans un modèle d'angiogenèse sur membrane chorioallantoïque de poulet (273), mais aussi la prostaglandine (PGE) et le nicotinamide. Ce dernier est un métabolite issu de la dégradation des nucléotides, qui s'accumulent au cours de l'ischémie et participent à l'induction de l'angiogenèse post-ischémique (274).

- **Les stimulants chimiques**

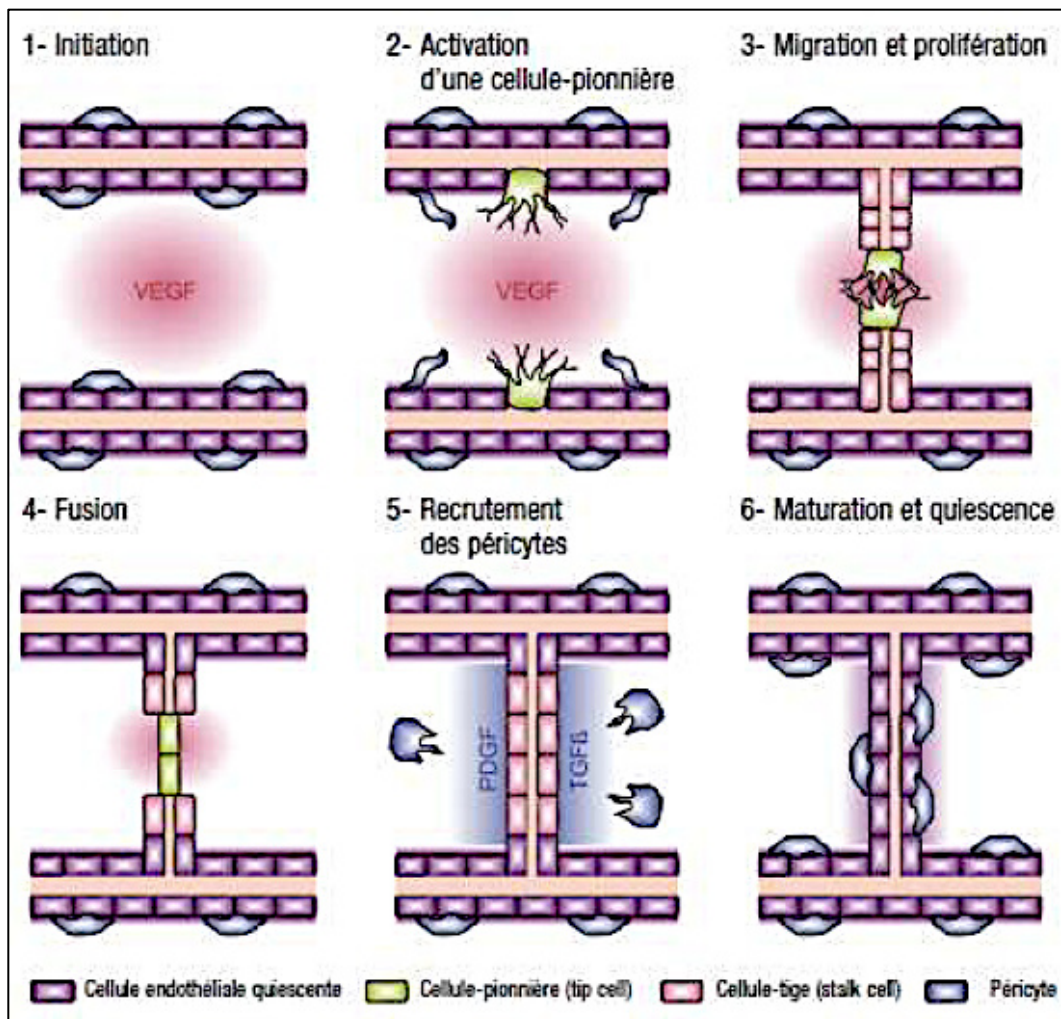
L'initiation de la machinerie moléculaire qui pilote l'angiogenèse peut être stimulée par la privation en oxygène et nutriments comme c'est le cas lors de l'ischémie (275). En plus des facteurs proangiogéniques non peptidiques cités précédemment, qui sont induits par l'hypoxie et activent le processus angiogénique, l'hypoxie stimule certaines cellules telles que les macrophages à sécréter des facteurs de croissance proangiogéniques (FGF-1, FGF-2, PDGF) (276). Elle induit également l'expression génique du VEGF, *via* le facteur de transcription « Hypoxia inducible factor » (HIF-1) (277), et aussi l'expression des récepteurs spécifiques du VEGF, VEGF-R1 (Flt1) et VEGF-R2 (KDR)(278), participant ainsi à l'activation des voies de signalisation pro-angiogénique, induites par ces facteurs de croissance et aboutissant à la prolifération et la migration des CE.

### c) Types d'angiogenèse

L'angiogenèse peut être classée en deux types selon le mécanisme : l'angiogenèse par bourgeonnement et l'angiogenèse par intussusception ou invagination.

- **L'angiogenèse intussusceptive** est réalisée par l'insertion de colonnes cellulaires interstitielles dans la lumière des vaisseaux préexistants. Une croissance et une stabilisation de ces colonnes aboutit ultérieurement au cloisonnement du vaisseau et au remodelage du réseau vasculaire local. En d'autres termes, elle est issue de la division d'un seul vaisseau en deux. Les CE opposées établissent un point de contact vers la lumière du vaisseau, ensuite, les fibroblastes et les péricytes sont recrutés pour stabiliser le nouveau vaisseau (279).
- **L'angiogenèse par bourgeonnement** est un mécanisme plus lent. Il est médié par des CE qui vont migrer et se développer en direction d'un stimuli angiogénique pour former un tube vasculaire. Les étapes de ce type d'angiogenèse comprennent la dégradation de la MEC, la migration dirigée des CE, leur prolifération, leur adhérence, la formation de tube vasculaire, la fusion des vaisseaux et leur stabilisation par les péricytes (280). Pendant ce processus, on distingue deux types de CE. D'une part les *tips cells* vont initier le développement du bourgeon en sécrétant des protéases qui dégradent la MEC (281), puis en orientant ce bourgeon vers le gradient du stimuli angiogénique, grâce à leurs filopodes qui expriment les récepteurs de ce facteur de croissance. D'autre part, les *tip cells* vont également induire la différenciation d'autres CE en *stalk-cells*, qui auront pour rôle de former le bourgeon par divisions cellulaires et s'organiser en tige.

Les *tip-cells* ont un phénotype très migratoire et peu prolifératif. Les *stalk-cells* présentent le phénotype inverse. Ces deux types cellulaires maintiennent ces phénotypes jusqu'à la fin de la formation du tube vasculaire puis retrouvent un phénotype de CE quiescentes (282).



**Figure 19. Représentation des différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement.**  
 L'angiogenèse par bourgeonnement est initiée par la fixation de facteurs proangiogéniques tels que le VEGF à leurs récepteurs spécifiques. Les tip-cells sont alors activées et vont induire la différenciation des cellules avoisinantes en stalk-cells qui forment un bourgeon vasculaire par division cellulaire. La jonction entre deux bourgeons forme le nouveau vaisseau sanguin. Des facteurs de croissance tels que le PDGF et le TGF- $\beta$  participent à la maturation du vaisseau sanguin néoformé, des péricytes entourent le vaisseau et permettent sa stabilisation. (D'après Feige et al., 2010) (282).

L'angiogenèse par bourgeonnement est la plus connue et la plus étudiée. C'est le stimulus à l'origine de l'angiogenèse qui détermine laquelle sera privilégiée. De manière générale, les variations du flux sanguins provoquent une angiogenèse par invagination, tandis que la sécrétion de facteurs proangiogéniques par un tissu ischémié provoque plutôt une angiogenèse par bourgeonnement. Au cours de ce travail, nous avons évalué l'implication des GAG dans les différentes étapes de l'angiogenèse *in vitro*, à savoir l'activation de la voie pro-angiogénique, la migration des CE, l'adhérence, l'établissement de

jonctions entre CE et la formation de tubes vasculaires. Ces étapes seront détaillées dans la partie suivante.

### 3. Étapes de l'angiogenèse

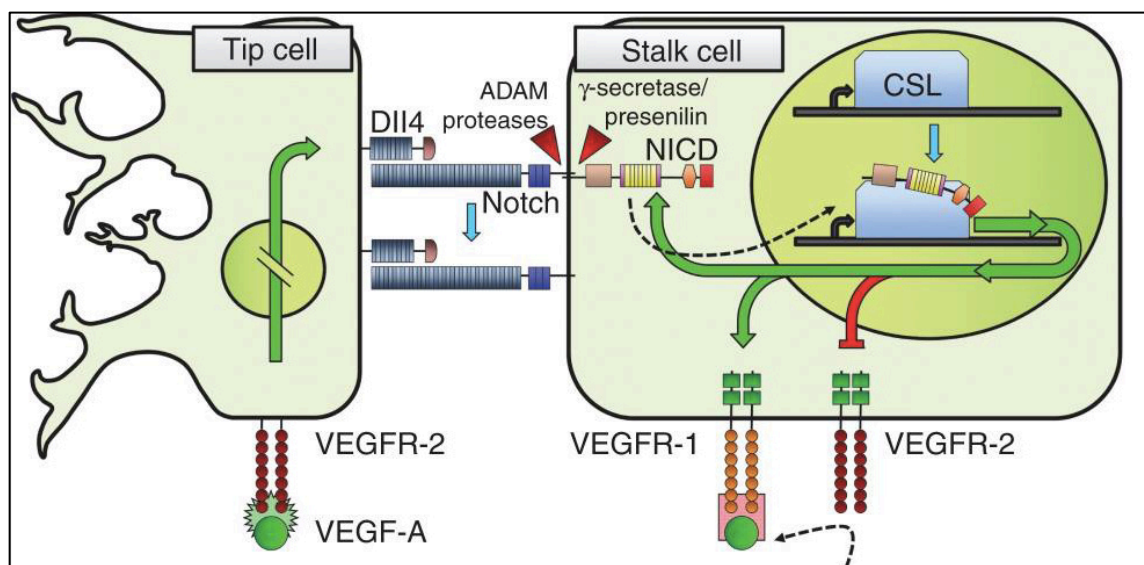
- **Dégradation de la MEC et migration des CE**

Des stimulants tels que l'hypoxie déclenchent l'angiogenèse via l'activation de l'expression de facteurs proangiogéniques. Ces facteurs activent les CE qui déclenchent à leur tour des voies de signalisation telle que ERK, aboutissant à l'expression et la synthèse de protéases, notamment les MMP (MMP-2, MMP-9) capables de dégrader la membrane basale libérant les CE. Les MMP permettent également de libérer les facteurs de croissance séquestrés dans la MEC tel que le VEGF (283,284). Le VEGF participe par la suite à la spécification des CE en deux phénotypes cellulaires fonctionnellement et morphologiquement caractérisés, les *tip cells* ou cellules initiatrices et les *stalk cells* ou cellules de l'élongation du vaisseau (Figure 20). Les *tip cells* présentent une forte expression du Delta-like Notch ligand 4 (DLL4), une faible activité Notch et sont peu prolifératives et plutôt migratrices. En revanche, les *stalk cells* expriment d'avantage Notch et sont très prolifératives, permettant ainsi l'élongation du bourgeon vasculaire.

Cette spécification des CE en *tip cells* ou en *stalk cells* dépend du VEGF-A. En réponse à ce facteur de croissance et suite à sa liaison à son récepteur VEGFR-2, les CE des vaisseaux quiescents augmentent le taux de DLL4 et forment des filopodes qui migrent de manière directionnelle, suivant un gradient chimiotactique créé par les facteurs proangiogéniques environnants. Les CE exprimant le plus de DLL4 deviennent des *tip cells* et activent la signalisation Notch par l'interaction entre le DLL-4 localisé à leur surface, et le récepteur Notch-1 situé à la surface des CE voisines, qui deviennent des *stalk cells*.

DLL-4 est une protéine appartenant à la famille des DLL composée de 5 membres. Elle est régulée à la hausse au cours de l'angiogenèse et interagit avec le récepteur Notch-1. L'interaction entre DLL-4 présent à la surface des *tip cells* et Notch-1 exprimé à la surface des *stalk cells* induit le clivage de la partie extracellulaire du récepteur par des protéases de type ADAM ou TACE, et aussi le clivage de sa partie transmembranaire par une  $\gamma$ -sécrétase au

niveau des *stalk cells*. La partie intracellulaire est donc libérée et transloquée vers le noyau pour activer la transcription de gènes cibles (285). Toujours dans les *stalk cells*, la signalisation Notch régule négativement l'expression du récepteur VEGFR-2 et de son corécepteur la neuropiline-1 (NRP-1). En revanche, l'expression du VEGFR-1, récepteur du VEGF-A ayant une grande affinité pour son ligand mais une faible activité signalétique, est régulée à la hausse, induisant une répression de la réponse au VEGF-A (286,287). L'activation de la voie Notch aboutit également à la synthèse de la Notch regulated ankyrin repeat protein (NRARP), impliquée dans la prolifération des *stalk cells*(288). La migration des *tip cells* nécessite la réorganisation de leur cytosquelette et la formation de filopodes. Ces structures qui apparaissent à la membrane cellulaire sont constituées de filaments d'actine et permettent les mouvements d'attachement et de détachement des cellules et ainsi leur migration directionnelle.



**Figure 20. Le VEGF et l'activation de la signalisation Notch par DLL4 régulent la spécification des cellules endothéliales en *tip cells* et *stalk cells* au cours de l'angiogenèse.**

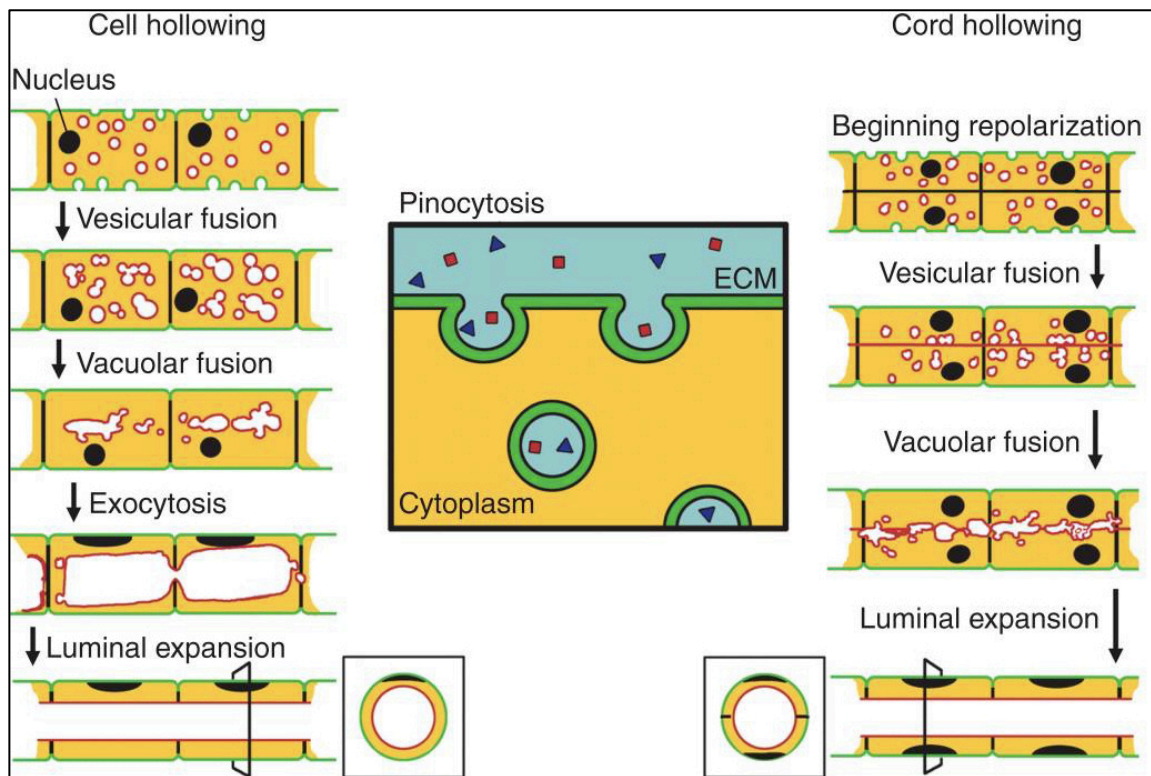
La fixation du VEGF-A à son récepteur VEGFR-2 à la surface des CE aboutit à l'expression de DLL4. Les CE exprimant le plus DLL4 se spécifient en *tip cells* et présentent un phénotype migratoire (présence de filopodes, réarrangement du cytosquelette) et peu prolifératif. Le DLL4 présent à la surface des *tip cells* interagit avec le récepteur Notch-1 exprimé par les CE avoisinantes (*stalk cell*). Cette interaction induit le clivage du récepteur par une métalloprotéase de type ADAM et une  $\gamma$ -sécrétase. Le domaine intracellulaire de Notch (NICD), transloque vers le noyau et provoque la répression du VEGFR-2 et la régulation à la hausse du VEGFR-1 qui a une forte affinité pour le VEGF mais une faible activité de signalisation. (D'après Tung et al., 2012). (288)

- **Anastomose et formation de la lumière vasculaire**

La migration des *tip cells* et la prolifération des *stalk cells* aboutissent à la formation de bourgeons vasculaires. Les *tip cells* situées au front des bourgeons subiront une anastomose pour former un réseau vasculaire rejoignant la circulation. La VE-cadhérine, glycoprotéine impliquée dans l'adhérence des CE et les jonctions CE-CE, joue un rôle important dans le phénomène d'anastomose. Elle intervient dans la formation de jonctions cellulaires entre les *tip cells* qui vont subir l'anastomose et permet la fusion des bourgeons vasculaires. La VE-cadhérine semble jouer un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité des vaisseaux. En effet, les jonctions entre les CE sont formées par des molécules d'adhésion jonctionnelles telles que la VE-cadhérine. Ces jonctions assurent la médiation et le contrôle de l'intégrité et de la perméabilité vasculaire, notamment aux composants plasmatiques de poids moléculaire élevé. La VE-cadhérine représente le constituant principal des jonctions d'adhérence inter-endothéliales, l'inactivation de son gène ou l'utilisation d'anticorps contre la VE-cadhérine perturbent les monocouches endothéliales *in vitro* et augmentent la perméabilité vasculaire pour les protéines plasmatiques *in vivo* (289).

La formation de la lumière vasculaire délimitée par des canaux tubulaires formés par les CE est un mécanisme complexe faisant intervenir plusieurs molécules. Deux différents processus sont décrits pour la formation de la lumière vasculaire (Figure 21). Le creusement cellulaire ou « *cell hollowing* » et le creusement du cordon vasculaire ou « *cord hollowing* ». Le creusement cellulaire fait référence à une invagination de la membrane cellulaire pour former une vacuole. La fusion des vacuoles de CE voisines forme le lumen. Ce mécanisme fait intervenir les interactions entre CE et MEC qui dépendent des petites protéines G, cdc42 et Rac1 régulées par le VEGF et les intégrines(290). Le deuxième mécanisme, le creusement vasculaire, intervient plutôt lors de la formation de lumière des vaisseaux de gros calibre. Dans ce modèle, un cordon endothélial multicellulaire est formé, puis les jonctions entre CE sont rompues et une lumière se forme au niveau extracellulaire. Ensuite, des signaux indiquent la repolarisation des CE. Les surfaces localisées du côté de la MEC vont accumuler des marqueurs basaux tandis que les marqueurs apicaux vont cibler les jonctions entre CE. Des vésicules apicales vont fusionner séparant les surfaces cellulaires au niveau d'un axe central. Les surfaces seront séparées par des poches remplies de fluides qui vont former la lumière du vaisseau (288).





**Figure 21. Mécanismes de formation de la lumière vasculaire, modèles du creusement cellulaire et du creusement du cordon vasculaire.**

Dans cette représentation, les bordures vertes représentent le domaine basal de la cellule tandis que les bordures rouges représentent le domaine apical. Le creusement cellulaire (représenté sur le panneau de gauche) débute par un cordon de cellules endothéliales subissant une pinocytose. Les vésicules pinocytaires résultantes fusionnent au niveau intracellulaire pour former des vacuoles, qui fusionnent à nouveau. Les marqueurs apicaux de la membrane vacolaire dirigent les vacuoles vers le site de la future lumière. La lumière de cette "cellule creuse" fusionne ensuite de manière intercellulaire avec les cellules creuses environnantes par exocytose des vacuoles pour former une lumière continue. Le Panneau central représente le processus de pinocytose. Le modèle du creusement vasculaire est représenté sur le panneau de gauche. Pendant l'invasion d'un cordon endothélial dans la MEC environnante, les cellules endothéliales perdent leur polarité apico-basale. Un signal déclenche la repolarisation et les membranes en contact avec la MEC accumulent des marqueurs basaux tandis que les vésicules pinocytaires portant des marqueurs apicaux fusionnent à l'emplacement de la future lumière. Les vésicules continuent à fusionner au niveau du domaine apical, créant des "poches de lumière" qui finissent par fusionner pour devenir une lumière continue. (D'après Tung et al., 2012) (288).

- **Maturation et remodelage**

La formation de la lumière vasculaire permet la perfusion du vaisseau, rétablissant un apport en oxygène. La réduction de l'hypoxie est accompagnée d'une diminution de l'expression du VEGF, orientant les CE vers un phénotype quiescent. Les vaisseaux néoformés sont



fonctionnels après des étapes de maturation, qui impliquent plusieurs facteurs de croissance tels que le PDGF, le TGF- $\beta$  et l'angiopoïétine-1 (Ang-1). Ces facteurs de croissance permettent d'inhiber certaines protéases telles que les MMP et les ADAM par l'expression de leurs inhibiteurs, les Tissue Inhibitor of Metalloproteinases « TIMP ». Ils permettent également la différenciation des cellules murales en péricytes ou en CML. Le PDGF est sécrété par les *tip cells* et se lie à leurs chaînes HS, lui permettant de se fixer à son récepteur PDGFR sur les cellules murales. La signalisation le complexe PDGF-PDGFR permet le recrutement des cellules murales vers le nouveau vaisseau et leur différenciation en péricytes. L'inactivation du gène du PDGF ou du PDGFR provoque un déficit en péricytes et des anomalies vasculaires graves (291). Le TGF- $\beta$  est sécrété par les CE et se fixe à son récepteur pour activer la migration et la différenciation des cellules murales en péricytes ou en CML, il intervient également dans la synthèse de la lame basale (292). Les péricytes recrutés vont adhérer aux CE via l'interaction entre Ang-1 sécrétée par les cellules murales et le RTK « Tie2 », exprimé à la surface des CE. Cette interaction Ang-1-Tie2 régule à la fois l'angiogenèse et la stabilisation et quiescence vasculaire. Les CE stabilisées entrent dans un état quiescent et non proliférant, elles forment une monocouche qui favorise la stabilisation du vaisseau grâce aux jonctions adhérentes en faisant intervenir la VE-cadhérine. Les CE vont également réprimer la réponse au VEGF-A par la production de VEGF-R1 soluble.

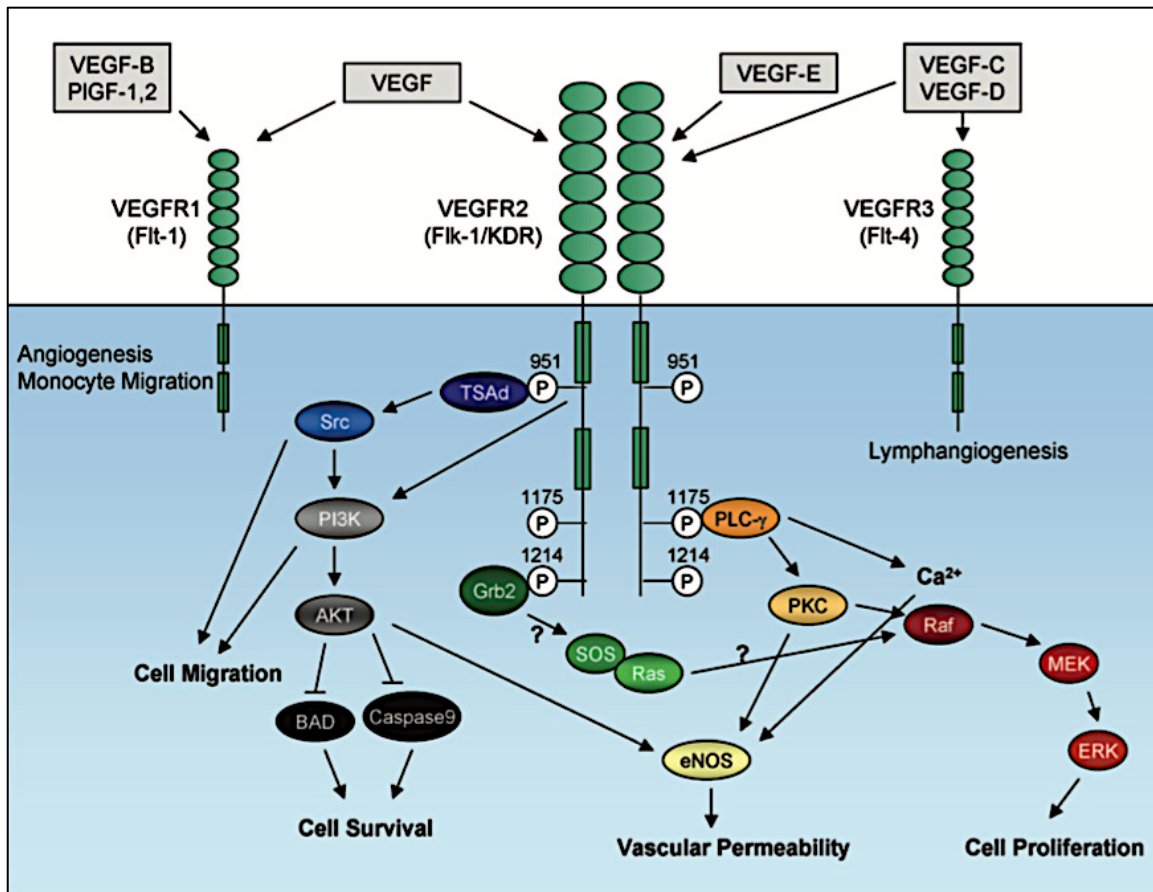
#### **4. Les facteurs pro-angiogéniques**

L'angiogenèse est un processus finement régulé au niveau cellulaire par la libération de facteurs de croissance et de protéines pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Au cours de l'ischémie, la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  induite par l'hypoxie entraîne la régulation à la hausse de l'expression de plusieurs facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF. Le VEGF se lie à son récepteur, le VEGFR, sur les CE, déclenchant un certain nombre de cascades de signalisation telles que les voies Notch, PI3K/Akt, ERK1/2, qui conduisent à la migration et à la différenciation des cellules endothéliales. L'hypoxie régule également à la hausse l'expression de CXCL12, une chimiokine qui exerce ses propriétés pro-angiogéniques via le recrutement de PEC vers le site de l'ischémie mais également via l'activation de voies de signalisation telles que ERK1/2 et PI3K/AKT (293). Le FGF est

également un facteur de croissance possédant des propriétés pro-angiogéniques via le contrôle de différents processus cellulaires tels que la survie, la migration et la différenciation des CE.

#### **a) Le VEGF**

Ce facteur de croissance et ses récepteurs sont largement reconnus comme des facteurs critiques responsables de la vascularisation. La famille des VEGF comprend les VEGF-A-B-C-D-E et le facteur de croissance placentaire (PlGF). Le VEGF-A peut être sécrété par les CE, les macrophages, les mastocytes et par les cellules cancéreuses en réponse à l'hypoxie (294). Il exerce ses effets angiogéniques en se liant à des RTK. Trois récepteurs membranaires sont spécifiques au VEGF : le VEGF-R1 (Flt1), le VEGF-R2 (KDR) et le VEGF-R3 (Flt4). La liaison du VEGF à ses récepteurs induit l'homo-dimérisation ou l'hétéro-dimérisation de ces derniers. Ces dimérisations activent la fonction kinase des récepteurs et leur autophosphorylation, induisant l'activation des molécules de la transduction du signal telles que la PLC- $\delta$ , PI3K, Akt, et les MAPK. Ces événements aboutissent *in fine* à la prolifération, la survie et la migration cellulaires (295). Ce facteur de croissance intervient également dans la perméabilité vasculaire en activant la nitric oxyde synthase (NOS). Le VEGF-R2 est le médiateur de la majorité des effets angiogéniques du VEGF (295). Les CE expriment le VEGF-R2 qui dirige positivement les réponses mitogènes et chimiotactiques des CE au VEGF. L'activation et la signalisation du VEGF-R2 peuvent être influencées positivement ou négativement par la coexpression et l'activation du VEGF-R1 qui agit comme un co-récepteur (Figure 22). La liaison VEGF/VEGF-R2 induit la formation et l'extension de filopodes dans les CE, leur permettant de migrer pour générer un pont avec les CE voisines et faire germer un nouveau vaisseau. En réponse à l'augmentation de l'expression du VEGF, les CE prolifèrent et migrent. Une membrane basale est synthétisée et une lumière vasculaire formée. Enfin, les péricytes régulent la stabilisation du nouveau vaisseau.



**Figure 22. Transduction du signal par la famille des VEGF.**

Les membres de la famille VEGF se lient à trois récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3), ce qui entraîne une dimérisation, une autophosphorylation du récepteur et une activation des voies de transduction du signal en aval. La transduction du signal par le VEGF-R2 est représentée dans ce schéma. La liaison du VEGF au VEGF-R2 active les molécules de transduction du signal phospholipase C-(PLC-), PI3K, Akt, Ras, Src et MAPK et régule la prolifération, la migration, la survie et la perméabilité vasculaire. (D'après Nilsson M et al., 2006) (295).

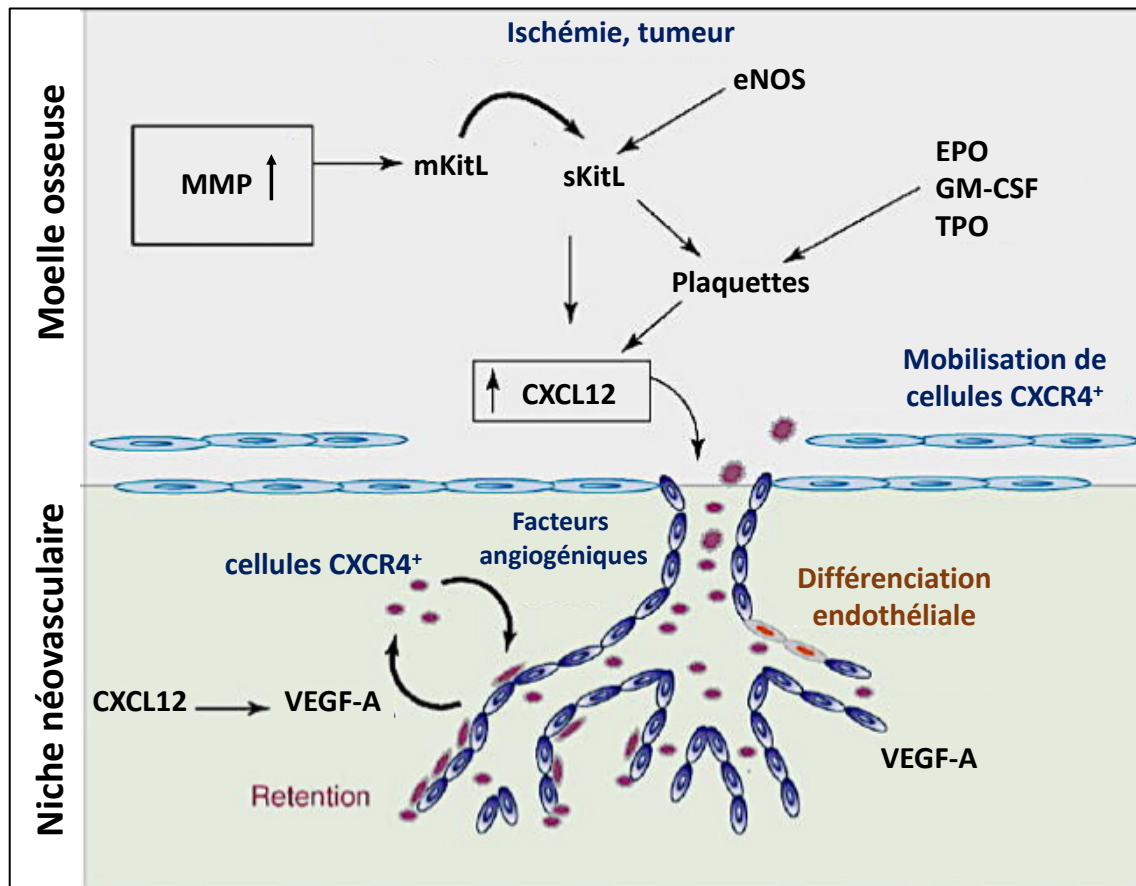
## b) La chimiokine CXCL12

Les chimiokines sont des petites protéines appartenant à la famille des cytokines. Elles sont classées en 4 sous-familles : les CCL, les CXCL, les CX3CL et les XCL (L= ligand). Ce classement repose sur l'espacement entre deux résidus cystéines en position N-terminale. Les CCL ont deux résidus cystéines adjacents qui ne sont pas séparés par un acide aminé. Les CXCL ont un seul acide aminé qui sépare les deux résidus cystéines. Les CX3CL comptent 3 acides aminés entre les résidus cystéines tandis que les XCL n'ont qu'un seul résidu cystéine en position N-terminale. Les chimiokines exercent leurs fonctions en se liant à des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) ou à des Atypical ChemoKine Receptors (ACKR).

CXCL12 est une chimiokine qui exerce ses fonctions en se liant à deux récepteurs, un RCPG, CXCR4 et un ACKR, CXCR7. Lors d'une hypoxie, l'expression de CXCL12 est régulée à la hausse dans les CE (296). Il a récemment été démontré que cette régulation dans les CE passe par l'axe LINC01693/miR-302d/CXCL12. LINC01693 est un long ARN non codant (lncRNA) dont l'expression est induite par l'hypoxie. Ce lncRNA sert d'éponge à ARN pour le micro-ARN-302d dans le but de contrecarrer la suppression de CXCL12 médiée par miR-302d. Pour résumer, l'hypoxie induit l'expression de LINC01693 qui à son tour induit l'expression de CXCL12 via l'inhibition du miR-302d. En parallèle, cette étude a démontré que l'angiogenèse induite par CXCL12 en hypoxie est fortement réduite lorsque l'expression de LINC01693 est inhibée (296). L'expression du récepteur CXCR4 est également régulée par l'hypoxie. En effet, le gène codant le récepteur CXCR4 contient une séquence HRE « hypoxia response element » qui permet la fixation de HIF et la régulation à la hausse de l'expression de CXCR4 lors d'une hypoxie (297).

CXCL12 est une chimiokine pro-angiogénique. L'inhibition de sa sécrétion par le LYG-202 inhibe l'activation des CE et l'angiogenèse (298). L'angiogenèse nécessite le recrutement de PEC de la moelle osseuse adressée vers les tissus ischémiques, ainsi que la dégradation et la réorganisation de la MEC. Le rôle de CXCL12 a été largement étudié, en particulier sa fonction dans le recrutement des PEC. Le récepteur CXCR4 exprimé à la surface des PEC est essentiel pour la migration des cellules vers le gradient chimiotactique de CXCL12. *In vitro*, CXCL12 augmente la prolifération et la migration des PEC et inhibe leur apoptose (299). CXCL12 induit également la libération de NO par les CE, régulant positivement l'expression de la MMP-9 (Figure 23). La MMP-9 va alors libérer le Kit-ligand soluble (s-KitL), qui augmente l'expression de CXCL12, renforçant ainsi le recrutement de cellules CXCR4<sup>+</sup>/c-kitL<sup>+</sup> (300). La fixation de CXCL12 à son récepteur induit l'activation de voies de signalisation telles que ERK1/2 et Akt dans une lignée de CE (HMEC). Cette étude a démontré que la voie ERK1/2 aboutit à la prolifération des CE et la voie PI3K/Akt intervient dans l'effet anti-apoptotique. Cependant, les deux voies sont indispensables à la formation de tubes vasculaires par les HMEC *in vitro* (301). Il a également été démontré que l'injection de

CXCL12 chez la souris permet de réduire la taille de l'infarctus post-ischémique et d'augmenter la néo-vascularisation (302).



**Figure 23. Régulation de l'angiogenèse par CXCL12.**

La chimiokine CXCL12 est produite lors d'une hypoxie, de lésions vasculaires ou de tumeurs, et est libérée dans la circulation. La signalisation du CXCL12 induit un remodelage complexe du microenvironnement de la moelle osseuse impliquant des protéases, le Kit-ligand (KitL) et la production de NO, conduisant à la mobilisation des cellules angiogéniques CXCR4+. L'expression de CXCL12 dans la niche néo-angiogénique recrute les cellules CXCR4+ et agit sur leur rétention, leur différenciation et leurs activités pro-angiogéniques en coordination avec d'autres facteurs angiogéniques tels que le VEGF-A (D'après Petit et al., 2007). (303)

## 5. Interaction entre les glycosaminoglycannes et les facteurs pro-angiogéniques

Les GAG interviennent dans divers processus physiopathologiques à travers leur capacité à interagir avec différentes protéines. Plus de 200 molécules interagissant avec les GAG ont été identifiées et décrites dans la littérature (304). Ces interactions dépendent en premier lieu de la composition et la structure des GAG. On pensait initialement que la charge négative des GAG permettait une interaction électrostatique non spécifique avec diverses

molécules chargées positivement. Plus tard, il a été démontré que ces interactions étaient d'une grande spécificité et dépendent d'une part de séquences consensus dans les protéines, avec la présence d'acides aminés basiques (lysine, arginine et histidine) et d'autre part de la charge, la composition et la structure des chaînes GAG. Ces liaisons peuvent s'établir par des interactions ioniques mais aussi par liaisons hydrogènes (110). Les GAG, et particulièrement les chaînes HS peuvent se lier à des facteurs de croissance et des chimiokines dans la MEC ou à la surface cellulaire, régulant leur fonction.

#### **a) Interaction GAG-VEGF**

Le gène humain du VEGF-A est composé de 8 exons, son épissage alternatif donne lieu à 7 isoformes. Le VEGF121, le VEGF165 et le VEGF189 sont les variants les plus abondants et les mieux étudiés. Des études ont mis en évidence l'interaction de ces variants avec l'héparine. Très sulfaté, ce GAG est fréquemment utilisé pour remplacer les chaînes HS dans les études d'interaction. Le VEGF121 est l'isoforme la plus courte et n'interagit pas avec l'héparine (305). Le VEGF165 se lie à l'héparine et est associé à la MEC ou à la surface cellulaire. Enfin, le VEGF189 se lie fortement à l'héparine grâce à un domaine de liaison supplémentaire. Le VEGF165 et le VEGF189 peuvent être libérés par l'action de la plasmine (306). L'importance des variants de liaison à l'héparine a été mise en évidence chez les souris. En effet, des souris modifiées sélectivement pour une seule isoforme telles que les souris VEGF<sub>120/120</sub> (analogue au 121 chez l'homme) présentent de graves défauts de la configuration vasculaire et meurent en 2 semaines. Les souris VEGF<sub>164/164</sub> (analogue au VEGF165 chez l'homme) présentent un développement normal. Les souris VEGF<sub>188/188</sub> (analogue au VEGF189 chez l'homme) présentent un développement veineux normal mais un défaut du développement artériel (307,308). Ces conséquences reflètent l'importance de l'interaction entre le VEGF et les HS. La liaison du VEGF165, l'isoforme prédominante sécrétée par les CE dépend fortement des chaînes HS, car le clivage enzymatique des HS abolit la liaison du VEGF à la surface des CE (309). L'interaction VEGF165-HS nécessite la présence de groupements sulfate particuliers et notamment la 6-O sulfatation (65). Le site de liaison du VEGF aux HS se trouve sur une séquence de 55 acides aminés contenant 4 ponts disulfure, dont un particulièrement important pour l'interaction du facteur de croissance aux chaînes HS (310). Le récepteur VEGF-R2 qui est l'effecteur majeur de la

signalisation du VEGF dans l'angiogenèse, il interagit également avec les chaînes HS, suggérant la formation d'un complexe ternaire, VEGF-HS-VEGFR (311). En facilitant l'interaction VEGF-VEGFR, les chaînes HS jouent un rôle crucial dans la signalisation du VEGF. En effet, des concentrations faibles d'héparine ou de HS (0,1-1 µg/mL), ont potentialisé la fixation du VEGF à son récepteur VEGFR et ont augmenté la phosphorylation de ce dernier. Elles ont également augmenté l'activation de la signalisation du VEGF et ses activités mitogéniques ainsi que la formation de tubes vasculaires par les CE. En revanche, le clivage des HS par l'héparinase a réduit l'activation de la voie ERK1/2 induite par le VEGF (312). Récemment, il a été démontré que l'inhibition du VEGF en interférant avec sa liaison aux HS permettait de protéger contre les pathologies induites par le VEGF telle que les microangiopathies diabétiques. En effet, dans un modèle de souris diabétiques induit par la streptozotocine, l'utilisation du calcium dobesilate (CaD), molécule qui interfère avec les sites de liaison aux HS du VEGF a permis de réduire la liaison du VEGF à son récepteur et d'atténuer sa signalisation au niveau des reins. Cette molécule a également montré un effet protecteur dans la neuropathie diabétique (313). Par ailleurs, le CaD est aujourd'hui utilisée pour traiter les rétinopathies diabétiques (314).

#### **b) Interaction GAG-CXCL12**

L'épissage alternatif du gène de CXCL12 donne lieu à 6 isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\phi$ ). L'isoforme  $\alpha$  est la plus abondante et présente une séquence de 68 acides aminés commune à toutes les isoformes, contenant le site de liaison au récepteur CXCR4 et à l'héparine/HS. Les autres isoformes diffèrent dans leurs parties C-terminales qui contiennent le site d'interaction aux GAG. Une attention particulière a été portée à la partie C-terminale de CXCL12- $\gamma$  plus longue de 30 acides aminés et fortement enrichie en acides aminés basiques, ce qui augmente son affinité pour les GAG. La liaison aux HS protège CXCL12 de l'inactivation protéolytique par CD26/DPP IV (88). Notre laboratoire a démontré que la liaison de CXCL12 au SDC-4 des cellules HeLa, des cellules T et des macrophages est HS dépendante. Cette liaison sur les macrophages facilite l'interaction de CXCL12 avec son récepteur CXCR4. Toutefois, la liaison HS-dépendante de CXCL12 au SDC-4 sur les cellules HeLa induit une transduction du signal, décrivant un rôle de récepteur allant au-delà de la présentation des chimiokines à leurs récepteurs spécifiques (315). Notre équipe a également démontré que

l'interaction avec les GAG est essentielle à l'invasion des cellules HeLa induite par CXCL12 (316).

### **c) Interaction entre GAG et autres facteurs pro-angiogéniques**

En plus de leur interaction avec VEGF et CXCL12, les GAG semblent être impliqués dans la liaison et la fonction d'une multitude de facteurs pro-angiogéniques. Comme cité précédemment, l'interaction entre les HS et le FGF permet la formation d'un complexe ternaire FGF-HS-FGFR HS-FGF-FGFR indispensable à la fonction de ce facteur de croissance. Jusqu'à la découverte du VEGF, le FGF2 était considéré comme le facteur de croissance clé de l'angiogenèse. La liaison du FGF2 aux HS dépend de la N-sulfatation des résidus de glucosamine et de la 2O-sulfatation des résidus IdoA (317). 6O-sulfation, N-sulfatation et 2O-sulfatation, sont nécessaires à l'activité mitogénique du FGF2 (318,319). La diminution de la 6O-sulfatation par l'inhibition de la HS 6O-sulfotransférase-1 réduit l'expansion et la formation de tubes vasculaires induites par le FGF2 (320). Les chaînes HS sont également importantes pour la fonction angiogénique du PDGF. La liaison du PDGF aux chaînes HS dépend de leur sulfatation globale et non pas d'un motif de sulfatation précis. Une sulfatation réduite des chaînes HS a conduit au détachement des péricytes et à un retard de leur migration(321). RANTES, une chimiokine pro-angiogénique de la famille des CCL (CCL5) se lie également aux GAG. Notre laboratoire a démontré que RANTES se lie au SDC-1 de manière GAG dépendante sur les macrophages primaires ou des lignées de carcinome hépatocellulaire (322). Notre équipe a également démontré que RANTES exerce ses fonctions proangiogéniques par le biais d'une signalisation intracellulaire activée par le SDC-4 et impliquant la PKC- $\alpha$  (323).



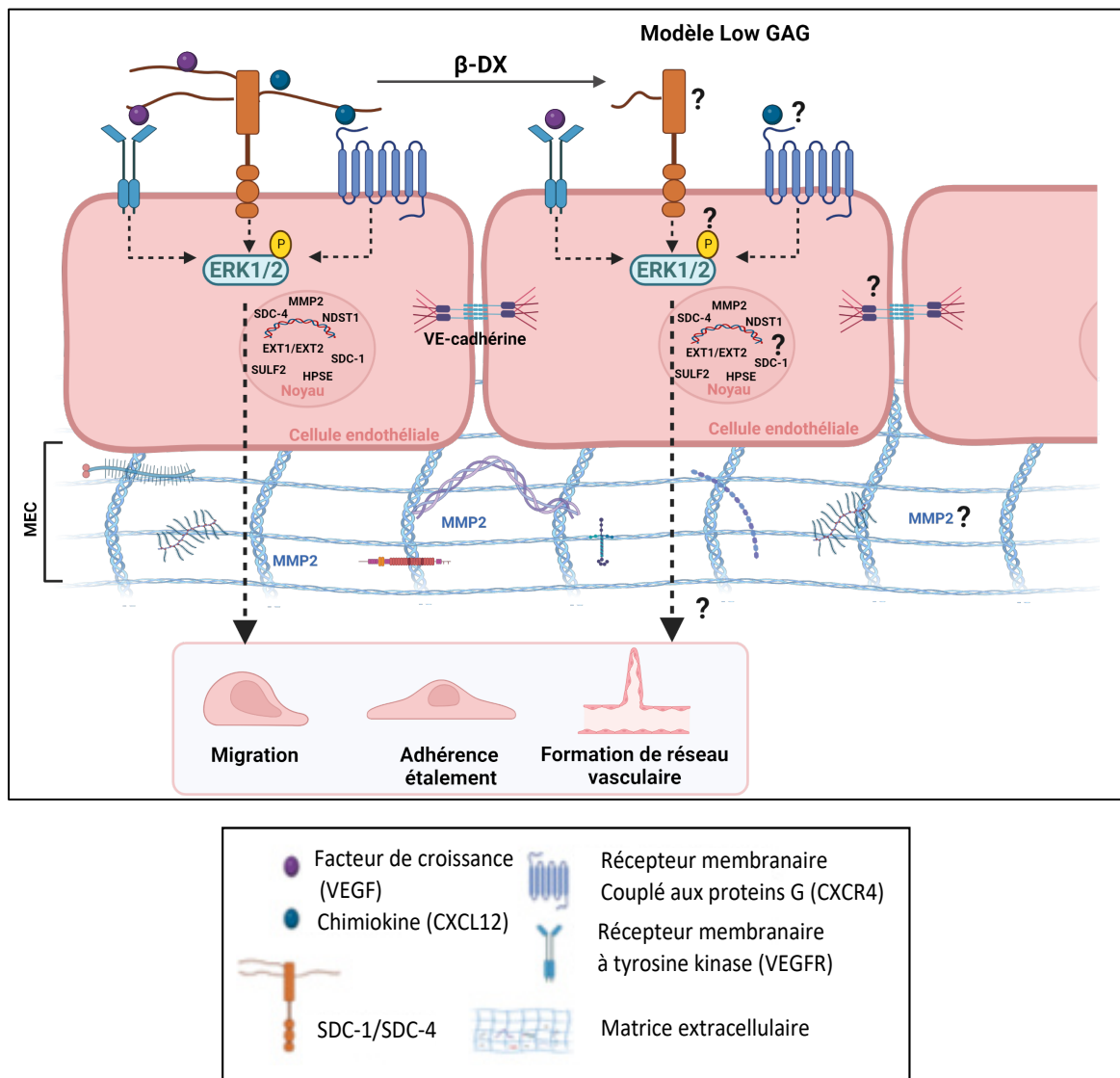
## Contexte et but de l'étude

L'ischémie représente une urgence médicale qui doit être rapidement prise en charge pour limiter les conséquences. Le pronostic dépend de la durée de l'ischémie, de la circulation collatérale préexistante et de la nature de l'occlusion (thrombose versus embolie). La revascularisation chirurgicale est un pilier du traitement de l'ischémie. Cependant, elle est parfois inenvisageable à cause de certaines comorbidités pouvant apparaître chez des patients à des stades avancés de la pathologie, à cause de l'âge ou d'autres antécédents cardiaques.

Comme réponse compensatoire à l'ischémie, l'organisme régule à la hausse l'expression des facteurs de croissance angiogéniques, tels que le VEGF, FGF, CXCL12, et les récepteurs correspondants qui, collectivement, peuvent stimuler le développement des vaisseaux collatéraux. Les différentes approches d'angiogenèse thérapeutique pour rétablir l'apport en nutriments et en oxygène représentent aujourd'hui des stratégies prometteuses pour le traitement de l'ischémie. De ce fait, l'analyse cellulaire et moléculaire et la connaissance des mécanismes impliqués au cours de l'angiogenèse, confère la capacité d'agir sur ce processus. Les facteurs de croissance et les chimiokines proangiogéniques se fixent à leurs récepteurs membranaires mais également à des corécepteurs protéoglycanniques qui jouent un rôle dans la fonction de ces protéines de différentes manières, notamment en permettant leur présentation à leurs récepteurs spécifiques, en formant des complexes ternaires ligand-PG-récepteur parfois indispensables à leur fonction, ou en les protégeant de la protéolyse. Cependant, lors de l'ischémie, le glycocalyx endothélial vasculaire subit une dégradation. Il a été démontré que l'induction d'une ischémie du membre inférieur chez le rat, a provoqué une modification du paysage glycanique avec notamment une modification de la longueur et la sulfatation des chaînes HS et CS. Ces changements structurels étaient accompagnés d'une modification de la capacité de ces GAG à lier des facteurs de croissance et à moduler leurs fonctions cellulaires. Une diminution de la revascularisation dans le muscle ischémié a également été notée. La revascularisation a été rétablie suite à un traitement avec des mimétiques des GAG (324).

Compte tenu de toutes ces données, l'objectif de ce travail est d'étudier **l'implication des glycosaminoglycannes dans les différents processus cellulaires impliqués dans l'angiogenèse (Figure 24)**. Pour cela, un modèle de cellules endothéliales appauvries en GAG a été mis au point par l'action d'un inhibiteur compétitif de l'élongation des GAG, le 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D -Xylopyranoside ( $\beta$ -DX). Nous avons évalué dans ce modèle, l'impact de l'appauvrissement en GAG sur :

1. L'expression génique des enzymes de biosynthèse et de modification des GAG (NDST, SULF, Héparanase, EXT).
2. L'expression génique et protéique du SDC-1 et SDC-4 ainsi que leur shedding.
3. La fixation de CXCL12 à la surface cellulaire.
4. La migration cellulaire induite ou non par CXCL12.
5. L'étalement, l'adhérence et les jonctions CE-CE.
6. L'expression et l'activité de la MMP2.
7. La formation de réseaux vasculaires, induite ou non par CXCL12 *in vitro* sur CE et *ex vivo* dans un modèle d'anneaux aortiques de rats.



**Figure 24. But des travaux de thèse.**

Les cellules endothéliales ont été traitées avec  $\beta$ -DX pour inhiber l'élongation des GAG. Différents processus cellulaires impliqués dans l'angiogenèse ont été analysés dans le modèle low GAG généré.

# Résultats



## **Article 1: Absence of glycosaminoglycans affects the endothelial cells responses involved in angiogenesis**

**Résumé :** L'ischémie résulte de l'obstruction des vaisseaux sanguins causant une diminution/arrêt du flux sanguin. Comme réponse compensatoire, l'organisme stimule l'angiogenèse par la production de facteurs pro-angiogéniques. Ces facteurs se lient à leurs récepteurs membranaires spécifiques mais également à des co-récepteurs protéoglycanniques. Les protéoglycannes (PG) sont constitués d'une protéine centrale liée à des chaînes de glycosaminoglycannes (GAG). Ces polysaccharides sont capables de se lier à différentes classes de molécules, régulant de façon importante leurs fonctions. Cependant, les GAG sont dégradés au cours de l'ischémie. De ce fait, l'objectif de notre étude est d'évaluer l'impact de la réduction des GAG sur les processus cellulaires impliqués dans l'angiogenèse. Pour cela, nous avons inhibé l'élongation des GAG dans des cellules endothéliales (CE) HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), en utilisant le  $\beta$ -DX (4-nitrophenyl  $\beta$ -D xylopyranoside), un inhibiteur compétitif chimique. Les cellules appauvries en GAG sont désignées par le terme « low GAG ». Ensuite, nous avons évalué l'impact de la réduction des GAG, sur l'expression des enzymes de biosynthèse et de modification des GAG, l'expression des PG, SDC-1 et SDC-4 et leur « shedding » (clivage de leur ectodomaine), la liaison de la chimiokine pro-angiogénique CXCL12 à la surface des CE « low GAG », la migration cellulaire induite ou non par CXCL12, l'adhérence, l'étalement des CE, la formation de jonctions entre CE et la formation de réseaux vasculaires induite ou non par CXCL12 *in vitro* (HUVEC) et *ex vivo* (anneaux aortiques de rats). Le modèle « low GAG » présente plus de 80% de réduction des chaînes héparane sulfate, impactant l'expression des enzymes de biosynthèse des GAG avec une diminution de l'expression de NDST1, EXT1, EXT2 et SULF2. L'expression génique et protéique des SDC-1 et SDC-4 a également été altérée avec une augmentation du « shedding » du SDC-1. Une diminution de l'activité de la métalloprotéase MMP-2 impliquée dans l'angiogenèse a également été relevée dans les HUVEC « low GAG » en comparaison aux cellules contrôles. Les HUVEC « low GAG » ont montré une faible capacité à adhérer à une surface recouverte de fibronectine et présentent des différences morphologiques comparées aux HUVEC contrôles. En effet, un changement de la disposition du cytosquelette d'actine a été relevé, les HUVEC « low GAG » présentent une forme circulaire et une actine périphérique corticale comparées aux cellules contrôles qui

présentent un aspect étalé avec des fibres de stress apparentes et une disposition homogène de l'actine. La réduction des GAG a provoqué une augmentation de la migration des HUVEC mais une forte diminution de la formation de réseaux vasculaires. *Ex vivo*, la réduction des GAG engendre une abolition de la formation de réseaux vasculaires. Malgré la forte fixation de CXCL12 à la surface des HUVEC « low GAG », la chimiokine n'a pas pu induire la formation de réseaux vasculaires dans ce modèle. En effet, aucune différence n'a été observée dans la migration ou la formation de réseaux vasculaires par les cellules low GAG en présence et en absence de CXCL12.

Pour résumer, nos résultats mettent en évidence les différentes conséquences de l'appauvrissement en GAG sur les processus cellulaires impliqués dans l'angiogenèse. Un ensemble d'observations telles que l'altération de l'expression des SDC, la perturbation de la balance migration/adhérence, la diminution de l'expression de la MMP2 et l'inhibition de la formation de réseaux vasculaires démontrent un rôle majeur des GAG et donc du glycocalyx des cellules endothéliales dans le processus. La restauration du glycocalyx et donc de la quantité et de la qualité des GAG en termes de longueur, de composition et de structure à la surface des cellules endothéliales pourrait s'avérer

## **Absence of glycosaminoglycans affects the endothelial cell responses involved in angiogenesis.**

Naim M<sup>1</sup>, Bassand K<sup>1</sup>, Haddad O<sup>1</sup>, Prabhakar Reddy D<sup>1</sup>, Mouhoubi N<sup>1</sup>, Sainte-Catherine O<sup>1</sup>, Dard N<sup>2</sup>, Oudar O<sup>1</sup>, Charnaux N<sup>1,3</sup>, Sutton A<sup>1,3,\*</sup> and Hlawaty H<sup>1,\*</sup>

1. Université Sorbonne Paris Nord, Laboratory for Vascular Translational Science, LVTS, INSERM, UMR 1148, F-93000, Bobigny, France ; Université de Paris, F-75018, Paris, France ; INSERM, F-75018, Paris, France

2. Université Sorbonne Paris Nord, Hypoxie et Poumon, INSERM UMR 1272, F-93000, Bobigny, France

3. AP-HP, HUPSSD, Hôpital Avicenne, Laboratoire de Biochimie, F-93000, Bobigny, France

\* These authors contributed equally

Running title: Glycosaminoglycans and angiogenesis

Keywords: Glycosaminoglycans, syndecans, angiogenesis

Abbreviations:  $\beta$ -DX: 4-Nitrophenyl- $\beta$ -d-Xylopyranoside; cDNA: complementary DNA; CXCL12: C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 ; CXCR: C-X-C motif chemokine receptors ; EC: Endothelial cells ; ECM : Extracellular matrix ; eGC : Endothelial glycocalyx ; EPC: Endothelial progenitor cells ; ERK: Extracellular signal-regulated kinases; EXT: Exostosins; GAG: Glycosaminoglycans; Gal: Galactose; GlcA: Glucuronic acid; HBP: Heparin binding protein; HPSE: Heparanase ; HS: Heparan sulfate ; Ig: Immunoglobuline ; IL : Interleukine ; MAPK: Mitogen-activated protein kinases ; MMP: Matrix metalloproteinase ; mRNA: Messenger ribonucleic acid ; PG: Proteoglycans ; qRT-PCR: Quantitative reverse transcription-polymerisation chain reaction ; SDC: Syndecan ; Sulf: Sulfatase; VE-cadherin: Vascular endothelial cadherin; VEGF: Vascular endothelial growth factor; VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor, Xyl: Xylose.

Corresponding author:

Hlawaty Hanna, Université Sorbonne Paris Nord, Laboratory for Vascular Translational Science, LVTS, INSERM, UMR 1148, F-93430, Bobigny, France.

E-mail: [hanna.hlawaty@univ-paris13.fr](mailto:hanna.hlawaty@univ-paris13.fr)

Tel: +33-1-48-38-85-18

## Abstract

Ischemia refers to reduction of blood flow and oxygen supplies in tissue due to the obstruction of vessels and cell necrosis. The damage of the endothelial GAG is one of the consequences of ischemia. In response to hypoxia, angiogenesis is stimulated by several pro-angiogenic factors, like chemokine (CXCL12) and vascular endothelial growth factor (VEGF) which bind to their specific receptors, co-receptors such as proteoglycans (PGs), and glycosaminoglycans (GAGs).

In this context, we investigated the impact of GAGs reduction on the different cellular processes involved in angiogenesis. We developed cellular model (human vascular endothelial cells, HUVEC) with reduced GAGs expression, named “Low GAG” HUVEC model. Firstly, we studied the PGs (Syndecan-1 and -4, SDC-1 and SDC-4) and GAG (Heparan sulfate, HS) expression. Secondly, we analyzed cell migration, adhesion, spreading and vascular network formation *in vitro*. In parallel, we studied the vascular network formation *ex vivo* in low GAG condition using the rat aortic ring assay. Finally, we investigated the CXCL12 binding to low GAGs HUVECs and its proangiogenic effect in migration and vascular network formation assays.

Our results showed a significant decrease of SDC-1 and SDC-4 expressions (mRNA, proteins) in “Low GAG” HUVEC model. In parallel, we observed a substantial increase in cell migration, accompanied by decrease of their adhesion. Interestingly, we showed a significant inhibition in vascular networks formation in both low GAGs models (*in vitro* and *ex vivo*). Concerning CXCL12, despite a strong increase of its binding to low GAGs HUVECs surface, we noticed that CXCL12 has no effect on migration and vascular network formation in low GAGs HUVECs. Taken together, these results highlight the strong involvement of GAG in angiogenic process.



## Introduction

The endothelial glycocalyx (eGC), present on the luminal side of endothelial cells (EC), consists of a network of glycoproteins and mainly proteoglycans (PG), including syndecan-1 and -4 (SDC-1, -4) which are proteins covalently linked to linear polysaccharide chains called glycosaminoglycans (GAG) (1). There are five main components of GAG chains: heparan sulfates (HS), chondroitin sulfates, dermatan sulfates, keratan sulfates, and hyaluronic acid. Among them, HS are the most abundant and represent between 50 and 90% of the GAG existent in the eGC (2). The eGC results from a balance between the synthesis and degradation of GAG. Their synthesis is initiated from a tetrasaccharide (Xyl-Gal-Gal-GlcA) where enzymes, especially exostosins (EXT) promote the elongation of GAG (3). In contrast, GAG degradation is regulated by enzymes such as heparanase (HSPE) (4). The eGC plays an essential role in vascular homeostasis. It regulates permeability and cell adhesion, acts as a mechanosensor of hemodynamic shear forces, and possess anti-thrombotic and anti-inflammatory activities (5). Injury to the eGC decreases vascular barrier function and results in protein extravasation and tissue oedema, loss of substrate supply to the tissue, and increased platelet and leukocyte adhesion (5). Indeed, eGC compounds, including SDC and HS, are shed from the endothelial surface, by HPSE or by matrix metalloproteinases (MMP) (5) respectively, in a variety of acute and chronic clinical conditions, the most clearly described examples being ischemia, hypoxia, and atherosclerosis (7). In this study, we focused on GAG impact on angiogenesis, which involves endothelial cell (EC) response to several stimuli, like cell proliferation, migration, and cell-to-cell interactions to form the vascular network. Previously, we observed the eGC modification during post-ischemic regeneration and angiogenesis in rat (8). Moreover, it has been shown that proangiogenic factors, such as CXCL12 and VEGF, needs to bind to GAG to induce the pro-angiogenic processes. In this context, the lack of GAG could be one of the reasons of the failure of pro-angiogenic therapies. To analyze the function of GAG on angiogenesis, we developed a low GAG human endothelial cell model to mimic the eGC degradation observed during ischemia in order to study endothelial cell function and their response to pro-angiogenic factors.

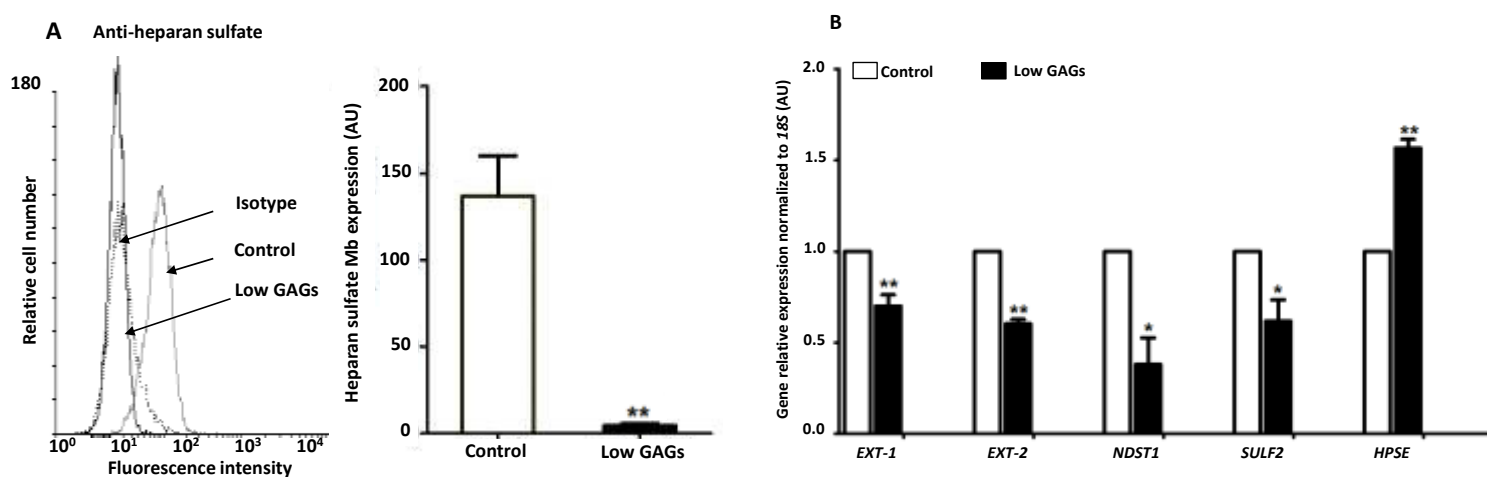
The originality and interest of our study was to evaluate the crucial role of endothelial GAG in different steps of angiogenesis, such as cell adhesion, spreading, migration, and vascular network formation analyzed in two *in vitro* and *ex vivo* models. In addition, our aim was to determine whether the modulation of GAG expression influenced CXCL12-induced vascular tube formation.

## Results

**Low GAG HUVECs displayed alterations of heparan sulfate levels and GAG-metabolism enzyme expression.** Firstly, to study the GAGs implication in different cellular processes involved in angiogenesis, we developed a low GAGs HUVECs model by treating HUVECs with  $\beta$ -DX (a chemical competitive inhibitor of GAGs elongation). Flow cytometry analysis using anti-heparan sulfate antibody revealed that heparan sulfates specific immunofluorescence staining was decreased up to  $80 \pm 23\%$  when HUVECs were treated with  $\beta$ -DX, as compared to untreated control cells (Fig 1A).

Secondly, we studied the effect of GAGs elongation inhibition on mRNA expression of *EXT1*, *EXT2*, *NDST1*, *SULF2* and *HPSE* that are enzymes involved in biosynthesis and modification of GAGs. We showed that  $\beta$ -DX treatment induced significant expression decrease of *EXT1* up to  $30 \pm 9\%$ , *EXT2* up to  $33 \pm 3\%$ , *NDST1* up to  $62 \pm 22\%$  and *SULF2* up to  $38 \pm 19\%$  as compared to control cells (Fig 1B). In contrast, we showed a significant increase in *HPSE* expression up to  $57 \pm 6\%$  when cells were treated with  $\beta$ -DX as compared to control cells (Fig 1B).

Taken together, we validated the low GAGs HUVECs model and we showed that it is characterized by a decrease of *EXT1*, *EXT2*, *NDST1* and *SULF2* expression.



**Figure 1: Low GAG HUVECs displayed alterations of heparan sulfate levels and GAG-metabolism enzyme expression.**

Low GAGs HUVEC model was developed by treating cells with 2 mM of  $\beta$ -DX (4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Xylopyranoside) for 72h. GAGs membrane expression was analyzed by flow cytometry (A). The effect of GAGs elongation inhibition on their biosynthesis and modification enzymes mRNA expression was studied by qRT-PCR using *18S* rRNA as endogenous control (B). The results were expressed as mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  as compared to control cells.

### **SDC-1 and SDC-4 expression and shedding are modified in low GAGs HUVECs.**

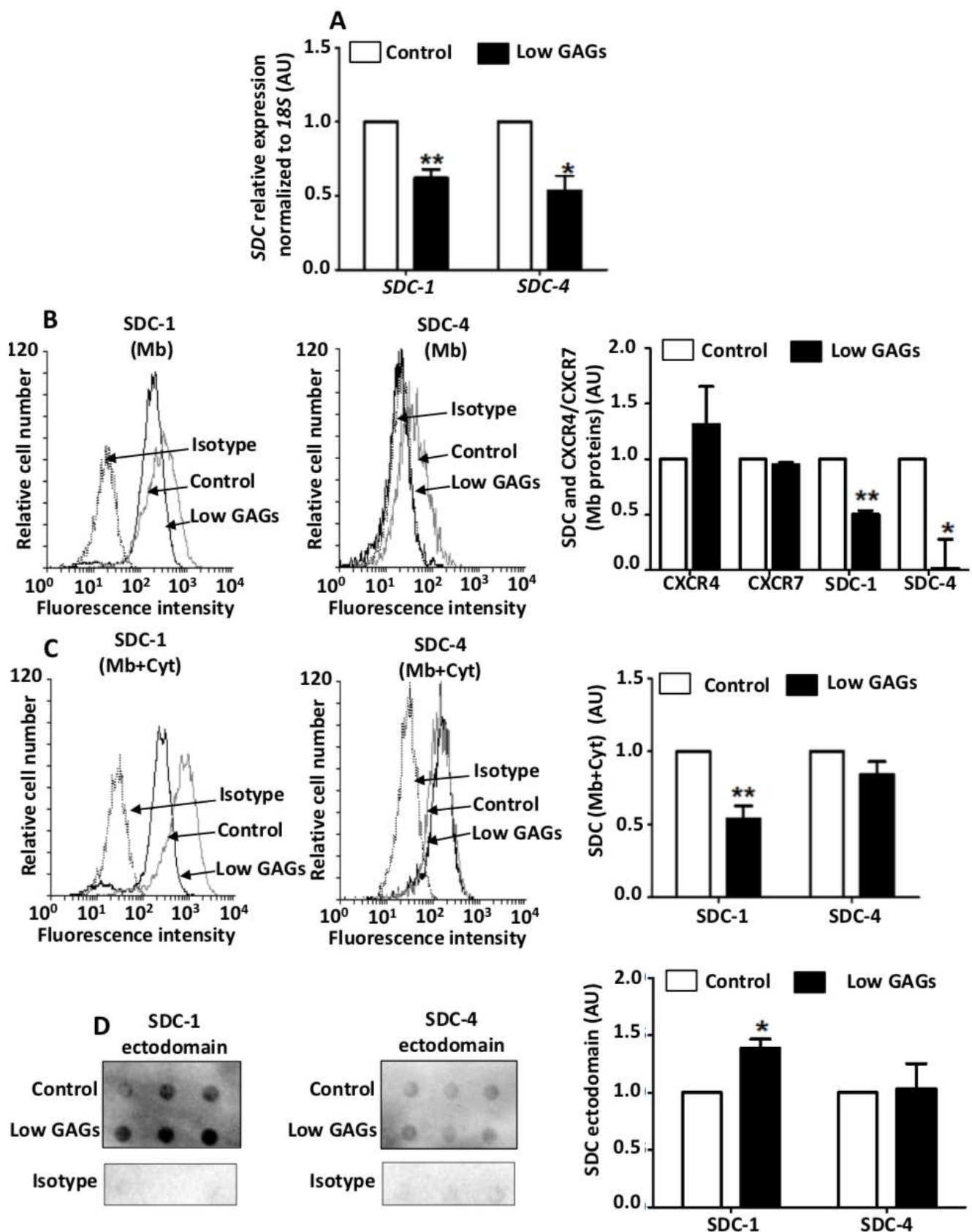
The second step of this work was to study the level of two PG such as SDC-1 and SDC-4 gene and protein expression in low GAGs HUVECs model. Since we validated the low GAGs HUVECs model using  $\beta$ -DX, we studied the effect of GAGs elongation inhibition on SDC-1 and SDC-4 mRNA expression. The qRT-PCR results showed that there was a significant decrease of SDC-1 and SDC-4 mRNA expressions up to  $38 \pm 9\%$  and  $47 \pm 17\%$  respectively, as compared to control HUVECs (Fig 2A).

In addition, the flow cytometry assays revealed that the decrease of GAGs level induced a significant inhibition of SDC-1 membrane expression up to  $50 \pm 7\%$  and SDC-4 up to  $93 \pm 33\%$  as compared to control cells (Fig 2B). Interestingly, our results showed that HUVECs expressed CXCR4 but no CXCR7 on the membrane. However, the inhibition of GAGs elongation did not affect the membrane expression of CXCR4 and CXCR7.

In parallel, total ( membrane and cytoplasm) protein expression of both SDC-1 and SDC-4 was determined by flow cytometry assay on permeabilized cells. There was a significant decrease of SDC-1 level up to  $46 \pm 18\%$  in low GAGs HUVECs and no difference of SDC-4 level, both as compared to control (Fig 2C).

To complete these results, we studied the shedding of SDC-1 and SDC-4 ectodomains in low GAGs HUVEC model. For this, we collected conditioned HUVEC media after  $\beta$ -DX treatment, and we performed the dot blot assay. There was a significant increase of SDC-1 shedding up to  $37 \pm 10\%$  as compared to control (Fig 2D). In contrast, no difference was found for SDC-4 shedding (Fig 2D).

Taken together, our data evidenced that the low GAGs HUVECs model affect the SDC expression with a decrease of SDC-1 and SDC-4 gene and membrane protein level, and with a decrease of SDC-1 total expression and shedding. However, despite of decreased SDC-4 gene expression there was no effect on its total protein level nor shedding in our low GAGs HUVECs model.



**Figure 2: Syndecan-1 and syndecan-4 expression and shedding are modified in low GAGs HUVECs**

HUVECs were treated or not with  $\beta$ -DX (2 mM) for 72h. mRNA expression of *SDC-1* and *SDC-4* were analyzed by qRT-PCR using *18S* rRNA as endogenous control (**A**). *SDC-1*, *SDC-4*, *CXCR4* and *CXCR7* membrane expression were studied by flow cytometry using anti-*SDC-1*, anti-*SDC-4*, anti-*CXCR4* or anti-*CXCR7* specific antibodies or their specific isotypes (IgG2a and IgG1 for *CXCR4* and *CXCR7* respectively) (**B**). Total *SDC-1* and *SDC-4* expression was studied by flow using anti-*SDC-1* and anti-*SDC-4* specific antibodies or their specific isotypes (IgG) cytometry after cell permeabilization (**C**). *SDC-1* and *SDC-4* shedding was analyzed by dot blot in conditioned media of cell culture using anti-*SDC-1* and anti-*SDC-4* specific antibodies or their isotypes (IgG1 or IgG2a) respectively (**D**). The results were expressed as mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  as compared to control cells.

### **Cell migration and ERK1/2 pathways are activated in low GAGs HUVECs.**

The next step of our study was to analyze the effect of GAGs decrease on the different cellular processes involved in angiogenesis. Firstly, we analyzed the effect of  $\beta$ -DX on low GAGs HUVECs migration. Interestingly, there was a significant increase of  $\beta$ -DX-treated cell migration up to  $62 \pm 22\%$ , as compared to control cells (Fig 3A). To explain this increased migration of low GAGs HUVECs, we analyzed the involvement of VEGF specific receptors Flt-1 and KDR in migration of HUVECs treated or not with  $\beta$ -DX. We noticed a significant decrease in HUVECs migration treated with anti-Flt-1 blocking antibody up to  $26 \pm 3\%$ , as compared to control cells. However, there was no significant difference when HUVECs were treated with anti-KDR blocking antibody, as compared to control cells. We observed a decreased migration up to  $36.5 \pm 0.35\%$  when HUVECs were treated with anti-Flt-1 and anti-KDR blocking antibodies at the same time, as compared to control cells. Interestingly, when low GAGs HUVECs were incubated with the blocking antibodies ( $\beta$ -DX and antibodies treatment), we noticed a significant decrease of cell migration up to  $44 \pm 14\%$  with anti-Flt-1,  $56.5 \pm 4\%$  with anti-KDR and  $56 \pm 5.5\%$  with both, anti-Flt-1 and anti-KDR antibodies, as compared to low GAG HUVECs (treated only with  $\beta$ -DX). This result showed that the inhibition of VEGF receptors using blocking antibodies, abolished the cell migration induced by  $\beta$ -DX (Fig 3B).

Then, we studied the activation of ERK1/2 pathway in low GAG HUVEC. Interestingly, our results showed that there was an increase of phospho-ERK1/2 in low GAGs HUVECs up to  $3 \pm 1.6$  fold, as compared to control cells (Fig 3C).

Taken together, our results suggested that the GAG absence increased cell migration via activation of ERK1/2 pathway.

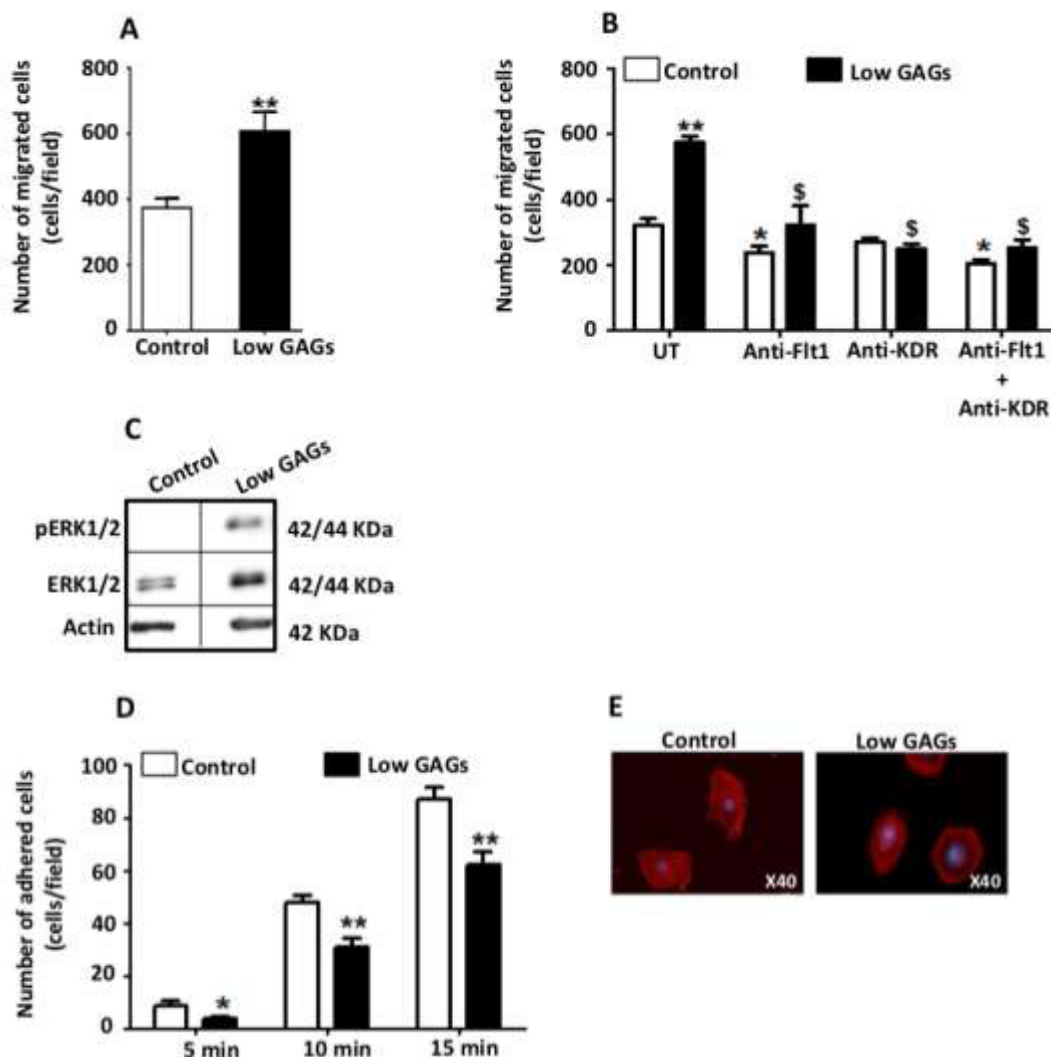
### **Cell adhesion is altered in low GAGs HUVECs.**

The next step of our study was to analyze the regulation of cell adhesion and spreading in low GAGs HUVECs model. We studied the effect of  $\beta$ -DX on HUVECs adhesion. For this, HUVECs were treated or not with  $\beta$ -DX, then seeded on fibronectin and incubated for 5 min, 10 min and 15 min. Our results showed a significant decrease of low GAGs HUVECs adhesion up to  $55.5 \pm 7.4\%$ ,  $35 \pm 10\%$  and  $30 \pm 6\%$  after 5, 10 or 15 min of incubation, as compared to control cells (Fig 3D).

In this context, we also studied the spreading of low GAGs HUVECs and untreated HUVECs by the staining of their filamentous actin (F-actin) with fluorescent-labelled phalloidin. We noticed the differences in cell structure between the low GAGs HUVECs and controls. Fluorescence microscopy

showed that low GAGs HUVECs presented different morphology, as compared to control cells. Indeed, low GAGs HUVECs showed circular shape compared to control cells that are more spread out. In addition, the F-actin in low GAGs HUVECs was cortical and appeared to be oriented circumferentially compared to control cells that showed more substantial stress fibers (Fig 3E).

Our data suggest that the decrease of low GAGs HUVECs adhesion can be related to modification of F-actin localization.



**Figure 3: Cell migration is enhanced but adhesion is altered in low GAGs HUVECs.**

HUVECs migration was studied using Boyden chamber. 40 000 HUVECs were pre-treated or not with  $\beta$ -DX (2mM) during 48h (A). Then, HUVECs and Low GAGs HUVECs were pre-treated or not with anti-VEGF-R1 (Flt-1) and anti-VEGF-R2 (KDR) blocking antibodies or both at 5  $\mu$ g/mL for 2h and deposited on the upper chamber (B). Migrated cells were colored using cristal violet and quantified under phase contrast microscope. ERK1/2 phosphorylation was studied using western blot assay in low GAGs HUVEC model. Activation of ERK1/2 was checked using a specific antibody against the phosphorylated ERK1/2. Total ERK1/2 level was also studied using specific anti-ERK1/2 specific antibody. Actin was used as endogenous control (C). To study cell adhesion, 3000 HUVECs pre-treated or not with  $\beta$ -DX were deposited on fibronectin coated Labtek®. Adhered cells were counted under phase contrast microscope (D). Cell spreading was studied by staining HUVECs treated or not with  $\beta$ -DX, using Alexa Fluor 568 phalloidin, nuclei were stained using DAPI. Cell spreading was observed with a fluorescence microscope magnification x40 (E). The results were expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p$ <0.05 vs control cells, \*\* $p$ <0.01 vs control cells, § $p$ <0.05 vs low GAG untreated cells (UT).

### **Vascular network formation is altered in low GAGs HUVECs.**

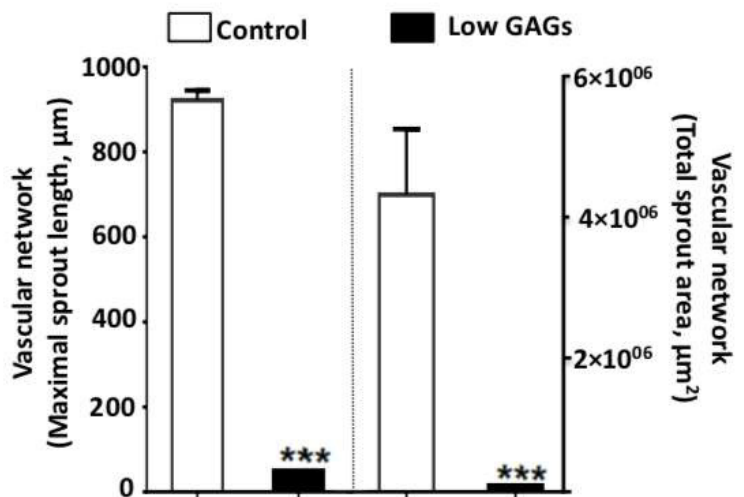
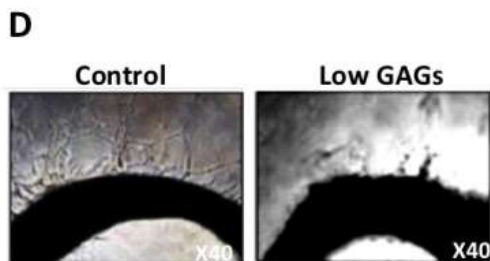
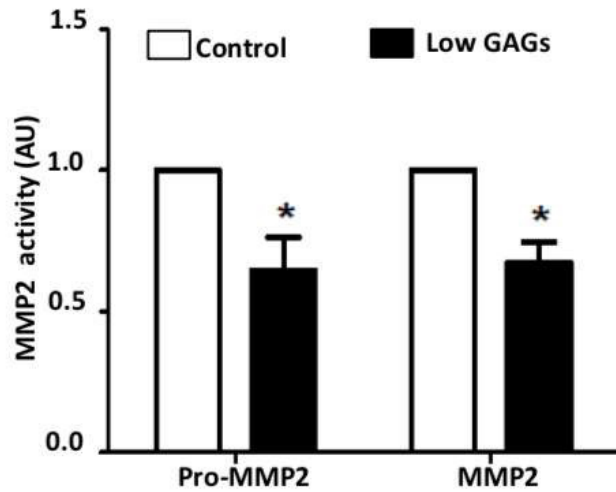
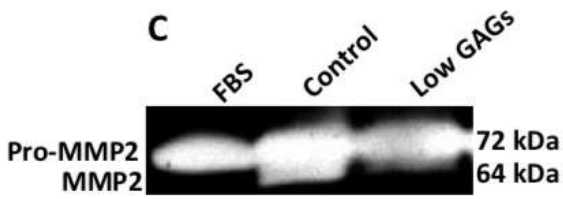
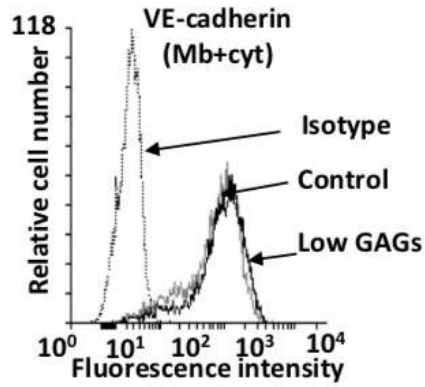
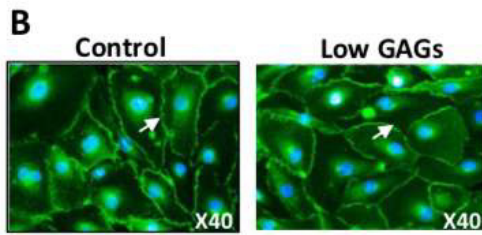
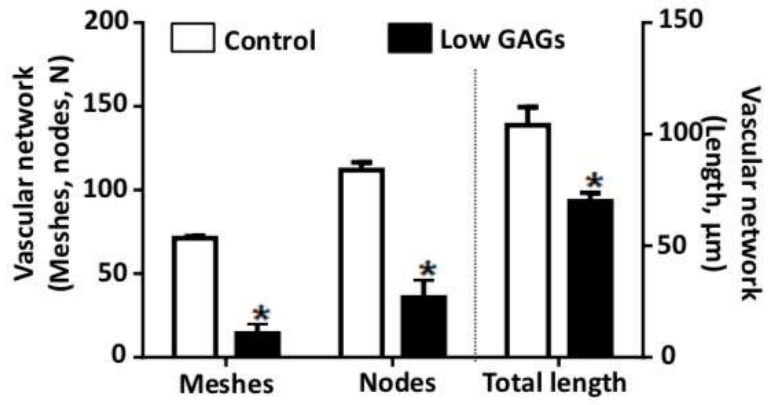
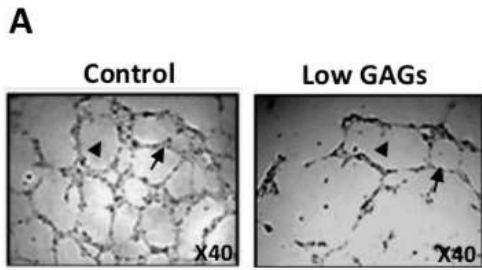
To study the role of GAGs in vascular network formation, HUVECs were treated with  $\beta$ -DX and used in 2D angiogenesis model on Matrigel. Then, the meshes and nodes number and total vascular network length were analyzed *In vitro*. Our results showed that there was a significant decrease up to  $80 \pm 12\%$  of meshes number,  $69 \pm 12\%$  of nodes number and a decrease up to  $32 \pm 9\%$  of total vascular network length formed by low GAGs HUVECs as compared to control cells (Fig 4A). Then, in order to find out whether the decreased vascular network formation in low GAG HUVECs was due to a cell-cell junctions' defect, we studied cell-cell junctions' formation in low GAGs HUVECs model using both fluorescent microscopy and flow cytometry through the immuno-staining of VE-cadherin with anti-VE-cadherin specific antibody. Our result showed no difference of VE-cadherin intercellular junctions' formation between low GAGs HUVECs and control cells (Fig 4B).

Then, considering the role of MMP-2 in angiogenesis, we studied the MMP-2 expression and activity in low GAG HUVEC model. The analysis of *MMP-2* gene expression measured by qRT-PCR showed no significant difference between low GAGs HUVECs and controls (data not shown). Nevertheless, MMP-2 protein level analyzed by western blot showed a significant decrease of pro-MMP-2 expression up to  $45 \pm 16\%$ , as compared to control (data not shown). Furthermore, as assessed by gelatin zymography, in conditioned media of low GAG HUVECs, there was a significant decrease of MMP-2 activity up to  $45 \pm 10\%$ , as compared to control cells (Fig 4C).

In parallel, we performed an *ex vivo* angiogenesis assay on rat aortic rings treated or not with  $\beta$ -DX, to confirm the results obtained in the *in vitro* cell model. More significant results were obtained in *ex vivo* model of angiogenesis. Indeed, the results showed a total abolition of vascular network formation when aortas were treated with  $\beta$ -DX, as compared to control aortas, meaning that the decrease in GAGs affects *ex vivo* angiogenesis to a greater extent (Fig 4D).

Taken together, the vascular network alteration in low GAGs HUVECs could be due to decrease of MMP-2 expression and activity.







#### Figure 4: Vascular network formation is inhibited in low GAG HUVECs

*In vitro* vascular network formation on Matrigel was studied using HUVECs treated or not with  $\beta$ -DX. Number of meshes, nodes and total length of the vascular network were quantified using Archimed<sup>™</sup> and Histolab<sup>™</sup> software using phase contrast microscope, magnification x40. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments **(A)**. VE-cadherin analysis was performed by immunofluorescence using anti-VE-cadherin primary antibody or its specific isotype IgG and FITC-coupled secondary antibody. Nuclei were stained using DAPI. Cell junctions were observed using fluorescence microscope coupled to a camera, images were taken at magnification x40. VE-cadherin total level was analyzed by flow cytometry using anti-VE-cadherin primary antibody or its specific isotype IgG and FITC-coupled secondary antibody **(B)**. MMP-2 activity in conditioned cell culture media was determined by gel zymography **(C)**. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$  as compared to control cells. For *ex vivo* vascular network formation study, aortic rings from Sprague-Dawley rats were treated or not with  $\beta$ -DX and deposited on Matrigel. Quantification of the maximal sprout length and sprout surface of the vascular network was performed using Archimed<sup>™</sup> and Histolab<sup>™</sup> software under phase contrast microscope, magnification x40. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM of five independent experiments. \*\*\* $p < 0.005$  vs untreated aortas **(D)**.

#### CXCL12 has no effect on migration and vascular network formation in low GAGs HUVECs.

In order to study the GAGs implication in CXCL12-induced angiogenesis, we firstly analyzed the effect of  $\beta$ -DX treatment on CXCL12 binding to HUVECs membrane. For this, cells treated or not with  $\beta$ -DX were incubated with biotinylated CXCL12. The results showed that effectively, CXCL12 has the capacity to bind to HUVECs membrane, but this binding was significantly increased in low GAGs HUVECs up to  $3 \pm 0.7$  fold, as compared to control cells (Fig 5A).

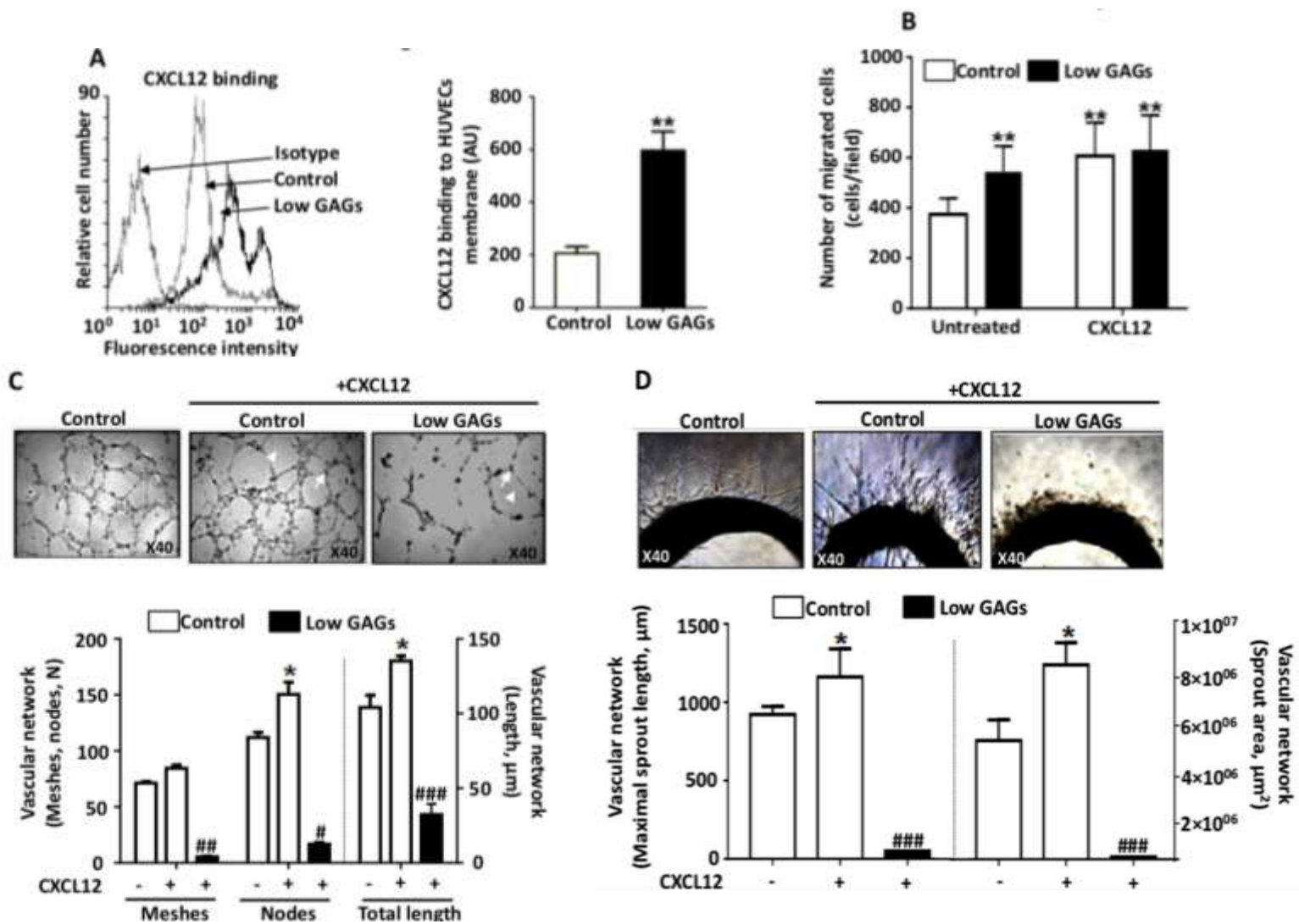
Then, we studied the low GAG HUVECs migration induced by CXCL12 using Boyden chamber. Low GAG HUVECs were deposited in the upper chamber, and then the cell migration was stimulated by CXCL12, which was present in the lower chamber. Firstly, we confirmed that CXCL12 increased cell migration up to  $45 \pm 21\%$  as compared to no stimulated cells. Secondly, we verified that low GAG HUVEC reached increased migration up to  $62 \pm 22\%$  as compared to control cells. Finally, our results showed that CXCL12 pro-migratory effect was completely lost in low GAG HUVECs. Indeed, we found no difference in migrated cells number, when HUVECs were treated with both  $\beta$ -DX and CXCL12 ( $607 \pm 133$ ), as compared to  $\beta$ -DX treated HUVEC in absence of CXCL12 ( $632 \pm 102$ ).

After that, we studied the role of GAGs in CXCL12 induced angiogenesis, in low GAGs HUVECs or rat aortas treated with  $\beta$ -DX using 2D angiogenesis assays on Matrigel. Firstly, we analyzed the vascular network formation *in vitro* by study of nodes number and total vascular network length. The results showed was enhanced up to  $34.42 \pm 5\%$  for nodes number and  $30 \pm 4\%$  for total

vascular network length in presence of CXCL12, as compared to control cells without CXCL12, confirming the proangiogenic effect of the chemokine.

In contrast, CXCL12 had no effect on vascular network formation in low GAG HUVEC. Indeed, no significant difference was noticed in vascular network formation between low GAG HUVEC without CXCL12 (Seen in Fig 4A) and low GAG HUVEC in presence of CXCL12 (Fig 5B). In the same way, we showed that total sprout area of vascular network formation *ex vivo* was enhanced up to  $65 \pm 7\%$  when rat aortas were treated with CXCL12, as compared to control aortas without CXCL12. However, no difference was noticed when aortas treated with  $\beta$ -DX (low GAG), were stimulated with CXCL12 (Fig 5C), as compared to rat aortas treated only with  $\beta$ -DX (Fig 4D).

To resume, cell migration was enhanced by CXCL12 in control cells, confirming the pro-migratory effect of this chemokine. However, CXCL12 had no effect on low GAG HUVEC cell migration. In parallel, the vascular network formation *ex vivo* is abolished in low GAG model, and CXCL12 has no effect on this process in this condition. This data suggest that the proangiogenic factors such as CXCL12 could not induct the proangiogenic response in degraded eGX.



**Figure 5: CXCL12 binding is enhanced but CXCL12-induced migration and vascular network formation are abolished in low GAGs HUVECs.**

CXCL12 binding to HUVECs membrane was checked by flow cytometry using biotinylated CXCL12 at 40 nM and fluorescent streptavidin (A). The results were expressed as mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. Low GAGs HUVECs migration induced by CXCL12 was studied using Boyden chamber. 40 000 HUVECs were treated or not with  $\beta$ -DX and deposited on the upper chamber. Cell migration was stimulated or not using CXCL12 at 6 nM in the bottom chamber for 24h. Migrated cells were colored using cristal violet and quantified under phase contrast microscope. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM of five independent experiments (B). *In vitro* vascular network formation on Matrigel was studied using HUVECs treated or not with  $\beta$ -DX and stimulated or not with CXCL12. Number of meshes, nodes and total length of the vascular network were quantified using Archimed™ and Histolab™ softwares using phase contrast microscope. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs control cells (C).

For *ex vivo* vascular network formation study, aortic rings from Sprague-Dawley rats were treated or not with  $\beta$ -DX and stimulated or not with CXCL12, then deposited on Matrigel. Quantification of the total length and sprout surface of the vascular network was performed using Archimed™ and Histolab™ softwares under phase contrast microscope. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM (D). of five independent experiments. \*\*\* $p$ <0.005 vs control aortas with CXCL12.

## **Discussion**

### **Endothelial glycocalyx composition and role.**

The vascular endothelial surface is coated by the endothelial glycocalyx (eGCX), which is mainly composed of proteoglycans (PGs) and glycosaminoglycans (GAGs). The eGCX is considered as a vascular gatekeeper through its determinant role in vascular permeability and circulatory homeostasis. 50-90% of the total endothelial PGs are heparan sulfate proteoglycans (HSPG). Heparan sulfate chains mediate most interactions between PGs and growth factors or chemokines, but also adhesion molecules, suggesting their essential role in regulation of several cell processes.

eGCX dysfunction has been noted in different pathologies including ischemia. Chappell and collaborators demonstrated in a porcine model that prolonged ischemia led to significant cleavage and eGCX degradation (9). Furthermore, it has been shown in a mouse model of acute ischemia that CXCL12-induced angiogenesis depends on CXCL12-HS chains interaction (10). However, the importance of GAGs in CXCL12-induced angiogenesis mediated by mature ECs remains unknown. Considering all these findings, the aim of our work was to study the role of GAGs in angiogenesis mediated by endothelial cells (ECs) in presence of CXCL12. For this, we performed the analysis of GAG involvement in EC biological response such as migration, adhesion and spreading. In parallel, we investigated the CXCL12 binding to the ECs surface and then their impact on ERK1/2 signaling pathways activation and vascular network formation.

### **Development of low GAGs HUVEC model.**

To study the role of GAGs in angiogenesis, we firstly developed a low GAGs HUVECs model. For this, GAGs incorporation into the newly formed proteoglycans was inhibited using 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Xylopyranoside ( $\beta$ -DX) as previously described (11, 12). As expected, a significant decrease up to 80% of HS chains was observed in HUVECs treated with  $\beta$ -DX. Indeed, it was previously shown that exposure of bovine corneal ECs to xyloside completely inhibited the synthesis of chondroitin sulfate or dermatan sulfate bound to PGs and decreased HSPG synthesis by 86% (13). Two different fluoro-xylosides showed an ability to inhibit HS synthesis in bovine lung microvascular ECs (14). Furthermore, another study resulted in reduced levels of cartilage GAGs during skeletogenesis when the larvae of zebrafish were treated with  $\beta$ -DX (15). Therefore, these findings proved that the  $\beta$ -DX is an efficient inhibitor of GAGs synthesis and we used it for the generation of the low GAGs HUVEC model.

### **SDC-1 and SDC-4 expression and localization depends on GAGs presence.**

We observed in our low GAGs HUVECs model that the decrease of HS chains level provoked an inhibition of *SDC-1* and *SDC-4* gene expression. Interestingly, we noticed a significant decrease of total (membrane and cytoplasm) *SDC-1* and membrane *SDC-4* expression in low GAGs HUVECs as compared to the control. It was previously shown that the diminution of HS chains in MDA-MB-231, PANC-1 and Hela cells resulted in an increase of *SDC-1* shedding and a decrease of its gene expression (16). In addition, transgenic mice expressing elevated heparanase level showed the higher *SDC-1* shedding reflecting that the correlation between HS chains level and *SDC-1* shedding occurs also *in vivo* (17). In accordance with the study cited above, our results showed the significant increase of heparanase gene expression that could be correlated with increased *SDC-1* concentration in low GAGs HUVECs conditioned media. We hypothesize that HPSE activates the syndecan-syntenin exosome pathway (18) leading to *SDC-1* accumulation in the cell conditioned media. Therefore, this could explain the membrane and cytoplasm *SDC-4* decreased level. In parallel, we showed that there was no effect on *SDC-4* shedding despite the decrease in its membrane expression. We hypothesize that *SDC-4* is rather intracellular and can be implicated in endocytosis process in low GAGs HUVECs. These results suggest that the reduction of GAGs affect the *SDC-1* and the *SDC-4* expressions, and may induce the modification of SDC physiological functions correlated with many pathologies characterized by eGCX degradation.

### **Migration and ERK1/2 activation are enhanced in low GAGs HUVECs model**

In this work, we analyzed the behavior of low GAGs HUVECs at the different steps of angiogenesis, including cell adhesion, spreading, migration and finally vascular network formation. Firstly, our results showed that low GAGs HUVECs had more capacity to migrate, which is in line with previous studies. We have previously demonstrated that GAGs mimetics led to decreased migration of human hepatoma cell line (Huh7) (19). In addition, the overexpression of *SDC-4* in CHO cells induced an increased focal adhesion formation associated to cell migration inhibition (20). Fang Zong and collaborators showed that the overexpression of *SDC-1* in mesenchymal tumor cells led to increased cell adhesion and reduced migration. While expression of the truncated form in the N-terminal ectodomain possessing GAGs, induced a decrease of cell adhesion and an increase on cell motility. Interestingly, the truncated *SDC-1* presence affected the gene expression, which was involved in cell adhesion and migration (21).

Moreover, we showed a strong activation of ERK1/2 signaling pathway in low GAGs HUVEC. This result led us to reflect about the opposite roles that GAGs can play depending on their location. On the one side, extracellular matrix GAGs could play an important role in sequestration of growth factors and chemokines as the negative regulators of signaling pathway. Hence, IL-27 activity is strongly inhibited by soluble GAGs, with a downstream inhibition of the activation of the STATs pathway and ultimately, an inhibition of the biological effects induced by this cytokine (22). On the other side, GAGs can be the regulators of ligand/receptor complexes. Indeed, a dual function of GAGs has been studied (23). Either GAGs could participate in the presentation of a ligand to its specific receptor or interact with this ligand, thus limiting its binding. For example, it was previously shown that GAGs interfere with CXCL9, CXCL10 and CXCL11 inducing signaling pathway in CHO cells (24). In our model, the inhibition of GAGs elongation concerns not only the membrane GAGs but also matrix GAGs, this could foster the cytokine binding to specific receptors and activate some signaling pathways. Previous study has evidenced that addition of heparin inhibited p38-MAPK pathway in Human pulmonary microvascular endothelial cells (25). Moreover, it has been shown that GAGs inhibited TNF- $\alpha$ -induced apoptosis through the inhibition of ERK/AP1 signaling in human dermal fibroblasts (26).

### **Adhesion is altered and morphology is modified in low GAGs HUVEC model**

Concerning cell adhesion, our results showed that low GAGs HUVECs had less capacity to adhere to fibronectin-coated surface. This relies on the role played by HSPGs on cell adhesion and motility associated with their link between the extracellular matrix (ECM) components via heparin-binding domain (fibronectin, vitronectin, collagen) and the cytoskeleton (27). Indeed, the presence of GAGs attached to the ectodomain of SDCs allows interaction with ECM components such as the HepII domain of fibronectin resulting in cell adhesion. If this interaction is disrupted by the absence of GAGs or the cleavage of the SDC ectodomain, the adhesion is stopped and migration is promoted. Other studies showed that fibroblasts were unable to form focal adhesion on fibronectin lacking its heparin-binding domain (HepII) (28), suggesting that GAGs-matrix components interactions are required for cell adhesion.

Taken together, our results suggest that low GAGs HUVECs lose their capacity to bind to the fibronectin-coated surface because of absence of connection between GAG and HepII domain of fibronectin, resulting in facilitated cell migration. Interestingly, our results showed that this increase

of low GAGs HUVECs migration was lost when the VEGFR1 and VEGFR2 were blocked using the specific antibodies. This result suggests that the reduction of GAG results in increased migration facilitated by the absence of capacity to adhere to the fibronectin surface and this migration is almost partly mediated by VEGF and VEGFR.

Further, we studied whether the loss of GAGs may affect the morphology and cytoskeleton organization in low GAGs HUVECs. For this, we compared the cell distribution of filamentous actin (F-actin) of low GAGs and control HUVECs and we noticed the morphological differences and the modification of F-actin cytoskeleton arrangement. Indeed, low GAGs HUVECs showed circular shape compared to control cells that were more spread. Our results showed that low GAGs HUVECs presented a peripheral submembranous F-actin localization indicating cortical meshwork, compared to control cells that presented F-actin scattered throughout the cytoplasm and more prominent stress fibers. Several works have previously showed the similar effect of GAGs lacking on other cell lines shape. Effectively, it was demonstrated that GAGs deficient CHO cells, showed circular shape and cortical meshwork and were unable to attach to fibronectin and to form F-actin containing stress fibers. After CHO transfection with SDC-4, they were more spread and showed fibroblastic shape with more prominent F-actin microfilaments (29). All these findings highlight the role of HSPGs in cell adhesion and motility, through their described implication in matrix-cell-cytoskeleton interactions.

### **Vascular network formation is altered in both low GAGs -HUVECs and -ring aorta models.**

The next step of our work was to investigate the role of GAGs in angiogenesis. Interestingly, our results showed that there was a strong inhibition of vascular network formation *in vitro* in the low GAGs HUVECs. Moreover, a total abolition of vascular network formation was observed in low GAG rat aortic ring model *ex vivo*. In the low GAGs HUVEC model, the GAG formation/elongation on the core protein is prevented by  $\beta$ -DX for 80% of cell population. Knowing that the membrane HS play a significant role as co-receptors that bind and present proangiogenic factors (CXCL12, VEGF) to their specific receptors (30, 31), this could explain the substantial reduction of vascular network formation in low GAGs model. Furthermore, as mentioned above, our model showed a significant reduction of SDC-1 and SDC-4 protein expression. This result is in accordance with other studies that highlight the role of SDCs in angiogenesis. Indeed, it was shown that mice with deletion of *SDC-2* present impaired angiogenesis and VEGF-A signaling. This impairment was explained by the loss of 6-O-sulphations carried by the SDC-2 ectodomain, which were necessary for the pro-angiogenic function of VEGF (32). In addition, we found a significant decrease of MMP-2 activity in

low GAGs HUVECs. This metalloproteinase is considered as an important regulator of angiogenesis through its role in matrix degradation, chemokine and growth factors activation and cell migration. Effectively, it was shown that MMP-2 deficient mice show reduced retinal angiogenesis (33). We have previously evidenced that the inhibition of MMP-2 by anti-MMP-2 blocking antibody results in significant reduction of vascular network formation by HUVECs (12). In the meantime, we investigated the ability of low GAGs HUVECs to establish cell-cell junctions, and this, by the immuno-labeling of VE-cadherin, which is the major endothelial adhesion molecule and plays an important role in the maintenance of vascular integrity and permeability. We did not notice any difference in VE-cadherin expression level between the low GAGs HUVECs and the control cells.

Taken together, we demonstrated that our low GAGs HUVECs model is characterized by decreased MMP-2 activity and SDC-1/SDC-4 expression that could contribute to the important decrease of vascular network formation observed in this model. In parallel, we showed that the loss of GAGs expression induced cell migration but decreased cell adhesion. This result suggests that GAGs play a key role in migration/adhesion balance that is crucial in angiogenesis process.

#### **CXCL12-induced angiogenesis is altered in low GAGs HUVECs.**

To study the role of GAGs in CXCL12 induced-angiogenesis, we firstly checked the CXCL12 binding capacity to the low GAGs HUVECs membrane. Surprisingly, we have demonstrated an increase of CXCL12 binding to low GAGs HUVECs as compared to control cells, suggesting that GAGs could reduce this chemokine binding to the cell membrane. The used of  $\beta$ -DX for the generation of low GAGs model leads to inhibition of GAGs elongation presented on the membrane level and in the ECM. Therefore, we hypothesized that the ECM HSPG bind to CXCL12, sequester them and reduce its accessibility to the cell membrane. Nevertheless, the inhibition of ECM GAGs elongation by  $\beta$ -DX presence could facilitate the chemokine direct binding to its specific receptors, such as CXCR4 and CXCR7 on HUVECs cell membrane.

Then, we investigated the role of GAGs in CXCL12-induced migration and vascular network formation. Interestingly, and despite the strong binding of CXCL12 on low GAGs HUVECs membrane, we did not show any pro-migratory and pro-angiogenic effect of this chemokine in our model. This result emphasizes the role of HS in chemokines functions. Indeed, we have previously evidenced the important role of GAGs in CXCL12 induced-invasion of Hela cells (34). In addition, it was shown that CXCL12 binds to GAGs (35) allowing the dimerization of the chemokine (36, 37) and



its protection from proteolysis by CD26/Dipeptidyl Peptidase IV (38). These literature findings allow us to suggest that despite increased CXCL12 binding to low GAGs HUVECs, the GAGs remain required for its pro-migratory effect. This important role of GAGs for CXCL12 function may also explain the abolition of CXCL12-induced vascular network formation noticed *in vitro* and *ex vivo* in our low GAGs HUVECs. Indeed, in a mouse model of acute ischemia, it was previously observed that the mutation of CXCL12 at the GAGs interaction site induced an impaired capacity to promote revascularization by the recruitment of endothelial progenitors, despite the high expression of CXCL12 isoforms (10).

## **Conclusion**

The aim of this study was to investigate the impact of GAG reduction on cellular processes involved in angiogenesis. The development of this low GAGs HUVECs model provided us several informations. The reduction of GAGs by inhibiting their elongation modulated different cellular events involved in the redaction of vascular network formation. Our results showed the alteration of SDC-1 and SDC-4 gene and protein expression, suggesting the modification of their known functions involved in the angiogenesis process. Vascular tube formation relies on fine regulation of cell migration and adhesion. Our low GAGs HUVECs model resulted in a strong increase of migration and a decrease of cell adhesion disrupting the balance between these two cellular responses. In addition, reduced MMP-2 activity was also involved in the inhibition of vascular network formation, given its widely described role in angiogenesis. Finally, the addition of a potent pro-angiogenic factor such as CXCL12 failed to restore the ability of low GAG HUVECs to form vascular networks *in vitro* and *ex vivo*. These results suggest that endothelial glycocalyx is crucial to induce the vascular network formation and their restoration during ischemia is an interesting therapeutic approach to be combined with the use of pro-angiogenic factors to stimulate angiogenesis and restore blood flow.

## **Materials and methods**

### **Cell culture**

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

### **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 during 72 h with or without at β-DX 2 mM. MTT solution at 1 mg/mL was added to the cell culture medium for 2 h. Then, DMSO was added and the metabolic activity was correlated by the absorbance at 570 nm with a spectrophotometer (Bio-rad® Microplate reader, Model 680).

### **Animal model**

*Ex vivo* experiments were realized in accordance with the European Communities Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) for animal care. Experiments were performed in Université Sorbonne Paris Nord (USPN), Bobigny, France (Agreement number A 9300801). Euthanized animals were obtained from the laboratory of Pr Carole PLANES (USPN, France), whose protocols were approved by the institutional reviewing with animal experimentation and accorded with animal welfare guidelines (Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, Paris, France) (CEEA – 005; Comité d'éthique en expérimentation animale Charles Darwin; C2EA-06, authorization C9300801, authorization APAFIS #8150, approved on august 2017, the 8th). Sprague Dawley rats from Janvier were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (60 mg/Kg) and euthanized by abdominal artery section. 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 elongation inhibition

GAGs elongation on HUVECs was inhibited using 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D Xylopyranoside ( $\beta$ -DX) at 2 mM for 72h (Sigma, St Quentin Fallavier, France).

## Flow cytometry

Proteins or heparan sulfates expressions were analyzed using flow cytometry assay. All primary antibodies, isotypes and secondary antibodies used are described in the table below. HUVECs were detached using PBS-EDTA (10 mM). Specific primary antibodies or their respective isotypes were diluted at 10  $\mu$ g/mL in PBS-BSA 0.1% or in saponine 0.1 %, BSA 0.2% for cell permeabilization and incubated with HUVECs for 1h at 4°C. Then, HUVECs were washed two times with PBS-BSA, 0.1% BSA or with saponine 0.1 %, BSA 0.2% and incubated with fluorescent secondary antibodies for 30 min at 4°C. For CXCR4 and CXCR7 cell surface expression, primary conjugated antibodies or their specific isotypes were used. For CXCL12 binding, cells were incubated for 1h at 4°C with biotinylated CXCL12. After 2 washes with PBS-BSA 0.1%, cells were incubated for 30 min at 4°C with streptavidin-Alexa Fluor 488 complex (Molecular probe Inc., Eugene, OR). Finally, HUVECs were fixed using paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at 1% for 20 min at 4°C. After two washes with PBS, cells were analyzed using a FACScan (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France).

Primary antibody	Clone	Isotype	Secondary antibody
Mouse anti-HS (370255, Ams Biotechnology)	10E4	Mouse IgM (550340, BD biosciences)	FITC-labeled goat- anti-mouse Ig antibody (BD Pharmingen)
Goat anti-SDC-1 (AF2780, R&D systems)	Polyclonal	Goat IgG (AB-108-C, R&D)	Alexa488-labeled donkey-anti-goat IgG antibody (11055, Invitrogen, Fisher Scientific)
Goat anti-SDC-4 (AF2918, R&D)	Polyclonal	Goat IgG (AB-108-C, R&D)	Alexa488-labeled donkey-anti-goat

systems)			IgG antibody (A-11055, Invitrogen, Fisher Scientific)
Mouse anti-CXCR4-BV480 (746621, BD biosciences)	12G5	Mouse IgG2a, BV480 conjugated (G155-178, BD biosciences)	/
Mouse anti-CXCR7-PE (FAB4227P, R&D systems)	11G8	mouse IgG1 PE conjugated (IC002P, R&D systems)	/
Rabbit anti-VE-Cadherin (#2500, cell signaling technology)	D87F2	Rabbit IgG (#3900, cell signaling technology)	FITC-labeled mouse anti-rabbit IgG antibody (31584, Invitrogen, Fisher Scientific)

### SDC shedding analysis

10<sup>5</sup> cells were seeded on a 6-well plate and treated or not with  $\beta$ -DX at 2 mM for 72h in serum-free medium. Conditioned media were collected and total proteins quantified using the Bradford assay (Invitrogen, Fisher Scientific, Illkirch, France). The media were applied to a cationic nylon membrane (Amersham Hybond-N+.GE Healthcare, Biosciences, Orsay, France) under vacuum in immunoblot apparatus (Slot blot, Amersham Biosciences, Orsay, France). The membrane was incubated with PBS-Tris 10 mM pH=7.4, fixed with Tris 250 mM, glycine 96 mM, ethanol 20% for 1h at room temperature. The membrane was then blocked in PBS supplemented with 3% BSA, 3% non-fat dry milk, and 0.5% Tween 20 for 2h at room temperature. SDCs were detected by incubating membranes overnight at 4°C with the following primary antibodies at 0.8  $\mu$ g/mL: anti SDC-1 (mAb DL101, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), or anti SDC-4 (mAb 5G9, Santa Cruz Biotechnology), or their specific isotypes IgG1 or IgG2a respectively (R&D systems). Then, membrane was washed three times with PBS- BSA 0.2%. The revelation was performed using secondary antibody, HRP-conjugated mouse IgG (P044701, DAKO, Trappes, France) for 1h at room temperature. Dot blots were revealed by chemiluminescence after adding Enhanced

chemiluminescence reagent (ECL Western Blotting Substrate, 32106, Pierce<sup>®</sup>, Fisher Scientific) and using Chemidoc apparatus and the Image Lab 4.2 software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

### **Migration Assay**

In order to study the role of GAGs in cell migration, HUVECs were firstly treated or not with  $\beta$ -DX (2 mM) for 72h. Then, 40.000 HUVECs were treated or not with anti-VEGF-R1 (Flt-1) and anti-VEGF-R2 (KDR) primary antibodies (R&D Systems, Bio-Techne) at 5  $\mu$ g/mL for 2h. Cells were deposited inside a Boyden insert chamber (0.8  $\mu$ m) precoated with fibronectin at 100  $\mu$ g/mL (354008, Corning, Amsterdam, Netherlands). Inserts were deposited on 24 well plates with or without CXCL12 (6 nM) in the lower chamber for 24h. Cells were fixed with ethanol for 15 min and colored using cristal violet. Finally, migrated cells were quantified under phase contrast microscope (Zeiss Axiophot) coupled to a camera (Nikon<sup>®</sup> Coolpix 8400).

### **Cell spreading**

8000 HUVECs treated or not with  $\beta$ -DX (2 mM) during 72h were seeded on an 8-well Labtek coated with fibronectin at 100  $\mu$ g/mL (354008, Corning, Amsterdam, Netherlands) and incubated for 2h at 37°C. Then, cells were permeabilized using 0.05% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). After 3 washes with PBS, cells were fixed with paraformaldehyde (PFA, 4%) for 20 min at 4°C. Filamentous actin was observed by staining cells with Alexa Fluor 568 phalloidin (1:200, molecular probes, Invitrogen, Fisher Scientific) and nuclei were stained with DAPI. Cells were observed using fluorescence microscope (Zeiss Axiophot, France S.A) coupled to a camera (Nikon<sup>®</sup> Coolpix 8400).

### **Cell adhesion assay**

3000 HUVECs treated or not with  $\beta$ -DX (2 mM) for 72h were seeded on Labtek<sup>®</sup> (Fisher Scientific) coated with fibronectin at 100  $\mu$ g/mL (354008, Corning) then incubated at 37°C, for 5, 10 or 15 min. Cell culture media were removed and the cells were washed twice with PBS. Nuclei were stained with DAPI (dilution 1/1000, Invitrogen, Fisher Scientific). A fluorescence microscope and Archimed<sup>®</sup> software were used to count adhered cells.

## **Western Blot**

HUVECs were treated or not with  $\beta$ -DX (2 mM) for 72h. Thirty  $\mu$ g of total protein extracted from cell lysates with RIPA lysis buffer, (89900, Thermo Scientific,) were loaded on a 10% poly-acrylamide gel then transferred to a nitrocellulose membrane (#10600001, GE Healthcare, Fisher Scientific). The membranes were saturated for 2h with TBS 0.1% - Tween 20 (TBS/T). The membrane was probed using anti-phospho or anti-ERK1/2 antibody (mouse monoclonal antibody diluted at 1/1000, Cell signaling) overnight at 4°C with gentle agitation. After that, secondary antibody (antimouse horseradish peroxidase, diluted at 1/5000, DAKO) was added for 45 min at room temperature. Proteins were detected by Enhanced chemiluminescence detection reagents (#32106, Pierce™ ECL western blotting substrate), using Chemidoc apparatus and image Lab 4.2 software (Bio-Rad).

## ***In vitro* 2D angiogenesis**

To study the implication of GAGs in vascular network formation *in vitro*, HUVECs were treated or not with  $\beta$ -DX (2mM) for 48h. Then, HUVECs were stimulated or not with CXCL12 (R&D Systems, Bio-Techne, Noyal-Chatillon sur Seiche, France) at 6 nM associated or not with  $\beta$ -DX at 2mM for 24h. Then, HUVECs were detached using PSB-EDTA (10 mM) and 7000 cells were deposited in 96 well plates coated with Matrigel (Corning, Amsterdam, Hollande) and incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 6h. After that, cells were fixed with PFA 4% at 4°C during 20 min. Vascular networks formation was analyzed using phase contrast microscope (Leica) associated with Archimed<sup>(TM)</sup> software (Microvision, Evry, France). The results represent the number of meshes, nodes and the total length of the vascular network, quantified using Histolab<sup>(TM)</sup> software (Microvision, Evry, France).

## **Analysis of MMP-2 activity in conditioned media**

After 48h of HUVECs treatment with  $\beta$ -DX (2 mM), cells were serum-deprived for 24h with or without  $\beta$ -DX (2 mM). Conditioned media were collected and stored at -20°C until analysis. MMP-2 gelatinolytic activity was determined by gel zymography on conditioned media diluted with sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 10% (w/v) glycerol) and loaded on a 9% acrylamide gel containing 2.5 mg/ml gelatin (G-1890, Sigma-Aldrich). After electrophoresis, the proteins were renatured by replacing SDS with 2.5 % Triton X-100, two times for 30 min incubation at room temperature. For detection of gelatinolytic activity, the gel was incubated for overnight at 37°C in

50 mM Tris-HCl buffer pH 7.8 containing 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Gels were colored with 0.45% Coomassie brilliant blue. Detection was visualized using the ChemiDoc MP Imaging System (BioRad).

### **Immunocytochemistry**

10<sup>4</sup> HUVECs treated or not with  $\beta$ -DX (2 mM) during 48h were seeded on Labtek® (Fisher Scientific) coated with fibronectin at 100  $\mu$ g/mL (354008, Corning) then incubated at 37°C during 24h. Cell media were removed and cells washed two times with PBS. Then, cells were permeabilized using 0.05% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and washed three times with PBS. After cell fixation with PFA at 4% during 20 min at 4°C, cells were washed three times with PBS then incubated with PBS, BSA 3% during 2h for saturation of unspecific sites. Cells were incubated with anti-VE-cadherin specific antibody (Rabbit anti-VE-Cadherin, #2500, Cell Signaling technology, Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France) or isotype (Rabbit IgG, #3900, cell signaling technology, Ozyme) during 2h at room temperature. After two washes with PBS-BSA 3%, cells were incubated with fluorescent secondary antibody (31584 FITC-labeled mouse anti-rabbit IgG antibody, Invitrogen, Fisher Scientific). Cell junctions were observed using fluorescence microscope (Zeiss Axiophot, France S.A) coupled to a camera (Nikon® Coolpix 8400).

### **Aortic rings assay**

*Ex vivo* angiogenesis was studied using aortic ring assay model. Aortas from 6 old week Sprague-Dawley rats were dissected, fragmented into 1 mm rings and deposited on 96 wells plate coated with Matrigel. Aortic rings were cultured in ECBM2 complete medium supplemented with 12% FBS, then treated or not with  $\beta$ -DX (2mM) and stimulated or not with CXCL12 at 6 nM up to 9 days. Treatments were repeated each 2 days. Finally, aortas were fixed using PFA at 4% for 30 min at 4°C and vascular network formation was analyzed following the same protocol as *in vitro* angiogenesis assay to quantify the total length and the sprout area of the vascular network.

### **qRT-PCR**

Total RNAs from HUVEC treated or not with  $\beta$ -DX (2 mM) during 72h were isolated using the RNeasy® Plus Mini kit (QIAGEN, Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions. The purity of total RNAs was analyzed by 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Glostrup, Denmark).

Reverse Transcription was performed using 500 ng of total RNA using High Capacity cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR were performed using TaqMan Gene Expression Master Mix kit (Applied Biosystems, Fisher Scientific). The mRNA levels were normalized with 18S housekeeping gene levels. The following Tap-Man specific primers were used (Applied Biosystems, Fisher Scientific):

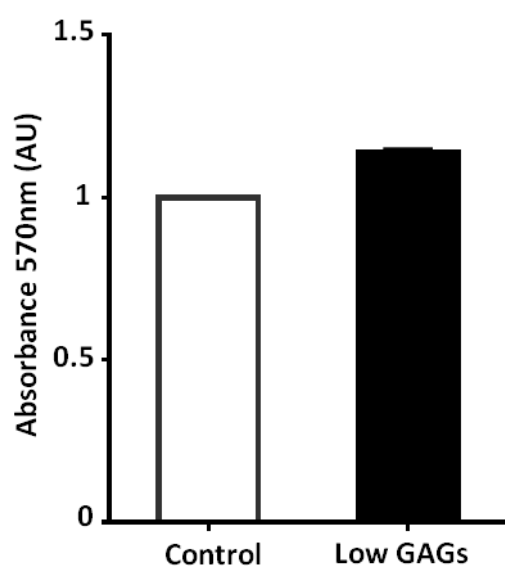
<b>Gene</b>	<b>Primer</b>
<b>18S</b>	Hs03003631_g1
<b>SDC1</b>	Hs00896423_m1
<b>SDC4</b>	Hs01120909_m1
<b>SULF2</b>	Hs01016480_m1
<b>HSPE</b>	Hs00180737_m1
<b>MMP2</b>	Hs0154872_m1
<b>TIMP2</b>	Hs01091317_m1
<b>NDST1</b>	Hs00925442_m1
<b>EXT1</b>	Hs00609162_m1
<b>EXT2</b>	Hs00181158_m1

### **Statistics and reproducibility**

T tests were performed with the StatView software (StatView 4.5 Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Statistical analysis on more than two groups were performed using Anova test on StatView software. GraphPad Prism 9.1.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used to construct figures. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. A *p*-value of <0.05 was used as the criterion of statistical significance.



### Supplemental data



**Figure S1.** Effect of  $\beta$ -DX on cell viability. The viability of HUVECs was analyzed using MTT assay after  $\beta$ -DX treatment for 72 h. The absorbance was read with a spectrophotometer (at 570 nm). Results are expressed as means  $\pm$  SEM (n=3). AU: Arbitrary Units.

**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.

**Sources of funding:** We would like to thank the Galilee Doctoral School for doctoral allocations of M. Naim, K. Bassand and N. Mouhoubi, and Sorbonne Paris Nord University for its support.

**Disclosures:** none.

## REFERENCES

1. Pankaj Kundra<sup>1</sup>, S. G. (2019) 'Endothelial glycocalyx: Role in body fluid homeostasis and fluid management', REVIEW ARTICLE, 63, pp. 6–14.
2. Reitsma, S., Slaaf, D. W., Vink, H., Van Zandvoort, M. A. M. J. and Oude Egbrink, M. G. A. (2007) 'The endothelial glycocalyx: Composition, functions, and visualization', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 454(3), pp. 345–359. doi: 10.1007/s00424-007-0212-8.
3. Kusche-Gullberg, M., Kjellén, L., Wilén, M., Feta, A., Presto, J., Busse, M. and Grønning, M. (2007) 'Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to Heparan Sulfate<sup>155</sup> Chain Elongation', *Journal of Biological Chemistry*, 282(45), pp. 32802–32810. doi: 10.1074/jbc.m703560200.
4. Gong, F., Jemth, P., Escobar Galvis, M. L., Vlodaysky, I., Horner, A., Lindahl, U. and Li, J. P. (2003) 'Processing of macromolecular heparin by heparanase', *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), pp. 35152–35158. doi: 10.1074/jbc.M300925200.
5. Ziganshina MM, Yarotskaya EL, Bovin NV, Pavlovich SV, Sukhikh GT. Can Endothelial Glycocalyx Be a Major Morphological Substrate in Pre-Eclampsia? *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 26;21(9):3048. doi: 10.3390/ijms21093048. PMID: 32357469; PMCID: PMC7246531.
6. Bertrand, J. and Bollmann, M. (2019) 'Soluble syndecans: biomarkers for diseases and therapeutic options', *British Journal of Pharmacology*, 176(1), pp. 67–81. doi: 10.1111/bph.14397.
7. Mitra R, O'Neil GL, Harding IC, Cheng MJ, Mensah SA, Ebong EE. Glycocalyx in Atherosclerosis-Relevant Endothelium Function and as a Therapeutic Target. *Curr Atheroscler Rep*. 2017 Nov 10;19(12):63. doi: 10.1007/s11883-017-0691-9. PMID: 29127504; PMCID: PMC5681608.

8. Chevalier F, Arnaud D, Henault E, Guillevic O, Siñeriz F, Ponsen AC, Papy-Garcia D, Barritault D, Letourneur D, Uzan G, Meddahi-Pellé A, Hlawaty H, Albanese P. A fine structural modification of glycosaminoglycans is correlated with the progression of muscle regeneration after ischaemia: towards a matrix-based therapy? *Eur Cell Mater*. 2015 Sep 4;30:51-68. doi: 10.22203/ecm.v030a05.
9. Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, Rehm M, Briegel J, Welsch U, Conzen P, Becker BF. TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol*. 2009 Jan;104(1):78-89. doi: 10.1007/s00395-008-0749-5. Epub 2008 Oct 3. PMID: 18836678.
10. Rueda P, Richart A, Récalde A, Gasse P, Vilar J, Guérin C, Lortat-Jacob H, Vieira P, Baleux F, Chretien F, Arenzana-Seisdedos F, Silvestre JS. Homeostatic and tissue reparation defaults in mice carrying selective genetic invalidation of CXCL12/proteoglycan interactions. *Circulation*. 2012 Oct 9;126(15):1882-95. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.113290. Epub 2012 Oct 3. PMID: 23035208; PMCID: PMC3928557.
11. Marinval N, Saboural P, Haddad O, Maire M, Bassand K, Geinguenaud F, Djaker N, Ben Akrouit K, Lamy de la Chapelle M, Robert R, Oudar O, Guyot E, Laguillier-Morizot C, Sutton A, Chauvierre C, Chaubet F, Charnaux N, Hlawaty H. Identification of a Pro-Angiogenic Potential and Cellular Uptake Mechanism of a LMW Highly Sulfated Fraction of Fucoïdan from *Ascophyllum nodosum*. *Mar Drugs*. 2016 Oct 17;14(10):185. doi: 10.3390/md14100185. PMID: 27763505; PMCID: PMC5082333.
12. Suffee N, Hlawaty H, Meddahi-Pelle A, Maillard L, Louedec L, Haddad O, Martin L, Laguillier C, Richard B, Oudar O, Letourneur D, Charnaux N, Sutton A. RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. *Angiogenesis*. 2012 Dec;15(4):727-44. doi: 10.1007/s10456-012-9285-x. Epub 2012 Jun 30. PMID: 22752444.

13. Robinson J, Gospodarowicz D. Effect of p-nitrophenyl-beta-D-xyloside on proteoglycan synthesis and extracellular matrix formation by bovine corneal endothelial cell cultures. *J Biol Chem*. 1984 Mar 25;259(6):3818-24. PMID: 6706981.
14. Raman K, Ninomiya M, Nguyen TKN, Tsuzuki Y, Koketsu M, Kuberan B. Novel Glycosaminoglycan Biosynthetic Inhibitors Affect Tumor-Associated Angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* (2011) 404(1):86–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.069
15. Hayes AJ, Mitchell RE, Bashford A, Reynolds S, Caterson B, Hammond CL. Expression of glycosaminoglycan epitopes during zebrafish skeletogenesis. *Dev Dyn*. 2013 Jun;242(6):778-89. doi: 10.1002/dvdy.23970. Epub 2013 Apr 29. PMID: 23576310; PMCID: PMC3698701.
16. Ramani VC, Pruett PS, Thompson CA, DeLucas LD, Sanderson RD. Heparan sulfate chains of syndecan-1 regulate ectodomain shedding. *J Biol Chem*. 2012 Mar 23;287(13):9952-9961. doi: 10.1074/jbc.M111.330803. Epub 2012 Feb 1. PMID: 22298773; PMCID: PMC3322978.
17. Yang Y, Macleod V, Miao HQ, Theus A, Zhan F, Shaughnessy JD Jr, Sawyer J, Li JP, Zcharia E, Vlodavsky I, Sanderson RD. Heparanase enhances syndecan-1 shedding: a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. *J Biol Chem*. 2007 May 4;282(18):13326-33. doi: 10.1074/jbc.M611259200. Epub 2007 Mar 8. PMID: 17347152.
18. Roucourt B, Meeussen S, Bao J, Zimmermann P, David G. Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway. *Cell Res*. 2015 Apr;25(4):412-28. doi: 10.1038/cr.2015.29. Epub 2015 Mar 3. PMID: 25732677; PMCID: PMC4387558.
19. Friand V, Haddad O, Papy-Garcia D, Hlawaty H, Vassy R, Hamma-Kourbali Y, Perret GY, Courty J, Baleux F, Oudar O, Gattegno L, Sutton A, Charnaux N. Glycosaminoglycan mimetics inhibit SDF-1/CXCL12-mediated migration and invasion of human hepatoma cells. *Glycobiology*. 2009 Dec;19(12):1511-24. doi: 10.1093/glycob/cwp130. Epub 2009 Aug 28. PMID: 19717493.

20. Longley RL, Woods A, Fleetwood A, Cowling GJ, Gallagher JT, Couchman JR. Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J Cell Sci.* 1999 Oct;112 ( Pt 20):3421-31. doi: 10.1242/jcs.112.20.3421. PMID: 10504291.
21. Zong F, Fthenou E, Mundt F, Szatmári T, Kovalszky I, Szilák L, Brodin D, Tzanakakis G, Hjerpe A, Dobra K. Specific syndecan-1 domains regulate mesenchymal tumor cell adhesion, motility and migration. *PLoS One.* 2011;6(6):e14816. doi: 10.1371/journal.pone.0014816. Epub 2011 Jun 23. PMID: 21731601; PMCID: PMC3121713.
22. Cavé MC, Maillard S, Hildenbrand K, Mamelonet C, Feige MJ, Devergne O. Glycosaminoglycans bind human IL-27 and regulate its activity. *Eur J Immunol.* 2020 Oct;50(10):1484-1499. doi: 10.1002/eji.202048558. Epub 2020 Jul 2. PMID: 32483835.
23. 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.
24. Metzemaekers M, Mortier A, Janssens R, Boff D, Vanbrabant L, Lamoen N, Van Damme J, Teixeira MM, De Meester I, Amaral FA, Proost P. Glycosaminoglycans Regulate CXCR3 Ligands at Distinct Levels: Protection against Processing by Dipeptidyl Peptidase IV/CD26 and Interference with Receptor Signaling. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 13;18(7):1513. doi: 10.3390/ijms18071513. PMID: 28703769; PMCID: PMC5536003.
25. Li X, Zheng Z, Li X, Ma X. Unfractionated heparin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through blocking p38 MAPK and NF- $\kappa$ B activation on endothelial cell. *Cytokine.* 2012 Oct;60(1):114-21. doi: 10.1016/j.cyto.2012.06.008. Epub 2012 Jul 2. PMID: 22763042.
26. Na J, Bak DH, Im SI, Choi H, Hwang JH, Kong SY, No YA, Lee Y, Kim BJ. Anti-apoptotic effects of glycosaminoglycans via inhibition of ERK/AP-1 signaling in TNF- $\alpha$ -stimulated human

- dermal fibroblasts. *Int J Mol Med*. 2018 May;41(5):3090-3098. doi: 10.3892/ijmm.2018.3483. Epub 2018 Feb 12. PMID: 29436595.
27. LeBaron RG, Esko JD, Woods A, Johansson S, Höök M. Adhesion of glycosaminoglycan-deficient chinese hamster ovary cell mutants to fibronectin substrata. *J Cell Biol*. 1988 Mar;106(3):945-52. doi: 10.1083/jcb.106.3.945. PMID: 3346331; PMCID: PMC2115113.
28. Woods A, McCarthy JB, Furcht LT, Couchman JR. A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation. *Mol Biol Cell*. 1993 Jun;4(6):605-13. doi: 10.1091/mbc.4.6.605. PMID: 8374170; PMCID: PMC300967.
29. Longley RL, Woods A, Fleetwood A, Cowling GJ, Gallagher JT, Couchman JR. Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J Cell Sci*. 1999 Oct;112 (Pt 20):3421-31. doi: 10.1242/jcs.112.20.3421. PMID: 10504291.
30. Migliorini E, Thakar D, Kühnle J, Sadir R, Dyer DP, Li Y, Sun C, Volkman BF, Handel TM, Coche-Guerente L, Fernig DG, Lortat-Jacob H, Richter RP. Cytokines and growth factors cross-link heparan sulfate. *Open Biol*. 2015 Aug;5(8):150046. doi: 10.1098/rsob.150046. PMID: 26269427; PMCID: PMC4554917.
31. Beckouche N, Bignon M, Lelarge V, Mathivet T, Pichol-Thievend C, Berndt S, Hardouin J, Garand M, Ardidie-Robouant C, Barret A, Melino G, Lortat-Jacob H, Muller L, Monnot C, Germain S. The interaction of heparan sulfate proteoglycans with endothelial transglutaminase-2 limits VEGF165-induced angiogenesis. *Sci Signal*. 2015 Jul 14;8(385):ra70. doi: 10.1126/scisignal.aaa0963. PMID: 26175493.
32. Corti F, Wang Y, Rhodes JM, Atri D, Archer-Hartmann S, Zhang J, Zhuang ZW, Chen D, Wang T, Wang Z, Azadi P, Simons M. N-terminal syndecan-2 domain selectively enhances 6-O heparan sulfate chains sulfation and promotes VEGFA165-dependent neovascularization.

Nat Commun. 2019 Apr 5;10(1):1562. doi: 10.1038/s41467-019-09605-z. Erratum in: Nat Commun. 2019 May 7;10(1):2124. PMID: 30952866; PMCID: PMC6450910.

33. Ohno-Matsui K, Uetama T, Yoshida T, Hayano M, Itoh T, Morita I, Mochizuki M. Reduced retinal angiogenesis in MMP-2-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Dec;44(12):5370-5. doi: 10.1167/iovs.03-0249. PMID: 14638740.
34. Brule S, Friand V, Sutton A, Baleux F, Gattegno L, Charnaux N. Glycosaminoglycans and syndecan-4 are involved in SDF-1/CXCL12-mediated invasion of human epitheloid carcinoma HeLa cells. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Dec;1790(12):1643-50. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.08.001. Epub 2009 Aug 17. PMID: 19695308.
35. Murphy JW, Cho Y, Sachpatzidis A, Fan C, Hodsdon ME, Lolis E. Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 alpha) binding to heparin. *J Biol Chem.* 2007 Mar 30;282(13):10018-10027. doi: 10.1074/jbc.M608796200. Epub 2007 Jan 29. PMID: 17264079; PMCID: PMC3684283.
36. Veldkamp CT, Peterson FC, Pelzek AJ, Volkman BF. The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin. *Protein Sci.* 2005 Apr;14(4):1071-81. doi: 10.1110/ps.041219505. Epub 2005 Mar 1. PMID: 15741341; PMCID: PMC2253449.
37. Fermas S, Gonnet F, Sutton A, Charnaux N, Mulloy B, Du Y, Baleux F, Daniel R. Sulfated oligosaccharides (heparin and fucoidan) binding and dimerization of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL 12) are coupled as evidenced by affinity CE-MS analysis. *Glycobiology.* 2008 Dec;18(12):1054-64. doi: 10.1093/glycob/cwn088. Epub 2008 Sep 16. PMID: 18796646.
38. Sadir R, Imberty A, Baleux F, Lortat-Jacob H. Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem.* 2004 Oct 15;279(42):43854-60. doi: 10.1074/jbc.M405392200. Epub 2004 Aug 2. PMID: 15292258.



# Discussion



L'angiogenèse est un processus intervenant dans différents contextes physiologiques et pathologiques. Lors d'une ischémie, l'hypoxie conduit à un remodelage du microenvironnement et une régulation de l'expression de différents gènes aboutissant à la stimulation de l'angiogenèse. Cette réponse permet de rétablir le flux sanguin et d'assurer un apport en nutriments et en oxygène. Lorsque l'ischémie est d'une étiologie thrombotique, elle apparaît généralement dans des artères athéromateuses avec une collatéralité souvent existante. En revanche, l'ischémie à étiologie embolique est plus aiguë, le caillot se déplace et stagne généralement au niveau des carrefours artériels (bifurcations, vaisseaux iliaques) sans qu'aucune suppléance vasculaire n'ait eu le temps de se mettre en place. Plus l'ischémie est aiguë, plus la prise en charge doit être rapide. La rapidité de la réponse angiogénique compensatoire est étroitement liée à la gravité des conséquences de l'ischémie. Cependant, l'angiogenèse est perturbée chez certains patients en raison du dysfonctionnement vasculaire et endothélial engendré. Cette situation peut être aggravée par l'état concomitant du patient, comme l'hyperglycémie ou l'hypertension. De ce fait, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'angiogenèse permet l'exploitation de ce processus comme cible thérapeutique dans les MCV et suscite un intérêt considérable. Dans ce contexte, l'angiogenèse thérapeutique vise à induire, augmenter et contrôler les réponses angiogéniques pour revasculariser les tissus ischémiques. Les facteurs de croissance, les chimiokines et leurs récepteurs sont largement reconnus comme des éléments critiques responsables de la vascularisation. Les avancées de la glycobiologie ont permis de reconnaître les GAG et les PG comme éléments importants à la fonction des facteurs angiogéniques. Les chaînes HS représentent 50-90% des GAG composant le glycocalyx de l'endothélium vasculaire. Ces chaînes se lient à de multiples molécules biologiquement actives, notamment les facteurs de croissance, les chimiokines, les cytokines et les récepteurs de signalisation transmembranaires (325,326). Les HSPG de la surface cellulaire sont ainsi amenés à moduler les principaux événements cellulaires, en jouant le rôle de corécepteurs, en déclenchant l'activation des récepteurs et la transduction de signal, et en étant d'importants transducteurs de mécanosignalisation des stimuli extracellulaires (327). Les HSPG renforcent l'activité des récepteurs exprimés sur la même

cellule, mais ils participent également à la transactivation des récepteurs dans les cellules adjacentes (328). Dans la MEC, les HSPG peuvent également fonctionner comme des unités de stockage et contribuer à la formation de gradients extracellulaires de diverses molécules solubles, modulant ainsi leur disponibilité.

La modification génétique des enzymes de biosynthèse des chaînes HS ou des protéines centrales des HSPG module l'angiogenèse dans différents modèles animaux. Dans presque tous les cas, une réduction de l'angiogenèse est observée (329).

Cependant, l'altération du glycocalyx au cours de l'ischémie a été démontrée dans différentes études. Il a été démontré que le LDL oxydé induisait la dégradation du glycocalyx, suggérant une dégradation précoce du glycocalyx endothélial coïncidant avec les premières étapes de l'athérosclérose (330). Une autre étude a démontré que les lipoprotéines athérogènes induisaient l'expression de l'héparanase par les CE aortiques, réduisant les HSPG ce qui favorise à son tour la rétention des lipoprotéines athérogènes (332). L'injection de oxLDL dans la veinule crémaster de souris a induit une augmentation de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium. L'injection de HS ou d'héparine dans la veinule a atténué l'adhérence des leucocytes induite par le oxLDL, suggérant un rôle important du glycocalyx dans la protection contre l'inflammation (26). Le SDC-1 représente le HSPG majoritaire du glycocalyx endothélial, des souris SDC-1<sup>-/-</sup> ont montré une hyperplasie intimale plus importante lors d'une lésion de l'artère carotide accompagnée d'une augmentation de la prolifération des CML comparé aux souris contrôles (331). Des études cliniques ont également décrit un dysfonctionnement du glycocalyx lié aux MCV. Il a été démontré qu'une diminution des chaînes HS de l'aorte humaine, corrélait avec l'âge et le taux de cholestérol dans l'aorte (332).

Nous avons démontré préalablement, une modification du paysage glycanique dans un modèle d'ischémie de la patte chez le rat. Des analyses histologiques et biochimiques après induction d'une ischémie du muscle *Extensor Digitorum Longus* (EDL) par ligature du tronc neurovasculaire accompagnant le tendon de l'EDL, ont révélé une augmentation de l'expression des gènes des enzymes de biosynthèse et de modification des GAG, accompagnée d'un changement structurel, notamment de la taille et de la sulfatation des GAG. Cette étude met en évidence un remodelage intense des GAG en fonction du temps se

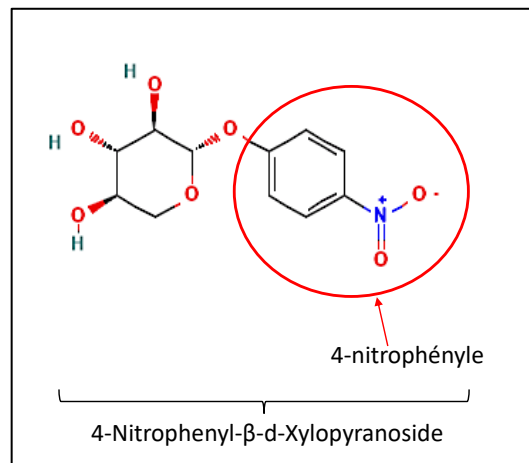
produisant après une ischémie musculaire et suggère un rôle important de ces GAG dans la régénération musculaire. Des modifications telles que l'hyper-sulfatation et la longueur des chaînes, ont été caractérisées et impliquées dans la modulation des activités des facteurs de croissance. Cette étude a également validé l'intérêt d'utiliser des mimétiques des GAGs synthétiques tels que l'OTR4131 pour restaurer un microenvironnement approprié qui potentialise la néovascularisation et accélère la régénération du muscle ischémique (324). Récemment, une équipe de recherche a démontré le rôle clé des GAG dans la régénération du muscle squelettique après une blessure. Une injection de mimétiques de GAG, 3 jours après la blessure, a augmenté la capillarisation des nouvelles myofibres et a également augmenté le nombre de myonucléus dans ces myofibres. Ces résultats ont prouvé qu'une seule injection de mimétiques de GAG a induit la myogenèse et l'angiogenèse dans le muscle squelettique en régénération (333).

Au niveau expérimental, plusieurs conditions sont connues pour être liées à la dégradation du glycoalyx. Outre la dégradation enzymatique par l'héparitinase qui clive les chaînes HS, la neuraminidase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons osidiques, la dégradation des GAG peut être induite par le TNF- $\alpha$ , le oxLDL, les espèces réactives de l'oxygène et l'héparanase produite par les plaquettes ou les cellules inflammatoires.

### **Le modèle Low GAG**

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'importance des GAG dans les différents effets cellulaires impliqués dans l'angiogenèse. Pour cela, un modèle de cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humain (HUVEC) appauvries en GAG a été mis au point. La réduction des GAG dans ce modèle a été induite par l'utilisation du 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Xylopyranoside ( $\beta$ -DX). Ces molécules comprennent un résidu xylose lié à un groupe aglycone. Les xylosides synthétiques entrent en concurrence avec la protéine centrale des PG pour les enzymes de biosynthèse, empêchant l'allongement des chaînes de GAG liées aux PG. Les xylosides servent également de précurseurs pour la synthèse de GAG non liés à la protéine centrale. Les chaînes de GAG amorcées par les xylosides entrent en concurrence avec les GAG liés aux PG endogènes pour la liaison de différents ligands. Ces xylosides présentent alors une double fonction : ils servent d'inhibiteur de l'élongation des GAG

endogènes en empêchant par compétition, leur liaison à la protéine centrale et ils servent aussi de précurseurs pour la synthèse de GAG libres. Cependant, la modification de la structure de ces xylosides par le remplacement de leur hydrogène en position C4 par un autre groupement, permet d'inhiber la fonction de précurseurs de l'élongation de GAG libres. En effet, des xylosides dont le groupe hydroxyl en position C4 ont perdu leur capacité à amorcer l'élongation des chaînes GAG car ils ne possèdent plus de groupe hydroxyle accepteur pour la fixation et l'allongement ultérieurs des sucres (334). Le  $\beta$ -DX utilisé pour ce travail de thèse est un xyloside dont le groupe hydroxyle en position C4 a été remplacé par un groupe 4-nitrophényle.



**Figure 25. Structure du 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Xylopyranoside**

Nos résultats ont montré par immunomarquage et cytométrie en flux une diminution de 80% des chaînes HS à la surface des HUVEC mises en culture en présence de  $\beta$ -DX. Ce résultat est en accord avec les précédentes études montrant l'effet des xylosides. En effet, une étude a démontré que l'exposition de CE cornéennes bovines au xyloside a totalement inhibé la synthèse de PG liés à des CS ou des DS et a diminué de 86% la synthèse de HSPG (335). Deux fluoro-xylosides différents ont montré une capacité d'inhiber la synthèse des HS dans des CE microvasculaires de poumon bovin (336).

## L'expression et la localisation de SDC-1 et SDC-4 dépendent des GAG

Dans le modèle low GAG, nous avons observé que la diminution du niveau des chaînes HS induit une diminution de l'expression des gènes *SDC-1* et *SDC-4*. De manière intéressante, nous avons relevé une diminution de l'expression protéique du SDC-1 totale et du SDC-1 et SDC-4 membranaires dans les cellules HUVEC « low GAG » en comparaison aux cellules contrôle. Ce résultat a été associé à une augmentation du shedding de SDC-1. Ces résultats sont en accord avec la littérature, des études antérieures ont montré que la diminution des chaînes HS dans les cellules MDA-MB-231, PANC-1 et HeLa, a entraîné une augmentation du shedding de SDC-1 et une diminution de son expression génique (337) . En outre, des souris transgéniques exprimant une héparanase élevée ont montré une augmentation du clivage de l'ectodomaine du SDC-1, ce qui montre que la corrélation entre le niveau des chaînes HS et le shedding de SDC-1 se produit également *in vivo* (338) . En accord avec la dernière étude citée, nos résultats ont montré une augmentation de l'expression génique de l'héparanase qui pourrait être corrélée avec une augmentation du clivage de l'ectodomaine du SDC-1. Les chaînes HS pourraient constituer une barrière physique pour les SDC les protégeant contre le clivage par les sheddases. Ces résultats suggèrent que la diminution des GAG affecte l'expression de SDC-1 et SDC-4, entraînant une dérégulation des fonctions physiologiques des SDC corrélée à de nombreuses pathologies caractérisées par la dégradation du glycocalyx. Cependant, aucun effet sur le shedding du SDC-4 n'a été observé dans les HUVEC « low GAG ». Il est intéressant de noter que nous avons rapporté une expression membranaire réduite du SDC-4 dans les HUVEC contrôle, ce qui peut expliquer l'absence d'effet sur son shedding. Notre modèle cellulaire présente plutôt une localisation intracellulaire du SDC-4 et une forte localisation membranaire du SDC-1, étant connu pour être le PG majoritaire à la surface des CE et dans le glycocalyx endothélial.

### **Le modèle « low GAG » présente une forte capacité de migration**

Concernant la migration cellulaire, nous avons montré que les HUVEC « low GAG » avaient une plus grande capacité à migrer, comparé aux cellules contrôles. Ce résultat est en accord avec les recherches précédentes. Notre laboratoire a démontré que l'utilisation de mimétiques de GAG entraîne une diminution de la migration dans la lignée cellulaire d'hépatome humain (Huh7)(339). La surexpression du SDC-4 dans les cellules CHO a induit une augmentation de la formation d'adhérences focales associée à une diminution de la migration cellulaire (340). De plus, Fang Zong et coll., (341) ont montré que la surexpression de SDC-1 dans des cellules tumorales mésenchymateuses, conduit à une augmentation de l'adhérence cellulaire et à une inhibition de la migration. Cette équipe a démontré que l'adhérence cellulaire dépend de l'ectodomaine du SDC-1 portant les GAG, l'expression de la forme tronquée de l'ectodomaine N-terminal possédant les GAG, induit une diminution de l'adhérence. Il a été démontré que le clivage de l'ectodomaine du SDC-4 inhibe l'adhérence des CE et favorise leur migration (342). La présence de GAG attachés à l'ectodomaine des SDC permet l'interaction avec les composants de la MEC tel que le domaine HepII de la fibronectine aboutissant à l'adhérence cellulaire. Si cette interaction est rompue par l'absence de GAG ou le clivage de l'ectodomaine des SDC, l'adhérence est rompue et la migration est favorisée. La migration cellulaire est plutôt contrôlée par les domaines transmembranaires et cytoplasmiques. L'absence de la région V du domaine cytoplasmique du SDC-4 inhibe la migration des CE (343). Il a été démontré que l'interaction du domaine intracellulaire du SDC-4 avec une protéine à domaine PDZ qui est la synténine, aboutit à l'activation de la GTPase Rac1 entraînant la polarisation et la migration cellulaire (343).

De façon intéressante, l'expression du SDC-1 tronqué du domaine responsable de la translocation du SDC-1 dans le noyau a affecté l'expression de gènes codant pour des molécules de la MEC, des facteurs de croissance et des récepteurs de facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines, des molécules d'adhérence et des molécules associées à la migration cellulaire (341). Ces résultats nous informent qu'en plus du contrôle de l'adhérence par leur ectodomaine et la migration par leur domaine intracellulaire, les SDC peuvent être transloqués dans le noyau et influencer l'expression des gènes impliqués dans les processus d'adhérence et de migration.

Tenant compte de ces résultats montrant une augmentation de la migration des HUVEC lorsque la quantité de GAG est diminuée, nous avons voulu savoir si cette augmentation de la migration n'était pas due à la fonction des récepteurs spécifiques des facteurs de croissance capables de stimuler le processus de migration. Nous avons donc choisi de bloquer les récepteurs 1 et 2 du VEGF (Flt1 et KDR) dans les HUVEC « low GAG » et les cellules contrôles. Le test de migration nous a permis d'affirmer notre hypothèse selon laquelle la migration des HUVEC « low GAG » était stimulée par l'interaction entre le facteur de croissance VEGF et ses récepteurs spécifiques. En effet, lorsque nous avons bloqué ces récepteurs en utilisant des anticorps bloquant anti-Flt1 et anti-KDR, nous avons annulé l'augmentation de la migration observée dans le modèle « low GAG ». Ce résultat nous laisse croire que le processus de migration est finement régulé par la présence des GAG et des SDC grâce à leur implication dans l'adhérence, l'organisation du cytosquelette et l'interaction avec la MEC. La perte de cette fonction par une réduction des GAG et des SDC aboutit à une augmentation de la capacité migratoire des HUVEC, notamment grâce à la fonction des facteurs de croissance et leurs récepteurs spécifiques telles que le VEGF et les VEGFR.

### **Le modèle « low GAG » montre une capacité d'adhérence réduite**

Dans ce travail, nous avons évalué l'impact de la réduction des GAG sur les différentes étapes de l'angiogenèse médiée par les HUVEC, comprenant l'adhérence, l'étalement des CE, la migration et la formation du réseau vasculaire. Tout d'abord, nos résultats ont montré que les HUVEC « low GAG » avaient une moindre capacité à adhérer à une surface recouverte de fibronectine en comparaison aux cellules contrôles. Les HSPG sont un élément important de l'équilibre entre l'adhérence et la motilité cellulaires. Ils détiennent un rôle déterminant dans le lien entre les composants de la MEC qui présentent un domaine de liaison à l'héparine (fibronectine, vitronectine, collagène) et le cytosquelette (344). Les SDC et notamment le SDC-4 s'associent au cytosquelette d'actine. Il a été démontré que le domaine HepII de la fibronectine interagit avec les HS du SDC-4 pour activer la PKC $\alpha$  et la famille Rho des protéines G en aval (346). En association avec les intégrines, le SDC-4 favorise ensuite l'assemblage des complexes d'adhérences focales. Dans



des études d'adhérence, il a été démontré que les fibroblastes étaient incapables de former une adhésion focale sur une fibronectine dépourvue de son domaine de liaison à l'héparine (345), ce qui suggère que les interactions GAG-composants de la MEC sont nécessaires à l'adhérence cellulaire. Compte tenu de ces données, on pourrait penser que les SDC contrôlent l'adhérence via le contrôle du cytosquelette et de l'expression de ses protéines. Mais une récente étude, a démontré que les HSPG jouent un rôle régulateur dans l'activation des canaux calciques par lesquels ils modulent l'organisation du cytosquelette et l'adhérence cellulaire. En effet, une analyse comparative entre des fibroblastes contrôles et des fibroblastes dépourvus de SDC-4 (SDC-4 KO) a montré que malgré les différences de cytosquelette d'actine entre les deux types de fibroblastes, il n'y avait pas de différences essentielles dans l'analyse transcriptomique de l'expression des gènes codant pour les protéines du cytosquelette. Cependant, des altérations de certaines voies régulées par le calcium (calcineurine-NFAT-RCAN-2) ont été observées. Cette observation a été confirmée par la mesure du statut calcique dans les fibroblastes contrôles et SDC-4 KO. Cette mesure a révélé des niveaux de calcium cytosolique constamment élevés dans les SDC-4 KO. Pour confirmer la spécificité de cette observation, le SDC-4 a été réexprimé dans les cellules SDC-4 KO, ce qui a permis de ramener les niveaux de calcium à des valeurs normales. Ces résultats ont suggéré que le SDC-4 contrôlait un ou plusieurs canaux calciques. Des analyses plus approfondies ont permis d'identifier une association entre le canal TRPC7 (transient receptor potential canonical) et la fonction du SDC-4. Ce canal a été retrouvé au niveau des adhérences focales en complexe avec le SDC-4 et l' $\alpha$ -actinine. De plus, la déplétion de TRPC7 dans les cellules SDC-4 KO a permis de retrouver des niveaux de calcium comparables aux cellules contrôles mais également un cytosquelette et des jonctions similaires aux cellules contrôles. De façon intéressante, cette étude a démontré que le SDC-4 exerce sa fonction de modulateur de ces canaux via l'interaction de ses chaînes HS avec des ligands tels que la fibronectine, activant la PKC- $\alpha$  qui phosphoryle TRPC7 aboutissant à sa fermeture et donc au contrôle du calcium cytosolique (346) .

## **La réduction des GAG modifie la morphologie des cellules et l'organisation du cytosquelette**

Pour évaluer la morphologie et l'organisation du cytosquelette des cellules « low GAG », nous avons comparé la disposition de leur actine filamenteuse (F-actine) à celle des HUVECs témoins. Nous avons relevé des différences morphologiques et un arrangement différent du cytosquelette de F-actine. En effet, les HUVEC « low GAG » présentent une morphologie circulaire par rapport aux cellules témoins qui sont plus étalées. Les HUVEC low GAG présentent une F-actine submembranaire périphérique indiquant un maillage cortical, comparé aux cellules contrôles qui présentent une F-actine dispersée dans le cytoplasme et des microfilaments plus proéminents. Plusieurs travaux ont montré un effet similaire de l'absence de GAG sur la morphologie et le cytosquelette d'autres lignées cellulaires. En effet, il a été démontré que les cellules CHO déficientes en GAG, présentaient une forme circulaire et un maillage cortical et étaient incapables de s'attacher à la fibronectine et de former des fibres de stress contenant de la F-actine, mais lorsqu'elles ont été transfectées avec SDC-4, les cellules étaient plus étalées et présentaient une forme fibroblastique avec des microfilaments de F-actine plus proéminents (340). Conformément aux résultats précédents, une étude a démontré que le clivage du SDC-4 par ADAMTS1, induit des changements dans la forme des cellules 293T, issues du rein embryonnaire humain. La co-expression à la fois de la protéase et de son substrat le SDC-4 a entraîné un arrondissement des cellules et une nette redistribution des faisceaux d'actine vers la périphérie de la cellule. La co-expression de ADAMTS1 et du SDC-4 a également provoqué une diminution de RhoA active impliquée dans l'assemblage des complexes d'adhérence focale (345). Sachant que la RhoA est indirectement activée par l'interaction des chaînes HS du SDC-4 avec des protéines de la MEC, ceci suggère un rôle des HS du SDC-4 dans la morphologie et dans la distribution du cytosquelette dans ces cellules (342).

Dans ce sens, il a également été démontré que les fibroblastes dépourvus de SDC-4 présentent un cytosquelette d'actine altéré par rapport aux cellules contrôles. Leur cytosquelette n'organise pas l'actine en faisceaux, mais ces cellules rétablissent une organisation comparable à celle des contrôles lorsque le SDC-4 complet est réexprimé. Cela nécessite la région centrale V du domaine cytoplasmique de la protéine centrale. Une

deuxième condition clé est la présence de plusieurs chaînes HS. En effet, les SDC-4 mutants sans chaînes ou avec une seule chaîne n'ont pas réussi à restaurer le phénotype de type sauvage, alors que ceux exprimant deux ou trois chaînes étaient compétents. La taille du contact/adhérence focale et de la phosphorylation de la kinase d'adhésion focale (FAK) sont réduites lorsque la fonction du SDC-4 est compromise par un manque de chaînes multiples d'HS (346).

**La formation de réseaux vasculaire est altérée dans le modèle « low GAG », *in vitro* et *ex vivo***

L'étape suivante consistait à étudier le rôle des GAG dans la formation de réseaux vasculaires. Nos résultats ont montré de manière très intéressante qu'il y avait une forte inhibition de la formation de réseaux vasculaires *in vitro* par les HUVEC « low GAG » et une abolition totale *ex vivo* dans le modèle d'anneau aortique de rat. Dans le modèle à faibles GAGs, la liaison des GAGs aux protéines centrales est empêchée par le traitement au  $\beta$ -DX. Comme mentionné ci-dessus, notre modèle a montré une réduction de l'expression des gènes *SDC-1* et *SDC-4* ainsi que de leurs niveaux de protéines. Ceci correspond à diverses autres études qui soulignent le rôle des SDC dans l'angiogenèse. En effet, il a été montré que les souris avec une délétion de *SDC-2* présentent une altération de l'angiogenèse et de la signalisation du VEGF-A. Cette altération s'explique par la perte des 6-O-sulfations portées par l'ectodomaine du *SDC-2* qui sont nécessaires à la fonction angiogénique du VEGF (347). En parallèle, nous avons démontré que la réduction des GAG aboutissait à une diminution de l'expression génique de certaines enzymes de biosynthèse des GAG telles qu'EXT 1, EXT 2 et NDST1. Notre équipe a précédemment démontré qu'une diminution de l'expression des enzymes responsables de l'élongation des chaînes GAG, EXT1 et EXT2, et particulièrement EXT2, provoquait une diminution de la formation de réseaux vasculaires par les HUVEC, et ce, même en présence de mimétiques de GAG (348). Nos résultats ont également montré une diminution de l'expression génique de NDST1 responsable de la N-sulfatation des GAG. Cette enzyme semble détenir un rôle important dans la fonction des GAG. D'ailleurs, Fuster et coll. ont généré des souris portant une délétion ciblée sur l'endothélium de l'enzyme biosynthétique NDST1. La croissance et la capacité de reproduction des souris n'ont pas été touchées. En revanche, l'angiogenèse pathologique dans les tumeurs expérimentales était

altérée, entraînant des tumeurs plus petites et une réduction de la densité et de la ramification microvasculaire. Pour mimer l'environnement angiogénique de la tumeur, des cellules endothéliales ont été isolées et mises en culture *in vitro* en présence de facteurs de croissance pro-angiogéniques. La liaison du FGF-2 et du VEGF aux cellules et aux HS a été considérablement réduite. Les cellules endothéliales mutantes ont également présenté des réponses angiogéniques altérées au FGF-2 et au VEGF164 (349).

L'utilisation de mimétiques de GAG est une approche qui a largement prouvé son efficacité dans l'induction de l'angiogenèse. Rouet et coll. ont démontré que l'utilisation de mimétiques de GAG synthétiques ayant une forte affinité pour le VEGF a permis de stimuler l'angiogenèse *in vivo* dans un modèle de membrane chorioallantoïque de poulet ou d'implantation sous cutanée de Matrigel chez la souris (350). De plus, l'injection d'une matrice contenant des HS a permis de restaurer une vascularisation normale post-ischémique dans un modèle d'ischémie de la patte chez le rat (324). L'utilisation de mimétiques de GAG permet de protéger les facteurs de croissance de la dégradation protéolytique et d'augmenter leur biodisponibilité, elle permet également d'induire le remodelage de la MEC. Récemment, des mimétiques des chaînes HS (HSm4131) ont été utilisés dans un modèle d'AVC ischémique induit par une occlusion intraluminale transitoire (1 h) de l'artère cérébrale moyenne (ACMo) chez le rat. Le HSm4131 a été administré par voie intraveineuse après l'induction de l'AVC. Le HSm4131 a été localisé dans l'hémisphère ischémique et a conféré une neuroprotection de longue durée et a réduit de manière significative les déficits fonctionnels. Il a également restauré la MEC et augmenté l'angiogenèse et la neurogenèse dans l'hémisphère cérébral affecté (351).

Le fucoïdane est un polysaccharide mimétique des GAG et un antithrombotique, qui peut induire les cellules formant des colonies endothéliales (ECFC) à adopter un phénotype angiogénique *in vitro*. L'effet du fucoïdane sur la vasculogenèse induite par les ECFC *in vivo* a été évalué dans un modèle murin d'ischémie des membres postérieurs. L'exposition des ECFC au fucoïdane avant leur injection intraveineuse améliorait le flux sanguin musculaire résiduel et augmentait la formation de vaisseaux collatéraux. La nécrose du tissu ischémique a été réduite de manière significative au 14<sup>e</sup> jour, à 12,1 % de la surface de section

transversale du gastronome, contre 40,1 % chez les animaux ayant reçu l'injection d'ECFC non traitées au fucoïdane. Les ECFC stimulés par le fucoïdane ont résisté à des contraintes de cisaillement allant jusqu'à 21 dyn cm<sup>-2</sup> (352).

Nos résultats ont également démontré une diminution significative de l'activité de la MMP2 chez les HUVEC « low GAG ». Cette métalloprotéase est considérée comme un régulateur important de l'angiogenèse par son rôle dans la dégradation de la MEC, l'activation des chimiokines et des facteurs de croissance et la migration cellulaire. En effet, il a été montré que les souris déficientes en MMP-2 présentent une angiogenèse rétinienne réduite, tandis que la déficience en MMP-9 chez ces souris ne montre pas de différence significative de la revascularisation rétinienne comparé aux souris contrôles (359). Notre laboratoire a confirmé le rôle de la MMP-2 dans l'angiogenèse médiée par les HUVEC. L'inhibition de MMP-2 à l'aide d'un anticorps bloquant anti-MMP-2, réduit significativement la formation de réseaux vasculaires (353). Récemment, des études se sont intéressées au mode d'action de différents micro-ARN dans la régulation de l'angiogenèse. Ces micro-ARN sont des petits ARN non codants capables de réguler l'expression des gènes. Plusieurs d'entre eux semblent compter parmi leurs effets pro-angiogéniques, la régulation à la hausse de l'expression de la MMP-2. Par exemple, dans un modèle de thrombus chez la souris induit par ligature de la veine jugulaire au niveau de la partie proximale du cœur, l'injection de miR-205 a induit une diminution de la taille du thrombus, le recrutement des PEC vers le site du thrombus, la prolifération et la migration des CE et l'angiogenèse. L'injection de l'anti-miR-205 a induit les effets inverses. Le miR-205 produit ces effets pro-angiogéniques via l'activation de l'expression de la MMP-2, qui a été retrouvée dans le site du thrombus. Le miR-205 active l'expression de la MMP-2 via l'inhibition de l'expression de la phosphatase and TENsin homologue « PTEN », connue pour avoir un rôle dans la régulation négative de l'expression de la MMP-2 via la voie PI3K/Akt (354).

Parallèlement, nous avons étudié la capacité des HUVEC « low GAG » à établir des jonctions cellule-cellule afin d'écartier l'hypothèse que l'incapacité de ce modèle à former des réseaux vasculaires soit due à un défaut de jonctions. Dans le modèle d'angiogenèse en 2D sur Matrigel qui nous a permis d'étudier l'angiogenèse *in vitro*, les jonctions entre CE sont

une étape clé dans la formation du réseau vasculaire par ces cellules, donnant une apparence en mailles quantifiables, formées par les contacts CE-CE. La VE-cadhérine est la principale molécule d'adhésion endothéliale, ayant un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité et de la perméabilité vasculaire. Nos résultats d'immunofluorescence et de cytométrie en flux n'ont relevé aucune différence entre les HUVEC appauvries en GAG et les cellules témoins dans les jonctions médiées par la VE-cadhérine.

### **La réduction des GAG abolit l'effet pro-angiogénique de CXCL12 *in vitro* et *ex vivo***

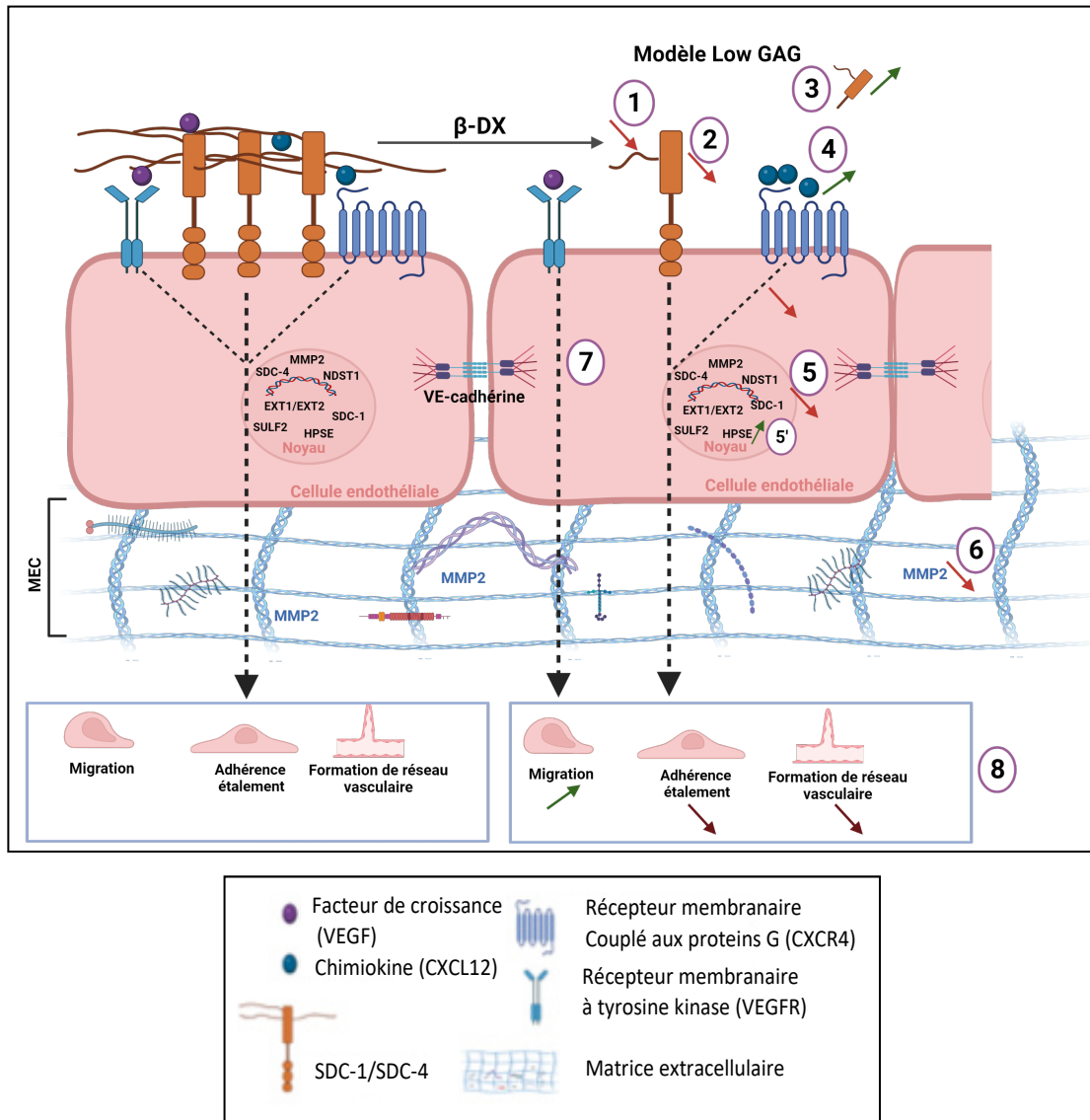
L'angiogenèse est un processus finement régulé par les chimiokines telles que RANTES et CXCL12. CXCL12 est une chimiokine connue pour ses effets pro-angiogéniques. Elle est produite par les CE lors de l'hypoxie, suite à la stabilisation de HIF et induit le recrutement des progéniteurs endothéliaux vers le site de l'hypoxie. La capacité de CXCL12 à induire la formation de réseaux vasculaires a été démontrée dans différentes études, cependant tous les mécanismes d'action de CXCL12 dans l'angiogenèse ne sont pas connus mais semblent multiples. Son effet pro-angiogénique dans les cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMEC-1) a été démontré. Le traitement avec CXCL12 a entraîné une activation de PI3K/Akt et de p44/42 MAP kinase. CXCL12 a diminué l'apoptose des HMEC-1, a stimulé la prolifération cellulaire et la formation de tubes vasculaires. Des études histologiques ont été réalisées sur des coupes de biopsies de gastrocnémiens obtenues à partir des membres inférieurs de patients atteints d'une ischémie critique du membre inférieur. Une augmentation de l'expression de CXCL12- $\alpha$  a été retrouvée au niveau des fibres musculaires squelettiques comparé aux contrôles. CXCR4 était largement exprimé et colocalisé aux microvaisseaux (293).

Nous avons récemment démontré que l'effet pro-angiogénique de CXCL12 pouvait être sous le contrôle des micro-ARN. En effet, nous avons étudié la régulation de l'angiogenèse par l'axe miR-126/CXCL12. Nos résultats ont démontré que CXCL12 induisait l'expression du miR-126 et que ce micro-ARN avait un rôle clé dans l'effet pro-angiogénique de CXCL12 *in vitro* (HUVEC) et *ex vivo* (anneaux aortiques de rats). Effectivement, l'inhibition du miR-126 par la transfection des HUVEC ou des anneaux aortiques de rats avec un anti-

miR-126 a aboli l'effet pro-migratoire de CXCL12 et la formation de réseaux vasculaires induite par CXCL12 *in vitro* et *ex vivo* (355).

Après avoir démontré l'effet pro-angiogénique de CXCL12, nous avons étudié cet effet dans les modèles appauvris en GAG, *in vitro* et *ex vivo*. Concernant la migration des HUVEC, l'effet pro-migratoire de CXCL12 a été aboli dans le modèle « low GAG ». En effet, la stimulation des HUVEC « low GAG » par CXCL12 n'augmente pas leur migration comparée aux « low GAG » non stimulées par CXCL12. L'ajout de CXCL12 aux HUVEC « low GAG » n'induit pas de formation de réseaux vasculaires, ce même résultat est retrouvé *ex vivo*. Ces résultats montrent que la réduction des GAG abolit l'effet pro-angiogénique de CXCL12, et ce malgré une plus forte fixation de la chimiokine à la surface des HUVEC low GAG comparé aux cellules contrôles. Ces résultats soulignent le rôle des GAG dans la fonction de CXCL12. En effet, notre laboratoire a précédemment démontré le rôle important des GAG dans l'invasion des cellules HeLa induite par CXCL12 (317). De plus, il a été démontré que CXCL12 se lie aux GAGs (356) permettant la dimérisation de la chimiokine (365) et sa protection contre la protéolyse par CD26/Dipeptidyl Peptidase IV (88). Ces informations suggèrent qu'outre leur rôle de corécepteurs, les GAG peuvent intervenir d'une autre manière dans la fonction de CXCL12. Ceci peut expliquer le fait que malgré une forte fixation à la surface des HUVEC « low GAG », CXCL12 n'a pas pu réaliser son effet pro-angiogénique dans ce modèle. De plus, l'inhibition de l'élongation des GAG dans notre modèle ne cible pas que les GAG membranaires mais aussi les GAG présents dans la MEC. L'absence ou la diminution des GAG matriciels pourrait faciliter l'accès de CXCL12 à ses récepteurs spécifiques présents à la surface des CE. D'ailleurs, notre modèle n'affecte pas l'expression membranaire de CXCR4.

Plusieurs cas de littérature démontrent le caractère indispensable de l'interaction GAG-CXCL12 pour la fonction chimiotactique et angiogénique de la chimiokine. Un modèle murin d'ischémie aiguë, induite par ligature de la partie proximale de l'artère fémorale droite exprimant une chimiokine CXCL12 mutée au niveau du site d'interaction avec les GAG, montrait une altération de la capacité à promouvoir la revascularisation par le recrutement de progéniteurs endothéliaux, malgré la forte expression des isoformes de CXCL12, comparé au modèle d'ischémie exprimant une CXCL12 sauvage (333).



**Figure 26. Schéma récapitulatif de l'étude.**

L'utilisation de  $\beta$ -DX a permis de réduire les GAG à la surface des HUVEC (1) et a entraîné différentes conséquences : (2) la diminution de l'expression membranaire des SDC-1 et SDC-4, (3) l'augmentation du clivage de l'ectodomaine de SDC-1, (4) l'augmentation de la fixation de CXCL12 à la surface des HUVEC low GAG, (5) une diminution de l'expression génique de SDC-1, SDC-4, NDST1, EXT1, EXT2, SULF2, (5') une augmentation de l'expression génique de l'héparanase, (6) une diminution de l'activité de la MMP2, (8) une altération de l'adhérence cellulaire, une inhibition de la formation de réseaux vasculaires induite ou non par CXCL12 et une augmentation de la migration cellulaire qui semble dépendre des récepteurs spécifiques du VEGF.



## Conclusion

A travers de ce travail, nous avons pu démontrer l'importance des GAG dans le processus d'angiogenèse. La réduction des GAG par l'inhibition de leur élongation a provoqué différents évènements cellulaires pouvant participer à l'inhibition de la formation de réseaux vasculaires. Notre modèle a montré une altération de l'expression des SDC-1 et SDC-4 suggérant une perturbation de leurs fonctions connues dans les processus impliqués dans l'angiogenèse. La formation de tubes vasculaires compte sur une fine régulation de la migration et de l'adhérence. Notre modèle a présenté une forte augmentation de la migration et une diminution de l'adhérence perturbant la balance entre ces deux réponses cellulaires. La diminution de l'activité de la MMP-2 participe également à l'inhibition de la formation de réseaux vasculaires, compte tenu de son rôle largement décrit dans l'angiogenèse. Enfin, l'ajout d'un puissant facteur pro-angiogénique tel que CXCL12 n'a pas réussi à rétablir la capacité des HUVEC « low GAG » à former des réseaux vasculaires *in vitro* et *ex vivo*. Ces résultats suggèrent que la restauration du glycocalyx endothélial au cours de l'ischémie est une approche thérapeutique intéressante à combiner avec l'utilisation de facteurs pro-angiogéniques pour stimuler l'angiogenèse et rétablir un flux sanguin normal.

## Perspectives

Au cours de notre travail, nous avons pu démontrer le rôle important des GAG dans la régulation des mécanismes cellulaires impliqués dans l'angiogenèse. Cette étude met en évidence principalement le caractère indispensable des GAG dans le processus d'angiogenèse. En effet, la réduction des GAG a fortement diminué la capacité des HUVEC à former des réseaux vasculaires. De façon intéressante, nous avons démontré que la réduction des GAG *ex vivo* aboutissait à l'abolition de la formation de réseaux vasculaires. Enfin, nous avons également vu une inhibition du pouvoir angiogénique de CXCL12 dans le modèle « low GAG ». Ce constat renforce l'importance de la régénération du glycocalyx endothélial qui est dégradé lors d'une ischémie. Pour une revascularisation rapide, afin de rétablir l'apport en nutriments et en oxygène, l'angiogenèse compensatoire nécessitera la présence de GAG. Différentes approches ont prouvé *in vivo* l'intérêt de l'utilisation de mimétiques de GAG dans des modèles expérimentaux d'ischémie avec des résultats prometteurs montrant une meilleure revascularisation et régénération. En collaboration avec une autre équipe de recherche, notre laboratoire a mis au point un système d'hydrogel à base de pullulan capables de soutenir l'adhérence des cellules progénitrices endothéliales (CD34<sup>+</sup>) mais aucune formation de réseaux vasculaire n'a été observée. En revanche, la fonctionnalisation de ces hydrogels avec le mimétique de GAG « Fucoïdan » en présence de VEGF a montré des résultats encourageants. Tout d'abord, la résonance plasmonique de surface a permis de confirmer l'interaction entre le VEGF et le fucoïdan. Leur combinaison dans les hydrogels a été utilisée dans un modèle d'angiogenèse sous cutanée chez la souris et a montré une réponse de vascularisation importante. L'isolectine B4, l'actine  $\alpha$ -musculaire lisse et la présence d'érythrocyte ont permis d'affirmer la fonctionnalité des néovaisseaux (357).

L'ensemble de ces données mettent en exergue l'importance de l'intégrité du glycocalyx endothélial vasculaire pour une revascularisation et une régénération rapide des tissus touchés par l'ischémie. Pour connaître davantage les conséquences de la dégradation du glycocalyx sur la fonction des CE, notre laboratoire développe un modèle de cellules

HUVEC ayant subi une invalidation du gène B3GAT3 codant pour la glucuronosyltransferase-1, enzyme impliquée dans la synthèse du tétrasaccharide de liaison, reliant les PG aux GAG. Cette enzyme complète la synthèse du tétrasaccharide en catalysant l'ajout d'un acide glucuronique. Pour invalider ce gène, nous utilisons la technologie CRISPR-Cas9. Cas-9 est une endonucléase d'ADN qui est guidée par un ARN constitué d'une séquence constante de 42 nucléotides et d'une séquence variable de 20 nucléotides, complémentaire à une séquence du gène cible. L'ARN guide reconnaît une région PAM sur l'ADN cible, cette séquence de 3 à 5 nucléotides est située après la séquence ciblée par l'ARN guide. L'enzyme Cas-9 se lie à cette séquence puis au complexe formé par l'ARN guide et l'ADN cible. Grâce à ses deux régions endonucléases, Cas-9 coupe les deux brins d'ADN cible. Cette technique nous permettra de générer des HUVEC complètement dépourvues de GAG. À l'aide de ce modèle, nous pourrions étudier de manière plus large et plus approfondie l'impact de l'absence de GAG sur la fonction des CE. Il serait intéressant d'évaluer le profil d'expression de tous les PG membranaires, matriciels et intracellulaires tels que les glycoprotéines dont le rôle dans l'angiogenèse et notamment pathologique a bien été décrit. Il serait également intéressant d'étudier l'impact de l'absence de GAG sur la fonction d'un large panel de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, le FGF, le PDGF et CCL5, en évaluant leur capacité à se lier à la membrane cellulaire en absence de GAG par résonance plasmonique de surface et à induire des voies de signalisation pro-angiogéniques aboutissant à la migration des CE, leur prolifération et la formation de tubes vasculaires. Notre étude a démontré que le profil d'expression des GAG peut influencer l'expression de certains gènes tels que les SDC et les enzymes de biosynthèse et de modification des GAG. Il serait intéressant d'utiliser des approches transcriptomiques comme le séquençage aléatoire du transcriptome complet ou RNAseq qui permettra d'évaluer les éventuelles perturbations de l'expression des gènes induites par l'absence de GAG, en portant un intérêt particulier à l'expression de gènes codant pour des chimiokines, des facteurs de croissance, et leurs récepteurs spécifiques mais aussi les gènes impliqués dans les processus de migration et d'adhérence cellulaires tels que les intégrines, les protéines du cytosquelette, les métalloprotéases et différentes kinases qui activent des substrats impliqués dans la prolifération, la migration cellulaire et l'angiogenèse.

Nos résultats *ex vivo* dans un modèle d'angiogenèse sur anneaux aortiques de rat ont montré que l'inhibition de l'élongation des GAG abolissait la formation de réseaux vasculaires même en présence de CXCL12. Ce modèle d'étude de la formation de réseaux vasculaire présente l'avantage de garder toutes les cellules (CE, CML et péricytes) ainsi que la matrice. Il serait intéressant de caractériser la structure des réseaux formés par une étude d'immunohistochimie permettant de mettre en évidence les différentes cellules qui composent le néo-vaisseau. Cela nous permettrait de savoir si les réseaux formés dans ce système ne sont composés que de CE, ou éventuellement de CML qui migrent et forment le néo-vaisseau en parallèle aux CE. Les CE et les CML sont en constante interaction et échange au niveau des vaisseaux sanguins. Le modèle d'HUVEC dépourvues de GAG pourrait être mis en co-culture avec les CML afin d'évaluer l'impact de l'absence des GAG endothéliaux sur la fonction des CML et leur communication et l'échange avec les CE. Les informations récoltées par ces différentes approches permettraient d'approfondir la connaissance des conséquences cellulaires et moléculaires de la dégradation des GAG endothéliaux dans différentes pathologies et de pouvoir agir sur les dysfonctions engendrées de manière ciblée et efficace.

## Références bibliographiques



1. Anatomie.. Tome 2, Viscères - Werner Kahle,Werner Platzer,Helmut Leonhardt,Christian Cabrol [Internet]. [cited 2022 Oct 21]. Available from: <https://www.decitre.fr/livres/anatomie-9782257122520.html>
2. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):677–84.
3. Kramsch DM, Franzblau C, Hollander W. The protein and lipid composition of arterial elastin and its relationship to lipid accumulation in the atherosclerotic plaque. *J Clin Invest*. 1971 Aug;50(8):1666–77.
4. Steinberg D. Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*. 1997 Feb 18;95(4):1062–71.
5. Napoli C, D’Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1997 Dec 1;100(11):2680–90.
6. de Winther MP, van Dijk KW, Havekes LM, Hofker MH. Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Feb;20(2):290–7.
7. Weissberg PL, Clesham GJ, Bennett MR. Is vascular smooth muscle cell proliferation beneficial? *Lancet Lond Engl*. 1996 Feb 3;347(8997):305–7.
8. Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*. 1996 Oct 15;94(8):2013–20.
9. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Dallas Tex*. 1986 Apr;6(2):131–8.
10. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27;288(5789):373–6.
11. Meredith IT, Anderson TJ, Uehata A, Yeung AC, Selwyn AP, Ganz P. Role of endothelium in ischemic coronary syndromes. *Am J Cardiol*. 1993 Sep 9;72(8):27C-31C; discussion 31C-32C.
12. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, et al. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest*. 1990 Jul;86(1):228–34.
13. Dinerman JL, Mehta JL. Endothelial, platelet and leukocyte interactions in ischemic heart disease: insights into potential mechanisms and their clinical relevance. *J Am Coll Cardiol*. 1990 Jul;16(1):207–22.
14. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol*. 1987 Sep;92(1):181–7.
15. Kinlay S, Selwyn AP, Delagrangé D, Creager MA, Libby P, Ganz P. Biological mechanisms for the clinical success of lipid-lowering in coronary artery disease and the use of surrogate end-points. *Curr Opin Lipidol*. 1996 Dec;7(6):389–97.
16. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 Jun;43(2):109–42.

17. Radziwon-Balicka A, Lesyk G, Back V, Fong T, Loreda-Calderon EL, Dong B, et al. Differential eNOS-signalling by platelet subpopulations regulates adhesion and aggregation. *Cardiovasc Res*. 2017 Dec 1;113(14):1719–31.
18. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1995 Jan 6;270(1):319–24.
19. Adams MR, Kinlay S, Blake GJ, Orford JL, Ganz P, Selwyn AP. Atherogenic lipids and endothelial dysfunction: mechanisms in the genesis of ischemic syndromes. *Annu Rev Med*. 2000;51:149–67.
20. Gaudette S, Hughes D, Boller M. The endothelial glycocalyx: Structure and function in health and critical illness. *J Vet Emerg Crit Care San Antonio Tex* 2001. 2020 Mar;30(2):117–34.
21. Henry CB, Duling BR. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am J Physiol*. 1999 Aug;277(2):H508-514.
22. Vink H, Duling BR. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Jan;278(1):H285-289.
23. Ueda A, Shimomura M, Ikeda M, Yamaguchi R, Tanishita K. Effect of glycocalyx on shear-dependent albumin uptake in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Nov;287(5):H2287-2294.
24. Vink H, Duling BR. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ Res*. 1996 Sep;79(3):581–9.
25. Henry CB, Duling BR. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Dec;279(6):H2815-2823.
26. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JAE. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Sep 1;23(9):1541–7.
27. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*. 1995 Jul;75(3):519–60.
28. Dewey CF, Bussolari SR, Gimbrone MA, Davies PF. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng*. 1981 Aug;103(3):177–85.
29. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1986 Jun;250(6 Pt 2):H1145-1149.
30. Urschel K, Tauchi M, Achenbach S, Dietel B. Investigation of Wall Shear Stress in Cardiovascular Research and in Clinical Practice-From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci*. 2021 May 26;22(11):5635.
31. Zhang B, Gu J, Qian M, Niu L, Zhou H, Ghista D. Correlation between quantitative analysis of wall shear stress and intima-media thickness in atherosclerosis development in carotid arteries. *Biomed Eng Online*. 2017 Dec 6;16(1):137.
32. Harding IC, Mitra R, Mensah SA, Herman IM, Ebong EE. Pro-atherosclerotic disturbed flow disrupts caveolin-1 expression, localization, and function via glycocalyx degradation. *J Transl Med*. 2018 Dec 18;16(1):364.
33. Psefteli PM, Kitscha P, Vizcay G, Fleck R, Chapple SJ, Mann GE, et al. Glycocalyx sialic acids regulate Nrf2-mediated signaling by fluid shear stress in human endothelial cells. *Redox Biol*. 2021 Jan;38:101816.
34. Urschel K, Tauchi M, Achenbach S, Dietel B. Investigation of Wall Shear Stress in Cardiovascular Research and in Clinical Practice-From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci*. 2021 May 26;22(11):5635.

35. Wang G, Kostidis S, Tiemeier GL, Sol WMPJ, de Vries MR, Giera M, et al. Shear Stress Regulation of Endothelial Glycocalyx Structure Is Determined by Glucobiosynthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020 Feb;40(2):350–64.
36. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res.* 2003 Nov 14;93(10):e136-142.
37. Mochizuki S, Vink H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Spaan JAE, et al. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Aug;285(2):H722-726.
38. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* 2007 Jun;454(3):345–59.
39. Shimada K, Kobayashi M, Kimura S, Nishinaga M, Takeuchi K, Ozawa T. Anticoagulant heparin-like glycosaminoglycans on endothelial cell surface. *Jpn Circ J.* 1991 Oct;55(10):1016–21.
40. Parker KA, Tollefsen DM. The protease specificity of heparin cofactor II. Inhibition of thrombin generated during coagulation. *J Biol Chem.* 1985 Mar 25;260(6):3501–5.
41. Allen BL, Filla MS, Rapraeger AC. Role of heparan sulfate as a tissue-specific regulator of FGF-4 and FGF receptor recognition. *J Cell Biol.* 2001 Nov 26;155(5):845–58.
42. Wilsie LC, Orlando RA. The low density lipoprotein receptor-related protein complexes with cell surface heparan sulfate proteoglycans to regulate proteoglycan-mediated lipoprotein catabolism. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):15758–64.
43. Bode L, Eklund EA, Murch S, Freeze HH. Heparan sulfate depletion amplifies TNF- $\alpha$ -induced protein leakage in an in vitro model of protein-losing enteropathy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 May;288(5):G1015-1023.
44. Strålin P, Marklund SL. Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2000 Aug;151(2):433–41.
45. Li Q, Bolli R, Qiu Y, Tang XL, Murphree SS, French BA. Gene therapy with extracellular superoxide dismutase attenuates myocardial stunning in conscious rabbits. *Circulation.* 1998 Oct 6;98(14):1438–48.
46. Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, Rehm M, Briegel J, Welsch U, et al. TNF- $\alpha$  induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol.* 2009 Jan;104(1):78–89.
47. Nieuwdorp M, Holleman F, de Groot E, Vink H, Gort J, Kontush A, et al. Perturbation of hyaluronan metabolism predisposes patients with type 1 diabetes mellitus to atherosclerosis. *Diabetologia.* 2007 Jun;50(6):1288–93.
48. Okada H, Yoshida S, Hara A, Ogura S, Tomita H. Vascular endothelial injury exacerbates coronavirus disease 2019: The role of endothelial glycocalyx protection. *Microcirc N Y N 1994.* 2021 Apr;28(3):e12654.
49. Vink H, Constantinescu AA, Spaan JA. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer: implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation.* 2000 Apr 4;101(13):1500–2.
50. van den Berg BM, Spaan JAE, Vink H. Impaired glycocalyx barrier properties contribute to enhanced intimal low-density lipoprotein accumulation at the carotid artery bifurcation in mice. *Pflugers Arch.* 2009 Apr;457(6):1199–206.



51. Zeng Y, Tarbell JM. The adaptive remodeling of endothelial glycocalyx in response to fluid shear stress. *PLoS One*. 2014;9(1):e86249.
52. van den Berg BM, Spaan JAE, Rolf TM, Vink H. Atherogenic region and diet diminish glycocalyx dimension and increase intima-to-media ratios at murine carotid artery bifurcation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Feb;290(2):H915-920.
53. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation*. 2001 Feb 20;103(7):926-33.
54. Song JW, Zullo JA, Liveris D, Dragovich M, Zhang XF, Goligorsky MS. Therapeutic Restoration of Endothelial Glycocalyx in Sepsis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017 Apr;361(1):115-21.
55. Cheng MJ, Kumar R, Sridhar S, Webster TJ, Ebong EE. Endothelial glycocalyx conditions influence nanoparticle uptake for passive targeting. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:3305-15.
56. Broekhuizen LN, Lemkes BA, Mooij HL, Meuwese MC, Verberne H, Holleman F, et al. Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2010 Dec;53(12):2646-55.
57. Masola V, Zaza G, Onisto M, Lupo A, Gambaro G. Glycosaminoglycans, proteoglycans and sulodexide and the endothelium: biological roles and pharmacological effects. *Int Angiol J Int Union Angiol*. 2014 Jun;33(3):243-54.
58. Melgar-Lesmes P, Garcia-Polite F, Del-Rey-Puech P, Rosas E, Dreyfuss JL, Montell E, et al. Treatment with chondroitin sulfate to modulate inflammation and atherogenesis in obesity. *Atherosclerosis*. 2016 Feb;245:82-7.
59. Handel TM, Johnson Z, Crown SE, Lau EK, Proudfoot AE. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:385-410.
60. Lindahl U, Couchman J, Kimata K, Esko JD. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015 [cited 2022 Oct 5]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453033/>
61. Zhang L, Esko JD. Amino acid determinants that drive heparan sulfate assembly in a proteoglycan. *J Biol Chem*. 1994 Jul 29;269(30):19295-9.
62. Yamada S, Oyama M, Yuki Y, Kato K, Sugahara K. The uniform galactose 4-sulfate structure in the carbohydrate-protein linkage region of human urinary trypsin inhibitor. *Eur J Biochem*. 1995 Oct 15;233(2):687-93.
63. Busse M, Feta A, Presto J, Wilén M, Grønning M, Kjellén L, et al. Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation. *J Biol Chem*. 2007 Nov 9;282(45):32802-10.
64. Kreuger J, Matsumoto T, Vanwildemeersch M, Sasaki T, Timpl R, Claesson-Welsh L, et al. Role of heparan sulfate domain organization in endostatin inhibition of endothelial cell function. *EMBO J*. 2002 Dec 2;21(23):6303-11.
65. Robinson CJ, Mulloy B, Gallagher JT, Stringer SE. VEGF165-binding sites within heparan sulfate encompass two highly sulfated domains and can be liberated by K5 lyase. *J Biol Chem*. 2006 Jan 20;281(3):1731-40.

66. Spillmann D, Witt D, Lindahl U. Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate. *J Biol Chem*. 1998 Jun 19;273(25):15487–93.
67. Lortat-Jacob H, Turnbull JE, Grimaud JA. Molecular organization of the interferon gamma-binding domain in heparan sulphate. *Biochem J*. 1995 Sep 1;310 ( Pt 2):497–505.
68. Yanagishita M, Hascall VC. Metabolism of proteoglycans in rat ovarian granulosa cell culture. Multiple intracellular degradative pathways and the effect of chloroquine. *J Biol Chem*. 1984 Aug 25;259(16):10270–83.
69. Vlodaysky I, Abboud-Jarrous G, Elkin M, Naggi A, Casu B, Sasisekharan R, et al. The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2006;35(1–2):116–27.
70. Ihrcke NS, Parker W, Reissner KJ, Platt JL. Regulation of platelet heparanase during inflammation: role of pH and proteinases. *J Cell Physiol*. 1998 Jun;175(3):255–67.
71. McKenzie EA. Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation. *Br J Pharmacol*. 2007 May;151(1):1–14.
72. Zcharia E, Jia J, Zhang X, Baraz L, Lindahl U, Peretz T, et al. Newly generated heparanase knock-out mice unravel co-regulation of heparanase and matrix metalloproteinases. *PLoS One*. 2009;4(4):e5181.
73. Vivès RR, Seffouh A, Lortat-Jacob H. Post-Synthetic Regulation of HS Structure: The Yin and Yang of the Sulfs in Cancer. *Front Oncol*. 2014 Jan 14;3:331.
74. Uchimura K, Morimoto-Tomita M, Rosen SD. Measuring the activities of the Sulfs: two novel heparin/heparan sulfate endosulfatases. *Methods Enzymol*. 2006;416:243–53.
75. El Masri R, Seffouh A, Lortat-Jacob H, Vivès RR. The ‘in and out’ of glucosamine 6-O-sulfation: the 6th sense of heparan sulfate. *Glycoconj J*. 2017 Jun;34(3):285–98.
76. Dai Y, Yang Y, MacLeod V, Yue X, Rapraeger AC, Shriver Z, et al. HSulf-1 and HSulf-2 are potent inhibitors of myeloma tumor growth in vivo. *J Biol Chem*. 2005 Dec 2;280(48):40066–73.
77. Lemjabbar-Alaoui H, van Zante A, Singer MS, Xue Q, Wang YQ, Tsay D, et al. Sulf-2, a heparan sulfate endosulfatase, promotes human lung carcinogenesis. *Oncogene*. 2010 Feb 4;29(5):635–46.
78. Proudfoot AEI, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, et al. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 18;100(4):1885–90.
79. Lipowsky HH, Lescanic A. Inhibition of inflammation induced shedding of the endothelial glycocalyx with low molecular weight heparin. *Microvasc Res*. 2017 Jul;112:72–8.
80. Marshall LJ, Ramdin LSP, Brooks T, DPhil PC, Shute JK. Plasminogen activator inhibitor-1 supports IL-8-mediated neutrophil transendothelial migration by inhibition of the constitutive shedding of endothelial IL-8/heparan sulfate/syndecan-1 complexes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Aug 15;171(4):2057–65.
81. Carter NM, Ali S, Kirby JA. Endothelial inflammation: the role of differential expression of N-acetylase/N-sulphotransferase enzymes in alteration of the immunological properties of heparan sulphate. *J Cell Sci*. 2003 Sep 1;116(Pt 17):3591–600.
82. Vaahtomeri K, Moussion C, Hauschild R, Sixt M. Shape and Function of Interstitial Chemokine CCL21 Gradients Are Independent of Heparan Sulfates Produced by Lymphatic Endothelium. *Front Immunol*. 2021;12:630002.

83. Kawamura T, Stephens B, Qin L, Yin X, Dores MR, Smith TH, et al. A general method for site specific fluorescent labeling of recombinant chemokines. *PLoS One*. 2014;9(1):e81454.
84. Fernando H, Chin C, Rösgen J, Rajarathnam K. Dimer dissociation is essential for interleukin-8 (IL-8) binding to CXCR1 receptor. *J Biol Chem*. 2004 Aug 27;279(35):36175–8.
85. Kuschert GS, Hoogewerf AJ, Proudfoot AE, Chung CW, Cooke RM, Hubbard RE, et al. Identification of a glycosaminoglycan binding surface on human interleukin-8. *Biochemistry*. 1998 Aug 11;37(32):11193–201.
86. Gangavarapu P, Rajagopalan L, Kolli D, Guerrero-Plata A, Garofalo RP, Rajarathnam K. The monomer-dimer equilibrium and glycosaminoglycan interactions of chemokine CXCL8 regulate tissue-specific neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol*. 2012 Feb;91(2):259–65.
87. Tanino Y, Coombe DR, Gill SE, Kett WC, Kajikawa O, Proudfoot AEI, et al. Kinetics of chemokine-glycosaminoglycan interactions control neutrophil migration into the airspaces of the lungs. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Mar 1;184(5):2677–85.
88. Sadir R, Imberty A, Baleux F, Lortat-Jacob H. Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem*. 2004 Oct 15;279(42):43854–60.
89. Lortat-Jacob H, Baltzer F, Grimaud JA. Heparin decreases the blood clearance of interferon-gamma and increases its activity by limiting the processing of its carboxyl-terminal sequence. *J Biol Chem*. 1996 Jul 5;271(27):16139–43.
90. Ellyard JJ, Simson L, Bezos A, Johnston K, Freeman C, Parish CR. Eotaxin selectively binds heparin. An interaction that protects eotaxin from proteolysis and potentiates chemotactic activity in vivo. *J Biol Chem*. 2007 May 18;282(20):15238–47.
91. Saigoh K, Izumikawa T, Koike T, Shimizu J, Kitagawa H, Kusunoki S. Chondroitin beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase-1 missense mutations are associated with neuropathies. *J Hum Genet*. 2011 Feb;56(2):143–6.
92. Kobayashi N, Miyoshi S, Mikami T, Koyama H, Kitazawa M, Takeoka M, et al. Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. *Cancer Res*. 2010 Sep 15;70(18):7073–83.
93. Tian X, Azpurua J, Hine C, Vaidya A, Myakishev-Rempel M, Ablueva J, et al. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat. *Nature*. 2013 Jul 18;499(7458):346–9.
94. *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes* [Internet]. [cited 2022 Oct 5]. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-4-431-54240-7>
95. Bui C, Huber C, Tuysuz B, Alanay Y, Bole-Feyssot C, Leroy JG, et al. XYLT1 mutations in Desbuquois dysplasia type 2. *Am J Hum Genet*. 2014 Mar 6;94(3):405–14.
96. Munns CF, Fahiminiya S, Poudel N, Munteanu MC, Majewski J, Sillence DO, et al. Homozygosity for frameshift mutations in XYLT2 result in a spondylo-ocular syndrome with bone fragility, cataracts, and hearing defects. *Am J Hum Genet*. 2015 Jun 4;96(6):971–8.
97. Sellars EA, Bosanko KA, Leopard T, Garnica A, Schaefer GB. A newborn with complex skeletal abnormalities, joint contractures, and bilateral corneal clouding with sclerocornea. *Semin Pediatr Neurol*. 2014 Jun;21(2):84–7.
98. Baasanjav S, Al-Gazali L, Hashiguchi T, Mizumoto S, Fischer B, Horn D, et al. Faulty initiation of proteoglycan synthesis causes cardiac and joint defects. *Am J Hum Genet*. 2011 Jul 15;89(1):15–27.

99. Budde BS, Mizumoto S, Kogawa R, Becker C, Altmüller J, Thiele H, et al. Skeletal dysplasia in a consanguineous clan from the island of Nias/Indonesia is caused by a novel mutation in B3GAT3. *Hum Genet.* 2015 Jul;134(7):691–704.
100. Syx D, Van Damme T, Symoens S, Maiburg MC, van de Laar I, Morton J, et al. Genetic heterogeneity and clinical variability in musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by impaired dermatan sulfate biosynthesis. *Hum Mutat.* 2015 May;36(5):535–47.
101. Müller T, Mizumoto S, Suresh I, Komatsu Y, Vodopituz J, Dundar M, et al. Loss of dermatan sulfate epimerase (DSE) function results in musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Mol Genet.* 2013 Sep 15;22(18):3761–72.
102. Unger S, Lausch E, Rossi A, Mégarbané A, Sillence D, Alcausin M, et al. Phenotypic features of carbohydrate sulfotransferase 3 (CHST3) deficiency in 24 patients: congenital dislocations and vertebral changes as principal diagnostic features. *Am J Med Genet A.* 2010 Oct;152A(10):2543–9.
103. Rajab A, Kunze J, Mundlos S. Spondyloepiphyseal dysplasia Omani type: a new recessive type of SED with progressive spinal involvement. *Am J Med Genet A.* 2004 May 1;126A(4):413–9.
104. Wraith JE. The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management. *Arch Dis Child.* 1995 Mar;72(3):263–7.
105. Muenzer J. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatr.* 2004 May;144(5 Suppl):S27–34.
106. Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spanpanato C, Venturi C, Medina D, et al. A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet.* 2008 Jan 1;17(1):119–29.
107. Monaco A, Maffia V, Sorrentino NC, Sambri I, Ezhova Y, Giuliano T, et al. The Amyloid Inhibitor CLR01 Relieves Autophagy and Ameliorates Neuropathology in a Severe Lysosomal Storage Disease. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2020 Apr 8;28(4):1167–76.
108. Haouari W, Dubail J, Poüs C, Cormier-Daire V, Bruneel A. Inherited Proteoglycan Biosynthesis Defects-Current Laboratory Tools and Bikunin as a Promising Blood Biomarker. *Genes.* 2021 Oct 20;12(11):1654.
109. Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:729–77.
110. Gandhi NS, Mancera RL. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des.* 2008 Dec;72(6):455–82.
111. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 2015 Mar;42:11–55.
112. Kolset SO, Pejler G. Serglycin: a structural and functional chameleon with wide impact on immune cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2011 Nov 15;187(10):4927–33.
113. Kolset SO, Tveit H. Serglycin--structure and biology. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2008 Apr;65(7–8):1073–85.
114. Kolset SO, Mann DM, Uhlin-Hansen L, Winberg JO, Ruoslahti E. Serglycin-binding proteins in activated macrophages and platelets. *J Leukoc Biol.* 1996 Apr;59(4):545–54.
115. Douaiher J, Succar J, Lancerotto L, Gurish MF, Orgill DP, Hamilton MJ, et al. Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. *Adv Immunol.* 2014;122:211–52.
116. Melo FR, Waern I, Rönnerberg E, Åbrink M, Lee DM, Schlenner SM, et al. A role for serglycin proteoglycan in mast cell apoptosis induced by a secretory granule-mediated pathway. *J Biol Chem.* 2011 Feb 18;286(7):5423–33.

117. Meen AJ, Øynebråten I, Reine TM, Duelli A, Svennevig K, Pejler G, et al. Serglycin is a major proteoglycan in polarized human endothelial cells and is implicated in the secretion of the chemokine GRO $\alpha$ /CXCL1. *J Biol Chem*. 2011 Jan 28;286(4):2636–47.
118. Zhang L, Yang M, Yang D, Cavey G, Davidson P, Gibson G. Molecular interactions of MMP-13 C-terminal domain with chondrocyte proteins. *Connect Tissue Res*. 2010 Jun;51(3):230–9.
119. Schick BP, Gradowski JF, San Antonio JD. Synthesis, secretion, and subcellular localization of serglycin proteoglycan in human endothelial cells. *Blood*. 2001 Jan 15;97(2):449–58.
120. Zernichow L, Abrink M, Hallgren J, Grujic M, Pejler G, Kolset SO. Serglycin is the major secreted proteoglycan in macrophages and has a role in the regulation of macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion in response to lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. 2006 Sep 15;281(37):26792–801.
121. Kunder CA, St John AL, Li G, Leong KW, Berwin B, Staats HF, et al. Mast cell-derived particles deliver peripheral signals to remote lymph nodes. *J Exp Med*. 2009 Oct 26;206(11):2455–67.
122. Wagner L, Yang OO, Garcia-Zepeda EA, Ge Y, Kalams SA, Walker BD, et al. Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature*. 1998 Feb 26;391(6670):908–11.
123. Toyama-Sorimachi N, Kitamura F, Habuchi H, Tobita Y, Kimata K, Miyasaka M. Widespread expression of chondroitin sulfate-type serglycins with CD44 binding ability in hematopoietic cells. *J Biol Chem*. 1997 Oct 17;272(42):26714–9.
124. Noonan DM, Fulle A, Valente P, Cai S, Horigan E, Sasaki M, et al. The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem*. 1991 Dec 5;266(34):22939–47.
125. Mahmoud M, Mayer M, Cancel LM, Bartosch AM, Mathews R, Tarbell JM. The glycocalyx core protein Glypican 1 protects vessel wall endothelial cells from stiffness-mediated dysfunction and disease. *Cardiovasc Res*. 2021 May 25;117(6):1592–605.
126. Muthusamy A, Cooper CR, Gomes RR. Soluble perlecan domain I enhances vascular endothelial growth factor-165 activity and receptor phosphorylation in human bone marrow endothelial cells. *BMC Biochem*. 2010 Nov 3;11:43.
127. Kaji T, Yamamoto C, Oh-i M, Fujiwara Y, Yamazaki Y, Morita T, et al. The vascular endothelial growth factor VEGF165 induces perlecan synthesis via VEGF receptor-2 in cultured human brain microvascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Sep;1760(9):1465–74.
128. Mongiat M, Sweeney SM, San Antonio JD, Fu J, Iozzo RV. Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *J Biol Chem*. 2003 Feb 7;278(6):4238–49.
129. Willis CD, Poluzzi C, Mongiat M, Iozzo RV. Endorepellin laminin-like globular 1/2 domains bind Ig3-5 of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 and block pro-angiogenic signaling by VEGFA in endothelial cells. *FEBS J*. 2013 May;280(10):2271–84.
130. Iozzo RV, Sanderson RD. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2011 May;15(5):1013–31.
131. Matsushima N, Ohyanagi T, Tanaka T, Kretsinger RH. Super-motifs and evolution of tandem leucine-rich repeats within the small proteoglycans--biglycan, decorin, lumican,

- fibromodulin, PRELP, keratocan, osteoadherin, epiphygan, and osteoglycin. *Proteins*. 2000 Feb 1;38(2):210–25.
132. Iozzo RV. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1997;32(2):141–74.
  133. Reed CC, Iozzo RV. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J*. 2002 Jun;19(4–5):249–55.
  134. Yamaguchi Y, Ruoslahti E. Expression of human proteoglycan in Chinese hamster ovary cells inhibits cell proliferation. *Nature*. 1988 Nov 17;336(6196):244–6.
  135. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature*. 1990 Jul 19;346(6281):281–4.
  136. Santra M, Reed CC, Iozzo RV. Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. *J Biol Chem*. 2002 Sep 20;277(38):35671–81.
  137. Zhu JX, Goldoni S, Bix G, Owens RT, McQuillan DJ, Reed CC, et al. Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis. *J Biol Chem*. 2005 Sep 16;280(37):32468–79.
  138. Csordás G, Santra M, Reed CC, Eichstetter I, McQuillan DJ, Gross D, et al. Sustained down-regulation of the epidermal growth factor receptor by decorin. A mechanism for controlling tumor growth in vivo. *J Biol Chem*. 2000 Oct 20;275(42):32879–87.
  139. Araki K, Wakabayashi H, Shintani K, Morikawa J, Matsumine A, Kusuzaki K, et al. Decorin suppresses bone metastasis in a breast cancer cell line. *Oncology*. 2009;77(2):92–9.
  140. Hu Y, Sun H, Owens RT, Wu J, Chen YQ, Berquin IM, et al. Decorin suppresses prostate tumor growth through inhibition of epidermal growth factor and androgen receptor pathways. *Neoplasia N Y N*. 2009 Oct;11(10):1042–53.
  141. Seidler DG, Goldoni S, Agnew C, Cardi C, Thakur ML, Owens RT, et al. Decorin protein core inhibits in vivo cancer growth and metabolism by hindering epidermal growth factor receptor function and triggering apoptosis via caspase-3 activation. *J Biol Chem*. 2006 Sep 8;281(36):26408–18.
  142. Goldoni S, Seidler DG, Heath J, Fassan M, Baffa R, Thakur ML, et al. An antimetastatic role for decorin in breast cancer. *Am J Pathol*. 2008 Sep;173(3):844–55.
  143. Dours-Zimmermann MT, Zimmermann DR. A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican. *J Biol Chem*. 1994 Dec 30;269(52):32992–8.
  144. Wu YJ, La Pierre DP, Wu J, Yee AJ, Yang BB. The interaction of versican with its binding partners. *Cell Res*. 2005 Jul;15(7):483–94.
  145. Kischel P, Waltregny D, Dumont B, Turtoi A, Greffe Y, Kirsch S, et al. Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting. *Int J Cancer*. 2010 Feb 1;126(3):640–50.
  146. Cattaruzza S, Schiappacassi M, Ljungberg-Rose A, Spessotto P, Perissinotto D, Mörgelin M, et al. Distribution of PG-M/versican variants in human tissues and de novo expression of isoform V3 upon endothelial cell activation, migration, and neoangiogenesis in vitro. *J Biol Chem*. 2002 Dec 6;277(49):47626–35.
  147. Bode-Lesniewska B, Dours-Zimmermann MT, Odermatt BF, Briner J, Heitz PU, Zimmermann DR. Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. 1996 Apr;44(4):303–12.

148. Wight TN. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Oct;14(5):617–23.
149. Ricciardelli C, Mayne K, Sykes PJ, Raymond WA, McCaul K, Marshall VR, et al. Elevated levels of versican but not decorin predict disease progression in early-stage prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1998 Apr;4(4):963–71.
150. Ghosh S, Albitar L, LeBaron R, Welch WR, Samimi G, Birrer MJ, et al. Up-regulation of stromal versican expression in advanced stage serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2010 Oct;119(1):114–20.
151. Skandalis SS, Kletsas D, Kyriakopoulou D, Stavropoulos M, Theocharis DA. The greatly increased amounts of accumulated versican and decorin with specific post-translational modifications may be closely associated with the malignant phenotype of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Aug;1760(8):1217–25.
152. Du WW, Yang BB, Shatseva TA, Yang BL, Deng Z, Shan SW, et al. Versican G3 promotes mouse mammary tumor cell growth, migration, and metastasis by influencing EGF receptor signaling. *PLoS One.* 2010 Nov 5;5(11):e13828.
153. Lim ST, Longley RL, Couchman JR, Woods A. Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C alpha (PKC alpha) increases focal adhesion localization of PKC alpha. *J Biol Chem.* 2003 Apr 18;278(16):13795–802.
154. Andres JL, DeFalcis D, Noda M, Massagué J. Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan. *J Biol Chem.* 1992 Mar 25;267(9):5927–30.
155. Couchman JR. Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:89–114.
156. van der Voort R, Taher TE, Wielenga VJ, Spaargaren M, Prevo R, Smit L, et al. Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met. *J Biol Chem.* 1999 Mar 5;274(10):6499–506.
157. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000 Jan 15;14(2):163–76.
158. Suffee N, Le Visage C, Hlawaty H, Aid-Launais R, Vanneaux V, Larghero J, et al. Pro-angiogenic effect of RANTES-loaded polysaccharide-based microparticles for a mouse ischemia therapy. *Sci Rep.* 2017 Oct 16;7(1):13294.
159. Cuff CA, Kothapalli D, Azonobi I, Chun S, Zhang Y, Belkin R, et al. The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. *J Clin Invest.* 2001 Oct;108(7):1031–40.
160. Schwarz Q, Ruhrberg C. Neuropilin, you gotta let me know: should I stay or should I go? *Cell Adhes Migr.* 2010 Mar;4(1):61–6.
161. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Dev Camb Engl.* 1999 Nov;126(21):4895–902.
162. Grun D, Adhikary G, Eckert RL. VEGF-A acts via neuropilin-1 to enhance epidermal cancer stem cell survival and formation of aggressive and highly vascularized tumors. *Oncogene.* 2016 Aug 18;35(33):4379–87.

163. Shintani Y, Takashima S, Asano Y, Kato H, Liao Y, Yamazaki S, et al. Glycosaminoglycan modification of neuropilin-1 modulates VEGFR2 signaling. *EMBO J.* 2006 Jul 12;25(13):3045–55.
164. Pellet-Many C, Mehta V, Fields L, Mahmoud M, Lowe V, Evans I, et al. Neuropilins 1 and 2 mediate neointimal hyperplasia and re-endothelialization following arterial injury. *Cardiovasc Res.* 2015 Nov 1;108(2):288–98.
165. Stallcup WB, Huang FJ. A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression. *Cell Adhes Migr.* 2008 Sep;2(3):192–201.
166. Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms - PubMed [Internet]. [cited 2022 Oct 6]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15210734/>
167. Fransson LA. Glypicans. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Feb;35(2):125–9.
168. Saunders S, Paine-Saunders S, Lander AD. Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain. *Dev Biol.* 1997 Oct 1;190(1):78–93.
169. Subramanian SV, Fitzgerald ML, Bernfield M. Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem.* 1997 Jun 6;272(23):14713–20.
170. Henry-Stanley MJ, Zhang B, Erlandsen SL, Wells CL. Synergistic effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on enterocyte shedding of syndecan-1 and associated decreases in internalization of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Cytokine.* 2006 Jun;34(5–6):252–9.
171. Day RM, Mitchell TJ, Knight SC, Forbes A. Regulation of epithelial syndecan-1 expression by inflammatory cytokines. *Cytokine.* 2003 Mar 7;21(5):224–33.
172. Brule S, Charnaux N, Sutton A, Ledoux D, Chaigneau T, Saffar L, et al. The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metalloproteinase-9. *Glycobiology.* 2006 Jun;16(6):488–501.
173. Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J.* 2010 Oct;277(19):3876–89.
174. Steppan J, Hofer S, Funke B, Brenner T, Henrich M, Martin E, et al. Sepsis and major abdominal surgery lead to flaking of the endothelial glycocalyx. *J Surg Res.* 2011 Jan;165(1):136–41.
175. Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock Augusta Ga.* 2008 Dec;30(6):623–7.
176. Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, et al. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation.* 2007 Oct 23;116(17):1896–906.
177. Seidel C, Ringdén O, Remberger M. Increased levels of syndecan-1 in serum during acute graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2003 Jul 27;76(2):423–6.
178. Joensuu H, Anttonen A, Eriksson M, Mäkitaro R, Alfthan H, Kinnula V, et al. Soluble syndecan-1 and serum basic fibroblast growth factor are new prognostic factors in lung cancer. *Cancer Res.* 2002 Sep 15;62(18):5210–7.
179. Yang Y, Yaccoby S, Liu W, Langford JK, Pumphrey CY, Theus A, et al. Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood.* 2002 Jul 15;100(2):610–7.



180. Kainulainen V, Wang H, Schick C, Bernfield M. Syndecans, heparan sulfate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound fluids. *J Biol Chem*. 1998 May 8;273(19):11563–9.
181. Kato M, Wang H, Kainulainen V, Fitzgerald ML, Ledbetter S, Ornitz DM, et al. Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. *Nat Med*. 1998 Jun;4(6):691–7.
182. De Cat B, Muyldermans SY, Coomans C, Degeest G, Vanderschueren B, Creemers J, et al. Processing by proprotein convertases is required for glypican-3 modulation of cell survival, Wnt signaling, and gastrulation movements. *J Cell Biol*. 2003 Nov 10;163(3):625–35.
183. Traister A, Shi W, Filmus J. Mammalian Notum induces the release of glypicans and other GPI-anchored proteins from the cell surface. *Biochem J*. 2008 Mar 15;410(3):503–11.
184. Filmus J, Capurro M, Rast J. Glypicans. *Genome Biol*. 2008;9(5):224.
185. Litwack ED, Ivins JK, Kumbasar A, Paine-Saunders S, Stipp CS, Lander AD. Expression of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in the developing rodent. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. 1998 Jan;211(1):72–87.
186. Asundi VK, Keister BF, Stahl RC, Carey DJ. Developmental and cell-type-specific expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans in the rat heart. *Exp Cell Res*. 1997 Jan 10;230(1):145–53.
187. Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, Baybayan P, Chen EY, Huber R, et al. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet*. 1996 Mar;12(3):241–7.
188. Cano-Gauci DF, Song HH, Yang H, McKerlie C, Choo B, Shi W, et al. Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J Cell Biol*. 1999 Jul 12;146(1):255–64.
189. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease - PubMed [Internet]. [cited 2022 Oct 6]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23719536/>
190. Teglund S, Toftgård R. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Apr;1805(2):181–208.
191. Williamson D, Selfe J, Gordon T, Lu YJ, Pritchard-Jones K, Murai K, et al. Role for amplification and expression of glypican-5 in rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*. 2007 Jan 1;67(1):57–65.
192. Hahn H, Wojnowski L, Zimmer AM, Hall J, Miller G, Zimmer A. Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat Med*. 1998 May;4(5):619–22.
193. Glypican-5 stimulates rhabdomyosarcoma cell proliferation by activating Hedgehog signaling - PubMed [Internet]. [cited 2022 Oct 6]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21339334/>
194. Capurro MI, Xu P, Shi W, Li F, Jia A, Filmus J. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Dev Cell*. 2008 May;14(5):700–11.
195. Capurro MI, Shi W, Filmus J. LRP1 mediates Hedgehog-induced endocytosis of the GPC3-Hedgehog complex. *J Cell Sci*. 2012 Jul 15;125(Pt 14):3380–9.
196. Filmus J, Capurro M. The role of glypicans in Hedgehog signaling. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2014 Apr;35:248–52.

197. Glypican-3 promotes cell proliferation and tumorigenesis through up-regulation of  $\beta$ -catenin expression in lung squamous cell carcinoma - PubMed [Internet]. [cited 2022 Oct 6]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31160489/>
198. Li N, Spetz MR, Ho M. The Role of Glypicans in Cancer Progression and Therapy. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 2020 Dec;68(12):841–62.
199. Hill JJ, Jin K, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Intracerebral chondroitinase ABC and heparan sulfate proteoglycan glypican improve outcome from chronic stroke in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun 5;109(23):9155–60.
200. Muendlein A, Brandtner EM, Leiherer A, Geiger K, Heinzle C, Gaenger S, et al. Serum glypican-4 is a marker of future vascular risk and mortality in coronary angiography patients. *Atherosclerosis.* 2022 Mar;345:33–8.
201. Melleby AO, Strand ME, Romaine A, Herum KM, Skrbic B, Dahl CP, et al. The Heparan Sulfate Proteoglycan Glypican-6 Is Upregulated in the Failing Heart, and Regulates Cardiomyocyte Growth through ERK1/2 Signaling. *PLoS One.* 2016;11(10):e0165079.
202. Couchman JR. Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:89–114.
203. Keller-Pinter A, Gyulai-Nagy S, Becsky D, Dux L, Rovo L. Syndecan-4 in Tumor Cell Motility. *Cancers.* 2021 Jul 1;13(13):3322.
204. Couchman JR. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Dec;4(12):926–37.
205. Halden Y, Rek A, Atzenhofer W, Szilak L, Wabnig A, Kungl AJ. Interleukin-8 binds to syndecan-2 on human endothelial cells. *Biochem J.* 2004 Jan 15;377(Pt 2):533–8.
206. Dobra K, Nurminen M, Hjerpe A. Growth factors regulate the expression profile of their syndecan co-receptors and the differentiation of mesothelioma cells. *Anticancer Res.* 2003 Jun;23(3B):2435–44.
207. Cizmeci-Smith G, Langan E, Youkey J, Showalter LJ, Carey DJ. Syndecan-4 is a primary-response gene induced by basic fibroblast growth factor and arterial injury in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Jan;17(1):172–80.
208. Geary RL, Koyama N, Wang TW, Vergel S, Clowes AW. Failure of heparin to inhibit intimal hyperplasia in injured baboon arteries. The role of heparin-sensitive and -insensitive pathways in the stimulation of smooth muscle cell migration and proliferation. *Circulation.* 1995 Jun 15;91(12):2972–81.
209. Li J, Brown LF, Laham RJ, Volk R, Simons M. Macrophage-dependent regulation of syndecan gene expression. *Circ Res.* 1997 Nov;81(5):785–96.
210. Stepp MA, Gibson HE, Gala PH, Iglesia DDS, Pajooohesh-Ganji A, Pal-Ghosh S, et al. Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *J Cell Sci.* 2002 Dec 1;115(Pt 23):4517–31.
211. Götte M. Syndecans in inflammation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2003 Apr;17(6):575–91.
212. Kramer KL, Yost HJ. Ectodermal syndecan-2 mediates left-right axis formation in migrating mesoderm as a cell-nonautonomous Vg1 cofactor. *Dev Cell.* 2002 Jan;2(1):115–24.
213. Strader AD, Reizes O, Woods SC, Benoit SC, Seeley RJ. Mice lacking the syndecan-3 gene are resistant to diet-induced obesity. *J Clin Invest.* 2004 Nov;114(9):1354–60.
214. Echtermeyer F, Streit M, Wilcox-Adelman S, Saoncella S, Denhez F, Detmar M, et al. Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest.* 2001 Jan;107(2):R9–14.

215. Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, Morimoto J, Sato M, Tanaka S, et al. Syndecan-4 prevents cardiac rupture and dysfunction after myocardial infarction. *Circ Res*. 2011 May 27;108(11):1328–39.
216. Apte SS, Parks WC. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2015 Jul;44–46:1–6.
217. Weber S, Saftig P. Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Dev Camb Engl*. 2012 Oct;139(20):3693–709.
218. Dubail J, Apte SS. Insights on ADAMTS proteases and ADAMTS-like proteins from mammalian genetics. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2015 Jul;44–46:24–37.
219. Nam EJ, Park PW. Shedding of cell membrane-bound proteoglycans. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2012;836:291–305.
220. Choi S, Lee H, Choi JR, Oh ES. Shedding; towards a new paradigm of syndecan function in cancer. *BMB Rep*. 2010 May;43(5):305–10.
221. Sanderson RD, Elkin M, Rapraeger AC, Ilan N, Vlodaysky I. Heparanase regulation of cancer, autophagy and inflammation: new mechanisms and targets for therapy. *FEBS J*. 2017 Jan;284(1):42–55.
222. Lu Z, Song N, Shen B, Xu X, Fang Y, Shi Y, et al. Syndecan-1 Shedding Inhibition to Protect Against Ischemic Acute Kidney Injury Through HGF Target Signaling Pathway. *Transplantation*. 2018 Jul;102(7):e331–44.
223. Wu H, Chen Z, Chen JZ, Xie J, Xu B. Resveratrol Improves Tube Formation in AGE-Induced Late Endothelial Progenitor Cells by Suppressing Syndecan-4 Shedding. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:9045976.
224. Stewart MD, Ramani VC, Sanderson RD. Shed syndecan-1 translocates to the nucleus of cells delivering growth factors and inhibiting histone acetylation: a novel mechanism of tumor-host cross-talk. *J Biol Chem*. 2015 Jan 9;290(2):941–9.
225. Lipphardt M, Song JW, Ratliff BB, Dihazi H, Müller GA, Goligorsky MS. Endothelial dysfunction is a superinducer of syndecan-4: fibrogenic role of its ectodomain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018 Mar 1;314(3):H484–96.
226. Bertrand J, Bollmann M. Soluble syndecans: biomarkers for diseases and therapeutic options. *Br J Pharmacol*. 2019 Jan;176(1):67–81.
227. Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, et al. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1992;8:365–93.
228. Zimmermann P, David G. The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1999;13 Suppl:S91–100.
229. Launay G, Salza R, Multedo D, Thierry-Mieg N, Ricard-Blum S. MatrixDB, the extracellular matrix interaction database: updated content, a new navigator and expanded functionalities. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D321–327.
230. Clerc O, Deniaud M, Vallet SD, Naba A, Rivet A, Perez S, et al. MatrixDB: integration of new data with a focus on glycosaminoglycan interactions. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D376–81.
231. Orchard S, Ammari M, Aranda B, Breuza L, Briganti L, Broackes-Carter F, et al. The MIntAct project--IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(Database issue):D358–363.

232. Derksen PWB, Keehnen RMJ, Evers LM, van Oers MHJ, Spaargaren M, Pals ST. Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. *Blood*. 2002 Feb 15;99(4):1405–10.
233. Ren Z, van Andel H, de Lau W, Hartholt RB, Maurice MM, Clevers H, et al. Syndecan-1 promotes Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in multiple myeloma by presenting Wnts and R-spondins. *Blood*. 2018 Mar 1;131(9):982–94.
234. Goetz R, Mohammadi M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Mar;14(3):166–80.
235. Yang X, Qiao D, Meyer K, Friedl A. Signal transducers and activators of transcription mediate fibroblast growth factor-induced vascular endothelial morphogenesis. *Cancer Res*. 2009 Feb 15;69(4):1668–77.
236. Carulli S, Beck K, Dayan G, Boulesteix S, Lortat-Jacob H, Rousselle P. Cell surface proteoglycans syndecan-1 and -4 bind overlapping but distinct sites in laminin  $\alpha$ 3 LG45 protein domain. *J Biol Chem*. 2012 Apr 6;287(15):12204–16.
237. Wang Z, Collighan RJ, Gross SR, Danen EHJ, Orend G, Telci D, et al. RGD-independent cell adhesion via a tissue transglutaminase-fibronectin matrix promotes fibronectin fibril deposition and requires syndecan-4/2  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin co-signaling. *J Biol Chem*. 2010 Dec 17;285(51):40212–29.
238. Dews IC, Mackenzie KR. Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 26;104(52):20782–7.
239. Oh ES, Woods A, Couchman JR. Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C. *J Biol Chem*. 1997 May 2;272(18):11805–11.
240. Woods A, Couchman JR. Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell*. 1994 Feb;5(2):183–92.
241. Horowitz A, Murakami M, Gao Y, Simons M. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate mediates the interaction of syndecan-4 with protein kinase C. *Biochemistry*. 1999 Nov 30;38(48):15871–7.
242. Oh ES, Woods A, Couchman JR. Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C. *J Biol Chem*. 1997 May 2;272(18):11805–11.
243. Yi JY, Han I, Oh ES. Transmembrane domain-dependent functional oligomerization of syndecans. *ScientificWorldJournal*. 2006 Apr 6;6:457–9.
244. Choi S, Lee E, Kwon S, Park H, Yi JY, Kim S, et al. Transmembrane domain-induced oligomerization is crucial for the functions of syndecan-2 and syndecan-4. *J Biol Chem*. 2005 Dec 30;280(52):42573–9.
245. Choi Y, Kim S, Lee J, Ko SG, Lee W, Han IO, et al. The oligomeric status of syndecan-4 regulates syndecan-4 interaction with alpha-actinin. *Eur J Cell Biol*. 2008 Oct;87(10):807–15.
246. Choi Y, Kwon MJ, Lim Y, Yun JH, Lee W, Oh ES. Trans-regulation of Syndecan Functions by Hetero-oligomerization. *J Biol Chem*. 2015 Jul 3;290(27):16943–53.
247. Alexopoulou AN, Multhaupt HAB, Couchman JR. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(3):505–28.
248. Effenbein A, Simons M. Syndecan-4 signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2013 Sep 1;126(Pt 17):3799–804.

249. Grootjans JJ, Zimmermann P, Reekmans G, Smets A, Degeest G, Dürr J, et al. Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 9;94(25):13683–8.
250. Cohen AR, Wood DF, Marfatia SM, Walther Z, Chishti AH, Anderson JM. Human CASK/LIN-2 Binds Syndecan-2 and Protein 4.1 and Localizes to the Basolateral Membrane of Epithelial Cells. *J Cell Biol*. 1998 Jul 13;142(1):129–38.
251. Altemeier WA, Schlesinger SY, Buell CA, Parks WC, Chen P. Syndecan-1 controls cell migration by activating Rap1 to regulate focal adhesion disassembly. *J Cell Sci*. 2012 Nov 1;125(Pt 21):5188–95.
252. Gao Y, Li M, Chen W, Simons M. Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J Cell Physiol*. 2000 Sep;184(3):373–9.
253. Shepherd TR, Klaus SM, Liu X, Ramaswamy S, DeMali KA, Fuentes EJ. The Tiam1 PDZ domain couples to Syndecan1 and promotes cell-matrix adhesion. *J Mol Biol*. 2010 May 21;398(5):730–46.
254. Ethell IM, Hagihara K, Miura Y, Irie F, Yamaguchi Y. Synbindin, A novel syndecan-2-binding protein in neuronal dendritic spines. *J Cell Biol*. 2000 Oct 2;151(1):53–68.
255. Choi Y, Chung H, Jung H, Couchman JR, Oh ES. Syndecans as cell surface receptors: Unique structure equates with functional diversity. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2011 Mar;30(2):93–9.
256. Tabibiazar R, Rockson SG. Angiogenesis and the ischaemic heart. *Eur Heart J*. 2001 Jun;22(11):903–18.
257. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997 Apr 17;386(6626):671–4.
258. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:73–91.
259. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklom P, Kessler R, et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Dev Camb Engl*. 1988 Mar;102(3):471–8.
260. Balaji S, King A, Crombleholme TM, Keswani SG. The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Adv Wound Care*. 2013 Jul;2(6):283–95.
261. Heil M, Schaper W. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res*. 2004 Sep 3;95(5):449–58.
262. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):389–95.
263. Tomanek RJ. Exercise-induced coronary angiogenesis: a review. *Med Sci Sports Exerc*. 1994 Oct;26(10):1245–51.
264. Gibaldi M. Regulating angiogenesis: a new therapeutic strategy. *J Clin Pharmacol*. 1998 Oct;38(10):898–903.
265. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Gimbrone MA. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1994 Aug;94(2):885–91.
266. Shen H, Clauss M, Ryan J, Schmidt AM, Tijburg P, Borden L, et al. Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood*. 1993 May 15;81(10):2767–73.
267. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte

- procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med.* 1990 Dec 1;172(6):1535–45.
268. Ando J, Nomura H, Kamiya A. The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res.* 1987 Jan;33(1):62–70.
269. Ando J, Kamiya A. Flow-dependent regulation of gene expression in vascular endothelial cells. *Jpn Heart J.* 1996 Jan;37(1):19–32.
270. Costa C, Incio J, Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis.* 2007;10(3):149–66.
271. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1997 May;11(6):457–65.
272. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971 Nov 18;285(21):1182–6.
273. Dusseau JW, Hutchins PM, Malbasa DS. Stimulation of angiogenesis by adenosine on the chick chorioallantoic membrane. *Circ Res.* 1986 Aug;59(2):163–70.
274. Morris PB, Ellis MN, Swain JL. Angiogenic potency of nucleotide metabolites: potential role in ischemia-induced vascular growth. *J Mol Cell Cardiol.* 1989 Apr;21(4):351–8.
275. Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jan 31;92(3):768–72.
276. Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, Koga S, Clauss M, Pinsky DJ, et al. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 9;92(10):4606–10.
277. Semenza GL, Agani F, Iyer N, Kotch L, Laughner E, Leung S, et al. Regulation of cardiovascular development and physiology by hypoxia-inducible factor 1. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Jun 30;874:262–8.
278. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol.* 1996 May;270(5 Pt 2):H1803-1811.
279. Ribatti D, Djonov V. Intussusceptive microvascular growth in tumors. *Cancer Lett.* 2012 Mar 28;316(2):126–31.
280. Carmeliet P, De Smet F, Loges S, Mazzone M. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009 Jun;6(6):315–26.
281. van Hinsbergh VWM, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res.* 2008 May 1;78(2):203–12.
282. Jj F. [Tumor angiogenesis: recent progress and remaining challenges]. *Bull Cancer (Paris)* [Internet]. 2010 Nov [cited 2022 Oct 21];97(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21051315/>
283. Babykutty S, S PP, J NR, Kumar MAS, Nair MS, Srinivas P, et al. Nimbolide retards tumor cell migration, invasion, and angiogenesis by downregulating MMP-2/9 expression via inhibiting ERK1/2 and reducing DNA-binding activity of NF-κB in colon cancer cells. *Mol Carcinog.* 2012 Jun;51(6):475–90.

284. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1825(1):29–36.
285. Kume T. Ligand-dependent Notch signaling in vascular formation. *Adv Exp Med Biol*. 2012;727:210–22.
286. Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol*. 2010 Oct;12(10):943–53.
287. Chappell JC, Taylor SM, Ferrara N, Bautch VL. Local guidance of emerging vessel sprouts requires soluble Flt-1. *Dev Cell*. 2009 Sep;17(3):377–86.
288. Tung JJ, Tattersall IW, Kitajewski J. Tips, stalks, tubes: notch-mediated cell fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Feb;2(2):a006601.
289. Duong CN, Nottebaum AF, Butz S, Volkery S, Zeuschner D, Stehling M, et al. Interference With ESAM (Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule) Plus Vascular Endothelial-Cadherin Causes Immediate Lethality and Lung-Specific Blood Coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020 Feb;40(2):378–93.
290. Bayless KJ, Davis GE. Sphingosine-1-phosphate markedly induces matrix metalloproteinase and integrin-dependent human endothelial cell invasion and lumen formation in three-dimensional collagen and fibrin matrices. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Dec 26;312(4):903–13.
291. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):685–93.
292. Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol*. 2010 Sep;20(9):556–67.
293. 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 Mar;51(3):689–99.
294. VEGF-A induces angiogenesis, arteriogenesis, lymphangiogenesis, and vascular malformations - PubMed [Internet]. [cited 2022 Oct 12]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12858545/>
295. Nilsson M, Heymach JV. Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2006 Oct;1(8):768–70.
296. Sun Y, Xiong X, Wang X. RELA promotes hypoxia-induced angiogenesis in human umbilical vascular endothelial cells via LINC01693/miR-302d/CXCL12 axis. *J Cell Biochem*. 2019 Aug;120(8):12549–58.
297. Scheurer SB, Rybak JN, Rösli C, Neri D, Elia G. Modulation of gene expression by hypoxia in human umbilical cord vein endothelial cells: A transcriptomic and proteomic study. *Proteomics*. 2004 Jun;4(6):1737–60.
298. Zhao K, Yao Y, Luo X, Lin B, Huang Y, Zhou Y, et al. LYG-202 inhibits activation of endothelial cells and angiogenesis through CXCL12/CXCR7 pathway in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2018 Apr 5;39(4):588–600.
299. Yamaguchi J ichi, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003 Mar 11;107(9):1322–8.

300. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002 May 31;109(5):625–37.
301. Ho TK, Shiwen X, Abraham D, Tsui J, Baker D. Stromal-Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as Potential Target of Therapeutic Angiogenesis in Critical Leg Ischaemia. *Cardiol Res Pract*. 2012;2012:143209.
302. Hu X, Dai S, Wu WJ, Tan W, Zhu X, Mu J, et al. 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*. 2007 Aug 7;116(6):654–63.
303. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol*. 2007 Jul;28(7):299–307.
304. Zhang L. Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2010;93:1–17.
305. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 1991 Dec;5(12):1806–14.
306. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*. 1992 Dec 25;267(36):26031–7.
307. Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, et al. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med*. 1999 May;5(5):495–502.
308. Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouché A, Yuce A, et al. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest*. 2002 Feb;109(3):327–36.
309. Gitay-Goren H, Soker S, Vlodavsky I, Neufeld G. The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *J Biol Chem*. 1992 Mar 25;267(9):6093–8.
310. Cébe-Suarez S, Grünwald FS, Jaussi R, Li X, Claesson-Welsh L, Spillmann D, et al. Orf virus VEGF-E NZ2 promotes paracellular NRP-1/VEGFR-2 coreceptor assembly via the peptide RPPR. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2008 Aug;22(8):3078–86.
311. Chiang MK, Flanagan JG. Interactions between the Flk-1 receptor, vascular endothelial growth factor, and cell surface proteoglycan identified with a soluble receptor reagent. *Growth Factors Chur Switz*. 1995;12(1):1–10.
312. Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Kimata K. Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins. *J Biol Chem*. 2005 Sep 9;280(36):31508–15.
313. Njau F, Shushakova N, Schenk H, Wulfmeyer VC, Bollin R, Menne J, et al. Correction: Calcium dobesilate reduces VEGF signaling by interfering with heparan sulfate binding site and protects from vascular complications in diabetic mice. *PLoS One*. 2020;15(12):e0244353.
314. Garay RP, Hannaert P, Chiavaroli C. Calcium dobesilate in the treatment of diabetic retinopathy. *Treat Endocrinol*. 2005;4(4):221–32.



315. Charnaux N, Brule S, Hamon M, Chaigneau T, Saffar L, Prost C, et al. Syndecan-4 is a signaling molecule for stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/ CXCL12. *FEBS J.* 2005 Apr;272(8):1937–51.
316. Brule S, Friand V, Sutton A, Baleux F, Gattegno L, Charnaux N. Glycosaminoglycans and syndecan-4 are involved in SDF-1/CXCL12-mediated invasion of human epitheloid carcinoma HeLa cells. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Dec;1790(12):1643–50.
317. Habuchi H, Suzuki S, Saito T, Tamura T, Harada T, Yoshida K, et al. Structure of a heparan sulphate oligosaccharide that binds to basic fibroblast growth factor. *Biochem J.* 1992 Aug 1;285 ( Pt 3):805–13.
318. Pye DA, Vives RR, Turnbull JE, Hyde P, Gallagher JT. Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity. *J Biol Chem.* 1998 Sep 4;273(36):22936–42.
319. Guimond S, Maccarana M, Olwin BB, Lindahl U, Rapraeger AC. Activating and inhibitory heparin sequences for FGF-2 (basic FGF). Distinct requirements for FGF-1, FGF-2, and FGF-4. *J Biol Chem.* 1993 Nov 15;268(32):23906–14.
320. Ferreras C, Rushton G, Cole CL, Babur M, Telfer BA, van Kuppevelt TH, et al. Endothelial heparan sulfate 6-O-sulfation levels regulate angiogenic responses of endothelial cells to fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 2012 Oct 19;287(43):36132–46.
321. Abramsson A, Kurup S, Busse M, Yamada S, Lindblom P, Schallmeiner E, et al. Defective N-sulfation of heparan sulfate proteoglycans limits PDGF-BB binding and pericyte recruitment in vascular development. *Genes Dev.* 2007 Feb 1;21(3):316–31.
322. Charni F, Friand V, Haddad O, Hlawaty H, Martin L, Vassy R, et al. Syndecan-1 and syndecan-4 are involved in RANTES/CCL5-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Oct;1790(10):1314–26.
323. Maillard L, Saito N, Hlawaty H, Friand V, Suffee N, Chmielewsky F, et al. RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKC $\alpha$  signaling pathway. *Biol Open.* 2014 Sep 26;3(10):995–1004.
324. Chevalier F, Arnaud D, Henault E, Guillevic O, Siñeriz F, Ponsen AC, et al. A fine structural modification of glycosaminoglycans is correlated with the progression of muscle regeneration after ischaemia: towards a matrix-based therapy? *Eur Cell Mater.* 2015 Sep 4;30:51–68.
325. Billings PC, Pacifici M. Interactions of signaling proteins, growth factors and other proteins with heparan sulfate: mechanisms and mysteries. *Connect Tissue Res.* 2015;56(4):272–80.
326. Karamanos NK, Piperigkou Z, Theocharis AD, Watanabe H, Franchi M, Baud S, et al. Proteoglycan Chemical Diversity Drives Multifunctional Cell Regulation and Therapeutics. *Chem Rev.* 2018 Sep 26;118(18):9152–232.
327. Hassan N, Greve B, Espinoza-Sánchez NA, Götte M. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans as multifunctional integrators of signaling in cancer. *Cell Signal.* 2021 Jan;77:109822.
328. Jakobsson L, Kreuger J, Holmborn K, Lundin L, Eriksson I, Kjellén L, et al. Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis. *Dev Cell.* 2006 May;10(5):625–34.
329. van Wijk XMR, van Kuppevelt TH. Heparan sulfate in angiogenesis: a target for therapy. *Angiogenesis.* 2014 Jul;17(3):443–62.

330. Ramasamy S, Lipke DW, Boissonneault GA, Guo H, Hennig B. Oxidized lipid-mediated alterations in proteoglycan metabolism in cultured pulmonary endothelial cells. *Atherosclerosis*. 1996 Feb;120(1–2):199–208.
331. Fukai N, Kenagy RD, Chen L, Gao L, Daum G, Clowes AW. Syndecan-1: an inhibitor of arterial smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Sep;29(9):1356–62.
332. Hollmann J, Schmidt A, von Bassewitz DB, Buddecke E. Relationship of sulfated glycosaminoglycans and cholesterol content in normal and arteriosclerotic human aorta. *Arterioscler Dallas Tex*. 1989 Apr;9(2):154–8.
333. Heparan Sulfate Mimetics Accelerate Postinjury Skeletal Muscle Regeneration - PubMed [Internet]. [cited 2022 Oct 18]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31062647/>
334. Garud DR, Tran VM, Victor XV, Koketsu M, Kuberan B. Inhibition of heparan sulfate and chondroitin sulfate proteoglycan biosynthesis. *J Biol Chem*. 2008 Oct 24;283(43):28881–7.
335. Robinson J, Gospodarowicz D. Effect of p-nitrophenyl-beta-D-xyloside on proteoglycan synthesis and extracellular matrix formation by bovine corneal endothelial cell cultures. *J Biol Chem*. 1984 Mar 25;259(6):3818–24.
336. Raman K, Ninomiya M, Nguyen TKN, Tsuzuki Y, Koketsu M, Kuberan B. Novel glycosaminoglycan biosynthetic inhibitors affect tumor-associated angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jan 7;404(1):86–9.
337. Ramani VC, Pruett PS, Thompson CA, DeLucas LD, Sanderson RD. Heparan sulfate chains of syndecan-1 regulate ectodomain shedding. *J Biol Chem*. 2012 Mar 23;287(13):9952–61.
338. Yang Y, Macleod V, Miao HQ, Theus A, Zhan F, Shaughnessy JD, et al. Heparanase enhances syndecan-1 shedding: a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. *J Biol Chem*. 2007 May 4;282(18):13326–33.
339. Friand V, Haddad O, Papy-Garcia D, Hlawaty H, Vassy R, Hamma-Kourbali Y, et al. Glycosaminoglycan mimetics inhibit SDF-1/CXCL12-mediated migration and invasion of human hepatoma cells. *Glycobiology*. 2009 Dec;19(12):1511–24.
340. Longley RL, Woods A, Fleetwood A, Cowling GJ, Gallagher JT, Couchman JR. Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J Cell Sci*. 1999 Oct;112 ( Pt 20):3421–31.
341. Zong F, Fthenou E, Mundt F, Szatmári T, Kovalszky I, Szilák L, et al. Specific syndecan-1 domains regulate mesenchymal tumor cell adhesion, motility and migration. *PloS One*. 2011;6(6):e14816.
342. Rodríguez-Manzanares JC, Carpizo D, Plaza-Calonge M del C, Torres-Collado AX, Thai SNM, Simons M, et al. Cleavage of syndecan-4 by ADAMTS1 provokes defects in adhesion. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Apr;41(4):800–10.
343. Tkachenko E, Effenbein A, Tirziu D, Simons M. Syndecan-4 clustering induces cell migration in a PDZ-dependent manner. *Circ Res*. 2006 Jun 9;98(11):1398–404.
344. LeBaron RG, Esko JD, Woods A, Johansson S, Höök M. Adhesion of glycosaminoglycan-deficient chinese hamster ovary cell mutants to fibronectin substrata. *J Cell Biol*. 1988 Mar;106(3):945–52.

345. Woods A, McCarthy JB, Furcht LT, Couchman JR. A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation. *Mol Biol Cell*. 1993 Jun;4(6):605–13.
346. Gopal S, Sogaard P, Multhaupt HAB, Pataki C, Okina E, Xian X, et al. Transmembrane proteoglycans control stretch-activated channels to set cytosolic calcium levels. *J Cell Biol*. 2015 Sep 28;210(7):1199–211.
347. Corti F, Wang Y, Rhodes JM, Atri D, Archer-Hartmann S, Zhang J, et al. N-terminal syndecan-2 domain selectively enhances 6-O heparan sulfate chains sulfation and promotes VEGFA165-dependent neovascularization. *Nat Commun*. 2019 Apr 5;10(1):1562.
348. Haddad O, Guyot E, Marinval N, Chevalier F, Maillard L, Gadi L, et al. Heparanase and Syndecan-4 Are Involved in Low Molecular Weight Fucoidan-Induced Angiogenesis. *Mar Drugs*. 2015 Oct 28;13(11):6588–608.
349. Genetic alteration of endothelial heparan sulfate selectively inhibits tumor angiogenesis - PubMed [Internet]. [cited 2022 Oct 18]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17470635/>
350. Rouet V, Hamma-Kourbali Y, Petit E, Panagopoulou P, Katsoris P, Barritault D, et al. A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis. *J Biol Chem*. 2005 Sep 23;280(38):32792–800.
351. Khelif Y, Toutain J, Quittet MS, Chantepie S, Laffray X, Valable S, et al. A heparan sulfate-based matrix therapy reduces brain damage and enhances functional recovery following stroke. *Theranostics*. 2018;8(21):5814–27.
352. Sarlon G, Zemani F, David L, Duong Van Huyen JP, Dizier B, Grelac F, et al. Therapeutic effect of fucoidan-stimulated endothelial colony-forming cells in peripheral ischemia. *J Thromb Haemost JTH*. 2012 Jan;10(1):38–48.
353. Suffee N, Hlawaty H, Meddahi-Pelle A, Maillard L, Louedec L, Haddad O, et al. RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. *Angiogenesis*. 2012 Dec;15(4):727–44.
354. Sun LL, Xiao L, Du XL, Hong L, Li CL, Jiao J, et al. MiR-205 promotes endothelial progenitor cell angiogenesis and deep vein thrombosis recanalization and resolution by targeting PTEN to regulate Akt/autophagy pathway and MMP2 expression. *J Cell Mol Med*. 2019 Dec;23(12):8493–504.
355. Bassand K, Metzinger L, Naïm M, Mouhoubi N, Haddad O, Assoun V, et al. miR-126-3p is essential for CXCL12-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2021 Jun 12;
356. Murphy JW, Cho Y, Sachpatzidis A, Fan C, Hodsdon ME, Lolis E. Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 alpha) binding to heparin. *J Biol Chem*. 2007 Mar 30;282(13):10018–27.
357. Purnama A, Aid-Launais R, Haddad O, Maire M, Mantovani D, Letourneur D, et al. Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv Transl Res*. 2015 Apr;5(2):187–97.

# Annexes

## ***Annexe1: miR-126-3p is essential for CXCL12-induced angiogenesis***

### **Résumé :**


L'athérosclérose fait partie des maladies cardiovasculaires et représente une des principales causes de décès dans le monde. Au stade ultime de son évolution, l'athérosclérose provoque une obstruction des vaisseaux sanguins, aboutissant à l'ischémie. Pour rétablir un flux sanguin normal, l'organisme stimule un processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins, appelé angiogenèse. Ce processus est régulé par des facteurs de croissance et des chimiokines telles que CXCL12, mais aussi par des microARN (miR). Les miR sont des petits ARN non codants capables de réguler l'expression des gènes. De ce fait, nous avons étudié l'axe miR-126/CXCL12 dans l'angiogenèse. Ainsi, nous avons comparé l'effet des deux brins du miR-126, miR-126-3p et du miR-126-5p, sur l'angiogenèse induite par CXCL12.

Dans ces conditions, nous avons étudié le processus d'angiogenèse *in vitro* à travers l'analyse de la migration en chambre de Boyden et la formation de réseaux vasculaires sur Matrigel, en utilisant des cellules endothéliales humaines (HUVEC). Nous avons également analysé l'angiogenèse *ex vivo* sur un modèle d'anneaux aortiques de rats.

Les résultats ont montré de façon originale que CXCL12 induit l'expression du miR-126-3p *in vitro* et *ex vivo*. Nous avons également démontré l'implication du miR-126-3p dans les effets pro-angiogéniques de CXCL12. En effet, les résultats montrent une augmentation de l'angiogenèse et de la migration induites par CXCL12 lorsque les cellules sont transfectées par le miR-126-3p. Nous avons ensuite démontré que l'expression de SPRED1, une cible potentielle du miR-126 est inhibée lorsque les HUVEC sont stimulées par CXCL12 ou lors de la transfection des cellules avec le miR-126-3p. L'inhibition de l'expression de SPRED-1 par un siRNA-SPRED1 induit une augmentation des effets pro-angiogéniques de CXCL12. Ces résultats décrivent de façon originale, le rôle du miR-126 et de SPRED1 dans l'angiogenèse induite par CXCL12.

## ORIGINAL ARTICLE

## miR-126-3p is essential for CXCL12-induced angiogenesis

Kévin Bassand<sup>1</sup>  | Laurent Metzinger<sup>2</sup> | Meriem Naïm<sup>1</sup> | Nesrine Mouhoubi<sup>1</sup> | Oualid Haddad<sup>1</sup> | Vincent Assoun<sup>1</sup> | Naïma Zaïdi<sup>1</sup> | Odile Sainte-Catherine<sup>1</sup> | Amena Butt<sup>1</sup> | Erwan Guyot<sup>1,3</sup> | Olivier Oudar<sup>1</sup> | Christelle Laguillier-Morizot<sup>1,3</sup> | Angela Sutton<sup>1,3</sup> | Nathalie Charnaux<sup>1,3</sup> | Valérie Metzinger-Le Meuth<sup>1</sup> | Hanna Hlawaty<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Sciences (LVTS), UFR SMBH Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France

<sup>2</sup>HEMATIM UR 4666, Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), Université de Picardie Jules Verne, CHU-Amiens-Picardie, Amiens, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Biochimie, Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France

**Correspondence**

Kévin Bassand and Hanna Hlawaty, 74 rue Marcel Cachin, UFR SMBH Université Sorbonne Paris Nord, INSERM U1148, LVTS, Bureau 224, 93000 Bobigny, France. Emails: bassand.k@gmail.com (KB); hanna.hlawaty@univ-paris13.fr (HH)

**Funding information**

The authors thank the Ecole doctorale Galilée and the Université Sorbonne Paris Nord for their support. This work was also supported by BQR (Bonus Qualité Recherche) grant of Commission Recherche du CAC from Université Sorbonne Paris Nord

**Abstract**

Atherosclerosis, in the ultimate stage of cardiovascular diseases, causes an obstruction of vessels leading to ischemia and finally to necrosis. To restore vascularization and tissue regeneration, stimulation of angiogenesis is necessary. Chemokines and microRNAs (miR) were studied as pro-angiogenic agents. We analysed the miR-126/CXCL12 axis and compared impacts of both miR-126-3p and miR-126-5p strands effects in CXCL12-induced angiogenesis. Indeed, the two strands of miR-126 were previously shown to be active but were never compared together in the same experimental conditions regarding their differential functions in angiogenesis. In this study, we analysed the 2D-angiogenesis and the migration assays in HUVEC in vitro and in rat's aortic rings ex vivo, both transfected with premiR-126-3p/-5p or anti-miR-126-3p/-5p strands and stimulated with CXCL12. First, we showed that CXCL12 had pro-angiogenic effects in vitro and ex vivo associated with overexpression of miR-126-3p in HUVEC and rat's aortas. Second, we showed that 2D-angiogenesis and migration induced by CXCL12 was abolished in vitro and ex vivo after miR-126-3p inhibition. Finally, we observed that SPRED-1 (one of miR-126-3p targets) was inhibited after CXCL12 treatment in HUVEC leading to improvement of CXCL12 pro-angiogenic potential in vitro. Our results proved for the first time: 1-the role of CXCL12 in modulation of miR-126 expression; 2-the involvement of miR-126 in CXCL12 pro-angiogenic effects; 3-the involvement of SPRED-1 in angiogenesis induced by miR-126/CXCL12 axis.

**KEYWORDS**

angiogenesis, chemokine CXCL12, endothelial cells, miR-126

Metzinger and Naïm these authors have contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2021 The Authors. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* published by Foundation for Cellular and Molecular Medicine and John Wiley & Sons Ltd.

## 1 | INTRODUCTION

Atherosclerosis is a vascular pathology leading to the partial or the total obstruction of the blood vessels and flow perturbation, the decrease in oxygen and nutrients leading to ischemia, cell death and finally to the tissue necrosis. To prevent the necrosis and induce tissue regeneration, angiogenesis needs to be initiated. This physiological process, which involves endothelial cells (EC) response to several stimuli, consists of cell proliferation, migration and cell-to-cell interactions to form functional vessels. In an ischemic tissue, the oxygen decrease allows the synthesis of pro-angiogenic factors secreted by adjacent EC in order to stimulate angiogenesis. Among these factors, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A and Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 bind to their tyrosine kinase receptors to induce intracellular signalling pathways involved in angiogenesis.<sup>1</sup> The chemokines are the small soluble proteins belonging to the family of chemoattractant cytokines that are secreted in ischemic areas.<sup>2,3</sup> Interestingly, we and others have already shown that chemokines can also be involved in angiogenesis.<sup>4,5</sup> CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) presence in the ischemic tissue allows for the recruitment of endothelial progenitor cells leading to local reendothelialization.<sup>6</sup> In addition, CXCL12 stimulates angiogenesis by binding to their specific seven transmembrane domains receptors coupled to G proteins, such as CXCR4 or CXCR7. This binding induces the intracellular signalling pathways involved in angiogenesis such as the MAPK Erk1/2.<sup>7</sup> This phenomenon can also be stimulated by modulation of microRNA (miRs) expression.<sup>8</sup> miRs are small, single-stranded, non-coding RNAs involved in the regulation of gene expression. By binding to their specific targeted mRNAs, they can induce their total degradation or repress their protein translation.<sup>9</sup> Over the last few years, miRs have been extensively studied in the context of angiogenic processes. Indeed, three classes of miRs could be dissociated: pro-angiogenic miRs, anti-angiogenic miRs and miRs with a dual role.<sup>10</sup> Among them, miR-126, strongly expressed in EC, has been found to be implicated in angiogenesis.<sup>11,12</sup> miR strand selection determines which one of the two strands (-5p or -3p) becomes the active strand, and this varies according to cell type and disease state.<sup>13</sup> Interestingly, it was previously shown that both strands of miR can be functional and have different targets.<sup>14-16</sup> In some miR species, including miR-126, both the passenger strand (miR-126-5p) and guide strand (miR-126-3p) have been shown to improve the biological effects, complicating the interpretation of their action.<sup>16</sup> The pro-angiogenic role of miR-126-3p has been extensively studied. Indeed, it is implicated in the Erk1/2 signalling pathway induced by VEGF-A through a repression of the protein SPRED-1<sup>17</sup> whose role is to inhibit the expression of the small protein G Ras.<sup>18</sup> Although mainly degraded, miR-126-5p has also demonstrated its pro-angiogenic role *in vitro*, but also *in vivo* by reduction of intimal hyperplasia and by stimulation of EC proliferation.<sup>19</sup> In EC, the link between miR-126-3p and chemokine CXCL12 has been already demonstrated.<sup>20</sup> Indeed,

we have previously shown that overexpression of miR-126 led to an increase of CXCR4 protein expression, a CXCL12's receptor.<sup>21</sup> Finally, overexpression of miR-126 caused an increase of CXCL12 synthesis by EC.<sup>20</sup>

The originality and interest of our study was to compare in the same experimental conditions the effect of both miR-126-3p and -5p strands in two angiogenesis models, *in vitro* and *ex vivo*. Also, our aim was to determine whether the modulation of their expression (miR-126-3p and -5p) is involved in the vascular tube formation induced by CXCL12.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Cell culture

Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC (ATCC<sup>®</sup> CRL-1730TM) were cultured in Endothelial Cell basal medium 2 (ECBM2, ref C22211, Promocell) and supplemented with 12% of Foetal Bovine Serum (to induce cell division every 16 hours), 5 ng.mL<sup>-1</sup> Epidermal Growth Factor, 0.2  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> hydrocortisone, 0.5 ng.mL<sup>-1</sup> VEGF, 10 ng.mL<sup>-1</sup> bFGF, 20 ng.mL<sup>-1</sup> Insulin like Growth Factor, 1  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> ascorbic acid and 100 Units.mL<sup>-1</sup> of penicillin and 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of streptomycin. The cells were cultured in an incubator at 37°C under a controlled atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

The Huh7 human hepatoma cell line was grown in Dulbecco's minimal essential medium supplemented with glucose (1 g.L<sup>-1</sup>), 10% of Foetal Bovine Serum, streptomycin (100 UI.mL<sup>-1</sup>) and penicillin (100 UI.mL<sup>-1</sup>) (Invitrogen). Cells were grown at 37°C in disposable plastic flasks, in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The medium was replaced twice weekly, and cells were trypsinized and diluted every 3 days at a ratio of 1:3.

### 2.2 | Animal model

Aortas from euthanized Sprague-Dawley rats (Janvier Labs) were harvested. Animals were anesthetized by intraperitoneal pentobarbital injection (60 mg/kg) and sacrificed by abdominal artery section. Experimental protocol was realized in accordance with the European Communities Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) for animal care. Experiments were performed in Université Sorbonne Paris Nord (Bobigny, FRANCE, agreement number A 9300801). Tissues were recovered from euthanized animals obtained from the laboratory of Pr- Carole PLANES (INSERM U1272, Université Sorbonne Paris Nord), whose research protocol was approved by the institutional reviewing with animal experimentation and accorded with animal welfare guidelines (Ministère Français de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, Paris, FRANCE) (CEEA - 005; Comité d'éthique en expérimentation animale Charles Darwin; C2EA-06, authorization C9300801, authorization APAFIS #8150, approved on august 2017, the 8th).

## 2.3 | Western blot

For the SPRED-1 protein expression analysis, 20  $\mu\text{g}$  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 twice 1-hour with 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 1/500e in TBS/T and 5% milk overnight. The detection was made by incubation with a secondary goat anti-mouse antibody diluted to 1/2000e (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).

## 2.4 | Transfection

HUVEC were transfected with premiR-126-3p (Assay ID PM2841, Fisher Scientific), premiR-126-5p (Assay ID PM10401, Fisher Scientific), anti-miR-126-3p (Assay ID AM10401, Fisher Scientific), anti-miR-126-5p (Assay ID AM12841, Fisher Scientific) or scramble negative control (SCL) at the concentration of 20  $\text{nmol.L}^{-1}$  in the presence of INTERFERin transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Polyplus) and incubated for 24 hours at 37°C with 5%  $\text{CO}_2$ . Cells were then harvested for further analysis.

## 2.5 | qRT-PCR

Total RNAs from transfected or not transfected HUVEC were isolated using the RNeasy® Plus minikit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The purity of total RNAs was analysed by measuring the 260/280 and 260/230 nm optical density ratios. Reverse Transcription was performed using 1  $\mu\text{g}$  of total RNA using High Capacity cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystem) according to the manufacturer's instructions. For reverse transcription of miR-126-3p, miR-126-5p or U6 small nuclear RNA (used as an endogenous control for miR expression), specific RT primers were added to the master mix. Finally, PCR reactions were performed with Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystem) using the following Taqman primers: miR-126-3p (Hsa-miR-126-3p-Assay ID 002228, Fisher Scientific), miR-126-5p (Hsa-miR-126-5p-Assay ID 000451, Fisher Scientific), U6 (U6snRNA-Assay ID 001973, Fisher Scientific).

## 2.6 | Aortic ring 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 1 mm 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 premiR-126 or anti-miR-126 (20  $\text{nmol.L}^{-1}$ ) for respectively the miR-126-3p or miR-126-5p species for 48 hours and stimulated or not by CXCL12 at 6  $\text{nmol.L}^{-1}$  (ref.350-NS-050, R&D system) for 96 hours (2  $\times$  48 hours). Finally, the aortic rings were fixed with 4% Paraformaldehyde and photographed under phase contrast microscope to quantify the total coverage area (in  $\text{mm}^2$ ), the quantity of meshes (N) and finally the maximum distance of migration (in mm).

## 2.7 | 2D-angiogenesis

To study the role of miR-126 and CXCL12 in vascular tube formation in vitro, HUVEC were transfected for 18 hours by premiRs-126 or anti-miRs-126 (20  $\text{nmol.L}^{-1}$ ) for respectively the miR-126-3p or miR-126-5p strands. The cells were removed using PBS/EDTA (10 $\text{mmol.L}^{-1}$ ) and 7000 cells were deposited on a thin layer of Matrigel (ref. 354248, Corning) pre-casted in 96-well plates and incubated for 6 hours at 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , stimulated or not by CXCL12 at 6  $\text{nmol.L}^{-1}$ . The results present quantification of the number of meshes carried out under a phase contrast microscope by mapping over an entire well using the Archimed<sup>(TM)</sup> and Histolab<sup>(TM)</sup> software. The representation of the whole well was done using the reconstitution of the different fields. The fields were analysed with the Cartograph module of the Archimed<sup>(TM)</sup> software. The multifocus module allowed us to acquire images on different focus planes in order to obtain the clear image of the whole well. The number of meshes represented by closed areas surrounded by segments and associated junctions formed by HUVECs was quantified by manual tracing using the Histolab<sup>(TM)</sup> software.

## 2.8 | Migration assay

HUVEC migration was studied using a modified Boyden Chamber. First, the upper chamber was precoated with fibronectin (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) 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%  $\text{CO}_2$ . Then, 5.10<sup>4</sup> HUVEC transfected or not were deposited on the upper chamber containing 500  $\mu\text{L}$  of complete ECBM2 medium supplemented with 12% of FBS. Migration was stimulated by adding 1 mL of complete medium with or without CXCL12 at 6  $\text{nmol/L}$  during 24 hours. At the end of the experiment, cells were fixed using 4% of paraformaldehyde, coloured using haematoxylin-Hemalum and quantification of migrated cells was performed under phase contrast microscope.

## 2.9 | Luciferase assay

To study the effect of CXCL12 on egfl7-miR-126 promoter activity, Huh7 cells 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 by CXCL12 for 24 hours at  $6 \text{ nmol.L}^{-1}$ . Detection of luminescence was performed using Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System (Promega) following the manufacturer's instructions.

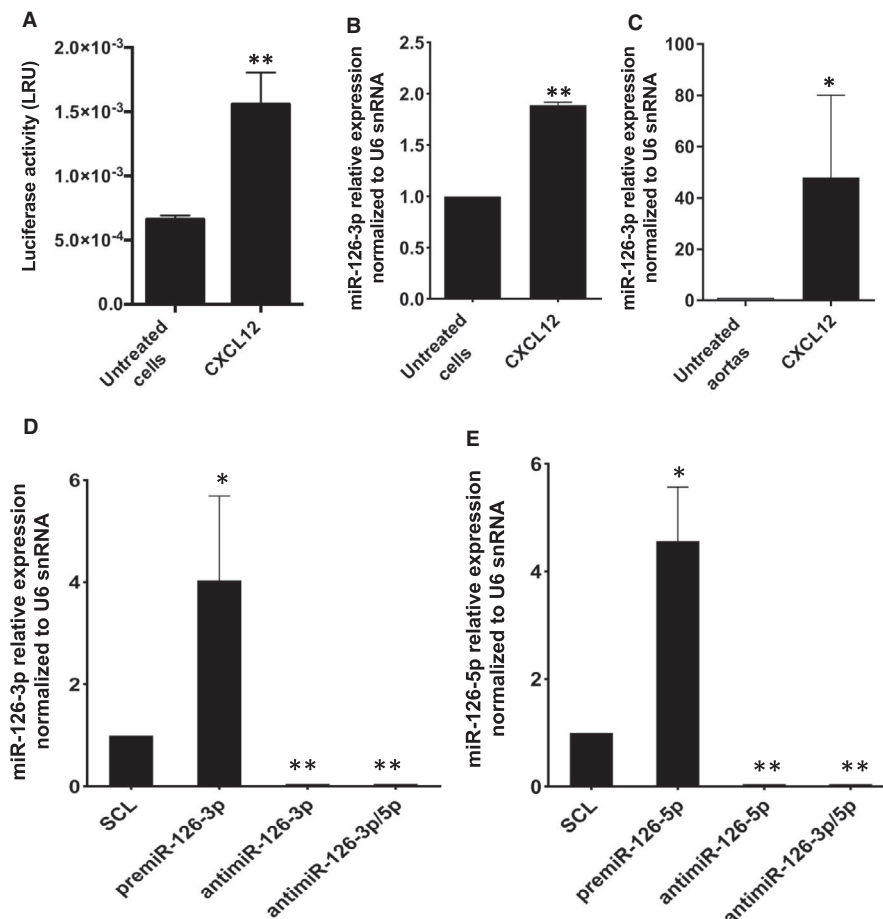
## 2.10 | Statistical analysis

All the results are presented with mean  $\pm$  SEM. For statistical analysis, non-parametric tests were performed using GraphPad Prism software. Independent sample *t* tests (Mann and Whitney) were applied to compare two groups when the data followed a normal distribution and one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare among several groups.  $p < .05$  indicated statistically significant differences.

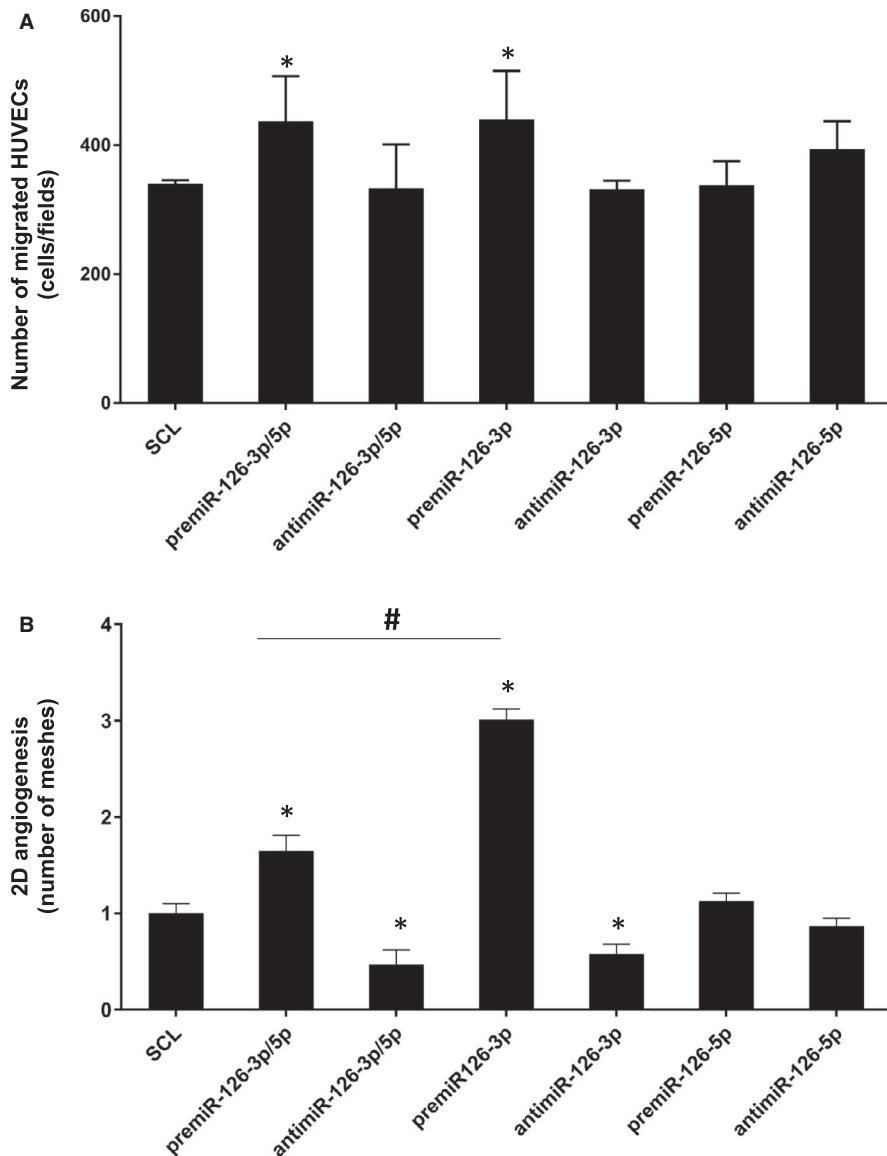
## 3 | RESULTS

### 3.1 | CXCL12-induced miR-126 expression in vitro and ex vivo

We and others showed that miR-126-3p regulates CXCL12 expression. Knowing that miR-126 is encoded by the *egfl7* gene, and in order to study a potential reverse effect of CXCL12 on miR-126 expression, we first decided to study the *egfl7* promoter activity. The results showed (Figure 1A) that there was a significant increase of  $2.35 \pm 0.35$ -fold of promoter activity after stimulation by CXCL12 as compared to untreated cells. To confirm this result, we decided to analyse the miR-126-3p expression in HUVEC and in rat aortas ex vivo after CXCL12 ( $6 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) stimulation for 24 hours. The results showed that there was a significant increase of miR-126-3p level up



**FIGURE 1** CXCL12-induced miR-126-3p endogenous expression in vitro and ex vivo. (A) To study the effect of CXCL12 on *egfl7*-miR-126 promoter activity, Huh7 were co-transfected 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 h at  $6 \text{ nmol.L}^{-1}$ . Detection of luminescence was performed using Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System (Promega). To study the effect of CXCL12 on miR-126 expression level, HUVEC (B) or rat aortas (C) were stimulated or not stimulated by CXCL12 for 24 h at  $6 \text{ nmol.L}^{-1}$ . After total RNA extraction, miR-126 level expression was analysed using qRT-PCR with U6 snRNA as endogenous control. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Three independent experiments were performed for in vitro experiments and six for ex vivo experiments. \*\* $p < .01$  vs Untreated cells; \* $p < .05$  vs Untreated aortas. To analyse the up and down regulation of miR-126-3p and miR-126-5p, HUVEC were transfected with  $20 \text{ nmol.L}^{-1}$  of premiR-126-3p, premiR-126-5p or inhibitors for 24 h. After total RNA extraction, miR-126-3p (D) and miR-126-5p (E) expression levels were analysed performing qRT-PCR using U6 snRNA as endogenous control. The results are expressed with mean  $\pm$  SEM. Three independent experiments were performed. \*\* $p < .01$  vs SCL; \* $p < .05$  vs SCL.



**FIGURE 2** Effect of miR-126-3p and miR-126-5p on HUVEC migration and vascular tubes formation. The miR-126 was up- or down-regulated by transfecting HUVEC with 20 nmol.L<sup>-1</sup> of premiR-126 or inhibitors for 24 h. (A) Migration assay was performed using Boyden chamber. 5.10<sup>4</sup> transfected cells were seeded on the upper compartment during 24 h; the number of migrated cells was determined using phase contrast microscope. (B) Vascular tubes formation in 2D on Matrigel. 7500 transfected cells were deposited on the top of Matrigel and the tubular formation was studied after 6 h of incubation. The quantity of meshes was determined using phase contrast microscope and Archimed<sup>(TM)</sup> and Histolab<sup>(TM)</sup> software. For each assay, three independent experiments were performed. \*p < .05 vs SCL; #p < .01 premiR-126-3p/5p vs premiR-126-3p

to 88 ± 5% when HUVEC were stimulated with CXCL12 as compared to untreated cells (Figure 1B). In addition, in our ex vivo model, there was a significant increase up to 48 ± 32-fold after CXCL12 stimulation as compared to untreated aortas (Figure 1C).

Then, we studied the implications of both strands of miR-126 (miR-126-5p and miR-126-3p) in angiogenesis processes induced by CXCL12. First, we set up the conditions needed to up-regulate (premiR) and down-regulate (antimiR) both miRs strands in HUVEC. The results showed that there was a significant increase of miR-126-3p level up to 4 ± 1.2-fold after premiR-126-3p transfection as compared to scramble negative control (SCL) (Figure 1D).

Moreover there was an abolition of miR-126-3p level after antimiR-126-3p transfection. The transfection with both antimiR-126-3p and antimiR-126-5p (antimiR-3p/5p) induced the same results. In parallel, there was a significant increase of miR-126-5p level up to 4.6 ± 0.8-fold after premiR-126-5p transfection as compared to SCL. In addition, miR-126-5p expression was also extinguished after antimiR-126-5p or both antimiR-126-3p/5p transfection

(Figure 1E). To control the cell viability after the transfection with all miRs, the MTT tests were performed. The results showed (*Data not shown*) that there was no toxicity after any miRs transfection as compared to SCL control.

Our results demonstrated that CXCL12 enhanced miR-126 expression and we validated the up- and down-regulation of the various miRs species.

The second step of this work was to study the role of these miRs on HUVEC migration and two-dimensional (2D) angiogenesis test.

### 3.2 | miR-126-3p increased HUVEC migration and 2D-angiogenesis in vitro

Our results showed that there was a significant increase of HUVEC migration up to 29.4 ± 16% and up to 28.5 ± 15% after premiR-126-3p alone or both premiR-126-3p and premiR-5p (premiR-126-3p/5p) transfection respectively (Figure 2A) as compared to SCL.

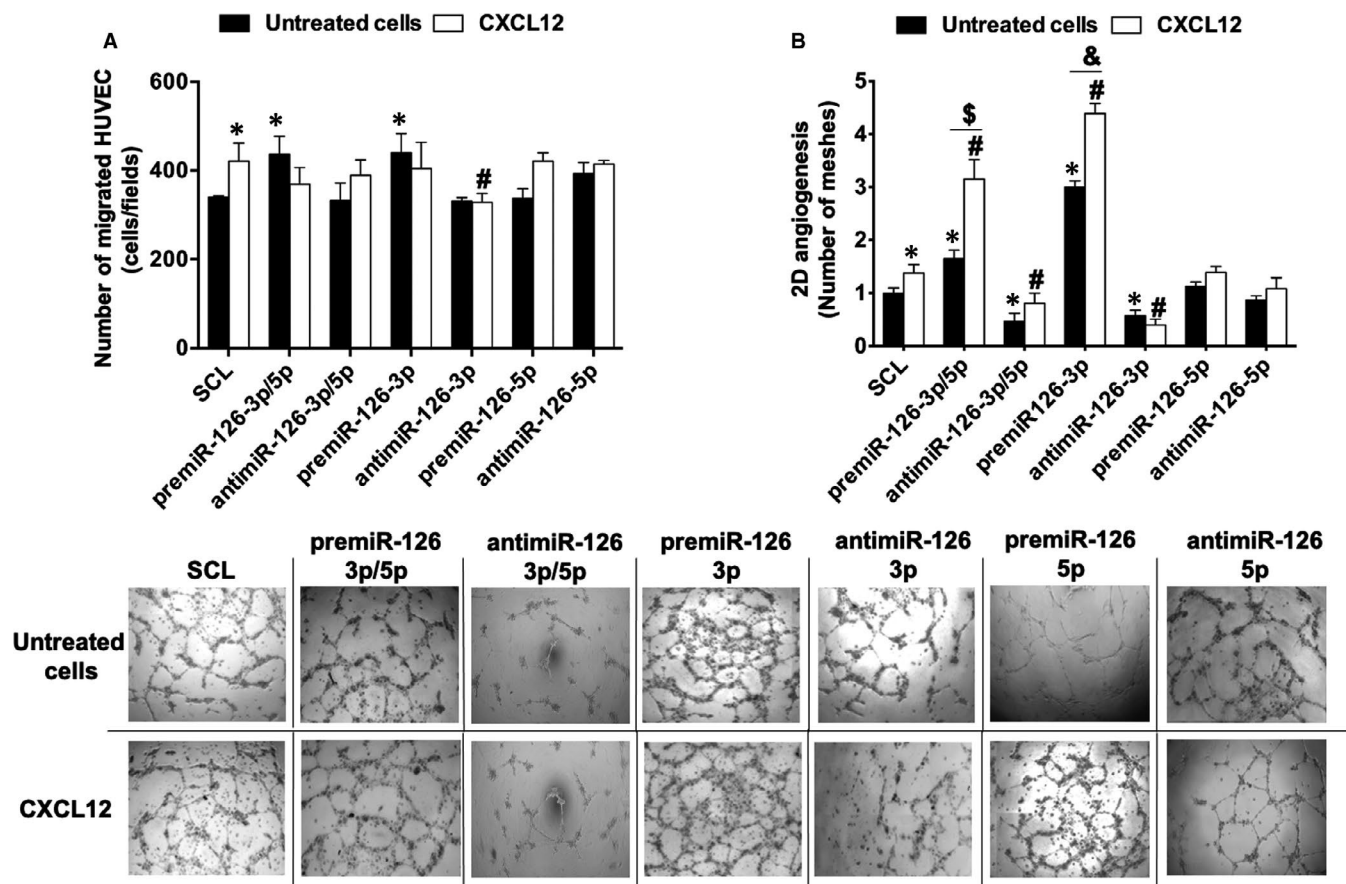
However, there was no effect on cell migration after premiR-126-5p alone, anti-miR-126-3p alone or both anti-miR-126-3p/5p transfection as compared to SCL.

Then, we studied the effect of the various miRs treatments on 2D-angiogenesis by analysing the number of meshes formed by HUVEC on Matrigel layer. The most striking result was a significant increase of the number of meshes up to  $3 \pm 0.1$  fold after premiR-126-3p transfection as compared to SCL (Figure 2B). In contrast, there was no significant effect after transfection of premiR-126-5p only. The transfection of both premiR-126-3p/5p gave an intermediary result with a significant increase of the number of meshes up to  $65 \pm 16\%$ . However, this result was significantly lower than with transfection of premiR-126-3p only, suggesting an inhibitory effect of miR-126-5p on miR-126-3p pro-angiogenic action. In the case of the inhibitory treatments, there was a significant decrease of 2D-angiogenesis up to  $42 \pm 10\%$  after transfection of anti-miR-126-3p only as compared to SCL. Interestingly, the transfection with both anti-miR-126-3p/5p led to a significant decrease of  $53 \pm 15\%$  as compared to SCL. In contrast, there wasn't any effect on 2D-angiogenesis after transfection of anti-miR-126-5p only.

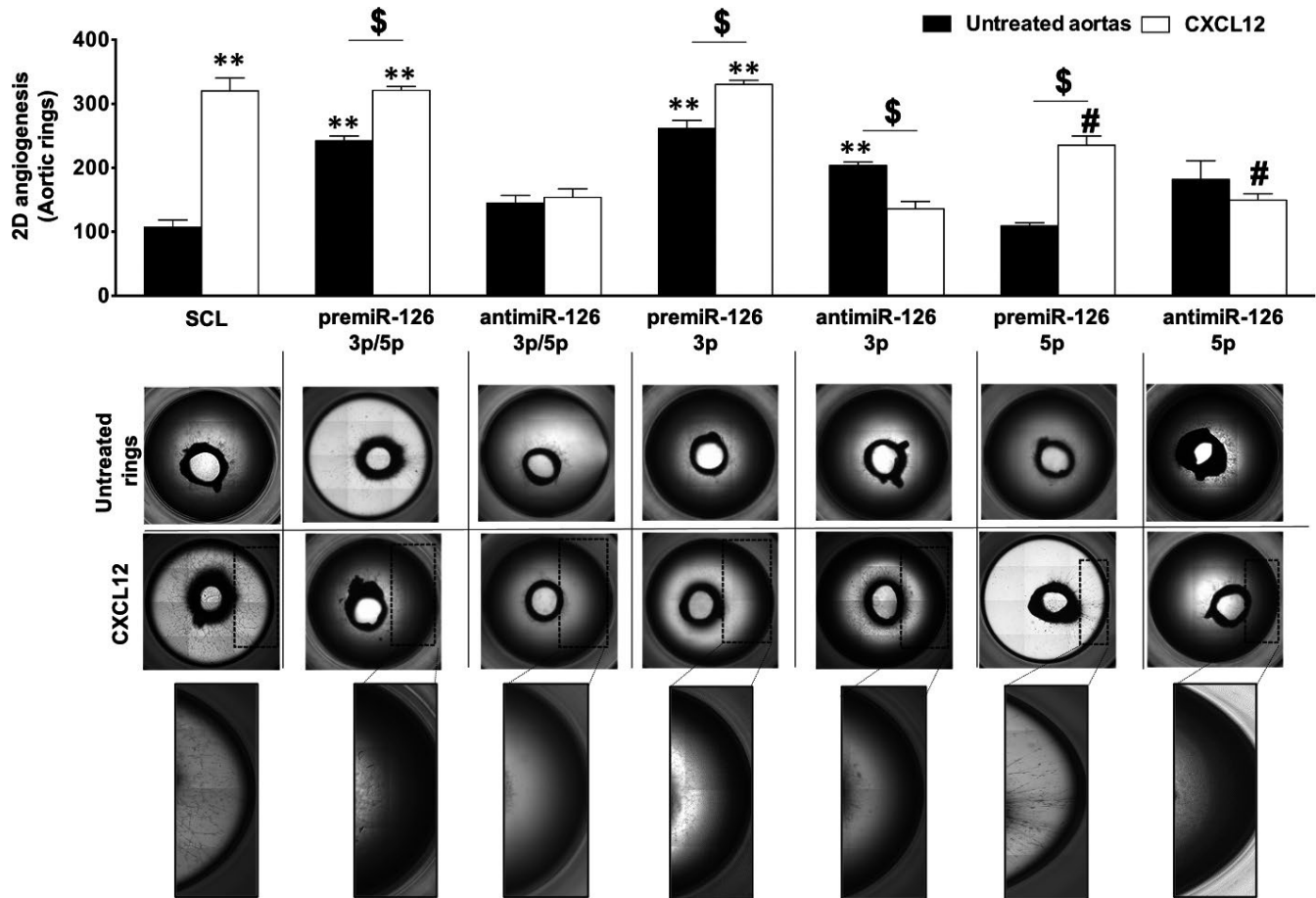
Taken together, our data suggest that miR-126-3p/5p and miR-126-3p act as positive regulators of HUVEC migration and vascular tubes formation, but miR-126-5p did not seem to have any effect on this physiological process.

### 3.3 | miR-126-3p was implicated in CXCL12-induced HUVEC migration

The next step of our study was to analyse the impact of miR-126 deregulation on HUVEC migration, induced by CXCL12. Our results indicated (Figure 3A) a significant increase of HUVEC migration up to  $24 \pm 16\%$ , when the cells were stimulated by CXCL12 as compared to SCL. Moreover, there was a significant decrease of HUVEC migration up to  $22 \pm 8\%$  after anti-miR-126-3p transfection and CXCL12 stimulation as compared to stimulation with CXCL12 only. In addition, the results showed that there was a significant increase of cell migration up to  $25 \pm 7\%$  after premiR-126-5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to the transfection with premiR-126-5p only. In contrast, there was no effect on HUVEC migration



**FIGURE 3** Effect of miR-126 on CXCL12-induced migration and vascular tubes formation in vitro. For migration assay (A),  $5.10^4$  transfected HUVEC were deposited on the upper chamber of Boyden chamber and migration was stimulated by adding CXCL12 in the bottom chamber at  $6 \text{ nmol.L}^{-1}$  for 24 h. Quantification of migrated cells was performed using phase contrast microscope. For vascular tubes formation in vitro (B), 7500 transfected HUVEC were deposited on Matrigel surface and stimulated during 6 h with CXCL12 at  $6 \text{ nmol.L}^{-1}$ ; quantification of the number of meshes was performed using phase contrast microscope and Archimed<sup>(TM)</sup> and Histolab<sup>(TM)</sup> software. The results are expressed with mean  $\pm$  SEM. Three independent experiments were performed for each assay. \* $p < .05$  vs SCL; # $p < .05$  vs SCL + CXCL12; \$ $p < .05$  premiR-126-3p/5p vs premiR-126-3p/5p + CXCL12; & $p < .05$  premiR-126-3p vs premiR-126-3p + CXCL12



**FIGURE 4** Effect of miR-126 on CXCL12-induced vascular tubes formation *ex vivo*. To analyse the implication of miR-126 on CXCL12-induced angiogenesis *ex vivo*, the aortic rings from Sprague-Dawley Rats were transfected and stimulated with CXCL12 at  $6 \text{ nmol.L}^{-1}$  for 5 d. Quantification of the number of meshes was performed using phase contrast microscope and Archimed<sup>(TM)</sup> and Histolab<sup>(TM)</sup> software. The results are expressed with mean  $\pm$  SEM. Five independent experiments were performed for each assay. # $p < .05$  vs SCL + CXCL12; \*\* $p < .05$  vs SCL; \$ $p < .05$

after anti-miR-126-5p, premiR-126-3p or anti-miR-126-3p/5p transfection and CXCL12 stimulation.

Our data suggest that miR-126-3p, but not miR-126-5p, was necessary in CXCL12-induced HUVEC migration.

### 3.4 | miR-126-3p was required for CXCL12-induced 2D-angiogenesis *in vitro*

The results showed (Figure 3B) that there was a significant increase of 2D-angiogenesis up to  $38 \pm 16\%$  after CXCL12 stimulation as compared to SCL. In addition, there was a significant increase up to  $2.3 \pm 0.3$ -fold of 2D-angiogenesis after HUVEC premiR-126-3p/5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to stimulation with CXCL12 only. Interestingly, there was a significant increase of 2D-angiogenesis up to  $91 \pm 23\%$  after premiR-126-3p/5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to transfection with premiR-126-3p/5p only. Moreover, there was a significant decrease in 2D-angiogenesis up to  $42 \pm 14\%$  after anti-miR-126-3p/5p transfection and CXCL12

stimulation as compared to stimulation with CXCL12 only, or to transfection with anti-miR-126-3p/5p only.

Then, we studied the role of miR-126-3p and miR-126-5p separately in HUVEC 2D-angiogenesis. Our results showed (Figure 3B) that there was a significant increase of this effect up to  $3.2 \pm 0.2$ -fold after premiR-126-3p transfection and CXCL12 stimulation as compared to stimulation with CXCL12 only. We also demonstrated a significant increase of  $46 \pm 6\%$  as compared to transfection with premiR-126-3p only (Figure 3B). Interestingly, the results showed that there was a significant decrease in 2D-angiogenesis up to  $71 \pm 8\%$  after anti-miR-126-3p transfection and CXCL12 stimulation as compared to stimulation with CXCL12 only. There were no significant changes as compared to transfection with anti-miR-126-3p only. However, there were no significant changes in 2D-angiogenesis after modulation of miR-126-5p expression.

Taken together, our results suggest that miR-126-3p/5p, miR-126-3p but not miR-126-5p are necessary in CXCL12-induced HUVEC 2D-angiogenesis. Moreover, miR-126-3p/5p and miR-126-3p potentialized CXCL12-induced angiogenesis *in vitro*.

### 3.5 | miR-126 was implicated in CXCL12-induced angiogenesis in an ex vivo rat aorta model

Herein, we investigated the miR-126 involvement in CXCL12-induced ex vivo angiogenesis by analysing the number of meshes formed on Matrigel layer. For this, the rat aortic rings were placed on Matrigel, transfected by miRs and then stimulated by CXCL12.

First, we performed the analysis of CXCL12 and miRs separately on ex vivo angiogenesis. Our results showed (Figure 4) that there was a significant increase of angiogenesis up to  $3 \pm 0.3$ -fold after CXCL12 stimulation (Figure 4). Moreover without CXCL12 stimulation, there was a significant increase in ex vivo angiogenesis up to  $2.3 \pm 0.1$ -fold and  $40 \pm 10\%$  after premiR-126-3p/5p or anti-miR-126-3p/5p transfection respectively. Then, we compared the effects of miR-126-3p and miR-126-5p strands separately. The results showed a significant increase of angiogenesis up to  $2.4 \pm 0.2$ -fold or  $90 \pm 10\%$  or  $70 \pm 40\%$  after premiR-126-3p or anti-miR-126-3p or anti-miR-126-5p transfection, respectively. There were no significant changes after premiR-126-5p transfection.

Second, we analysed the effect of CXCL12's angiogenesis stimulation after ex vivo miRs- transfection of aortas ring. Our results indicated a significant increase of angiogenesis up to  $33 \pm 4\%$  after premiR-126-3p/5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to premiR-126-3p/5p alone. However, there were no significant changes after premiR-126-3p/5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to CXCL12 alone. Interestingly, the results showed that there was a significant decrease of angiogenesis up to  $52 \pm 6\%$  after anti-miR-126-3p/5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to CXCL12 alone. In addition, there were no significant differences after anti-miR-126-3p/5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to anti-miR-126-3p/5p alone.

Finally, we studied the implication of miR-126 on ex vivo angiogenesis using separately the miR-126-3p and miR-126-5p strands. For the -3p strand, the results showed that there was a significant increase of ex vivo angiogenesis up to  $26 \pm 4\%$  after premiR-126-3p transfection and CXCL12 stimulation as compared to premiR-126-3p alone. However, there were no significant changes between aortas transfected with premiR-126-3p and stimulated with CXCL12 as compared to CXCL12 alone. Interestingly, the results showed that there was a significant decrease of angiogenesis up to  $57.5 \pm 5\%$  after anti-miR-126-3p transfection and CXCL12 stimulation as compared to CXCL12 alone. In addition, there was a significant decrease up to  $33 \pm 8\%$  after anti-miR-126-3p transfection and stimulation by CXCL12 as compared to anti-miR-126-3p alone.

Furthermore, for the -5p strand, the results showed that there was a significant decrease of angiogenesis up to  $26 \pm 6\%$  after premiR-126-5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to CXCL12 alone. Interestingly, there was a significant increase up to  $2.2 \pm 0.2$ -fold after premiR-126-5p transfection and CXCL12 stimulation as compared to premiR-126-5p alone. Finally, the results showed that there was a significant decrease in angiogenesis up to  $53 \pm 4\%$  after anti-miR-126-5p transfection and CXCL12

stimulation as compared to CXCL12 alone. However, there were no significant changes between aortas transfected with anti-miR-126-5p and stimulated with CXCL12 with those transfected only with anti-miR-126-5p.

Our result suggests that miR-126-3p/5p and miR-126-3p but not miR-126-5p were necessary for CXCL12-induced angiogenesis ex vivo. In contrast, modulation (up or downregulation) of miR-126-5p seems to alter CXCL12 angiogenic properties ex vivo.

### 3.6 | SPRED-1 inhibition induced 2D-angiogenesis in vitro

Since the -5p species had no significant effects in our previous models, we decided to focus on the -3p species for the rest of the study. To determine the essential role of miR-126-3p in CXCL12-induced angiogenesis, we focused on SPRED-1 expression, since SPRED-1 is a known target of miR-126-3p. First, we confirmed that there was a significant decrease of SPRED-1 protein level after premiR-126-3p transfection in HUVEC (Figure 5A). We hypothesized that its downregulation is necessary for CXCL12-induced angiogenesis. To study this, we decided to analyse 2D-angiogenesis in HUVEC in the presence of siRNA-SPRED-1 after CXCL12 stimulation. We validated the siRNA-SPRED-1 efficiency showing the abolition of SPRED-1 mRNA expression compared to SCL (Figure 5B). Second, we analysed 2D-angiogenesis in HUVEC after siRNA-SPRED-1 transfection. The results showed that there was a significant increase of 2D-angiogenesis up to  $50 \pm 15\%$  after siRNA-SPRED-1 transfection as compared to HUVEC transfected with SCL (Figure 5C).

Finally, our results suggest that SPRED-1 is a negative regulator of HUVEC's 2D-angiogenesis.

### 3.7 | CXCL12 decreased SPRED-1 expression leading to increase of 2D-angiogenesis

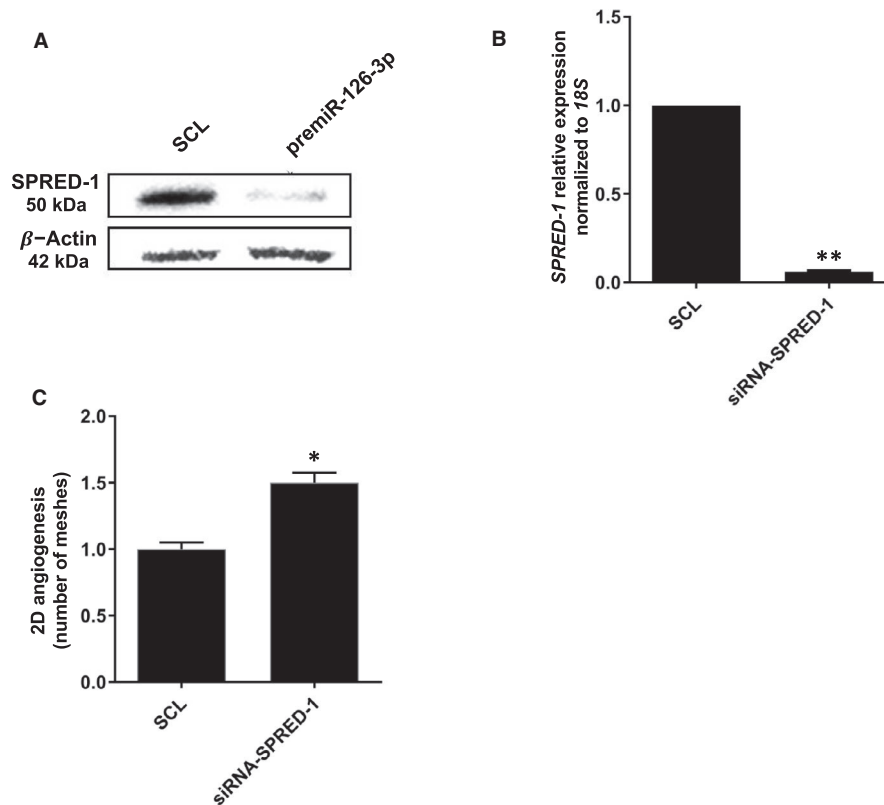
In the last part of this study, we wanted to know if downregulation of SPRED-1 by miR-126-3p is implicated in CXCL12-dependent angiogenesis.

Since we proved that CXCL12 increased miR-126-3p level in HUVEC, we hypothesized that CXCL12 can modulate the SPRED-1 expression. For the first time, the results showed that CXCL12 triggered a significant decrease of SPRED-1 protein level at 24 hours of treatment (Figure 6A).

Interestingly, the results showed that siRNA-SPRED-1 transfection and CXCL12 stimulation led to a significant increase of 2D-angiogenesis up to  $59 \pm 9\%$  as compared to CXCL12 alone (Figure 6B, white arrows).

Then, we compared the effect of both siRNA-SPRED-1 and anti-miR-126-3p co-transfection on HUVEC 2D-angiogenesis with transfection of siRNA-SPRED-1 only. The results showed that there was a significant increase of 2D-angiogenesis up to  $2.6 \pm 0.1$ -fold after siRNA-SPRED-1 and anti-miR-126-3p





**FIGURE 5** SPRED-1 is implicated in CXCL12/miR-126-induced vascular tubes formation. (A) To determine the effect of miR-126-3p on SPRED-1 expression, HUVEC were transfected with pre-miR-126-3p for 24 h. Total proteins were extracted, and Western blot analysis was performed. (B) The inhibition of SPRED-1 mRNA was checked by qRT-PCR and using 18S rRNA as endogenous control (C) To analyse the implication of SPRED-1 on CXCL12 induced vascular tubes formation in vitro, HUVEC were transfected with siRNA-SPRED-1 at 25 nmol.L<sup>-1</sup> during 24 h. 7000 HUVECs were seeded on Matrigel and stimulated by CXCL12 at 6 nmol.L<sup>-1</sup> for 6 h. Vascular tubes formation was observed and the quantity of meshes was determined using phase contrast microscope and Archimed<sup>(TM)</sup> and Histolab<sup>(TM)</sup> software. Data were presented as the mean  $\pm$  SEM of three and four independent experiments. \*\* $p < .01$  vs Untreated cells; \* $p < .05$  vs Untreated aortas

co-transfection as compared to transfection with anti-miR-126-3p only (Figure 6C, black arrows). Interestingly, CXCL12 addition had no pro-angiogenic effect on co-transfected HUVEC (siRNA-SPRED-1 and anti-miR-126-3p).

Overall, these results demonstrated that inhibition of SPRED-1 potentializes CXCL12 pro-angiogenic effect. Moreover miR-126-3p was crucial for CXCL12-induced angiogenesis.

Taken together our results showed that, in the absence of both SPRED-1 (siRNA-SPRED-1) and miR-126-3p (anti-miR-126-3p), CXCL12 alone had no pro-angiogenic effect on EC.

In conclusion, these results suggested that the pro-angiogenic effect of CXCL12 was dependent on miR-126-3p and an alternative signalling pathway parallel to SPRED-1. Despite the potentiating effect of the absence of SPRED-1, the presence of miR-126-3p was essential for the pro-angiogenic effect of CXCL12.

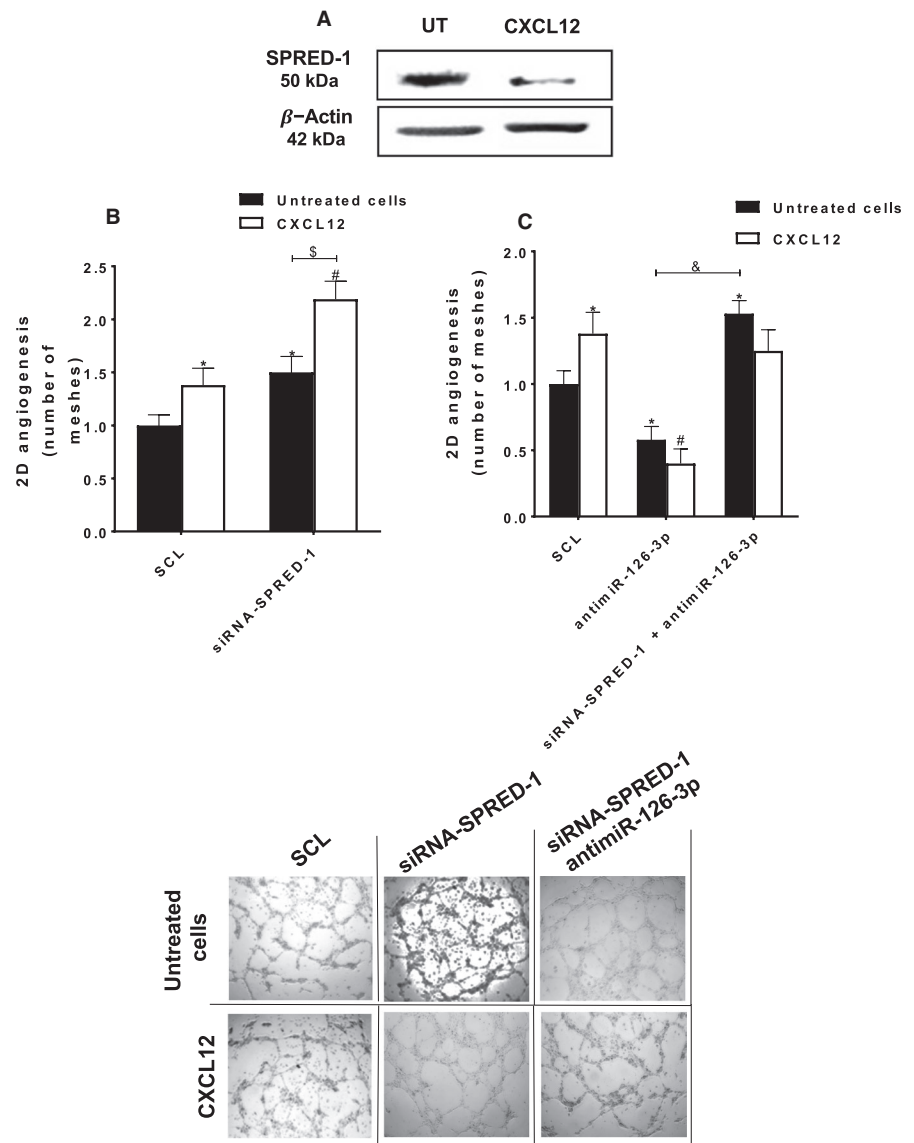
## 4 | DISCUSSION

Angiogenesis is a physiological process, necessary for cardiovascular disorders regeneration, particularly after ischemic injuries. In this context, the pro-angiogenic factors such as chemokines and

miRs can be implicated to stimulate angiogenesis.<sup>22</sup> In this study, we decided to focus on CXCL12 and its effect on EC through miRs modulation. Among miRs, miR-126, strongly expressed by EC, has been identified as a pro-angiogenic factor, which acts by decreasing SPRED-1 level and stimulating the Erk1/2 signalling pathway.<sup>17</sup> Like most miRs, miR-126 is produced from a double stranded duplex precursor that imbeds miR-126-3p and miR-126-5p complementary strands.<sup>23</sup> Depending on the tissue or cell type, the guide and passenger strands of a miR can act in synergy or as antagonists to regulate various biological processes.<sup>13</sup> For example, although they have different mRNA targets, miR-30-3p and miR-30-5p or miR-145-3p and miR-145-5p act in synergy in the tumour progression of glioma or bladder tumour cells.<sup>24,25</sup> Conversely, depending on their rate and location, miR-155-3p and miR-155-5p may act together or against each other in dendritic and astrocytic cells.<sup>26,27</sup> Therefore, depending on the tissue environment and pathophysiological conditions, the two strands (-3p or -5p) of the same miR may have different roles and this requires studying them simultaneously in order to know the involvement of each strands in a pathophysiological process. This is why we wanted to study the role of both strands (miR-126-3p and miR-126-5p) in angiogenesis. These roles have never been compared

### FIGURE 6 miR-126-3p is implicated in the pro-angiogenic effect of SPRED-1 abolition.

(A) To analyse the effect of CXCL12 on SPRED-1 expression, the HUVEC were stimulated or not with CXCL12 (6 nmol.L<sup>-1</sup>) for 24 h. Total proteins were extracted, and Western blot analysis was performed. (B) To analyse the implication of SPRED-1 in CXCL12-induced angiogenesis, HUVEC were transfected with siRNA-SPRED-1 (25 nmol.L<sup>-1</sup>), deposited on Matrigel and stimulated with CXCL12 (6 nmol.L<sup>-1</sup>) for 6 h. (C) To analyse the implication of miR-126-3p in the pro-angiogenic effect of the abolition of SPRED-1, HUVEC were co-transfected with siRNA-SPRED-1 (25 nmol.L<sup>-1</sup>) and anti-miR-126-3p (20 nmol.L<sup>-1</sup>). After co-transfection, HUVEC were deposited on Matrigel and stimulated by CXCL12 (6 nmol.L<sup>-1</sup>) for 6 h. For all analysis of vascular tubes formation and meshes quantification, the phase contrast microscope and the Archimed<sup>(TM)</sup> and the Histolab<sup>(TM)</sup> software were used. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < .05$  vs SCL; # $p < .01$  vs SCL + CXCL12; \$ $p < .05$  siRNA-SPRED-1 vs siRNA-SPRED-1 + CXCL12; & $p < .05$  anti-miR-126-3p vs anti-miR-126-3p + siRNA-SPRED-1. Magnification: x40



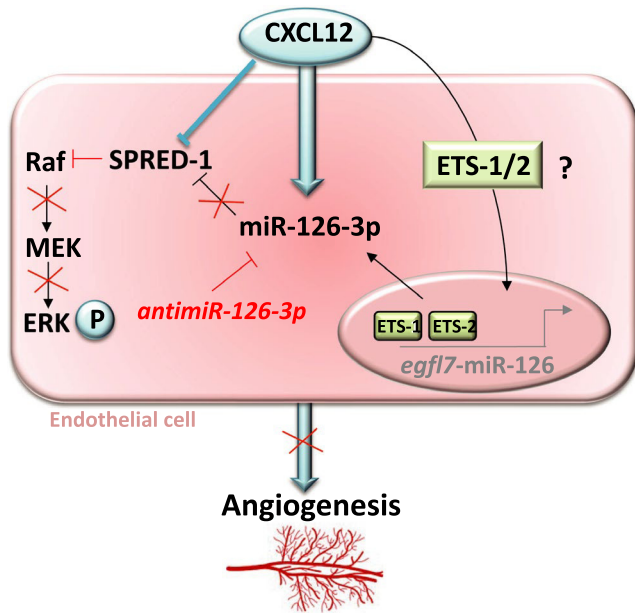
at the same time and in the same experimental conditions in this physiological process.

Recently, it has been shown that the pro-angiogenic process is controlled by chemokines through miRs regulation in chondrosarcoma and osteosarcoma cells.<sup>28-31</sup> However, there is no data indicating how chemokines impact miR regulation in the EC biological response and their impact on chemokine-induced angiogenesis.

The aim of our work was to compare, in parallel, the effect of separate and combined miR-126-3p and miR-126-5p action on EC migration and on vascular tubes formation (2D-angiogenesis) induced by CXCL12 and mediated by EC.

Our results showed for the first time that CXCL12 increased miR-126-3p expression, in both HUVEC in vitro and rat aortas ex vivo models and that this effect was associated with activation of *egfl7*-miR-126 promoter. Knowing that miR-126-3p is encoded by the 7th intron of the *egfl7* gene, we wished to demonstrate an increase of the promoter transcriptional activity using a plasmid reporter strategy associated with luciferase. Since the HUVEC lipofection leads to very

low transfection efficiency and based on previous reports,<sup>17,32-35</sup> we chose the human hepatocyte-derived carcinoma cell line Huh7 to study this promoter activity. Although they represent a different cell model, it has been shown that the Huh7 cells present the CXCL12 specific receptors on their surface and, CXCL12 induce the similar signalling pathways (MAPK Erk1/2 and PI3K/Akt) that we found in HUVEC.<sup>36</sup> In this context, we demonstrated that CXCL12 stimulation was associated with the activation of *egfl7*-miR-126 promoter. Since Ets1/2 is known as a specific transcription factor for *egfl7*,<sup>37</sup> we could hypothesize that CXCL12 induced *egfl7* transcriptional activity through an increase of Ets1/2 (Figure S1). The *egfl7* transcription start site contains 2 Ets binding sites that bind Ets1/2 transcription factor.<sup>17</sup> Mutation of the Ets binding element decreases promoter transactivation and decreases miR-126 expression.<sup>37</sup> It has been previously shown that different growth factors and chemokines activate the Ets transcription factor, for example: CXCL12-induced colorectal cancer cells migration via upregulation of Ets1.<sup>38</sup> Based on these studies and in light of our results we hypothesize that CXCL12



**FIGURE 7** CXCL12 induces 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 leads to a decrease of angiogenesis induced by CXCL12 in vitro. Moreover CXCL12 induced a decrease in SPRED-1 (miR-126-3p known target) and this downregulation improves CXCL12-induced angiogenesis in vitro. In this context, we hypothesized that CXCL12 induced miR-126-3p expression through the expression of Ets1/2 transcription factor complex

enhances the miR-126 promoter activity by the upregulation of the Ets transcription factor responsible of miR-126 expression.

Regarding angiogenesis stimulation, according to the literature, CXCL12 and miR-126-3p had pro-angiogenic effect on both migration and 2D-angiogenesis in vitro and ex vivo<sup>39,40</sup> models. However, in our experimental conditions the miR-126-5p did not seem to have any detectable effect on this process.

Our results and others<sup>17</sup> suggest that miR-126-3p had a strong pro-angiogenic potential. Our model showed that miR-126-5p alone had no effect on 2D-angiogenesis. However, its over-expression (after premiR-126-3p/5p co-transfection) reduced the pro-angiogenic effect of miR-126-3p in HUVEC. In contrast, Zhou et al,<sup>41</sup> found in retinal EC, that silencing the miR-126-3p repressed angiogenesis, while the over-expression of miR-126-5p increased angiogenesis.<sup>41</sup>

We believe that this discrepancy was due to the differences between the experimental models and experimental conditions (cells types, presence of growth factors, and time of vascular tubes formation).

We further demonstrated that miR-126-3p is crucial for CXCL12-induced migration and 2D-angiogenesis in both in vitro and ex vivo models. Indeed, we showed that in absence of miR-126-3p (after anti-miR-126-3p transfection) there was an abolition of CXCL12 pro-angiogenic properties. These data suggest that the presence of miR-126-3p is essential to stimulate the pro-angiogenic pathways induced by CXCL12. However, we observed conflicting results in our

2D-angiogenesis ex vivo model. Indeed, in the absence of CXCL12 stimulation, we observed that the inhibition of miR-126-3p leads to an increase of 2D-angiogenesis ex vivo. Interestingly, we and others have previously shown that the absence of miR-126-3p leads to CXCL12 synthesis and secretion in HUVEC culture medium.<sup>21,42</sup>

In addition, since in our ex vivo experimental condition the miR transfection was done into the whole aorta, not only the EC but also the smooth muscle cells (SMC) and the fibroblasts could be transfected. In this context, it has been demonstrated by Jansen et al,<sup>43</sup> that inhibition of miR-126-3p in SMC leads to an increase of its proliferation. Furthermore, it has been shown that the absence of miR-126-3p can lead to VEGF-A synthesis.<sup>44</sup>

Since CXCL12 and anti-miR-126-3p have been previously shown to enhance VEGF-A expression<sup>44-46</sup> and both of them can stimulate PKC/Erk1/2 pro-angiogenic pathways through the stimulation of Raf protein,<sup>47-49</sup> we hypothesize that anti-miR-126-3p could have pro-angiogenic action in our long-term ex vivo tissue culture model. In addition, since in ex vivo experiments the rat aortas were kept in ex vivo tissue culture for 9 days, we hypothesized that after anti-miR-126 transfection there was an increase of SMC proliferation associated with VEGF synthesis, which could explain the pro-angiogenic effect in the absence of CXCL12. However, in the presence of CXCL12 we showed that miR-126-3p was crucial for the chemokine pro-angiogenic effects.

Then, we hypothesized that SPRED-1 (a miR-126-3p known target)<sup>17</sup> could be implicated in CXCL12-induced angiogenesis. To prove this, we showed for the first time that CXCL12 inhibited SPRED-1 expression in HUVEC.

Interestingly, our results showed that, the knock-down of SPRED-1 expression led to the stimulation of 2D-angiogenesis in HUVEC associated with an increase in CXCL12-induced angiogenesis. These data suggest a relationship between SPRED-1 and CXCL12. Knowing that, we hypothesized that inhibition of SPRED-1 could abolish the anti-angiogenic effect induced by the absence of miR-126-3p and restored with CXCL12 pro-angiogenic function. We demonstrated, in accordance with Wang et al,<sup>17</sup> that the knock-down of SPRED-1 expression blocked the action of anti-miR-126-3p leading to inhibition of the anti-miR-126-3p-based decrease of angiogenesis. However, in the presence of CXCL12, although inhibition of SPRED-1 abolished the anti-miR-126-3p-based decrease of angiogenesis, this effect was not sufficient to recover an equivalent level to that which was observed after the transfection of siRNA-SPRED-1 only.

As demonstrated by Ho et al,<sup>50</sup> in order to show the CXCL12 pro-angiogenic effects, this process requires the joint activation of the Erk1/2 and PI3K/Akt signalling pathways. Furthermore, in EC, SPRED-1 acts as a negative regulator of the Erk1/2 signalling pathway. Under our experimental conditions, although the Erk1/2 pathway can be unblocked by the SPRED-1 inhibition, it has been demonstrated by Fish et al,<sup>11</sup> that miR-126-3p inhibition leads to the PI3K/Akt-pathway inactivation through the PI3KR2 modulation (Figure S2). Thus, in our model, when SPRED-1 and miR-126-3p were inhibited (after co-transfection with siRNA-SPRED-1 and anti-miR-126-3p), the Erk1/2 pathway could be activated while the PI3K/Akt



channel remains inactivated. Therefore, the inhibition of SPRED-1 (after siRNA-SPRED-1 transfection) was not sufficient to restore the CXCL12 pro-angiogenic effects in anti-miR-126-transfected HUVEC.

Taken together, under these conditions, it is clear that miR-126-3p plays a key role in CXCL12-induced activation of both Erk1/2 and PI3K/Akt pro-angiogenic pathways (Figure 7).

## 5 | CONCLUSION

In conclusion, in this study we focused on two pro-angiogenic factors, the miR-126 and chemokine CXCL12, showing that the miR-126/CXCL12 axis was implicated in endothelial cell migration and vascular tubes formation. In this context, we demonstrated that: (a) CXCL12 modulated the miR-126-3p expression in vitro in HUVEC model, as well as ex vivo in rat aortas model; (b) miR-126 was necessary for the pro-angiogenic effect induced by CXCL12; (c) SPRED-1 was implicated in CXCL12-induced angiogenesis; (d) miR-126-3p enhanced cell migration and vascular tubes formation, in HUVEC, however, the miR-126-5p had no effect on both processes.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in collaboration by the Direction de la Recherche et des Enseignements Doctoraux (Ministere de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et de l'Innovation), the Université Sorbonne Paris Nord (USPN) and Inserm (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale).

In addition, this work and publication fees was supported by grants from Commission Recherche (Bonus Qualité Recherche) of USPN.

K. Bassand was supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et de l'Innovation and USPN.

The authors thank the INSERM U1272 laboratory of Professor Carole PLANES for giving us access to their animals in order to allow us to carry out our experiments.

## CONFLICT OF INTEREST

The author declares that there is no conflict of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Kévin BASSAND:** Conceptualization (lead); Formal analysis (lead); Funding acquisition (equal); Investigation (lead); Methodology (lead); Project administration (lead); Supervision (equal); Validation (lead); Visualization (lead); Writing-original draft (lead); Writing-review & editing (lead). **Laurent Metzinger:** Conceptualization (equal); Methodology (equal); Writing-original draft (equal). **Meriem NAIM:** Writing-original draft (supporting); Writing-review & editing (equal). **Nesrine MOUHOUBI:** Conceptualization (supporting). **Oualid Haddad:** Conceptualization (supporting); Investigation (supporting); Methodology (supporting); Resources (supporting). **Vincent ASSOUN:** Investigation (supporting). **Naima**

**ZAIDI:** Resources (supporting). **Odile SAINTE-CATHERINE:** Investigation (supporting); Resources (supporting). **Amena BUTT:** Conceptualization (supporting); Resources (supporting). **Erwan GUYOT:** Conceptualization (supporting); Funding acquisition (equal). **Olivier OUDAR:** Conceptualization (supporting). **Christelle Laguillier-Morizot:** Conceptualization (supporting); Funding acquisition (equal). **Angela SUTTON:** Conceptualization (supporting); Funding acquisition (equal); Writing-original draft (supporting); Writing-review & editing (supporting). **Nathalie CHARNAUX:** Conceptualization (supporting). **Valérie METZINGER-LE MEUTH:** Conceptualization (equal); Methodology (equal); Writing-original draft (equal). **Hanna HLAWATY:** Conceptualization (lead); Formal analysis (lead); Funding acquisition (lead); Methodology (lead); Project administration (lead); Resources (equal); Supervision (lead); Validation (lead); Visualization (lead); Writing-original draft (lead); Writing-review & editing (lead).

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data supporting the findings of this study could be obtained from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Kévin Bassand  <https://orcid.org/0000-0002-7789-5004>

## REFERENCES

- Poole TJ, Finkelstein EB, Cox CM. The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev Dyn*. 2001;220(1):1-17.
- Zhang Y, Zhang H, Lin S, et al. SDF-1/CXCR7 chemokine signalling is induced in the peri-infarct regions in patients with ischemic stroke. *Aging Dis*. 2018;9(2):287-295.
- Yamagami S, Tamura M, Hayashi M, et al. Differential production of MCP-1 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the ischemic brain after transient focal ischemia in rats. *J Leukoc Biol*. 1999;65(6):744-749.
- Suffee N, Hlawaty H, Meddahi-Pelle A, et al. RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. *Angiogenesis*. 2012;15(4):727-744.
- Mehrad B, Keane MP, Strieter RM. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2007;97(5):755-762.
- Yin Y, Zhao X, Fang Y, Yu S, Zhao J. SDF-1  $\alpha$  involved in mobilization and recruitment of endothelial progenitor cells after arterial injury in mice. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19(4):218-227.
- 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.
- Welten SMJ, Goossens EAC, Quax PHA, Nossent AY. The multifactorial nature of microRNAs in vascular remodelling. *Cardiovasc Res*. 2016;110(1):6-22.
- Bartel DP, Chen C-Z. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*. 2004;5(5):396-400.
- 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.
- Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*. 2008;15(2):272-284.

12. 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.
13. Meijer HA, Smith EM, Bushell M. Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans*. 2014;42(4):1135-1140.
14. 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.
15. Zhou Q, Anderson C, Hanus J, et al. Strand and cell type-specific function of microRNA-126 in. *Angiogenesis*. 2016;24(10):1823-1835.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009;2(100):ra81.
21. 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.
22. Staszal T, Zapala B, Polus A, et al. Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology. *Pol Arch Med Wewn*. 2011;121(10):361-367.
23. 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.
24. Jiang L, Lin C, Song L, et al. MicroRNA-30e\* promotes human glioma cell invasiveness in an orthotopic xenotransplantation model by disrupting the NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  negative feedback loop. *J Clin Invest*. 2012;122(1):33-47.
25. Matsushita R, Yoshino H, Enokida H, et al. Regulation of UHRF1 by dual-strand tumor suppressor microRNA-145 (miR-145-5p and miR-145-3p): inhibition of bladder cancer cell aggressiveness. *Oncotarget*. 2016;7(19):28460-28487.
26. Zhou H, Huang X, Cui H, et al. miR-155 and its star-form partner miR-155\* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2010;116(26):5885-5894.
27. Tarassishin L, Loudig O, Bauman A, Shafit-Zagardo B, Suh H-S, Lee SC. Interferon regulatory factor 3 inhibits astrocyte inflammatory gene expression through suppression of the proinflammatory miR-155 and miR-155\*. *Glia*. 2011;59(12):1911-1922.
28. Liu GT, Huang YL, Tzeng HE, Tsai CH, Wang SW, Tang CH. CCL5 promotes vascular endothelial growth factor expression and induces angiogenesis by down-regulating miR-199a in human chondrosarcoma cells. *Cancer Lett*. 2015;357(2):476-487.
29. Liu G-T, Chen H-T, Tsou H-K, et al. CCL5 promotes VEGF-dependent angiogenesis by down-regulating miR-200b through PI3K/Akt signaling pathway in human. *Oncotarget*. 2014;5(21):10718-10731.
30. Wang L-H, Lin C-Y, Liu S-C, et al. CCL5 promotes VEGF-C production and induces lymphangiogenesis by suppressing miR-507 in human chondrosarcoma cells. *Oncotarget*. 2016;7(24):36896-36908.
31. Liao Y-Y, Tsai H-C, Chou P-Y, et al. CCL3 promotes angiogenesis by dysregulation of miR-374b/ VEGF-A axis in human osteosarcoma cells. *Oncotarget*. 2016;7(4):4310-4325.
32. Zhou S, Liang P, Zhang P, Zhang M, Huang X. The long noncoding RNA PDK1-AS/miR-125b-5p/VEGFA axis modulates human dermal microvascular endothelial cell and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis after thermal injury. *J Cell Physiol*. 2020;236(4):3129-3142.
33. Pang J, Ye L, Chen Q, Wang J, Yang X, He W, Hao L. The effect of MicroRNA-101 on angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells during hypoxia and in mice with myocardial infarction. *Biomed Res Int*. 2020;2020:5426971.
34. Anene C, Graham AM, Boyne J, Roberts W. Platelet microparticle delivered microRNA-Let-7a promotes the angiogenic switch. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(8):2633-2643.
35. Soufi-Zomorrod M, Hajifathali A, Kouhkan F, Mehdizadeh M, Rad SM, Soleimani M. MicroRNAs modulating angiogenesis: miR-129-1 and miR-133 act as angio-miR in HUVECs. *Tumour Biol*. 2016;37(7):9527-9534.
36. Sutton A, Friand V, Brulé-Donneger S, et al. Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C Motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. *Mol Cancer Res*. 2007;5(1):21-33.
37. Harris Ta, 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.
38. Li P, Wei J, Li X, et al. 17 $\beta$ -Estradiol enhances vascular endothelial Ets-1/miR-126-3p expression: the possible mechanism for attenuation of atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(2):594-603.
39. Wang Y, Huang J, Li Y, Yang G. Roles of chemokine CXCL12 and its receptors in ischemic. *Stroke*. 2012;13(2):166-172.
40. Qu Q, Bing W, Meng X, et al. 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*. 2017;8(63):106790-106806.
41. Zhou Q, Anderson C, Hanus J, et al. Strand and cell type-specific function of microRNA-126 in angiogenesis. *Mol Ther*. 2016;24(10):1823-1835.
42. 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.
43. Jansen F, Stumpf T, Proebsting S, et al. Inter-cellular transfer of miR-126-3p by endothelial microparticles reduces vascular smooth muscle cell proliferation and limits neointima formation by inhibiting LRP6. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;104:43-52.
44. Ye P, Liu J, He F, Xu W, Yao K. Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulatory effect on VEGF and MMP-9 expression. *Int J Med Sci*. 2013;11(1):17-23.
45. Ge HY, Han ZJ, Tian P, et al. VEGFA expression is inhibited by arsenic trioxide in HUVECs through the upregulation of Ets-2 and miR-NA-126. *PLoS One*. 2015;10(8):1-18.
46. 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.
47. 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.
48. Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, Polishchuk L, Telegueev GD, Dubrovska A. OTT-36109-emerging-targets-in-cancer-management-role-of-the-cxcl12-cx. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1347-1361.
49. 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.

50. Ho TK, Shiwen X, Abraham D, Tsui J, Baker D. Stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as potential target of therapeutic angiogenesis in critical leg ischaemia. *Cardiol Res Prac.* 2012;2012:1-7.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Bassand K, Metzinger L, Naïm M, et al. miR-126-3p is essential for CXCL12-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2021;25:6032–6045. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16460>

## ***Annexe 2: Novelty in the development of biodegradable polymer coatings for biomedical devices: paclitaxel grafting on PDMMLA derivatives***

### **Résumé :**

Les polymères biodégradables sont largement utilisés en biothérapies actuelles. Ils peuvent servir de matrice chargée de médicaments et être implantés dans la zone d'intérêt, permettant une délivrance locale et contrôlée des médicaments. Le PLA (Acide polylactique) est l'un des biopolymères les plus utilisés, présentant des propriétés biocompatibles et biorésorbables intéressantes. Dans cette étude, Le poly([R,S]-3,3-diméthylmalic acid) (PDMMLA) a été utilisé, et contrairement au PLA, ce polymère présente l'avantage de pouvoir être modifié chimiquement pour adapter l'équilibre hydrophile/hydrophobe, la cinétique de dégradation et les propriétés physico-chimiques et biologiques. Dans ce travail, le paclitaxel (PTX), un agent anticancéreux stabilisant les microtubules, a été greffé au PDMMLA. Ces dernières années, il est également utilisé comme agent antiprolifératif dans les stents à élution médicamenteuse, car il empêche la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses, limitant ainsi la formation de néointima, et donc la resténose intra-stent. Le greffage est réalisé par liaison ester entre un groupe hydroxyle du PTX et un groupe acide carboxylique du PDMMLA. Dans cette étude, un PDMMLA contenant 60% de groupes esters hexyliques et 40% de groupes acides carboxyliques a été synthétisé (PDMMLA 40/60). Le PTX a été greffé sur 10% des groupes esters, générant un polymère, le PDMMLA-PTX 30/10/60. Des analyses de RMN ont confirmé le greffage du PTX au polymère PDMMLA 40/60. Le polymère PDMMLA-PTX 30/10/60 généré a montré une température de transition vitreuse (paramètre lié à la résistance d'un matériau) inférieure à 37°C, ce qui est adapté aux applications médicales. Enfin, Des tests *in vitro* ont été réalisés en utilisant des cellules endothéliales humaines (HUVEC). Les polymères, PDMMLA-PTX 30/10/60, PDMMLA 40/60 et le PLA ont été comparés lors de tests de cytotoxicité pendant 24h, 48h et 72h, par dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture. Des tests d'adhérence cellulaire ont également été réalisés. Le PDMMLA-PTX 30/10/60 présente une moindre cytotoxicité comparé aux autres polymères. Il permet également une meilleure adhérence des HUVECs.

# Novelty in the development of biodegradable polymer coatings for biomedical devices: paclitaxel grafting on PDMMLA derivatives

Elnaz Gholizadeh<sup>a</sup>, Meriem Naim<sup>b</sup>, Rima Belibel<sup>c</sup>, Hanna Hlawaty<sup>b</sup> and Christel Barbaud<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institut Galilée, Laboratory for Vascular Transitional Science (LVTS), Université Sorbonne Paris Nord, Villetaneuse, France; <sup>b</sup>Smbh, Laboratory for Vascular Transitional Science (LVTS), Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France; <sup>c</sup>Université Sorbonne Paris Nord, KymiaNova, Châtenay Malabry, France

## ABSTRACT

Biocompatible and biodegradable polymers are widely used in the medical field. In some cases, the biopolymer is accompanied by an active drug, which is delivered locally in a controlled manner in order to improve the healing conditions. Poly([R,S]-3,3-dimethylmalic acid) (PDMMLA) is a synthetic amphiphilic biodegradable polymer, which unlike PLA, can be chemically modified to adapt hydrophilic/hydrophobic balance, degradation kinetics, and physicochemical and biological properties. It may contain a lateral alkyl group or a functional group for coupling bioactive molecules to release during its degradation. In this work, we realized the chemical grafting of paclitaxel (PTX), a microtubule stabilizing anti-cancer agent on PDMMLA derivatives bio-polyesters following a Steglich esterification protocol. 1D and 2D NMR analyses validated the reaction with 10% (using 0.1 equivalent) of PTX on the copolymer PDMMLAH<sub>40-co</sub>-Hex<sub>60</sub> (PDMMLA 40/60) and a maximal PTX grafting rate of 55% on the homopolymer PDMMLAH (PDMMLA 100/0). *In vitro* adhesion and cytotoxicity assays were carried out on HUVEC cells with PDMMLA 40/60, PDMMLA-PTX 30/10/60 and PLA.

## ARTICLE HISTORY

Received 20 December 2021  
Accepted 11 March 2022

## KEYWORDS

PDMMLA; polyesters; paclitaxel; covalent grafting; steglich esterification; drug eluting polymers

## 1. Introduction

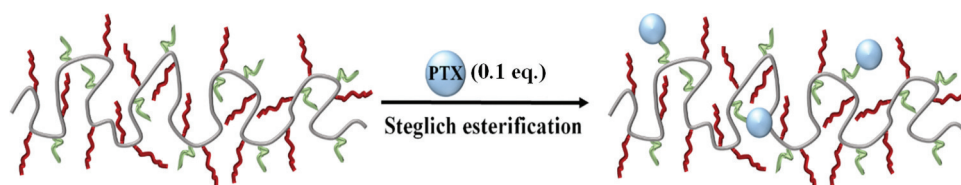
Biologically active materials are of great interest in medical fields for the treatment of various diseases. Bioresorbable polymers especially draw attention because of their specific properties. They can be used as suture threads, scaffolds for tissue regeneration and regrowth, or as vectors for local drug delivery. In this case, the polymer is used as a matrix loaded with drugs which is implanted into the area of interest, releasing the drug during the healing period and being degraded naturally at the same time [1,2]. PLA is one of the most used biopolymers in the development of drug-eluting devices, showing interesting biocompatible and bioresorbable properties. However, the slow degradation kinetics of PLA going up to 2 years is considered as a restrictive drawback. In the case of drug-eluting stents (DESS) for example, the durable presence of the polymer coating can lead to a late stent thrombosis [3–5].

Here, we study the chemical grafting of paclitaxel (PTX) on new bioresorbable polyesters, PDMMLAs, derived from poly( $\beta$ -malic acid) (PMLA), which is also a polyester known for its biocompatible and biodegradable properties [6,7]. Previous studies have shown the

promising properties of PDMMLA derivatives in terms of mechanical properties [8,9], degradation kinetics [10], and cell response [11]. The most interesting point about PDMMLA is the presence of carboxylic acid groups on its side chain, allowing control of the hydrophilicity levels of the polymer, which affects its degradation kinetics. It also makes possible the functionalization of these groups using potential molecules such as active drugs. It is supposed that when the drug is covalently bonded to the polymer, its release can be slower and controlled compared to the cases where the drug is loaded to the polymer only by physical interactions leading to a burst release [12].

PTX is an FDA approved anti-cancer agent, isolated for the first time from the Pacific yew tree, *Taxus brevifolia*. As a member of the taxane family, PTX acts through binding to  $\beta$ -tubulin and inhibiting the disassembly of microtubules [13]. This microtubule stabilization during the mitotic stage inhibits cell division, resulting in cell cycle blocking and cell death [14,15]. PTX is widely used for the treatment of ovarian, lung, prostate, breast, and solid tumor cancer. In recent years, it is also being used as an anti-proliferative agent in DESSs, since it prevents





**Figure 1.** Schematic representation of PTX covalent grafting on PDMMLA 40/60 via Steglich esterification; Red: hexylic ester groups, Green: carboxylic acid groups, Blue: PTX.

the migration and the proliferation of smooth muscle cells (SMCs), limiting the neointima formation, and thus intra-stent restenosis [16].

The Steglich esterification protocol is followed in this work, in order to form an ester bond between the hydroxyl group of PTX and the carboxylic acid group of PDMMLA. In this protocol, the carboxylic acid is activated by *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), forming an *O*-acylisourea intermediate [17,18]. The esterification is improved by the addition of a catalytic amount of 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP), leading to a more effective reaction [19,20]. According to the literature, by using DCC/DMAP, only the 2'-hydroxyl of the PTX is activated [21,22].

In order to obtain the desired amphiphilic bioactive polymer, the grafting of PTX was first realized on a PDMMLA copolymer containing 40% of carboxylic acid groups and 60% of hexylic ester groups, PDMMLAH<sub>40</sub>-co-Hex<sub>60</sub> (PDMMLA 40/60). Indeed, previous research studies have shown that the amphiphilic copolymer PDMMLAH<sub>30</sub>-co-Hex<sub>70</sub> (PDMMLA 30/70) is the most optimal surface for grafting the desired therapeutic agent. It presents better adhesion and proliferation of human endothelial cells [11], very favorable surface properties [8,9] and adequate degradation rate in physiological conditions [10].

Relying on these results, a new PDMMLA derivative was prepared with 40% of -COOH (PDMMLA 40/60), and 10% of PTX was grafted on these groups in order to recover the initially desired 30% carboxylic acid groups (Figure 1).

In addition, the hydrophilic homopolymer PDMMLA 100/0, which contains only the repeating unit of -COOH groups on its side chain, is selected in order to determine the maximal grafting percentage of PTX

The grafting is confirmed by 1D and 2D NMR analyses. Thereafter, thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC) are utilized to study the thermal properties of the polymers.

It is also important to test the bioactive terpolymer PDMMLA-PTX 30/10/60 *in vitro* and to compare it with the corresponding copolymer PDMMLA 40/60 and the PLA which is the most studied. For this, cell adhesion tests of these three polymers on HUVEC endothelial cells as well as cytotoxicity tests will be carried out.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

All commercially available chemicals were purchased from Sigma Aldrich (France) and employed as received. Reactions with anhydrous organic solvents were performed under nitrogen atmosphere. THF was distilled on sodium-benzophenone.

FTIR spectra were recorded on AVATAR 370 TF-IR Thermo Nicolet spectrometer using the Nicolet OMNI-Sampler ATR Smart Accessory (Ge, DTGS). Adsorption bands are given in  $\text{cm}^{-1}$ .

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C and HMBC NMR spectra were recorded on a Bruker AM-400 MHz spectrometer using deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>) or deuterated acetone (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) as solvent, depending on the sample solubility. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm. Multiplicity of the groups is given as follows: s (singlet); d (doublet); t (triplet); q (quadruplet); m (multiplet).

The absolute molecular weights and weight distributions were determined at room temperature by coupling a high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC), a multi-angle laser light scattering detector (MALLS), a viscosimeter, and a differential refractive index (dRI) detector. THF was used as the carrier phase and was filtered through a 0.1  $\mu\text{m}$  filter unit (Millipore, Billerica, USA). It was degassed (DGU-20A3R Shimadzu, Kyoto Japan) and eluted at a 0.5 mL/min flow rate (LC10Ai Shimadzu, Kyoto Japan). 100  $\mu\text{L}$  of a 0.2  $\mu\text{m}$ -filtered sample solution ( $C = 10 \text{ mg/mL}$ ) were injected with an automatic injector (SIL-20A HT Shimadzu, Kyoto Japan). The column packing was a divinylbenzene gel. The MALLS photometer, a miniDawn TREOS from Wyatt Technology Inc. (Santa Barbara, CA, USA) was provided with a fused silica cell and a Ga-As laser ( $\lambda = 665.8 \text{ nm}$ ). The whole collected data: light scattering (LS), dRI were analyzed using the Astra v6.0.6 software package. Molar mass was obtained with a Zimm order 1 method. The concentration of each eluted fraction was determined with dRI (RID10A Shimadzu, Kyoto Japan) with a  $dn/dc$  value of 0.05.

Thermogravimetric analysis (TGA) measurements were carried out on a TGA Q50 analyzer. The temperature range was set from 20°C to 500°C with a heating rate of 10°C/min under N<sub>2</sub> atmosphere. Differential scanning calorimetry (DSC) analyses were carried out on a DSC Q2000 analyzer. Polymers were put in the furnace and heated from -25°C to 200°C with a heating rate of 10°C/min (the final temperature can vary for different polymers regarding their TGA values). The heating cycle was repeated twice, and the  $T_g$  value was collected from the inclination point on the second heating curve.

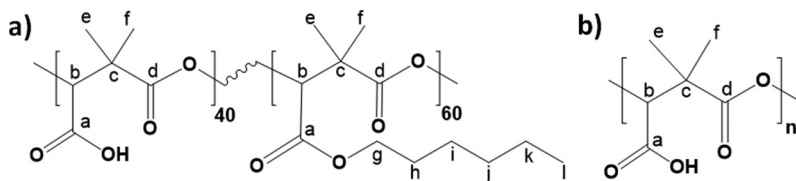
## 2.2. Methods

**Polymer synthesis:** PDMMLAs were prepared in anhydrous THF solution by ring-opening polymerization of racemic  $\beta$ -lactones following the previously reported protocol, using tetraethylammonium benzoate as initiator [23].  $\beta$ -lactones were also synthesized following the previously described procedure with different functional groups to bring the hydrophilic and hydrophobic properties to the polymer [24].

**PDMMLAH<sub>40-co-Hex<sub>60</sub></sub>** (PDMMLA 40/60): For the synthesis of this copolymer,  $\beta$ -lactones with benzylic and hexylic groups were used. Theoretical molecular weight of the polymer can be determined by the molar ratio of initiator/monomer (I/M). In this work, an initiator was used at (I/M = 0.005) equivalent per mole monomer. 4-benzoyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (benzylic lactone) (1.1 g, 4.67 mmol) and 4-hexyloxycarbonyl-3,3-dimethyl-2-oxetanone (hexylic lactone) (1.6 g, 7.01 mmol) were dissolved in 50 mL of freshly distilled THF. The lactone solution was then added to a round bottom flask containing the initiator tetraethylammonium benzoate (14.65 mg, 0.05 mmol) under nitrogen atmosphere. After confirmation of the polymerization by FTIR, two to four drops of acetic acid were added in order to obtain PDMMLA-Bn<sub>40-co-Hex<sub>60</sub> ( $M_n = 4.390 \times 10^4$  g/mol;  $M_w = 4.391 \times 10^4$  g/mol;  $\bar{D} = 1.00$ ). The formed polymer was isolated by precipitation in ethanol. A hydrogenolysis was then carried out on the polymer using 920 mg (40% of the total mass) of Pd/C for 2.3 g (1 eq.) of PDMMLA-Bn<sub>40-co-Hex<sub>60</sub>. PDMMLAH<sub>40-co-Hex<sub>60</sub> (PDMMLA 40/60) was thus obtained.  $T_d = 198.1^\circ\text{C}$ ;  $T_g = 23.66^\circ\text{C}$ . FTIR (neat, cm<sup>-1</sup>) 1743 (C = O ester). **<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>,  $\delta_H$  ppm):** 0.69 (s, 3 H, H<sub>i</sub>), 1.22 (m, 12 H, H<sub>f</sub>, H<sub>e</sub>, H<sub>k</sub>, H<sub>j</sub>, H<sub>i</sub>), 1.54 (s, 2 H, H<sub>h</sub>), 4.06 (s, 2 H, H<sub>g</sub>), 5.26 (s, 1H, H<sub>b</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>,  $\delta_C$  ppm):** 13.99 (C<sub>i</sub>), 22.49 (C<sub>f</sub>, C<sub>e</sub>), 26.31 (C<sub>k</sub>), 32.22 (C<sub>i</sub>, C<sub>j</sub>, C<sub>k</sub>), 45.98 (C<sub>c</sub>), 66.28 (C<sub>g</sub>), 77.14 (C<sub>b</sub>), 168.26 (C<sub>a</sub>), 173.76 (C<sub>d</sub>).</sub></sub></sub>

**PDMMLAH (PDMMLA 100/0):** The same protocol was followed for the synthesis of the homopolymer using the benzylic  $\beta$ -lactone (1.01 g, 4.27 mmol, 1 eq.) and the initiator tetraethylammonium benzoate (5.35 mg, 0.021 mmol, 0.005 eq.) ( $M_n = 3.180 \times 10^4$  g/mol;  $M_w = 3.180 \times 10^4$  g/mol;  $\bar{D} = 1.00$ ). PDMMLA-H (PDMMLA 100/0) was obtained after a catalytic hydrogenolysis using 500 mg of Pd/C (1 mass eq.) for 500 mg (1 eq.) of PDMMLA-Bn.  $T_g = 69.9^\circ\text{C}$ . FTIR (neat, cm<sup>-1</sup>) 1746 (C = O ester). **<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>,  $\delta_H$  ppm):** 1.26 (m, 6 H, H<sub>e</sub>, H<sub>f</sub>), 5.24 (s, 1H, H<sub>b</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>,  $\delta_C$  ppm):** 20.64 (C<sub>e</sub>, C<sub>f</sub>), 44.91 (C<sub>c</sub>), 76.04 (C<sub>b</sub>), 168.34 (C<sub>a</sub>), 173.14 (C<sub>d</sub>).

**PDMMLAH<sub>30-ter-PTX<sub>10-ter-Hex<sub>60</sub></sub></sub>**: Copolymer PDMMLA 40/60 (600 mg, 2.59 mmol, 1 eq.), PTX (221.1 mg, 0.25 mmol, 0.1 eq.), and DMAP (87.3 mg, 0.71 mmol, 10% of total mass) were placed in a round-bottom flask and dissolved in 20 mL of freshly distilled THF under nitrogen atmosphere. *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (53.4 mg, 0.25 mmol, 0.1 eq.) was dissolved in 5 mL of THF as well and added to the previous mixture using a cannula. The reaction was stirred under nitrogen atmosphere for 48 h at room temperature. After the reaction, the polymer was isolated by precipitation in cyclohexane.  $M_n = 3.178 \times 10^4$  g/mol,  $M_w = 3.185 \times 10^4$  g/mol,  $\bar{D} = 1.002$ .  $T_d = 168.86^\circ\text{C}$ ;  $T_g = 34.70^\circ\text{C}$ . **<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_H$  ppm):** 0.87 (s, 3 H, H<sub>i</sub>), 1.24 (m, 18.05 H, H<sub>16</sub>, H<sub>18</sub>, H<sub>e</sub>, H<sub>f</sub>, H<sub>k</sub>, H<sub>j</sub>, H<sub>i</sub>), 1.61 (s, 2.05 H, H<sub>h</sub>), 1.67 (s, 0.3 H, H<sub>17</sub>), 1.79 (s, 0.29 H, H<sub>19</sub>), 1.86, 2.51 (td, 0.27 H, H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>), 2.23 (s, 0.34 H, H<sub>31</sub>), 2.26 (s, 0.3 H, 1-OH), 2.32, 2.38 (m, 0.33 H, H<sub>14a</sub>, H<sub>14b</sub>), 2.41 (s, 0.3 H, H<sub>29</sub>), 2.49 (d, 0.29 H, 7-OH), 3.77 (m, 0.11 H, H<sub>3</sub>), 4.12 (m, 2.13 H, H<sub>g</sub>, H<sub>20a</sub>), 4.28 (d, 0.12 H, H<sub>20b</sub>), 4.39 (m, 0.11 H, H<sub>7</sub>), 4.80 (m, 0.12 H, H<sub>2</sub>), 4.95 (dd, 0.12 H, H<sub>5</sub>), 5.34 (s, 1.32 H, H<sub>b</sub>), 5.66 (d, 0.12 H, H<sub>2</sub>), 5.78 (d, 0.12 H, H<sub>3</sub>) 6.20 (t, 0.12 H, H<sub>13</sub>), 6.27 (s, 0.12 H, H<sub>10</sub>), 7.00 (d, 0.10 H, N-H), 7.28 (m, 0.13 H, H<sub>35</sub>), 7.31 (m, 0.22 H, H<sub>34</sub>, H<sub>36</sub>), 7.42 (m, 0.21 H, H<sub>40</sub>, H<sub>42</sub>), 7.48 (m, 0.11 H, H<sub>41</sub>), 7.51 (m, 0.24 H, H<sub>33</sub>, H<sub>37</sub>), 7.52 (d, 0.24 H, H<sub>24</sub>, H<sub>26</sub>), 7.64 (t, 0.12 H, H<sub>25</sub>), 7.76 (d, 0.23 H, H<sub>39</sub>, H<sub>43</sub>), 8.15 (d, 0.21 H, H<sub>23</sub>, H<sub>27</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_C$  ppm):** 9.58 (C<sub>19</sub>), 13.98 (C<sub>i</sub>), 14.83 (C<sub>18</sub>), 20.87 (C<sub>31</sub>), 21.82 (C<sub>16</sub>), 22.48 (C<sub>e</sub>, C<sub>f</sub>), 22.60 (C<sub>29</sub>), 25.39 (C<sub>j</sub>) 26.80 (C<sub>17</sub>), 28.38 (C<sub>k</sub>), 29.69 (C<sub>i</sub>), 30.31 (C<sub>h</sub>), 35.60 (C<sub>14</sub>), 35.62 (C<sub>6</sub>), 43.15 (C<sub>15</sub>), 45.18 (C<sub>c</sub>), 45.64 (C<sub>3</sub>), 55.25 (C<sub>3</sub>), 58.51 (C<sub>8</sub>), 65.86 (C<sub>g</sub>), 72.15 (C<sub>7</sub>), 73.29 (C<sub>2</sub>), 74.76 (C<sub>2</sub>), 74.91 (C<sub>13</sub>), 75.62 (C<sub>10</sub>), 76.50 (C<sub>b</sub>), 77.29 (C<sub>20</sub>), 78.93 (C<sub>1</sub>), 81.06 (C<sub>4</sub>), 84.43 (C<sub>5</sub>), 127.07 (C<sub>39</sub>, C<sub>43</sub>), 127.17 (C<sub>33</sub>, C<sub>37</sub>), 128.29 (C<sub>35</sub>), 128.68 (C<sub>40</sub>, C<sub>42</sub>), 128.74 (C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub>), 129.96 (C<sub>34</sub>, C<sub>36</sub>), 129.14 (C<sub>22</sub>), 130.20 (C<sub>23</sub>, C<sub>27</sub>), 131.99 (C<sub>41</sub>), 133.06 (C<sub>11</sub>), 133.55



**Figure 2.** Chemical structure of: a) PDMMLA 40/60, b) PDMMLA 100/0.

(C<sub>32</sub>), 133.74 (C<sub>25</sub>), 137.92 (C<sub>38</sub>), 142.07 (C<sub>12</sub>), 166.94 (C<sub>5</sub>), 167.47 (C<sub>21</sub>), 167.70 (C<sub>a</sub>), 170.50 (C<sub>28</sub>), 171.31 (C<sub>30</sub>), 172.74 (C<sub>1</sub>), 173.15 (C<sub>d</sub>), 203.65 (C<sub>9</sub>).

**PDMMLA<sub>45</sub>-co-PTX<sub>55</sub>:** Following the same protocol, PTX was grafted to the homopolymer PDMMLA 100/0 using the following quantities of reactants: PDMMLA100/0 (16.8 mg, 0.12 mmol, 1 eq.), PTX (100.0 mg, 0.12 mmol, 1 eq.), DMAP (14.1 mg, 0.11 mmol, 10% of total mass), DCC (24.1 mg, 0.12 mmol, 1 eq.) and 20 mL of anhydrous THF.  $M_n = 2.883 \times 10^4$  g/mol,  $M_w = 2.974 \times 10^4$  g/mol,  $D = 1.031$ .  $T_d = 170.1^\circ\text{C}$ ;  $T_g = 64.53^\circ\text{C}$ . **<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_H$  ppm):** 1.15 (m, 3.00 H, H<sub>16</sub>), 1.20 (m, 9.22 H, H<sub>17</sub>, H<sub>f</sub>, H<sub>e</sub>), 1.57 (s, 2.99 H, H<sub>18</sub>), 1.68 (s, 3.04 H, H<sub>19</sub>), 1.77, 2.41 (td, 2 H, H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>), 2.19 (s, 3.06 H, H<sub>31</sub>), 2.18 (s, 1.03 H, 1-OH), 2.32, 2.38 (m, 2 H, H<sub>14a</sub>, H<sub>14b</sub>), 2.40 (s, 3.06 H, H<sub>29</sub>), 3.71 (m, 1.03 H, H<sub>3</sub>), 4.10 (d, 1.02 H, H<sub>20a</sub>), 4.20 (d, 1.01 H, H<sub>20b</sub>), 4.30 (m, 1.03 H, H<sub>7</sub>), 4.70 (s, 1.03 H, H<sub>2</sub>), 4.80 (dd, 1.06 H, H<sub>5</sub>), 5.25 (s, 0.69 H, H<sub>b</sub>), 5.59 (d, 1.09 H, H<sub>2</sub>), 5.73 (d, 1.06 H, H<sub>3</sub>), 6.15 (t, 1.00 H, H<sub>13</sub>), 6.23 (s, 1.01 H, H<sub>10</sub>), 7.12 (d, 1.04 H, N-H), 7.27 (m, 1H, H<sub>35</sub>), 7.31 (m, 2 H, H<sub>34</sub>, H<sub>36</sub>), 7.42 (m, 2 H, H<sub>40</sub>, H<sub>42</sub>), 7.48 (m, 1H, H<sub>41</sub>), 7.51 (m, 2 H, H<sub>33</sub>, H<sub>37</sub>), 7.52 (d, 2 H, H<sub>24</sub>, H<sub>26</sub>), 7.64 (t, 1H, H<sub>25</sub>), 7.76 (d, 2 H, H<sub>39</sub>, H<sub>43</sub>), 8.15 (d, 2 H, H<sub>23</sub>, H<sub>27</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta_C$  ppm):** 9.60 (C<sub>19</sub>), 14.80 (C<sub>18</sub>), 20.85 (C<sub>31</sub>), 21.87 (C<sub>16</sub>), 22.51 (C<sub>e</sub>, C<sub>f</sub>), 22.61 (C<sub>29</sub>), 26.77 (C<sub>17</sub>), 35.58 (C<sub>14</sub>), 35.63 (C<sub>6</sub>), 43.15 (C<sub>15</sub>), 45.16 (C<sub>c</sub>), 45.66 (C<sub>3</sub>), 55.23 (C<sub>3</sub>), 58.54 (C<sub>8</sub>), 72.17 (C<sub>7</sub>), 73.31 (C<sub>2</sub>), 74.77 (C<sub>2</sub>), 74.94 (C<sub>13</sub>), 75.66 (C<sub>10</sub>), 76.48 (C<sub>b</sub>), 77.30 (C<sub>20</sub>), 78.91 (C<sub>1</sub>), 82.00 (C<sub>4</sub>), 84.44 (C<sub>5</sub>), 127.10 (C<sub>39</sub>, C<sub>43</sub>), 127.13 (C<sub>33</sub>, C<sub>37</sub>), 128.32 (C<sub>35</sub>), 128.72 (C<sub>40</sub>, C<sub>42</sub>), 128.77 (C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub>), 129.16 (C<sub>22</sub>), 129.93 (C<sub>34</sub>, C<sub>36</sub>), 130.19 (C<sub>23</sub>, C<sub>27</sub>), 132.03 (C<sub>41</sub>), 133.06 (C<sub>11</sub>), 133.53 (C<sub>32</sub>), 133.77 (C<sub>25</sub>), 137.98 (C<sub>38</sub>), 142.10 (C<sub>12</sub>), 166.91 (C<sub>5</sub>), 167.44 (C<sub>21</sub>), 167.73 (C<sub>a</sub>), 170.51 (C<sub>28</sub>), 171.29 (C<sub>30</sub>), 172.77 (C<sub>1</sub>), 173.20 (C<sub>d</sub>), 203.66 (C<sub>9</sub>).

**Cell culture:** HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial cells, N° CRL- 1730, ATCC, LGC Molsheim, France) were cultured in complete medium containing endothelial cell basal medium 2 (ECBM2, PromoCell, Germany) and epidermal growth

factor (EGF), hydrocortisone, vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor, ascorbic acid, heparin, and antibiotics (penicillin-streptomycin 1%, PAA Laboratories, Pasching, Austria). This medium was supplemented with 10% of foetal bovine serum. Cells were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 24 h to perform the adhesion and cytotoxicity tests.

**Lactate dehydrogenase (LDH) colorimetric assay for cytotoxicity measurement:** 25,000 HUVECs were cultured on different polymer films (PLA, PDMMLA 40/60 or PDMMLA-PTX 30/10/60) with complete culture media. After 24 h, 48 h, and 72 h of cell culture, the cytotoxicity was determined using colorimetric LDH cytotoxicity assay following the manufacturer's instructions (LDH, CyQUANT™, Invitrogen France) using spectrophotometer at 490 nm. The experiment was produced four times at different cell passage numbers (n = 4).

**Adherence assay:** 3000 HUVECs were plated on Labtek® (Thermo Fisher Scientific, Brébières, France) coated with fibronectin (control) or polymer films (PLA, PDMMLA 40/60 or PDMMLA-PTX 30/10/60) with complete culture media. After 15 minutes of incubation, the cell culture media was removed and the cells were washed twice with PBS. Nuclei were stained with DAPI (dilution 1/1000, Invitrogen, France) and the cytoskeleton (F-actin) was labelled with Alexa fluor 546 phalloidin (dilution 1/200, Invitrogen, France). A fluorescence microscope and Archimed® software were used, x40 magnification to analyze cell adhesion. The experiment was produced three times at different cell passage numbers (n = 3).

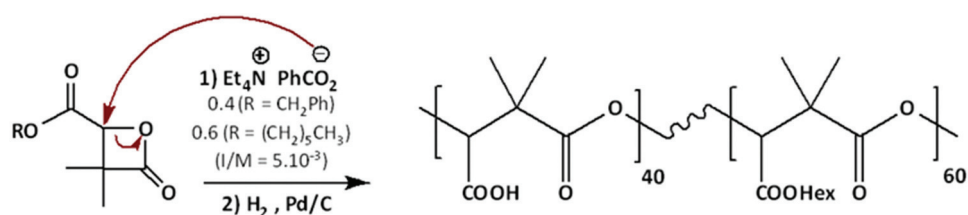
**Statistical analysis:** Results are expressed by mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by ANOVA test  $p < 0.05$  represent statistically significant difference.

### 3. Results and discussion

#### Preparation of polymer supports for grafting

Two polymers were utilized as support to carry out the covalent grafting reaction: copolymer PDMMLA 40/60 and homopolymer PDMMLA 100/0 (Figure 2).





**Scheme 1:** Synthesis of PDMMLA40/60 via the ROP of benzylic and hexylic  $\beta$ -lactones.

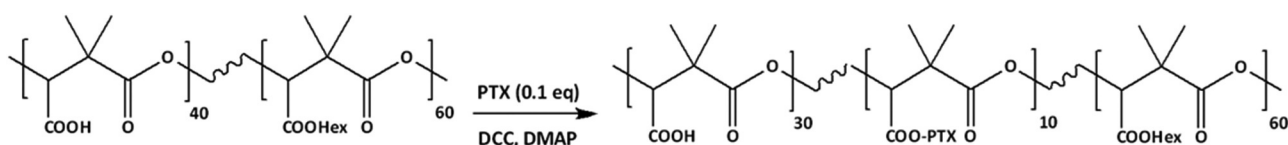
These polymers were successfully prepared via an anionic ring-opening polymerization (ROP) of the monomers,  $\alpha,\alpha,\beta$ -tri-substituted  $\beta$ -lactones: benzylic  $\beta$ -lactone 'R =  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ' and hexylic  $\beta$ -lactone 'R =  $-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ' in anhydrous THF solution following the previously reported procedure [23,25]. Tetraethylammonium benzoate was used as initiator (Scheme 1). The polymerization was monitored by FTIR spectroscopy, which shows the disappearance of the  $\beta$ -lactone band ( $\nu_{\text{C=O}}$ ) at  $1850\text{ cm}^{-1}$  (100% conversion).

The chemical structure of the polymers was confirmed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR. The co-monomers relative content (40%) is obtained by  $^1\text{H}$  NMR using the integration ratio of peak at 4.15 ppm corresponding to -

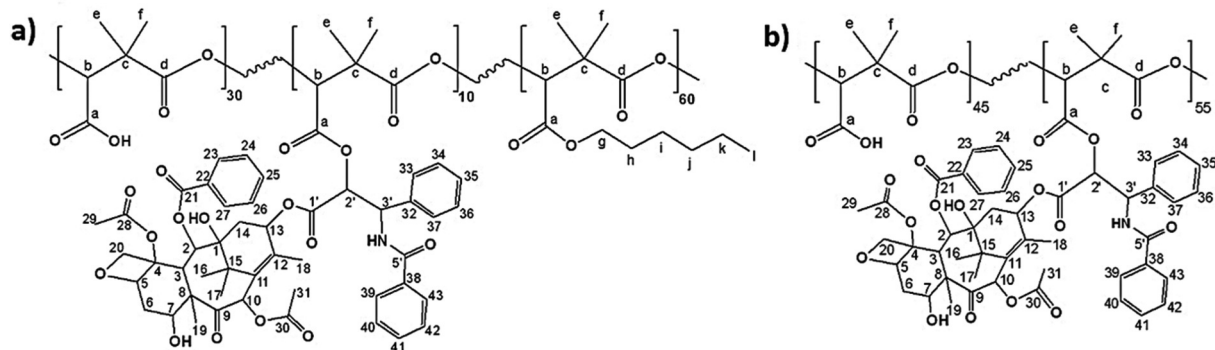
$\text{CH}_2\text{-O-hexyl}$  and at 5.20 ppm corresponding to  $-\text{CH}_2\text{-O-benzyl}$ . The final polymers with  $-\text{COOH}$  groups were obtained after a catalytic hydrogenolysis using palladium on charcoal (Scheme 1), confirmed by the disappearance of benzylic peaks at 5.2 and 7.4 ppm on the  $^1\text{H}$ -NMR spectrum for both PDMMLA 40/60 and PDMMLA 100/0.

### Covalent grafting

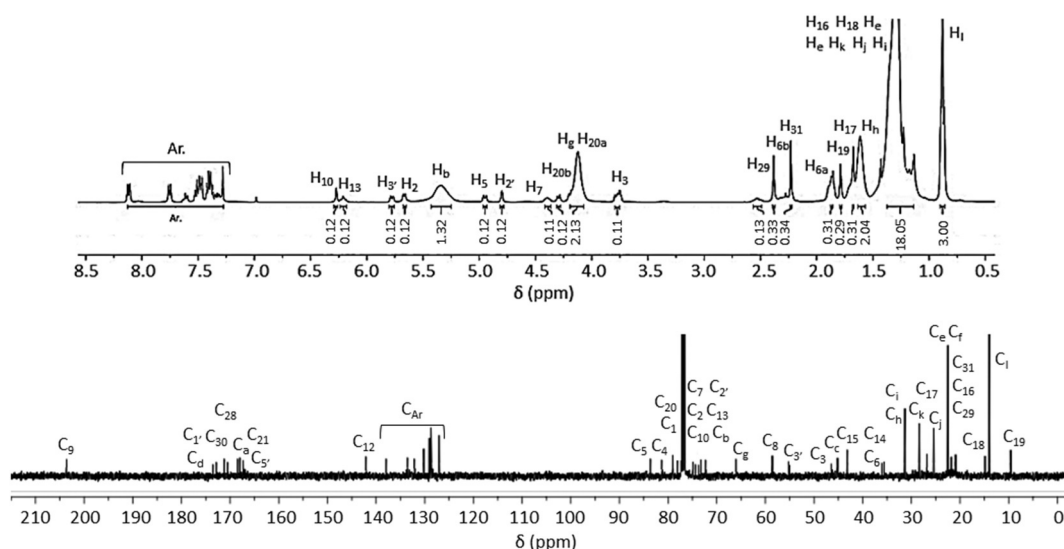
The approach was to synthesize a bioresorbable polymer with a covalently grafted active drug. The reaction was realized via the Steglich esterification



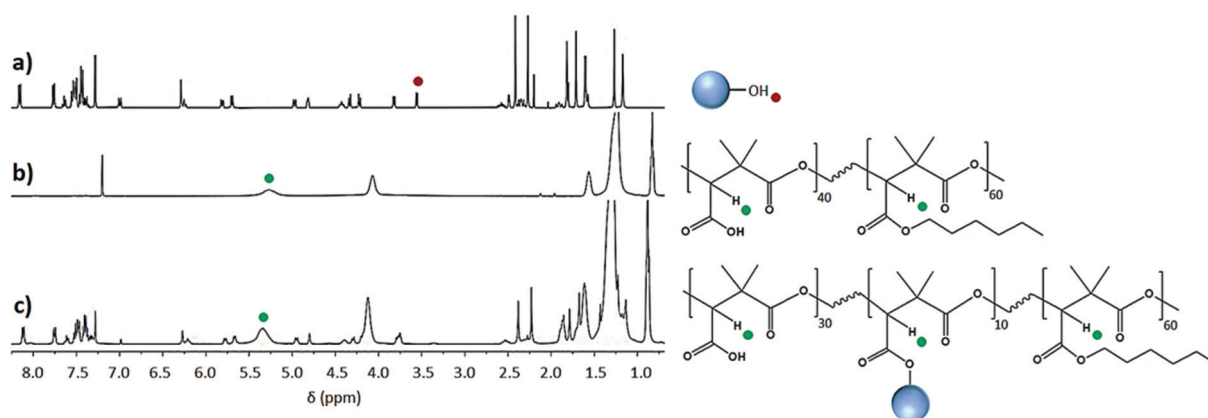
**Scheme 2:** Covalent grafting of 10% of PTX on the PDMMLA 40/60.



**Figure 3.** Chemical structure of (a) PDMMLA-PTX 30/10/60 and (b) PDMMLA-PTX 45/55.



**Figure 4.**  $^1\text{H}$  (400 MHz) and  $^{13}\text{C}$  (100 MHz)( $\text{CDCl}_3$ ) NMR spectra of the new terpolymer PDMMLA-PTX 30/10/60.



**Figure 5.**  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectra of (a) PTX (represented by the blue round shape with its available 2'-hydroxyl group), (b) PDMMLA 40/60, and (c) PDMMLA-PTX 30/10/60.

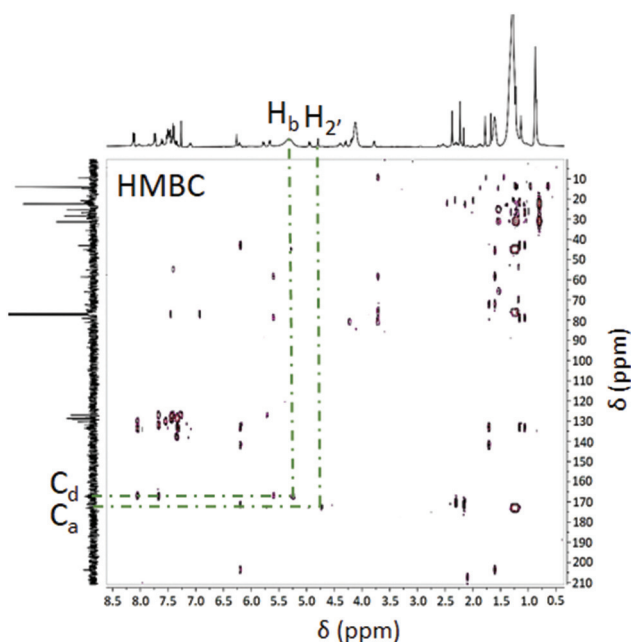
protocol, which forms a new ester bond between the 2'-OH group of PTX and the -COOH groups of the polymers (Scheme 2).

Final polymers obtained after PTX grafting on PDMMLA 40/60 and PDMMLA 100/0, are the terpolymer PDMMLAH<sub>30</sub>-ter-PTX<sub>10</sub>-ter-Hex<sub>60</sub> (PDMMLA-PTX 30/10/60) and the copolymer PDMMLAH<sub>45</sub>-CO-PTX<sub>55</sub> (PDMMLA-PTX 45/55), respectively (Figure 3). The new terpolymer PDMMLA-PTX 30/10/60 is particularly important since its development aims biomedical applications.

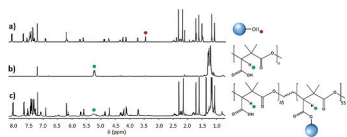
Figure 4 shows the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of the terpolymer PDMMLA-PTX 30/10/60 with the assignments of the peaks, and Figure 5 shows the comparative  $^1\text{H}$ -NMR spectra of PTX, PDMMLA 40/60 and PDMMLA-PTX 30/10/60. Chemical shifts and integrals show that the grafting by esterification has taken place involving the 2'-hydroxyl group of PTX and the carboxylic acid group of the

copolymer. The peak at 3.55 ppm on the spectrum 'a' corresponding to the proton of the alcohol on C<sub>2</sub> of PTX (Figure 5 –a) disappears on the spectrum 'c' (Figure 5–c) (after grafting), indicating that this functional group has been transformed into an ester. Using the integral values of the peak at 5.34 ppm (integrating for 1.32, proton b on the polymer chain) and the peak at 6.20 ppm (integrating for 0.12, proton H<sub>2</sub>), one can deduce the ratio of the PTX-ester groups and the remaining carboxylic acid groups on the side chain of the polymer. Calculations confirm that 10% of PTX has been grafted on PDMMLA 40/60. The desired proportion of PTX and the new terpolymer are thus successfully obtained: 10% of PTX, terpolymer PDMMLA-PTX 30/10/60 (Figure 3–a).

In addition to  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra, a heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) of the PDMMLA-PTX 30/10/60 was recorded in order to demonstrate the formation of a new bond (Figure 6). An HMBC spectrum



**Figure 6.** HMBC spectrum of the terpolymer PDMMLA-PTX 30/10/60 in  $\text{CDCl}_3$ .



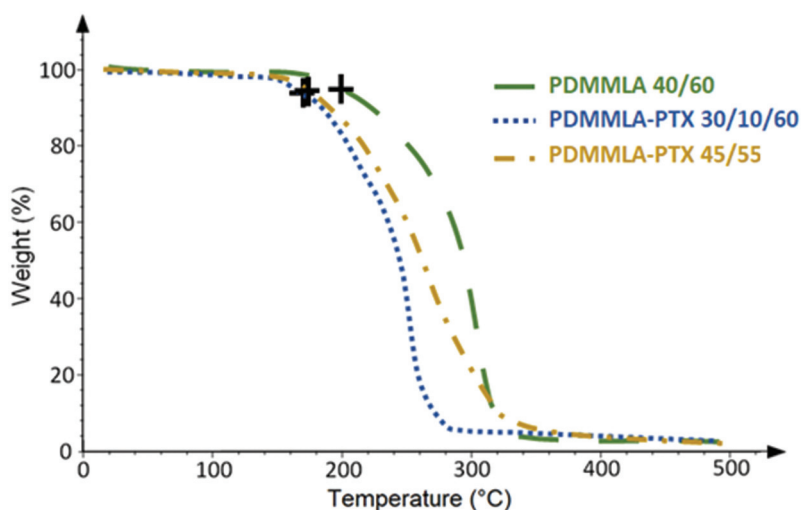
**Figure 7.**  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). spectra of: a) PTX, b) PDMMLA-H, c) PDMMLA-PTX 45/55.

represents the correlations between two different nuclei (here, carbons, and protons) through several bonds [26]. In our case, the terpolymer shows a correlation between  $\text{H}_{2'}$  and  $\text{C}_a$ , which are through three bonds ( $^3J$ ) and a correlation between  $\text{H}_b$  and  $\text{C}_d$  ( $^3J$ ). This method confirms with evidence the formation of the ester bond by demonstrating the correlation between the groups directly involved in this new bond,  $\text{H}_{2'}$  and  $\text{C}_a$  ( $^3J$ ).

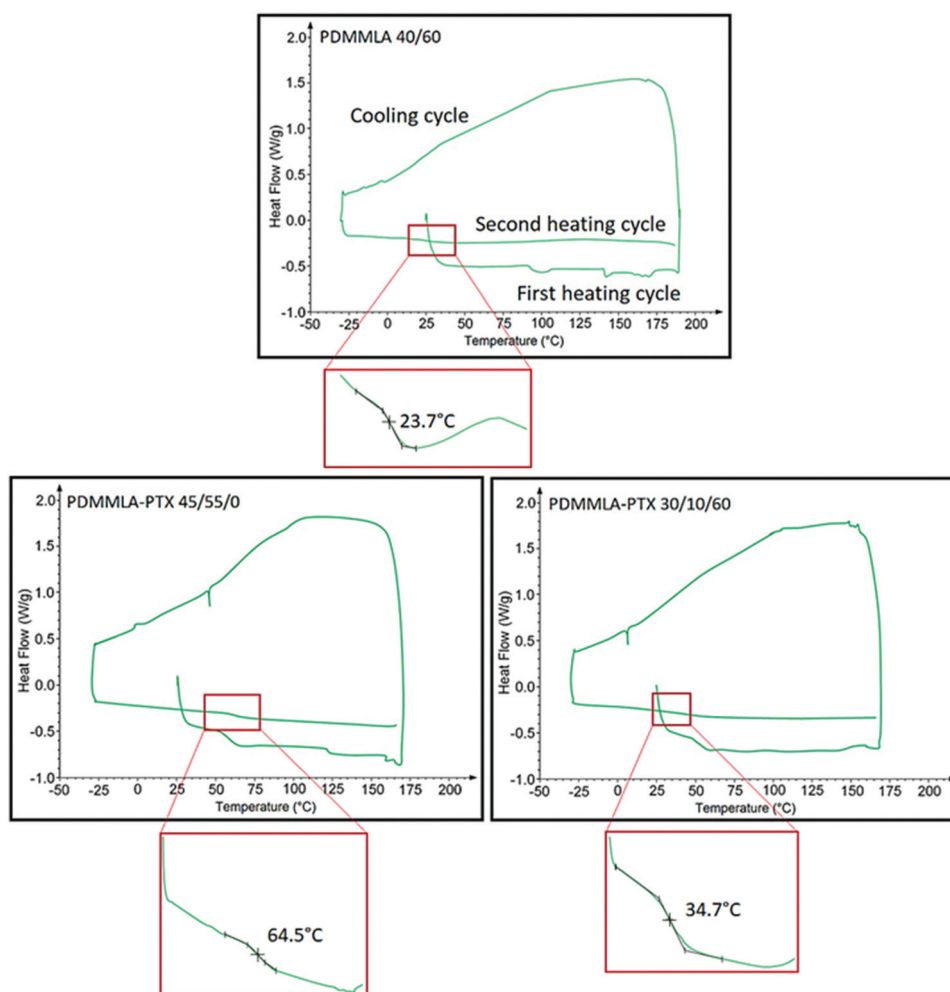
Regarding the homopolymer, NMR signals (Figure 7) of the same functional moieties show that there is 45% of free carboxylic acid groups on the PTX-grafted PDMMLA, compared to the PDMMLA 100/0. This indicates that the maximal grafting percentage is limited to around 55%, which can be explained by the relatively large structure of PTX and its consequent steric hindrance. The obtained copolymer is thus the PDMMLA $_{45}$ -co-PTX $_{55}$  or PDMMLA-PTX 45/55 (Figure 3–b).

### Thermal properties

TGA and DSC analyses were performed in order to determine the thermal properties of the polymers. The TGA measurements provide information about the thermal stability and the degradation temperature  $T_d$  of the polymers [27]. The DSC technique determines mainly the glass transition temperature  $T_g$  and melting temperature  $T_m$  of the polymer [28,29].



**Figure 8.** TGA thermograms of PDMMLA 40/60, PDMMLA-PTX 30/10/60, and PDMMLA-PTX 45/55.



**Figure 9.** DSC thermograms of PDMMMLA 40/60, PDMMMLA-PTX 30/10/60, and PDMMMLA-PTX 45/55.  $T_g$  is measured during the second heating cycle.

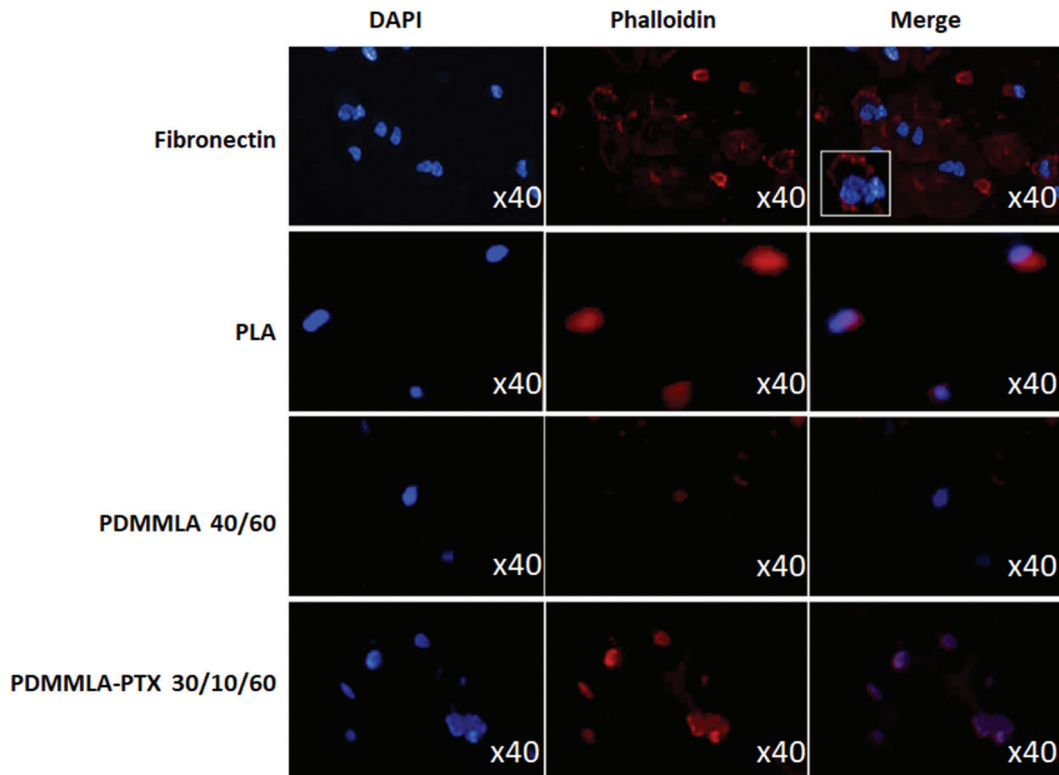
Figure 8 presents the TGA thermograms of PDMMMLA 40/60, PDMMMLA-PTX 30/10/60, and PDMMMLA-PTX 45/55. The onset of thermal degradation of each of the polymers can be observed between 170°C and 200°C. This degradation is reflected by a loss of the residual mass of the sample. In our case, the complete degradation of the polymers is observed between 270°C and 320°C.

The DSC curves of the polymers are shown in Figure 9. Results show that the grafting of 10% of PTX on the copolymer PDMMMLA 40/60 increases the  $T_g$  from 23.7°C to 34.7°C. In contrast, in the case of the homopolymer PDMMMLA-H, the  $T_g$  undergoes a slight decrease from 69.9°C to 64.5°C [11]. On the other hand, a  $T_g$  value of 34.7°C is obtained for the terpolymer PDMMMLA-PTX 30/10/60. A  $T_g$  below 37°C indicates that the polymer will be in its rubbery state at physiological temperature and consequently, will not undergo a change after implantation in the body.

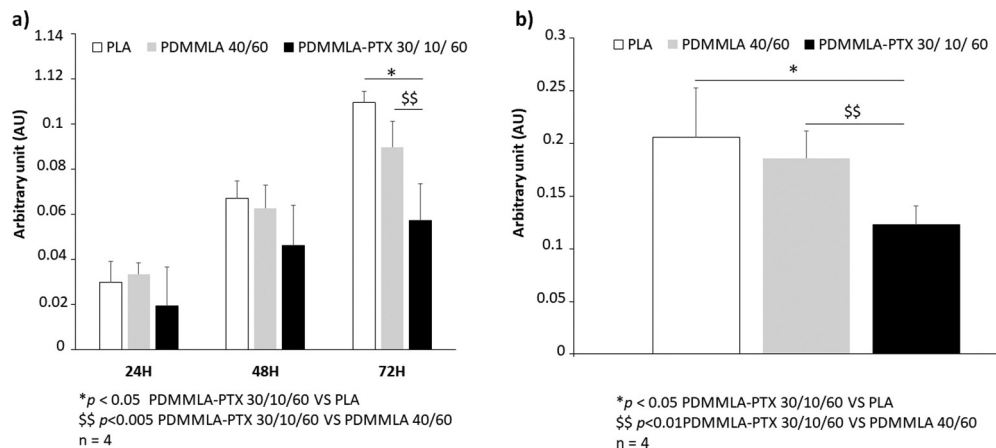
### Cell response

**Adhesion:** Cell adhesion assay was performed *in vitro* to study the attachment of HUVECs on different polymer layers (PLA, PDMMMLA 40/60 or PDMMMLA-PTX 30/10/60) and compared to fibronectin. Consequently, after 15 minutes of HUVEC incubation, we noticed an important attachment of HUVECs on PDMMMLA-PTX 30/10/60 layer, which was similar to cells attached on fibronectin. In contrast, less of HUVECs were attached on PLA and PDMMMLA 40/60 (Figure 10).

**Cytotoxicity** in HUVEC seeded on the different polymers (PLA, PDMMMLA 40/60, and PDMMMLA-PTX 30/10/60) was analyzed using LDH assay after 24 h, 48 h, and 72 h of incubation in complete culture media. The level of LDH was analyzed in conditioned media and was proportional to cell apoptosis. Our results showed that PLA and PDMMMLA 40/60 induced more cytotoxicity as compared to PDMMMLA-



**Figure 10.** Adhesion assay results on control (fibronectin), PLA, PDMMLA 40/60, and PDMMLA-PTX 30/10/60. For adhesion assay, HUVECs were seeded in Labtek™ coated with fibronectin or polymers films (PLA, PDMMLA 40/60 or PDMMLA-PTX 30/10/60) and incubated for 15 minutes in complete culture media. Then, DAPI staining (nucleus, first column) and Phalloidin staining (cytoskeleton, second column) were carried out. The merge images of the two stainings are presented in the third column. The images were taken by fluorescence microscopy (x40 magnification, high view insert in merge). Three independent experiments were carried out (n = 3).



**Figure 11.** Cytotoxicity results on PLA, PDMMLA 40/60, and PDMMLA-PTX 30/10/60. For cytotoxicity assay, HUVECs were plated on Labtek™ coated with PLA, PDMMLA 40/60 or PDMMLA-PTX 10/30/60. Figure 11a: LDH released in cell culture supernatant is proportional to cytotoxicity and was measured by colorimetric assay, as function of HUVECs incubation times (24 h, 48 h and 72 h), Figure 11b: the results of the three times of incubation were summed up to assess the global cytotoxicity of each polymer. Four independent experiments were performed. \*p < 0.05 PDMMLA-PTX 30/10/60 vs PLA; \$\$ p < 0.005 PDMMLA-PTX 30/10/60 vs PDMMLA 40/60; n = 4.



PTX 30/10/60 without any significant difference at 24 h and 48 h of cell culture. However, there was a significantly lower cytotoxicity in HUVECs cultured on PDMMLA-PTX 30/10/60 ( $0.05 \pm 0.004$ ) as compared to PLA ( $0.011 \pm 0.013$ ) and to PDMMLA 40/60 ( $0.09 \pm 0.008$ ) at 72 h of cell culture. In parallel, the cytotoxicity analyses during 3 days was gathered (24 h, 48 h and 72 h) and the result showed a significant decrease in cytotoxicity in HUVECs cultured on PDMMLA-PTX 30/10/60 ( $0.123 \pm 0.014$ ) as compared to PLA ( $0.206 \pm 0.03$ ) and PDMMLA 40/60 ( $0.186 \pm 0.019$ ) (Figures 11a and 11b).

#### 4. Conclusion

The tailored synthesis of PDMMLA derivatives allows to obtain amphiphilic copolymers with hexylic ester (-COOHex) and carboxylic acid (-COOH) side groups. The presence of chemically modifiable -COOH groups makes possible a covalent grafting of molecules on PDMMLA, such as active drugs. The covalent grafting would improve the release profile and kinetics of the active drug during the healing period.

In this work, the chemical grafting of PTX, an FDA approved active drug, was carried out on two PDMMLA derivatives following the Steglich esterification protocol. The grafting was implemented on the copolymer PDMMLA 40/60 using 0.1 equivalent of PTX per repetition unit, allowing to obtain the terpolymer PDMMLA-PTX 30/10/60, which is the product of interest for future biomedical applications, such as cardiovascular stent coating. 1D and 2D NMR analyses confirm the reaction and the formation of a new bond between PTX and the copolymer.

Following the same protocol, the grafting was also carried out on the homopolymer PDMMLA-H, using 1 equivalent of PTX in order to determine the maximal grafting percentage. NMR analyses of the products show that the grafting of PTX on PDMMLA-H is limited to 55% due to its steric hindrance.

Thermogravimetric analyses of the polymers before and after PTX grafting gave high  $T_d$  values for all polymers and a  $T_g$  value below 37°C for the terpolymer PDMMLA-PTX 30/10/60 (34.7°C), which is suitable for biomedical applications.

For the cell adhesion test, we observed the more efficient binding of the HUVECs on the PDMMLA-PTX 30/10/60 layer. Cytotoxicity analyses for 3 days (24 h, 48 h, and 72 h) showed the lowest cytotoxicity for HUVECs cultured on PDMMLA-PTX 30/10/60.

All these positive results lead to the conclusion that the PTX grafting reaction has made it possible to develop a new biodegradable and non-cytotoxic terpolymer to be used as a future coating for endovascular stents.

#### Acknowledgments

We thank Nadia Bouchemal (Université Sorbonne Paris Nord, UFR SMBH – CSPBAT- UMR 7244, group NBD) and Véronique Bennevault (Sorbonne Université, IPCM- UMR 7610, group LCP) for their cooperation and support in the preparation of this work.

#### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).


#### References

- [1] Casalini T, Perale G. Types of bioresorbable polymers for medical applications. Durability and Reliability of Medical Polymers. *2012*;2012:3–29.
- [2] Pertici G. Introduction to bioresorbable polymers for biomedical applications. In: Perale G, Hilborn J, editors. *Bioresorbable polymers for biomedical applications: from fundamentals to translational medicine*. Mezzovico-Vira: Elsevier Ltd; *2017*. p. 3–29.
- [3] Schmidt T, Abbott J. Coronary stents: history, design, and construction. *J Clin Med*. *2018*;7(126–133). DOI:10.3390/jcm7060126
- [4] Lee DH, Hernandez J. M. d. la T.: the newest generation of drug-eluting stents and beyond. *European Cardiology Review*, 13, 54–59 (*2018*). 10.15420/ecr.2018:8: 2
- [5] Wiebe J, Nef HM, Hamm CW. Current status of bioresorbable scaffolds in the treatment of coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*. *2014*;64:2541–2551.
- [6] Martinez Barbosa ME, Cammas S, Appel M, et al. Investigation of the degradation mechanisms of poly(malic acid) esters in vitro and their related cytotoxicities on J774 macrophages. *Biomacromolecules*. *2004*;5:137–143.
- [7] Braud C, Bunel C, Vert M. Poly( $\beta$ -malic acid): a new polymeric drug-carrier evidence for degradation in vitro. *Polym Bull*. *1985*;13:293–299.
- [8] Belibel R, Avramoglou T, Garcia A, et al. Effect of chemical heterogeneity of biodegradable polymers on surface energy: a static contact angle analysis of polyester model films. *Mater Sci Eng C*. *2016*;59:998–1006.
- [9] Belibel R, Barbaud C, Mora L. Dynamic contact angle cycling homogenizes heterogeneous surfaces. *Mater Sci Eng C*. *2016*;69:1192–1200.
- [10] Belibel R, Marival N, Hlawaty H, et al. Poly((R,S)-3,3-dimethylmalic acid) derivatives as a promising cardiovascular metallic stent coating: biodegradation and biocompatibility of the hydrolysis products in human endothelial cells. *Polym Degrad Stab*. *2016*;130:288–299.
- [11] Belibel R, Sali S, Marival N, et al. PDMMLA derivatives as a promising cardiovascular metallic stent coating: physicochemical and biological evaluation. *Mater Sci Eng C*. *2020*;117(111284). 10.1016/j.msec.2020.111284

- [12] Huang X, Brazel CS. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J Control Release*. 2001;73:121–136.
- [13] Alves RC, Fernandes RP, Eloy JO, et al. Characteristics, properties and analytical methods of paclitaxel: a review. *Crit Rev Anal Chem*. 2018;48:110–118.
- [14] Weaver BA, Bement W. How taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2014;25:2677–2681.
- [15] Ng VG, Mena C, Pietras C, et al. Local delivery of paclitaxel in the treatment of peripheral arterial disease. *Eur J Clin Invest*. 2015;45:333–345.
- [16] Kuhlmann TW, Pelisek MT, Scobioala J, et al. S.: paclitaxel delivered to adventitia attenuates neointima formation without compromising re-endothelialization after angioplasty in a porcine restenosis model. *J Endovasc Ther*. 2006;13:616–629.
- [17] Vieira GV, Lacerda MA, Castro V, et al. S. J.: a new, simple and efficient method of steglich esterification of juglone with long-chain fatty acids: synthesis of a new class of non-polymeric wax deposition inhibitors for crude oil. *J Braz Chem Soc*. 2015;26:74–83.
- [18] Molnár K, Behra J, Takács L, et al. A Convenient Procedure for the Synthesis of 2,2,2-Trifluoroethyl Methyl 2-Oxoalkylphosphonates. Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements. 2015;190:677–680.
- [19] Neises B, Steglich W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1978;17:522–524.
- [20] Lutjen AB, Quirk MA, Barbera AM, et al. Synthesis of (E)-cinnamyl ester derivatives via a greener steglich esterification. *Bioorg Med Chem*. 2018;26:5291–5298.
- [21] Zou YY, Yu J, Ji L, et al. C.: functional poly(lactide- g - paclitaxel-poly(ethylene glycol) by azide-alkyne click chemistry. *Macromolecules*. 2011;44:4793–4800.
- [22] Zhang S, Zou J, Elsbahy M, et al. Poly(ethylene oxide)-block-polyphosphoester-based paclitaxel conjugates as a platform for ultra-high paclitaxel-loaded multifunctional nanoparticles. *Chem Sci*. 2013;4:2122–2126.
- [23] Ouhib F, Randriamahefa S, Guerin P, et al. Synthesis of new statistical and block co-polyesters by ROP of  $\alpha,\alpha,\beta$ -trisubstituted  $\beta$ -lactones and their characterizations. *Des Monomers Polym*. 2005;8:25–35.
- [24] Barbaud C, Abdillah F, Fabienne F, et al. Synthesis of new  $\alpha, \alpha', \beta$ -trisubstituted  $\beta$ -lactones as monomers for hydrolyzable polyesters. *Des Monomers Polym*. 2003;6:353–367.
- [25] Belibel R, Azzouz I, Barbaud C. Synthesis and characterizations of new isotactic homopolyesters, statistical and block copolyesters derived of poly((S)-3,3-dimethylmalic acid) via the lactone route. *J Polym Sci Part A*. 2016;54:1495–1507.
- [26] Szakács Z, Sánta Z, Methodological Overview NMR. Anthropoc awareness: the human aspects of scientific thinking in NMR spectroscopy and mass spectrometry. Eds. Szantay C Elsevier Inc. Budapest 2015:257–289 2015; 10.1016/B978-0-12-419963-7.00007-9
- [27] El-Sayed S, Mahmoud KH, Fatah AA, et al. DSC, TGA and dielectric properties of carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol blends. *Phys B Condens Matter*. 2011;406:4068–4076.
- [28] Grunina NA, Belopolskaya TV, Tsereteli GI. The glass transition process in humid biopolymers. DSC study. *J Phys*. 2006;40:105–110.
- [29] Gornicka B, Gorecki L. TGA/DTG/DSC investigation of thermal ageing effects on polyamide-imide enamel. *J Therm Anal Calorim*. 2010;101(647–650). 10.1007/s10973-010-0883-9


### **Annexe 3 : Liste des communications**

#### **1) Communications nationales affichées :**

-  **SFA:** Société Française d'Angiogenèse: Symposium-GDR, réparer l'humain- WP3: Interface cellules-environnement. Collège de France. 13 Décembre 2019.


Titre: Glycosaminoglycans are implicated in CXCL12-induced angiogenesis.

Auteurs : **NAIM Meriem**, Kevin Bassand, Nesrine Mouhoubi, Oualid Haddad, Naima Zaidi, Odile Sainte catherine, Christelle Laguillier Morizot, Erwan Guyot, Olivier Oudar, Nathalie Charnaux, Angela Sutton, Hanna Hlawaty.

-  **NSFA:** Nouvelle société francophone d'athérosclérose, 16ème congrès de la NSFA Biarritz, le 23 et 24 Juin 2021, Poster+flash présentation

Titre: Glycosaminoglycans are implicated in CXCL12-induced angiogenesis.


Auteurs : **NAIM Meriem**, Kevin Bassand, Nesrine Mouhoubi, Oualid Haddad, Odile Sainte catherine, Christelle Laguillier Morizot, Erwan Guyot, Olivier Oudar, Nathalie Charnaux, Angela Sutton, Hanna Hlawaty.

-  **SFA:** Société Française d'angiogenèse. Congrès d'angiogenèse, 9ème édition Nantes (E-congres) le 16 et 17 Novembre 2021 Poster

Titre: Glycosaminoglycans are implicated in CXCL12-induced angiogenesis.

Auteurs : **NAIM Meriem**, Kevin Bassand, Nesrine Mouhoubi, Oualid Haddad, Odile Sainte-Catherine, Olivier Oudar, Nathalie Charnaux, Angela Sutton, Hanna Hlawaty.

#### **2) Communications internationales affichées:**

-  **EAS:** European society of atherosclerosis: 89th EAS virtual congres Helsinki (E-Congres) du 30Mai au 2 Juin 2021, Poster+flash présentation.

Titre: Glycosaminoglycans are implicated in CXCL12-induced angiogenesis.

Auteurs: **NAIM Meriem**, Kevin Bassand, Nesrine Mouhoubi, Oualid Haddad, Odile Sainte catherine, Christelle Laguillier Morizot, Erwan Guyot, Olivier Oudar, Nathalie Charnaux, Angela Sutton, Hanna Hlawaty.

**Abstract Publié** dans Atherosclerosis journal « official journal of EAS » impact factor 5.162 Édition d'Aout 2021, volume 331



## Résumé

---

Les maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose représentent la première cause de mortalité dans le monde. L'athérosclérose est caractérisée par une obstruction des vaisseaux sanguins causant une ischémie, définie par une diminution ou arrêt du flux sanguin et pouvant aboutir à la nécrose des tissus. Comme réponse compensatoire, l'organisme stimule l'angiogenèse. L'angiogenèse est un processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins médié par les cellules endothéliales en réponse à des facteurs pro-angiogéniques tels que les facteurs de croissance (VEGF) et les chimiokines (CXCL12). Les protéoglycannes (PG) sont des protéines liées de manière covalente à des chaînes de glycosaminoglycannes (GAG) qui interviennent dans la régulation de différents processus cellulaires à travers leur capacité à se lier à diverses molécules. Les GAG et les PG sont les éléments majoritaires composant le glycocalyx endothélial vasculaire. Cependant, le glycocalyx est dégradé au cours de l'ischémie. De ce fait, nous avons étudié dans un modèle de cellules endothéliales, l'impact de l'appauvrissement en GAG sur les processus impliqués dans l'angiogenèse. Nos résultats ont principalement montré que la réduction en GAG *in vitro* engendre une modification de l'expression des PG SDC-1 et SDC-4, une perturbation de la balance adhérence-migration et une inhibition de la formation de réseaux vasculaires en absence et en présence de CXCL12 (*in vitro* et *ex vivo* sur modèle d'anneaux aortiques de rat). Ces résultats mettent en évidence le rôle important des GAG dans l'angiogenèse.

**Mots clés :** Glycosaminoglycannes, angiogenèse, cellules endothéliales.

## Abstract

---

Cardiovascular diseases such as atherosclerosis are the leading cause of death in the world. Atherosclerosis is characterized by a blockage of blood vessels causing ischemia, defined as a decrease or cessation of blood flow which can lead to tissue necrosis. As a compensatory response, the body stimulates angiogenesis. Angiogenesis is a process of new blood vessel formation mediated by endothelial cells in response to pro-angiogenic factors such as growth factors (VEGF) and chemokines (CXCL12). Proteoglycans (PGs) are proteins covalently linked to glycosaminoglycan (GAG) chains that are involved in the regulation of several cellular processes through their ability to bind to different molecules. GAGs and PGs are the major components of the vascular endothelial glycocalyx. However, the glycocalyx is degraded during ischemia. Therefore, we studied in an endothelial cell model the impact of GAG depletion on the processes involved in angiogenesis. Our results mainly showed that GAG depletion *in vitro* leads to a modification of the expression of the PGs SDC-1 and SDC-4, a disruption of the adhesion-migration balance and an inhibition of vascular networks formation in absence and in presence of CXCL12 (*in vitro* and *ex vivo* in rat aortic ring model). These results highlight the important role of GAGs in angiogenesis.

**Key words:** Glycosaminoglycans, angiogenesis, endothelial cells