

N° d'ordre : 40163

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse de doctorat

Présentée par

Audrey DELIGNY

En vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lille

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Rôle des glucosaminyl sulfotransférases dans la biosynthèse de motifs héparanes sulfates impliqués dans la fixation et l'activité de facteurs inflammatoires

Soutenue le 10 décembre 2009 devant la commission d'examen :

Président : Dr. Jean-Claude MICHALSKI (Directeur de recherche INSERM, Lille)

Rapporteurs : Dr. Hugues LORTAT-JACOB (Directeur de recherche CNRS, Grenoble)
Dr. Sylvie FOURNEL-GIGLEUX (Directeur de recherche INSERM, Nancy)

Examineurs : Dr. Nathalie CHARNAUX (Université Paris 13)
Dr. Joël MAZURIER (Directeur de recherche CNRS, Lille)
Pr. Fabrice ALLAIN (Université de Lille 1)

N° d'ordre : 40163

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse de doctorat

Présentée par

Audrey DELIGNY

En vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lille

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Rôle des glucosaminyl sulfotransférases dans la biosynthèse de motifs héparanes sulfates impliqués dans la fixation et l'activité de facteurs inflammatoires

Soutenue le 10 décembre 2009 devant la commission d'examen :

Président : Dr. Jean-Claude MICHALSKI (Directeur de recherche INSERM, Lille)

Rapporteurs : Dr. Hugues LORTAT-JACOB (Directeur de recherche CNRS, Grenoble)
Dr. Sylvie FOURNEL-GIGLEUX (Directeur de recherche INSERM, Nancy)

Examineurs : Dr. Nathalie CHARNAUX (Université Paris 13)
Dr. Joël MAZURIER (Directeur de recherche CNRS, Lille)
Pr. Fabrice ALLAIN (Université de Lille 1)

Ce travail a été réalisé sous la direction du Pr. Fabrice ALLAIN au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 du CNRS (Directeur : Dr. Jean-Claude MICHALSKI), Université des Sciences et Technologies de Lille.

Il a bénéficié d'une allocation de Recherche financée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Tout d'abord, je souhaite vivement remercier les membres du jury,

Monsieur le Docteur Jean-Claude MICHALSKI,

Malgré vos nombreuses occupations, vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.

Monsieur le Docteur Hugues LORTAT-JACOB,

Je suis sensible à l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de juger ce travail en qualité de Rapporteur. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Madame le Docteur Sylvie FOURNEL-GIGLEUX,

Vous m'avez fait l'honneur d'être Rapporteur de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt que vous portez à ce travail et soyez assurée de ma plus vive reconnaissance.

Madame le Docteur Nathalie CHARNAUX,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Je tiens à vous exprimer mes sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Joël MAZURIER,

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre équipe. Soyez assuré de mes sincères remerciements et de mon entière gratitude.

Monsieur le Professeur Fabrice ALLAIN,

Les quatre années que j'ai passées au sein de ton équipe m'ont apporté bien plus qu'une formation à la Recherche. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée. Tu n'as jamais douté, même quand je n'y croyais plus. Je te remercie pour ta disponibilité, ton soutien, ta gentillesse et tes précieux conseils. Merci de m'avoir guidée et de m'avoir permis d'avancer sereinement dans mes travaux. Sois assuré de mon profond respect et de mon entière reconnaissance.

Je tiens également à remercier tout particulièrement,

Agnès,

Je te remercie pour ta disponibilité, ta patience et ton soutien à mon égard. Ton enthousiasme, ta persévérance et tes bons conseils m'ont permis de mener à bien ce projet et m'ont appris à ne rien lâcher. Trouve ici tous mes remerciements et ma plus profonde gratitude.

Adeline,

Au cours de ces deux dernières années, j'ai pu apprécier ta bonne humeur et ton *sourire*. Je te remercie pour tous les bons moments partagés à la paillasse ou en dehors, pour nos discussions anti-stress et pour toute l'aide que tu m'as apportée quand j'en ai eu besoin. Je te remercie pour ton amitié et te souhaite un avenir plein de réussite.

Aurélie M.,

J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler à tes côtés. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et l'aide précieuse que tu as pu m'apporter au cours de ces années.

Fanny,

Merci pour ces quelques moments passés à travailler ensemble. Je te souhaite autant de plaisir que j'en ai eu à travailler dans l'équipe.

Aux étudiants du premier étage,

Ma gratitude s'adresse aussi à ceux qui m'ont supportée pendant plus de trois ans dans le bureau des d'jeuns. Adeline, Aurélie M., Esthelle, Marie-Estelle et Stéphan, je vous remercie pour tous les fous rires que l'on a pu partager au cours de ces années. Ces moments de détente nous ont sans doute permis de surmonter les ratages parfois trop nombreux.

Béatrice, Agnès, Edwige (et bébé),

Je vous remercie profondément pour la relecture de ce manuscrit et les corrections judicieuses que vous m'avez suggérées.

Je tiens également à remercier ceux que je nommerai « mes compagnons de thèse ». Adeline, Aurélie C., Béatrice, Edwige, Sylvain, Stéphane, Marie, Fala, Gilles et Anne-France, je vous remercie pour toutes les petites choses que vous m'avez apportées au cours de ces années. Nos merveilleux repas partagés au Pariselle, nos discussions sans fin et nos

mémorables soirées resteront pendant longtemps dans ma mémoire. Je vous exprime toute mon amitié.

Je remercie également toutes les personnes de l'étage pour leur accueil chaleureux et leur sympathie.

Je voudrais adresser un remerciement particulier à tous les membres de l'UMR 8576 dont la bonne humeur offre au quotidien une ambiance de travail chaleureuse qui, selon les dires, est sans égal.

Je tiens également à remercier mes proches, Maxime, Carole, Pauline et Caro. Merci pour votre compréhension et votre soutien.

Pour terminer, peut-être le plus important, mes remerciements les plus profonds vont à mes parents, à qui je dédie cette thèse. Vos encouragements et votre soutien sans faille tout au long de ces années m'ont sans doute permis d'effectuer ce travail. Vous m'avez donné toutes les chances pour réussir et avez toujours été présents pour moi. Trouvez ici l'expression de mon entière gratitude et de mon affection.

RESUME

Les héparanes sulfates (HS) sont synthétisés à partir d'un précurseur non sulfaté, formé de la répétition du disaccharide [GlcUA β 1,4 GlcNAc]. Ce précurseur est ensuite modifié par des enzymes de maturation, *N*-déacétylase/*N*-sulfotransférases (NDSTs), *O*-sulfotransférases (OSTs) et C₅-épimérase. Ces enzymes, dont l'expression est dépendante du type cellulaire, possèdent des activités et des spécificités de substrat différentes, ce qui confère une grande hétérogénéité structurale aux HS et offre un large éventail de motifs de fixation pour les protéines. Il est clairement établi que les protéoglycanes à chaînes HS régulent la fixation et l'activité de nombreux facteurs inflammatoires. En revanche, peu d'informations sont disponibles sur la nature de leurs motifs HS de fixation.

L'objectif de ces travaux a été de relier les variations d'expression des glucosaminyl sulfotransférases à la génération de motifs HS spécialisés dans la fixation des facteurs inflammatoires. Dans cette optique, nous avons utilisé comme modèles la cyclophiline B (CyPB) et la chimiokine RANTES/CCL5, deux facteurs chimio-attractants dont les activités sont dépendantes de leur interaction avec les chaînes HS. La caractérisation structurale du motif HS reconnu par la CyPB a permis de mettre en évidence la présence d'une glucosamine *N*-non substituée 3-*O*-sulfatée et de souligner l'importance de la densité en groupements *N*-sulfates dans les interactions. Nous avons alors entrepris l'étude de l'expression des glucosaminyl sulfotransférases dans divers types cellulaires et avons montré que les lymphocytes T et les monocytes/macrophages expriment majoritairement la NDST2 et les 3-OST-3. L'invalidation de ces enzymes par ARN interférence a permis de démontrer que la fixation et l'activité de la CyPB sont dépendantes de l'expression de ces deux enzymes. A la différence de la CyPB, les 3-OST-3 ne sont pas nécessaires pour la fixation cellulaire de RANTES/CCL5. Toutefois, nous avons montré qu'elles sont absolument requises pour les réponses biologiques induites par la chimiokine, ce qui suggère que les 3-OST-3, et par conséquent les HS 3-*O*-sulfatés, régulent les activités de la CyPB et de RANTES/CCL5 *via* deux mécanismes distincts. En conclusion, ces travaux démontrent, pour la première fois, que la spécificité d'action des facteurs inflammatoires est dépendante de la présence de motifs HS particuliers à la surface de leurs cellules cibles, conséquence de l'expression spécifique de certaines glucosaminyl sulfotransférases par ces cellules. En outre, ces travaux devraient fournir de nouveaux éléments pour développer des molécules dérivées des motifs HS ayant des applications dans le traitement de certaines pathologies inflammatoires.

SUMMARY

Heparan sulfate (HS) are synthesized from a non-sulfated precursor, formed by the repetition of the disaccharide unit [GlcUA β 1,4 GlcNAc]. This precursor is subsequently modified by a set of enzymes of maturation, *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferases (NDSTs), *O*-sulfotransferases (OSTs) and C₅-epimerase. These enzymes, whose expression is dependent on cell type, exhibit fine differences in activity and substrate specificity, which confer a large structural heterogeneity in HS species and offer a plethora of binding sites for proteins. It is now well established that HS proteoglycans regulate the binding and activity of a number of inflammatory factors. However, little is known about the structural features of HS sequences involved in these interactions.

The aim of these works was to correlate the cell-type specific expression of HS biosynthetic enzymes to the generation of specialized HS motifs with binding properties for inflammatory factors. To this end, we used cyclophilin B (CyPB) and RANTES/CCL5, two models of chemotactic factors for which the responses are dependent on the interactions with HS chains. Structural analysis of the HS motif involved in the specific binding of CyPB led us to emphasize the presence of an *N*-unsubstituted 3-*O*-sulfated glucosamine residue and to highlight the importance of the density of *N*-sulfate groups for the interactions. We then studied the expression of glucosaminyl sulfotransferases in various cell types and we showed that inflammatory cells express high levels of NDST2 and 3-OST-3 isoforms. Down-regulation of these enzymes by RNA interference demonstrated that both enzymes contribute to the synthesis of HS motifs with CyPB-binding and -activating properties. Unlike CyPB, cell binding of RANTES/CCL5 was not dependent on the expression of 3-OST-3 isoforms. However, these enzymes are absolutely required for biological responses induced by the chemokine, suggesting that 3-OST-3, and consequent 3-*O*-sulfation of HS, regulate the responses induced by CyPB and RANTES/CCL5 *via* two distinct mechanisms. In conclusion, our results demonstrate for the first time that the specificity of action of inflammatory factors is dependent on the expression of specialized HS motifs on the surface of responsive cells, as a result of cell-type specific expression of certain glucosaminyl sulfotransferases. Moreover, these works may provide new insights for the development of HS-derived molecules with therapeutic applications in some inflammatory disorders.

ABRÉVIATIONS

2-OST : 2- <i>O</i> -sulfotransférase	EMSA : electrophoretic mobility shift assay
3'PB : 3'-phosphate binding motif	ERK : extracellular signal-regulated kinase
3-OST : 3- <i>O</i> -sulfotransférase	ERM : ezrin, radixin, moesin
5'PSB : 5'-phosphosulfate binding motif	ESM-1 : endothelial cell specific molecule-1
5'UTR : 5'-untranslated region	EXT : exostosin
6-OST : 6- <i>O</i> -sulfotransférase	FGF : fibroblast growth factor
ADN : acide désoxyribonucléique	FMV : variation of fluorescence mean
AH : acide hyaluronique	GABP : GA-binding protein
apoO : apolipoprotéine O	GAG : glycosaminoglycane
ARN : acide ribonucléique	Gal : galactose
AT-III : antithrombine III	GFP : green fluorescent protein
BACE1 : beta amyloïd cleaving enzyme 1	GlcNAc : glucosamine <i>N</i> -acétylée
BMP : bone morphogenetic protein	GlcNH₂ : glucosamine <i>N</i> -non substituée
BSA : bovine serum albumin	GlcNS : glucosamine <i>N</i> -sulfatée
CASK : calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase	GlcUA : acide D-glucuronique
CD : cluster of differentiation	GM-CSF : granulocyte macrophage-colony stimulating factor
CDS : coding DNA sequence	GPI : glycosylphosphatidylinositol
CS : chondroïtine sulfate	HBD : heparin-binding domain
CsA : cyclosporine A	HB-GAM : heparin-binding growth-associated molecule
CTAP-III : connective tissue activating peptide-III	HBP : heparin-binding protein
CyPA, CyPB : cyclophiline A, B	HGF : hepatocyte growth factor
DMEM : dulbecco's modified eagle medium	HIV : human immunodeficiency virus
dp : degré de polymérisation	HME : hereditary multiple exostoses
DPBS : dulbecco's phosphate buffered saline	HPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
DS : dermatane sulfate	HS : héparane sulfate
ECL : enhanced chemiluminescence	HSPG : protéoglycane à chaînes HS
EDTA : éthylène diamine tétra acétate	HSV-1 : herpes simplex virus type 1
EGF : epithelial growth factor	HVEM : herpesvirus entry mediator
	IdoUA : acide L-iduronique
	IFNγ : interféron γ

Ig : immunoglobuline
IGF : insulin-like growth factor
IL : interleukin
IRES : internal ribosome entry site
Kd : constante de dissociation
kDa : kilodalton
KS : kératine sulfate
LDL : low-density lipoprotein
LPS : lipopolysaccharide
LRR : leucine-rich repeat
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF-1 : macrophage-colony stimulating factor-1
MIFT : mi transcription factor
MIP-1 β : macrophage inflammatory protein-1 β
MM : masse moléculaire
MPS : mucopolysaccharidose
NA : *N*-acétylé
N-CAM : neural cell adhesion molecule
NDST : *N*-déacétylase/*N*-sulfotransférase
Ng-CAM : neuron-glia cell adhesion molecule
NS : *N*-sulfaté
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
PAP : 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate
PAPS : 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate
pb : paire de base
PBP : platelet basic protein
PDGF : platelet-derived growth factor
PDZ : post-synaptic density-95/ discs-large/ zonula occludens-1
PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PF4 : platelet factor 4
PG : protéoglycane
pI : point isoélectrique
PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PI-PLD : phosphatidylinositol phospholipase D
PKC α : protéine kinase C α
PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate
PPIase : peptidyl-prolyl cis/trans isomérase
RANTES : regulated on activation normal T-cell expressed and secreted
RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SDF-1 : stromal cell-derived factor-1
SDS : sodium dodecyl sulfate
siRNA : small-interfering RNA
SMC3 : structural maintenance of chromosome 3
SVF : sérum de veau foetal
TBS : tris-buffered saline
TCF4 : T-cell factor 4
TGF- β : transforming growth factor- β
TNF- α : tumor necrosis factor- α
UDP : uridine diphosphate
VEGF : vascular endothelial growth factor
VSV : vesicular stomatitis virus
Xyl : xylose

Acides aminés :
A (Ala) : alanine
C (Cys) : cystéine
D (Asp) : acide aspartique
E (Glu) : acide glutamique
F (Phe) : phénylalanine

G (Gly) : glycine

H (His) : histidine

I (Ile) : isoleucine

K (Lys) : lysine

L (Leu) : leucine

M (Met) : méthionine

N (Asn) : asparagine

P (Pro) : proline

Q (Gln) : glutamine

R (Arg) : arginine

S (Ser) : sérine

T (Thr) : thréonine

V (Val) : valine

W (Trp) : tryptophane

Y (Tyr) : tyrosine

Table des Matières

AVANT-PROPOS	1
GENERALITES	6
Chapitre I : Les protéoglycanes	7
A - Les glycosaminoglycanes	8
A.1. L'acide hyaluronique	9
A.2. L'héparine et les héparanes sulfates	10
A.3. Les kératanes sulfates	11
A.4. Les chondroïtines sulfates	12
A.5. Les dermatanes sulfates	12
B - Les « cores » protéiques	13
B.1. Les protéoglycanes intracellulaires	13
B.2. Les protéoglycanes membranaires	15
B.2.1. Les syndécans	15
B.2.2. Les glypicans	18
B.2.3. Le CD44	21
B.2.4. Le bétaglycan	23
B.3. Les protéoglycanes extracellulaires	24
B.3.1. Les protéoglycanes de la membrane basale	24
a) Le perlécan	24
b) L'agrine	26
c) Les collagènes XVIII et XV	27
d) Le bamacan	27
B.3.2. Les hyalectanes	28
a) Le versican	29
b) L'aggrécan	30
c) Les autres hyalectanes	31
B.3.3. Les protéoglycanes riches en leucine	31
a) La décorine	32
b) Le biglycan	33
c) Le lumican	33
d) La fibromoduline	34
B.3.4. Les protéoglycanes circulants	34
a) Le protéoglycane-100	34
b) La bikunine	34
c) L'endocan	36
d) L'apolipoprotéine O	36
Chapitre II : Les héparanes sulfates, des régulateurs essentiels de nombreux médiateurs extracellulaires	37
A - Implication des héparanes sulfates dans divers processus biologiques	38
A.1. Augmentation de l'activité des protéines par changement conformationnel	38
A.2. Protection et stockage des protéines	40
A.3. Oligomérisation et présentation des protéines	42
A.4. Participation aux complexes de signalisation	43
A.5. Organisation de la matrice extracellulaire	45

A.6. Internalisation des protéines.....	45
A.7. Fixation des agents pathogènes.....	46
B - L'interaction héparane sulfate/protéine.....	47
B.1. Caractéristiques de l'interaction	47
B.2. Spécificité des sites de fixation.....	50
Chapitre III : Métabolisme des héparanes sulfates	53
A - Biosynthèse des héparanes sulfates	54
A.1. Schéma général	54
A.1.1. L'initiation	54
A.1.2. L'élongation.....	57
A.1.3. La maturation	58
A.2. Les enzymes de maturation	59
A.2.1. Les glucosaminyl <i>N</i> -déacétylase/ <i>N</i> -sulfotransférases.....	59
a) Structure	59
b) Activités	64
c) Régulation de l'expression	65
A.2.2. La glucuronyl C ₅ -épimérase	68
a) Structure	68
b) Activités	69
c) Régulation de l'expression	70
A.2.3. L'uronosyl 2- <i>O</i> -sulfotransférase	71
a) Structure	71
b) Activités	72
c) Régulation de l'expression	74
A.2.4. Les glucosaminyl 6- <i>O</i> -sulfotransférases	74
a) Structure	74
b) Activités	77
c) Régulation de l'expression	78
A.2.5. Les glucosaminyl 3- <i>O</i> -sulfotransférases	79
a) Structure	79
b) Activités	83
c) Régulation de l'expression	85
A.3. Le concept du « GAGosome »	86
B - Dégradation des héparanes sulfates	88
B.1. Remodelage fonctionnel des héparanes sulfates ou « processing »	88
B.2. Recyclage des héparanes sulfates ou « turn-over »	90
TRAVAUX PERSONNELS	94
Chapitre I : Identification des glucosaminyl sulfotransférases impliquées dans la synthèse du motif HS spécifique de la CyPB.....	95
Introduction	96
<u>Publication 1</u> : The heparin/heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B contains a 3- <i>O</i> -sulfated <i>N</i> -unsubstituted glucosamine residue	
<u>Publication 2</u> : <i>N</i> -deacetylase/ <i>N</i> -sulfotransferase 2 contributes to the synthesis of heparan sulfate motifs with cyclophilin B-binding and activating properties	

Discussion.....	140
Chapitre II : Importance de la 3- <i>O</i> -sulfatation dans les réponses cellulaires induites par la CyPB et la chimiokine RANTES/CCL5.....	147
A - Introduction	148
B - Résultats.....	151
B.1. Etude de l'expression et de l'activité des 3- <i>O</i> -sulfotransférases dans les cellules inflammatoires.....	151
B.1.1. Analyse de l'expression des 3- <i>O</i> -sulfotransférases dans divers types cellulaires.....	151
B.1.2. Etude des variations d'expression des 3- <i>O</i> -sulfotransférases en réponse à des stimuli inflammatoires	152
B.1.3. Etude des variations de sulfatation des HS membranaires.....	154
B.2. Rôle des 3-OST-3 dans la synthèse du motif HS de fixation de RANTES.....	157
B.2.1. Effet de l'invalidation des 3-OST-3 sur les interactions entre RANTES et les HS membranaires.....	158
B.2.2. Effet de l'invalidation des 3-OST-3 sur les activités biologiques de RANTES	160
a) Activité chimiotactile	160
b) Activation de la voie p44/p42 MAPK.....	160
C - Discussion	163
D - Matériels et méthodes.....	166
D.1. Matériels	166
D.2. Culture cellulaire et isolation des leucocytes du sang.....	167
D.3. Invalidation des sulfotransférases par ARN interférence	168
D.4. Quantification de l'expression des ARNm par RT-PCR	168
D.5. Analyse par cytofluorimétrie en flux	169
D.6. Etude du chimiotactisme	170
D.7. Détection de l'expression des protéines par immunorévélation	171
D.8. Analyse statistique	171
CONCLUSION GENERALE.....	172
ANNEXE.....	178
<u>Publication 3</u> : Cyclophilin B induces integrin-mediated cell adhesion by a mechanism involving CD98-dependent activation of protein kinase C-delta and p44/42 mitogen-activated protein kinases	
BIBLIOGRAPHIE	194

Avant-Propos

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe « Rôle des protéoglycanes à chaînes héparanes sulfates dans la fixation et l'activité des facteurs inflammatoires » dirigée par le Pr. Fabrice ALLAIN et s'inscrit dans la thématique du groupe « Régulation de la réaction inflammatoire et du cancer par les glycoconjugués » (Dr. Joël MAZURIER).

Malgré l'intérêt grandissant porté aux héparanes sulfates (HS) dans la régulation de phénomènes biologiques autant physiologiques que pathologiques, les mécanismes à l'origine de la diversité structurale et fonctionnelle de ces molécules restent peu connus. L'objectif de ma thèse a été de participer à la compréhension de ces mécanismes, en étudiant les relations entre la biosynthèse de motifs HS spécifiques et les activités de deux familles de facteurs inflammatoires, les chimiokines et les cyclophilines.

Présents à la surface de nombreux types cellulaires et dans la matrice extracellulaire, les protéoglycanes à chaînes HS (HSPGs) sont d'importants éléments régulateurs qui interviennent dans des mécanismes aussi généraux que la prolifération, la différenciation, l'adhérence et/ou la migration cellulaire. Ce vaste répertoire fonctionnel est lié à la capacité des chaînes HS à interagir spécifiquement avec une myriade de protéines telles que les facteurs de croissance, les cytokines, les chimiokines, les protéines de la matrice extracellulaire ou encore les inhibiteurs de protéases.

Les chaînes HS sont synthétisées sous la forme d'un précurseur non sulfaté, constitué par la répétition d'unités disaccharidiques formées d'un acide glucuronique (GlcUA) lié à une *N*-acétyl-glucosamine (GlcNAc) [GlcUA β 1-4 GlcNAc]. Ce précurseur subit ensuite cinq étapes séquentielles de maturation, initiées par une *N*-déacétylation/*N*-sulfatation des résidus de GlcNAc. Cette modification est suivie de l'épimérisation des résidus de GlcUA en acide iduronique (IdoUA), puis complétée par des étapes de sulfatation sur les hydroxyles en position C2 des résidus de IdoUA et en position C6 et C3 des résidus de glucosamine. Ces unités sont regroupées en domaines de taille et de degré de sulfatation variables, séparés par des domaines peu sulfatés et relativement uniformes. De plus, la distribution, la longueur et le niveau de modifications des HS varient considérablement selon le type cellulaire, le stade de développement et/ou les conditions physiopathologiques. Cette hétérogénéité structurale, à l'origine des motifs HS spécifiques, est essentiellement liée à l'activité séquentielle et coordonnée des glucosaminyl sulfotransférases intervenant dans les étapes de maturation. Ces enzymes appartiennent à trois familles distinctes, les *N*-déacétylase/*N*-sulfotransférases (NDSTs) qui catalysent les étapes de *N*-déacétylation/*N*-sulfatation des groupements aminés des résidus de GlcNAc, les 6-*O*-sulfotransférases (6-OSTs) et les 3-*O*-sulfotransférases (3-

OSTs) qui sulfatent les groupements hydroxyles des glucosamines en position C6 et C3. Chaque famille d'enzymes est représentée par plusieurs isoformes (quatre NDSTs, trois 6-OSTs et sept 3-OSTs), qui possèdent des spécificités de substrat différentes et sont exprimées à des taux variables suivant le type cellulaire.

Les chimiokines et les cyclophilines sont deux familles de cytokines chimio-attractantes dont les activités sont dépendantes de leur fixation sur les HSPGs. La fixation aux HS régule les fonctions biologiques des chimiokines et des cyclophilines en augmentant leur concentration locale, en favorisant leur oligomérisation et en facilitant leur présentation aux récepteurs de signalisation. Ainsi, il est possible que l'activité des chimiokines et des cyclophilines soit dépendante de l'expression de certaines glucosaminyl sulfotransférases, dont l'action coordonnée expliquerait la présence de séquences HS spécifiques de ces ligands à la surface de leurs cellules cibles.

L'ensemble de mes travaux de thèse a été regroupé en deux chapitres. Le premier concerne la caractérisation du motif héparanique reconnu par la cyclophiline B (CyPB) et l'identification des glucosaminyl sulfotransférases impliquées dans la biosynthèse de ce motif. En utilisant la technologie des biocapteurs optiques et une méthode visuelle de retard sur gel en électrophorèse non dénaturante, nous avons précisé le rôle de certains groupements responsables de la spécificité de fixation de la CyPB. En sus de l'implication des groupements 2-*O*-, 6-*O*- et *N*-sulfates, nous avons démontré que la fixation de la CyPB est dépendante d'une glucosamine *N*-non substituée 3-*O*-sulfatée. Nous avons également défini le profil d'expression des glucosaminyl sulfotransférases dans différentes cellules inflammatoires par PCR en temps réel. Grâce à l'invalidation de ces enzymes par ARN interférence, nous avons pu montrer que la fixation et l'activité de la CyPB sont dépendantes de la co-expression de plusieurs enzymes de biosynthèse telles que la NDST2 et la 3-OST-3B.

Dans le second chapitre, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à un autre ligand des HS, RANTES/CCL5, qui constitue le prototype des chimiokines inflammatoires. En étudiant les relations entre l'expression des glucosaminyl sulfotransférases dans les monocytes, la structure des HS membranaires et les réponses induites par la chimiokine, nous avons mis en évidence que, contrairement à la CyPB, l'expression des 3-OST-3 n'est pas requise pour la fixation de RANTES/CCL5 à la surface de ses cellules cibles, mais reste indispensable pour les activités biologiques de ce facteur inflammatoire.

Une partie des travaux réalisés au cours de ma thèse a fait l'objet des publications et des communications suivantes :

Publications :

Vanpouille, C., **Deligny, A.**, Delehedde, M., Denys, A., Melchior, A., Lienard, X., Lyon, M., Mazurier, J., Fernig, D. G. & Allain, F. 2007, The heparin/heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B contains a 3-*O*-sulfated *N*-unsubstituted glucosamine residue, *J Biol Chem*, **282**, 24416-24429.

Melchior, A., Denys, A., **Deligny, A.**, Mazurier, J. & Allain, F. 2008, Cyclophilin B induces integrin-mediated cell adhesion by a mechanism involving CD98-dependent activation of protein kinase C-delta and p44/42 mitogen-activated protein kinases, *Exp Cell Res*, **314**, 616-628.

Deligny, A., Denys, A., Marcant, A., Melchior, A., Mazurier, J., van Kuppevelt, T. H. & Allain, F. *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase 2 contributes to the synthesis of heparan sulfate motifs with cyclophilin B-binding and activating properties (en révision dans *J Biol Chem*).

Deligny, A., Lenson, F., Denys, A., Marcant, A., Mazurier, J. & Allain, F. 3-*O*-sulfation of heparan sulfate differently regulates the migratory activity of RANTES/CCL5 and cyclophilin B (en rédaction pour *Glycobiology*).

Communications orales :

Fabrice Allain, Aurélie Melchior, **Audrey Deligny** and Agnès Denys. Potential role of cyclophilin B in the regulation of inflammatory and immune responses. *International Symposium on Cyclophilins as Drug Targets, March 17th-18th 2008, Lausanne (Debiopharm), Switzerland.*

Fabrice Allain, **Audrey Deligny**, Aurélie Melchior, Joël Mazurier and Agnès Denys. Importance of 3-*O*-sulfation of heparan sulfate in the binding of inflammatory factors : the example of cyclophilin B. *5th International meeting on Cell therapy, Bioengineering and Regenerative Medicine & 4th Meeting of Lorraine Centre of Cartilage Engineering, September 10th-12th 2008, Vandoeuvre-les-Nancy, France.*

Audrey Deligny, Christophe Vanpouille, Agnès Denys et Fabrice Allain. Caractérisation du motif héparane sulfate spécifique de la cyclophiline B : Importance de la 3-*O*-sulfatation. 8^{ème} *Journée André VERBERT, 18 Septembre 2008, Lille, France.*

Communications par affiche :

Audrey Deligny, Christophe Vanpouille, Agnès Denys, Aurélie Melchior, Maryse Delehedde, David G. Fernig and Fabrice Allain. Involvement of 3-*O*-sulfotransferase-3 in the generation of the heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B. 18th *Joint Meeting of Glycobiology, November 04th-06th 2007, Lille-Lesquin, France.*

Audrey Deligny, Agnès Denys, Toin H. van Kuppevelt, Joël Mazurier and Fabrice Allain. A role for NDST2 in the biosynthesis of CyPB-binding heparan sulfate in T lymphocytes. 67th *Harden – Decoding the biology of heparan sulphate proteoglycans, March 29th-April 02th 2008, Cambridge, United Kingdom.*

Généralités

CHAPITRE I

Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont constitués d'un noyau protéique, appelé « core » protéique, sur lequel sont greffées par covalence une ou plusieurs chaînes polyosidiques, appelées glycosaminoglycanes (GAGs). Les protéoglycanes se distinguent des glycoprotéines par (a) la présence d'au moins une chaîne polysaccharidique de type GAG, (b) la longueur de ces polysaccharides (jusqu'à plusieurs milliers d'oses). Alors que les glycoprotéines ne contiennent que des oligosaccharides : les glucides représentent en général 95 % du poids des protéoglycanes contre 1 à 60 % pour les glycoprotéines.

Les protéoglycanes sont majoritairement présents à la surface cellulaire et dans les matrices extracellulaires de la plupart des tissus de mammifère. Cependant, dans certains cas, ils peuvent également être intracellulaires voire circulants. Ce sont des molécules remarquables du fait de leur double nature biochimique. Leurs fonctions sont diverses et peuvent être exercées aussi bien par la partie protéique que par les chaînes de GAG. Ainsi, les protéoglycanes sont impliqués dans un grand nombre de processus autant physiologiques que pathologiques.

A - Les glycosaminoglycanes

Les GAGs ont longtemps été désignés sous le terme de « mucopolysaccharides » en raison de leur forte capacité de rétention de l'eau (« muco ») et de leur nature glucidique (« polysaccharides »). Les GAGs sont des hétéropolysaccharides, linéaires et anioniques, constitués par la répétition d'unités disaccharidiques. Ces unités peuvent être plus ou moins sulfatées et sont composées d'une manière générale d'une hexosamine, glucosamine ou galactosamine, substituée ou non par un groupement acétyl ou sulfate sur la fonction amine, et d'un acide hexuronique, acide glucuronique (GlcUA) ou iduronique (IdoUA). Les fonctions hydroxyles en position C2 des acides uroniques et en position C3, C4 et/ou C6 des hexosamines peuvent être sulfatées. La présence des acides uroniques et des groupements sulfates confère aux GAGs un caractère fortement anionique et fait d'eux les molécules les plus négativement chargées de l'organisme. Selon la nature de l'hexosamine, les termes de glucosaminoglycane ou de galactosaminoglycane sont employés. La nature des monosaccharides et le type de liaison osidique définissent différentes familles de GAGs (Figure 1 & 2).

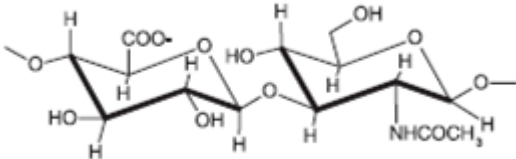
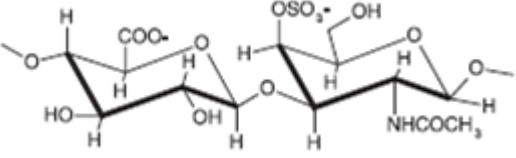
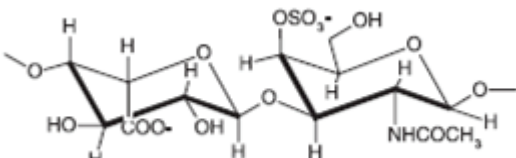
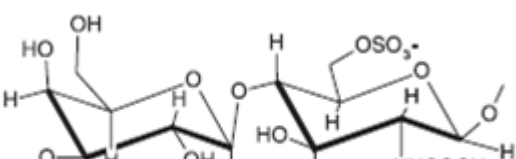
Glycosaminoglycane	Unité disaccharidique	Particularité
Acide hyaluronique	 <p>D-GlcUA-β(1-3)-D-GlcNAc-β(1-4)</p>	n = 5000 - 30 000 MM = 4 - 8000 kDa
Chondroïtine sulfate	 <p>D-GlcUA-β(1-3)-D-GalNAc4S-β(1-4)</p>	n = 20 - 70 MM = 5 - 50 kDa
Dermatane sulfate	 <p>L-IdoUA-α(1-3)-D-GalNAc4S-β(1-4)</p>	n = 30 - 80 MM = 15 - 40 kDa
Kératane sulfate	 <p>D-Gal-β(1-4)-D-GlcNAc6S-β(1-3)</p>	n < 25 MM = 4 - 19 kDa

Figure 1 : Unités disaccharidiques répétitives des différents GAGs (adaptée de Gandhi & Mancera, 2008). (n = nombre moyen de disaccharides constituant chaque GAG ; MM = masse moléculaire).

A.1. L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (AH) est un GAG largement retrouvé dans les tissus conjonctifs, épithéliaux et nerveux. Il est, par exemple, présent dans l'humeur vitrée et le liquide synovial et il est l'un des principaux composants de la matrice extracellulaire.

A la différence des autres GAGs, il n'est ni sulfaté, ni lié de façon covalente à un « core » protéique. Sa composition, déterminée dans les années 1930, est la plus simple des GAGs (Meyer *et al.*, 1938). Il est formé de la répétition de l'unité disaccharidique suivante : [4 acide D-glucuronique (β1-3) N-acétyl-D-glucosamine β1]. Les polymères peuvent compter

50 000 unités récurrentes et ainsi atteindre une taille comprise entre 10^2 et 10^4 kDa (Figure 1) (Fraser *et al.*, 1997).

A.2. L'héparine et les héparanes sulfates

Initialement identifiés comme étant des contaminants de l'héparine, les héparanes sulfates (HS) constituent bien une classe de GAG à part entière (Linker *et al.*, 1958). Les HS sont constitués par la répétition d'unités disaccharidiques liées en α 1-4, formées d'un acide uronique (acide β -D-glucuronique ou α -L-iduronique) lié à une D-glucosamine modifiée. Ces deux monosaccharides sont liés en β 1-4 si l'acide uronique est un GlcUA ou en α 1-4 s'il s'agit d'un IdoUA (Lindahl *et al.*, 1998; Esko & Lindahl, 2001; Esko & Selleck, 2002; Lindahl, 2007). Ce disaccharide présente des profils de substitution variés. Alors que le résidu de IdoUA est souvent sulfaté sur la fonction hydroxyle en position C2, la glucosamine peut être sulfatée sur les fonctions hydroxyles en position C3 et/ou C6 et la fonction amine peut être acétylée (GlcNAc), sulfatée (GlcNS) ou très rarement non substituée (GlcNH₂). En tenant compte des différents profils de sulfatation et de la teneur en GlcUA/IdoUA, 48 disaccharides théoriques peuvent être synthétisés. Néanmoins, la spécificité des enzymes de biosynthèse impose des restrictions dans l'arrangement des disaccharides, ce qui explique pourquoi à ce jour, uniquement 24 disaccharides ont été identifiés dans l'héparine, les HS et les intermédiaires de biosynthèse (Esko & Selleck, 2002; Gandhi & Mancera, 2008).

La distribution, la longueur et le degré de modifications des HS varient considérablement selon l'espèce, le tissu, le stade de développement ou les conditions physiopathologiques (Maccarana *et al.*, 1996; Lindahl & Lindahl, 1997; Brickman *et al.*, 1998a; 1998b; Feyzi *et al.*, 1998; Esko & Lindahl, 2001; Turnbull *et al.*, 2001; Esko & Selleck, 2002). Alors que les HS sont synthétisés par la majorité des cellules, l'héparine est exclusivement synthétisée par les mastocytes. L'héparine est un polymère essentiellement constitué du disaccharide trisulfaté [IdoUA₂S-GlcNS₆S] (Figure 2). La structure des HS, quant à elle, est plus hétérogène ; ils sont typiquement composés de régions *N*-sulfatées (NS) intercalées entre des séquences non modifiées *N*-acétylées (NA) et des régions NA/NS constituées d'unités disaccharidiques alternées *N*-acétylées et *N*-sulfatées (Figure 3) (Maccarana *et al.*, 1996; Gallagher, 2001; Lopes *et al.*, 2006a). Tandis que les disaccharides les plus représentés dans les chaînes HS sont [GlcUA-GlcNAc] et [IdoUA^{+/-}2S-GlcNS^{+/-}6S], on retrouve moins fréquemment des disaccharides aux structures rares comprenant des GlcUA 2-*O*-sulfatés, des glucosamines 3-*O*-sulfatées ou encore des glucosamines *N*-non substituées.

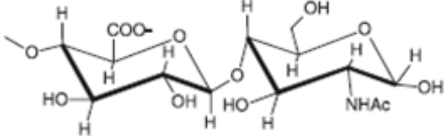
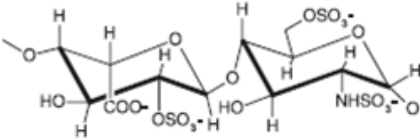
Propriété	Héparane sulfate	Héparine
Teneur en glucosamines N-sulfatées	40 - 60 %	> 85 %
Teneur en IdoUA	30 - 50 %	> 70 %
Nombre de groupements sulfate/disaccharide	~ 1	~ 2,7
Masse Moléculaire	10 - 70 kDa	10 - 12 kDa
Lieu de synthèse	Quasi-totalité des cellules	Mastocytes uniquement
Unité disaccharidique majoritaire	 D-GlcUA-β(1-4)-D-GlcNAc-α(1-4)	 L-IdoUA2S-α(1-4)-D-GlcNS6S-α(1-4)
	X : H ou SO ₃ ⁻ ; Y : Ac, SO ₃ ⁻ , H	

Figure 2 : Différences majeures entre les HS et l'héparine (adaptée de Gandhi & Mancera, 2008).

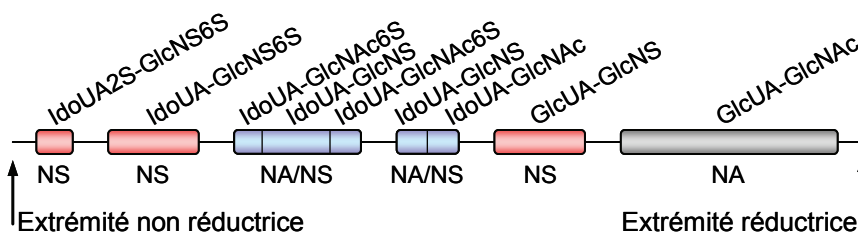


Figure 3 : Domaines structuraux (NA, NS, NA/NS) des chaînes HS.

A.3. Les kératanes sulfates

Les kératanes sulfates (KS) ont été identifiés en 1939 dans des extraits de cornée mais ce n'est que dans les années 1950 qu'ils ont été caractérisés (Meyer *et al.*, 1953). On compte trois classes de KS, désignées KSI, KSII et KSIII. Cette classification est basée sur leur type de liaison au « core » protéique. Les KSI sont liés au « core » protéique *via* un résidu de Asn,

les KSII regroupent tous les KS liés à la protéine grâce à un lien GalNAc-O-Ser/Thr (Funderburgh, 2000), tandis que les KSIII utilisent un lien de type Mannose-O-Ser (Krusius *et al.*, 1986).

Les KS se distinguent des autres GAGs de part leur motif disaccharidique de base. Celui-ci possède un résidu de galactose en lieu et place de l'acide uronique caractéristique (Greiling, 1994). Ce sont des polymères de lactosamine [3 D-galactose (β 1-4) *N*-acétyl-D-glucosamine β 1], sulfatés en position C6 des deux hexoses (Figure 1) (Meyer *et al.*, 1953). Les KS peuvent présenter des ramifications et leur séquence osidique est couramment terminée par des acides sialiques (Brown *et al.*, 1996; Tai *et al.*, 1996). Enfin, les KS peuvent également être substitués par des résidus de fucose en position C3 de la GlcNAc (Brown *et al.*, 1996).

A.4. Les chondroïtines sulfates

Les chondroïtines sulfates (CS) ont été isolés du cartilage en 1884, mais leur composition et leur structure n'ont été décrites qu'en 1925. Les CS sont constitués de l'unité disaccharidique [4 acide D-glucuronique (β 1-3) *N*-acétyl-D-galactosamine β 1]. Ces disaccharides sont communément sulfatés en position C4 et/ou C6 des résidus de GalNAc et l'acide glucuronique peut également porter un groupement sulfaté en position C2 (Figure 1) (Lauder, 2009). Selon l'espèce et le tissu étudié, les CS montrent une large gamme de sulfatation qui a permis d'établir une classification. Ainsi, le terme CS-A ou chondroïtine-4-sulfate désigne les CS riches en [GlcUA-GalNAc4S] et les CS-C ou chondroïtine-6-sulfate comprennent les CS riches en [GlcUA-GalNAc6S]. Il existe également des CS très sulfatés qui sont caractéristiques de certains cartilages, comme les CS-D [GlcUA2S-GalNAc6S] et -E [GlcUA-GalNAc4S6S] que l'on retrouve dans les cartilages des requins et des calmars (Sugahara *et al.*, 2003; Lamari & Karamanos, 2006).

A.5. Les dermatanes sulfates

Les dermatanes sulfates (DS), également appelés chondroïtine sulfate de type B (CS-B), dérivent des CS. Ce sont des polymères de [acide D-glucuronique (β 1-3) *N*-acétyl-D-galactosamine] et de [acide L-iduronique (α 1-3) *N*-acétyl-D-galactosamine] liés en β 1-4 (Figure 1) (Karamanos *et al.*, 1995). L'épimérisation des résidus de GlcUA en IdoUA est essentielle puisqu'elle définit à elle seule la classe des DS. Les DS peuvent être modifiés par

sulfatation de la GalNAc en position C4 et C6 (comme les CS-A et CS-C) et en position C2 de l'IdoUA (comme l'héparine et les HS). Les DS présentent donc une structure beaucoup plus diversifiée que celle des CS. En effet, le polysaccharide peut posséder trois variables pour l'acide uronique (GlcUA, IdoUA ou IdoUA2S) et quatre pour les hexosamines (GalNAc, GalNAc4S, GalNAc6S ou GalNAc4S6S) (Trowbridge & Gallo, 2002; Lamari & Karamanos, 2006).

B - Les « cores » protéiques

En raison de leur forte hétérogénéité, il est difficile d'envisager une classification des protéoglycanes en fonction de la nature de leur partie protéique ou glycanique. Il est toutefois possible de les classer en fonction de leur localisation cellulaire. On distingue ainsi les protéoglycanes intracellulaires, membranaires et extracellulaires (Tableau 1) (Bernfield *et al.*, 1999).

B.1. Les protéoglycanes intracellulaires

Le protéoglycane intracellulaire type est représenté par la **serglycine**. La serglycine est un petit protéoglycane (10 à 15 kDa) abondamment retrouvé dans les granules de sécrétion des cellules hématopoïétiques et des cellules endothéliales (Kolset *et al.*, 2004; Kolset & Tveit, 2008). Le « core » protéique est formé par la répétition de 9 à 24 séquences peptidiques de type Ser/Gly sur lesquelles sont fixées 7 à 15 chaînes de GAG. En fonction du type cellulaire, la serglycine porte soit des chaînes d'héparine, soit des chaînes CS (Kolset & Gallagher, 1990). Ainsi, la serglycine présente dans les mastocytes est le seul protéoglycane à porter des chaînes d'héparine (MM = 5000 à 25 000 Da) (Yurt *et al.*, 1977; Bourdon *et al.*, 1985; Humphries *et al.*, 1999). Ces chaînes sont clivées par des endo- β -glucuronidases et les fragments issus de cette dégradation sont stockés à l'intérieur des granules de sécrétion cytoplasmiques dans des complexes non covalents stabilisés par des protéines basiques. La serglycine des autres cellules hématopoïétiques et des cellules endothéliales, quant à elle, portent exclusivement des chaînes CS très sulfatées (Stevens *et al.*, 1987; Stevens & Austen, 1989; Schick *et al.*, 2001).

Tableau 1 : Classification des protéoglycanes (PGs) en fonction de leur localisation cellulaire.

Localisation cellulaire	Famille	Protéoglycane	Type de GAGs
Intracellulaire		Serglycine	HS (Héparine), CS
Extracellulaire	Les PGs de la membrane basale	Perlécane Agrine Collagène XVIII Collagène XV Bamacan	HS, CS HS HS CS CS
	Les hyalectanes	Versican Aggrécan Neurocan Brévican	CS CS, KS CS CS
	Les PGs riches en leucine	Décorine Biglycan Lumican Fibromoduline	DS DS KS KS
	Les PGs circulants	Endocan PG-100 Bikunine Apolipoprotéine O	DS CS CS CS
	Membranaire	Les PGs transmembranaires	Syndécans CD44 Bétaglycan
Les PGs liés par une ancre GPI		Glypicans	HS

Dans les granules de sécrétion, la serglycine et les autres protéoglycanes intracellulaires jouent un rôle d'agent protecteur et/ou modulateur pour différents facteurs inflammatoires comme les cytokines, les chimiokines et les protéases en les transportant sur les sites où ils sont sécrétés (Schick *et al.*, 2001).

B.2. Les protéoglycanes membranaires

B.2.1. Les syndécans

Les syndécans forment une famille de protéoglycanes membranaires codés par quatre gènes distincts (syndécan-1 à -4) chez les vertébrés. L'étude phylogénétique de cette famille suggère qu'elle résulte de la duplication d'un gène ancestral. Ainsi, les syndécan-1 et -3 et les syndécan-2 et -4 constitueraient deux sous-familles (Saunders *et al.*, 1989; Carey *et al.*, 1992; David *et al.*, 1992; Pierce *et al.*, 1992; Bernfield *et al.*, 1999).

Leur expression est hautement régulée et dépend du stade de développement et des conditions physiopathologiques. Chaque type cellulaire exprime au moins un syndécan, mais la plupart des cellules présentent plusieurs isoformes à leur surface. Le syndécan-1 est majoritairement exprimé par les cellules épithéliales et endothéliales, tandis que le syndécan-2 est retrouvé à la surface des cellules neuronales, mésenchymateuses et des fibroblastes. Le syndécan-3 est préférentiellement exprimé par les cellules neuronales. Enfin, le syndécan-4 est exprimé par la plupart des cellules, mais en quantité plus faible que ses homologues (Bernfield *et al.*, 1992; Couchman, 2003; Alexopoulou *et al.*, 2007).

Les syndécans sont de tailles variables (MM = 20-45 kDa). Ce sont des protéines transmembranaires de type I qui possèdent (a) un domaine extracellulaire N-terminal qui porte trois à cinq chaînes de GAG, (b) un domaine transmembranaire et (c) un domaine cytoplasmique C-terminal (Figure 4). Alors que les domaines transmembranaires et cytoplasmiques sont conservés, les domaines extracellulaires diffèrent d'un syndécan à un autre (Bernfield *et al.*, 1999; Rapraeger, 2001; Tkachenko *et al.*, 2005).

Le domaine extracellulaire, encore appelé ectodomaine, est peu conservé à l'exception des régions sensibles à la protéolyse et des sites d'attachement pour les GAGs. Ces sites, formés par la répétition de deux à trois dipeptides Ser-Gly entourés de résidus acides et hydrophobes, permettent l'ancrage préférentiel des chaînes HS (Zhang *et al.*, 1995). Toutefois, les syndécans peuvent également porter des chaînes CS aux sites de glycosylation les plus proches de la membrane plasmique (Ueno *et al.*, 2001). Il est démontré que

l'ensemble des syndécans peuvent subir un clivage protéolytique à proximité de la membrane plasmique, ce qui a pour conséquence de libérer des protéoglycanes à chaînes HS (HSPGs) solubles qui conservent leur propriété de fixation *via* les chaînes de GAG (Elenius *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1994). Ce clivage appelé « shedding » est un processus hautement régulé et peut être accéléré par divers effecteurs. La thrombine, la plasmine, ou encore l'élastase et les métalloprotéinases sont impliquées dans ce processus (Subramanian *et al.*, 1997; Endo *et al.*, 2003; Marshall *et al.*, 2003).

Contrairement au domaine extracellulaire, la région transmembranaire est très conservée. Elle est impliquée dans les interactions avec d'autres protéines membranaires et participerait à l'oligomérisation des syndécans. La formation de ces complexes permettrait d'augmenter la densité de chaînes HS à la surface cellulaire (Asundi & Carey, 1995; Rapraeger & Ott, 1998; Choi *et al.*, 2005).

En dépit de sa petite taille, le domaine cytoplasmique peut être divisé en trois régions : deux régions conservées (C1 et C2) séparées par une région (V) de taille et composition variable (Rapraeger, 2001).

La région C1 est très conservée, ce qui confère des fonctions communes à chaque syndécan. Elle est notamment impliquée dans la fixation de plusieurs protéines intracellulaires telles que la tubuline, les kinases Src, la cortactine et l'eitrine, un membre de la famille ERM (*Ezrin, Radixin, Moesin*) connue pour lier les protéines membranaires au cytosquelette d'actine (Kinnunen *et al.*, 1998; Granes *et al.*, 2000; 2003). La région C2, quant à elle, possède une séquence EFYA dans la région C-terminale capable de fixer spécifiquement les protéines portant un domaine PDZ (*Post-synaptic density-95 (PSD-95)/ Discs-large (Dlg)/ Zonula occludens-1 (ZO-1)*), telles que la synténine, la synectine, la synbindine et CASK (*Calcium/Calmodulin-Dependent Serine Protein Kinase*) (Hsueh *et al.*, 1998; Ethell *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2001). Les protéines à domaine PDZ sont impliquées dans l'organisation et l'assemblage de complexes protéiques et jouent ainsi le rôle d'échafaudage moléculaire (Bass & Humphries, 2002).

La région V diffère pour chaque membre de la famille des syndécans. Les fonctions de ce domaine restent peu connues, excepté pour le syndécan-4. En effet, la région V de cette isoforme possède un site de fixation au phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2), qui favorise la dimérisation voire l'oligomérisation du protéoglycane. Ces interactions permettent alors le recrutement et l'activation de la protéine kinase C α (PKC α), ce qui permet la formation de fibres de stress et de plaques focales d'adhérence (Oh *et al.*, 1997; 1998; Horowitz *et al.*, 1999). Le syndesmos est une autre protéine interagissant avec le syndécan-4

B.2.2. Les glypicans

Contrairement aux syndécans qui sont transmembranaires, les glypicans ont la particularité d'être insérés dans la membrane plasmique grâce à une ancre lipidique de type glycosylphosphatidylinositol (GPI) (De Cat & David, 2001; Filmus & Selleck, 2001; Song & Filmus, 2002; Filmus *et al.*, 2008). Six membres de cette famille, codés par des gènes différents, ont été identifiés chez les mammifères (glypican-1 à -6) (Filmus *et al.*, 1988; David *et al.*, 1990; Stipp *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1995; Saunders *et al.*, 1997; Veugelers *et al.*, 1999). Leur homologie, de l'ordre de 17 à 63 %, est assez hétérogène et l'alignement des séquences protéiques suggère l'existence de deux sous-groupes composés des glypican-1, -2, -4, -6 (groupe 1) et des glypican-3 et -5 (groupe 2) (De Cat & David, 2001).

Les glypicans présentent un profil d'expression tissu-spécifique, particulièrement évident durant le développement embryonnaire. Ainsi, le glypican-1 est principalement exprimé par le système nerveux central au cours du développement mais il est également présent dans d'autres tissus à l'âge adulte. Le glypican-2 est fortement présent dans le cerveau lors du développement mais ne semble pas être exprimé chez l'adulte. Enfin, les glypican-3, -4, -5 et -6 possèdent un profil d'expression plus ubiquitaire chez l'embryon et beaucoup plus limité chez l'adulte (Filmus & Selleck, 2001; Fransson *et al.*, 2004). Cette répartition suggère l'importance de ces molécules lors de la morphogenèse. Une mutation sur le gène codant pour le glypican-3 chez l'homme, par exemple, est à l'origine du syndrome Simpson-Golabi-Behmel qui se caractérise par des anomalies morphologiques et une croissance excessive dès la naissance (DeBaun *et al.*, 2001; Shi & Filmus, 2009).

Les glypicans (MM = 60-70 kDa) possèdent une organisation générale conservée. Les « cores » protéiques portent (a) un domaine globulaire N-terminal stabilisé par des ponts disulfures, (b) un domaine portant deux à quatre sites consensus d'ancrage des chaînes de GAG et (c) une région hydrophobe C-terminale impliquée dans la formation de l'ancre GPI (Figure 5) (De Cat & David, 2001).

Le domaine globulaire N-terminal est très conservé. Il possède 14 résidus caractéristiques de cystéine qui, réduits sous forme de ponts disulfures intramoléculaires, participent à la structure tridimensionnelle retrouvée chez l'ensemble des glypicans (Veugelers *et al.*, 1999).

Les sites consensus d'ancrage des GAGs (DSGSGSG) sont localisés au niveau des 50 derniers résidus d'acide aminé de l'extrémité C-terminale et suggèrent que les chaînes soient déployées à proximité de la membrane plasmique (Filmus *et al.*, 2008). Les glypicans portent

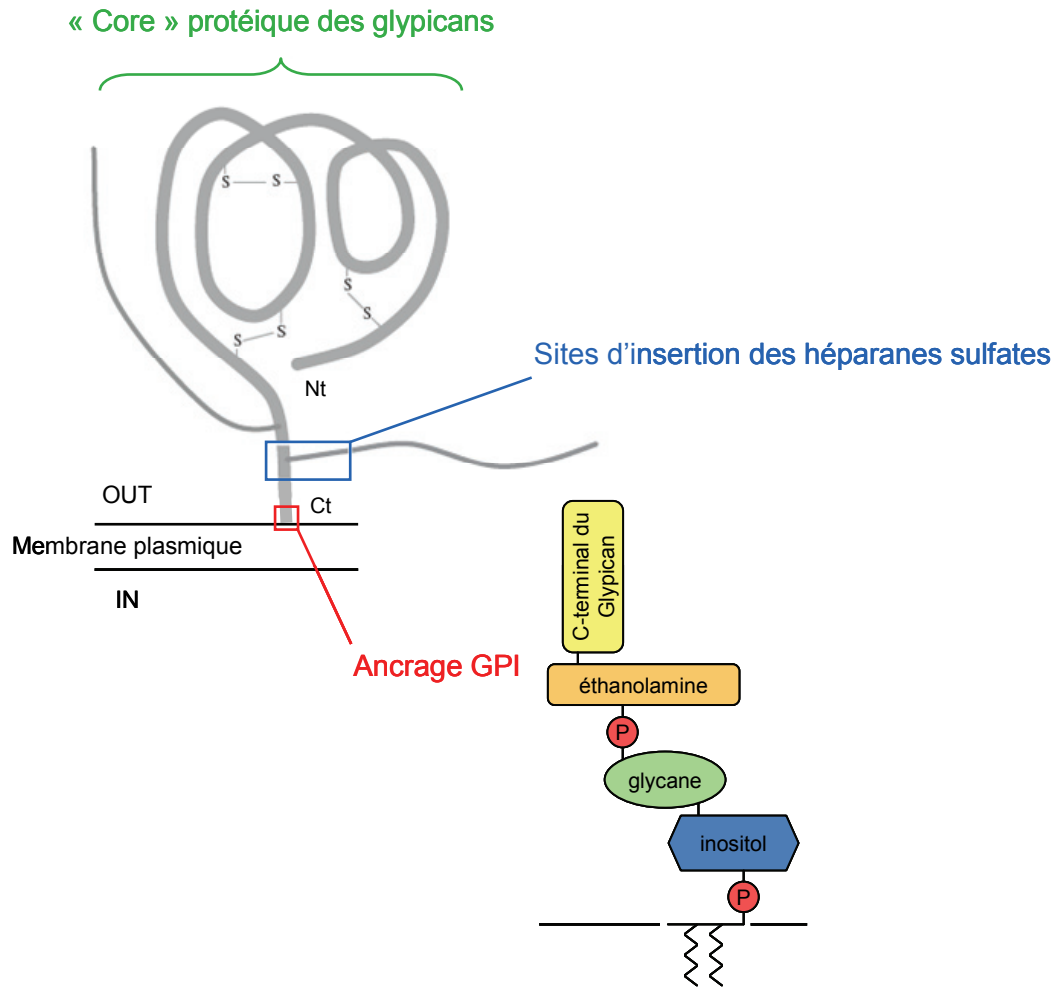


Figure 5 : Représentation schématique des glypicans. Le « core » protéique est lié à la membrane plasmique par son extrémité C-terminale *via* un ancrage GPI. Il possède de nombreux ponts disulfures qui permettent l'organisation de la partie protéique N-terminale en un domaine globulaire compact. Les chaînes HS sont covalamment liées au « core » protéique au niveau de sites d'insertion situés à proximité de la membrane plasmique (modifiée à partir de De Cat & David, 2001).

quasi-exclusivement des chaînes HS. En effet, une caractérisation biochimique du glypican-5 suggère que le « core » protéique peut également être substitué par des chaînes CS (Saunders *et al.*, 1997). Par ailleurs, il a été démontré que le domaine N-terminal du « core » protéique peut influencer la nature des GAGs (Chen & Lander, 2001). Enfin, Siebertz *et al.* (1999) ont mis en évidence une sous-population de glypicans dépourvus de GAG.

Comme les syndécans, un site de clivage protéolytique a été identifié pour les glypican-1, -3 et -4. Cependant, la partie terminale clivée n'est pas libérée mais reste liée à la partie C-terminale grâce aux ponts disulfures (Watanabe *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 1997). La fonction de ce clivage ainsi que la ou les protéases impliquées restent toujours à identifier.

La signification fonctionnelle d'un ancrage GPI n'a pas été clairement établie mais plusieurs rôles ont été suggérés. L'un des rôles possibles serait de permettre la localisation préférentielle des protéines à ancre GPI dans des microdomaines de la membrane cellulaire appelés « raft ». Les rafts, riches en shingolipides, en cholestérol, en tyrosine kinases de la famille Src, et en protéines G, sont des plateformes spécialisées dans la transduction du signal (Simons & Ikonen, 1997; Ishitsuka *et al.*, 2005). Ainsi, le ciblage des glypicans dans ces domaines faciliterait leurs interactions avec des molécules de signalisation en absence de domaine cytoplasmique (Ilangumaran *et al.*, 2000). Les protéines à ancre GPI s'accumulent généralement à la surface apicale des cellules polarisées. Toutefois, le glypican-1 est retrouvé sur les faces basolatérales des cellules épithéliales. La délétion des sites d'attachement des chaînes HS augmente le ciblage apical de la protéine. Ainsi, la distribution des glypicans à la surface cellulaire pourrait également être déterminée par la partie glycanique de la molécule (Mertens *et al.*, 1996).

Une autre fonction attribuée aux ancrages GPI serait de permettre la libération des protéines dans l'environnement extracellulaire suite à un clivage non-protéolytique *via* l'action de la phosphatidylinositol phospholipase D membranaire (PI-PLD) et Notum, une lipase extracellulaire (Brunner *et al.*, 1994; Traister *et al.*, 2007).

Enfin, il a été suggéré que l'ancrage GPI dirigerait les protéines vers des voies d'endocytose spécifiques qui permettent le recyclage à la membrane plasmique (Cheng *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2002). Dans le cas des glypicans, il a été démontré que ce recyclage s'accompagne d'un remodelage des chaînes HS et d'une acylation de l'ancrage GPI, qui a pour conséquence de rendre les protéines résistantes aux lipases (Brickman *et al.*, 1998b; Kato *et al.*, 1998).

B.2.3. Le CD44

Le CD44 est décrit comme une molécule d'adhérence impliquée dans de multiples phénomènes biologiques tels que la migration et l'adhérence cellulaire, l'hématopoïèse, l'activation des lymphocytes, l'assemblage de la matrice extracellulaire et l'invasion tumorale. La distribution du CD44 est assez ubiquitaire. Il est en effet exprimé à la surface des leucocytes, des fibroblastes, des cellules épithéliales, des kératinocytes et de certaines cellules endothéliales (Bajorath, 2000). Dans de nombreux cas, les fonctions associées au CD44 sont liées à sa capacité de fixer les composants de la matrice extracellulaire, en particulier l'AH dont il est le principal récepteur (Lesley & Hyman, 1998; Pure & Cuff, 2001).

Le CD44 est une protéine transmembranaire de type I, dont la caractéristique majeure est l'existence de multiples isoformes (Figure 6). Ces différentes isoformes résultent toutes de l'épissage alternatif d'un gène unique, composé de deux groupes d'exons (Screaton *et al.*, 1992). L'isoforme standard du CD44 (CD44s), exprimée par la plupart des tissus, est composée des exons dits « constitutifs » (1 à 5 et 16 à 20), tandis que l'épissage alternatif des dix exons dits « variables » (v1 à v10) génère l'ensemble des isoformes dont les masses varient de 80 à 250 kDa. Cette diversité structurale est accentuée par des modifications post-traductionnelles, comme la N-, la O-glycosylation et la glycanation par des chaînes de GAG (Borland *et al.*, 1998; Goodison *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2003).

Les isoformes du CD44 sont composés d'un domaine extracellulaire N-terminal, d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine C-terminal intracellulaire (Bajorath, 2000; Pure & Cuff, 2001).

Le domaine extracellulaire se caractérise par la présence de deux régions distinctes. Une région très conservée à l'extrémité N-terminale qui permet la fixation de l'AH. Cette région, stabilisée par trois ponts disulfures, possède une structure globulaire nécessaire pour l'interaction. A l'inverse, la région à proximité de la membrane plasmique est peu conservée puisque codée par des exons variables. Cette région porte les sites d'ancrage pour les GAGs (Aruffo *et al.*, 1990; Goodison *et al.*, 1999). Toutes les isoformes sont substituées par des chaînes CS. Toutefois, les variants possédant l'exon v3, tels que le CD44v3-10 et le CD44v3,8-10, portent également une chaîne HS (Bennett *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1995; Greenfield *et al.*, 1999).

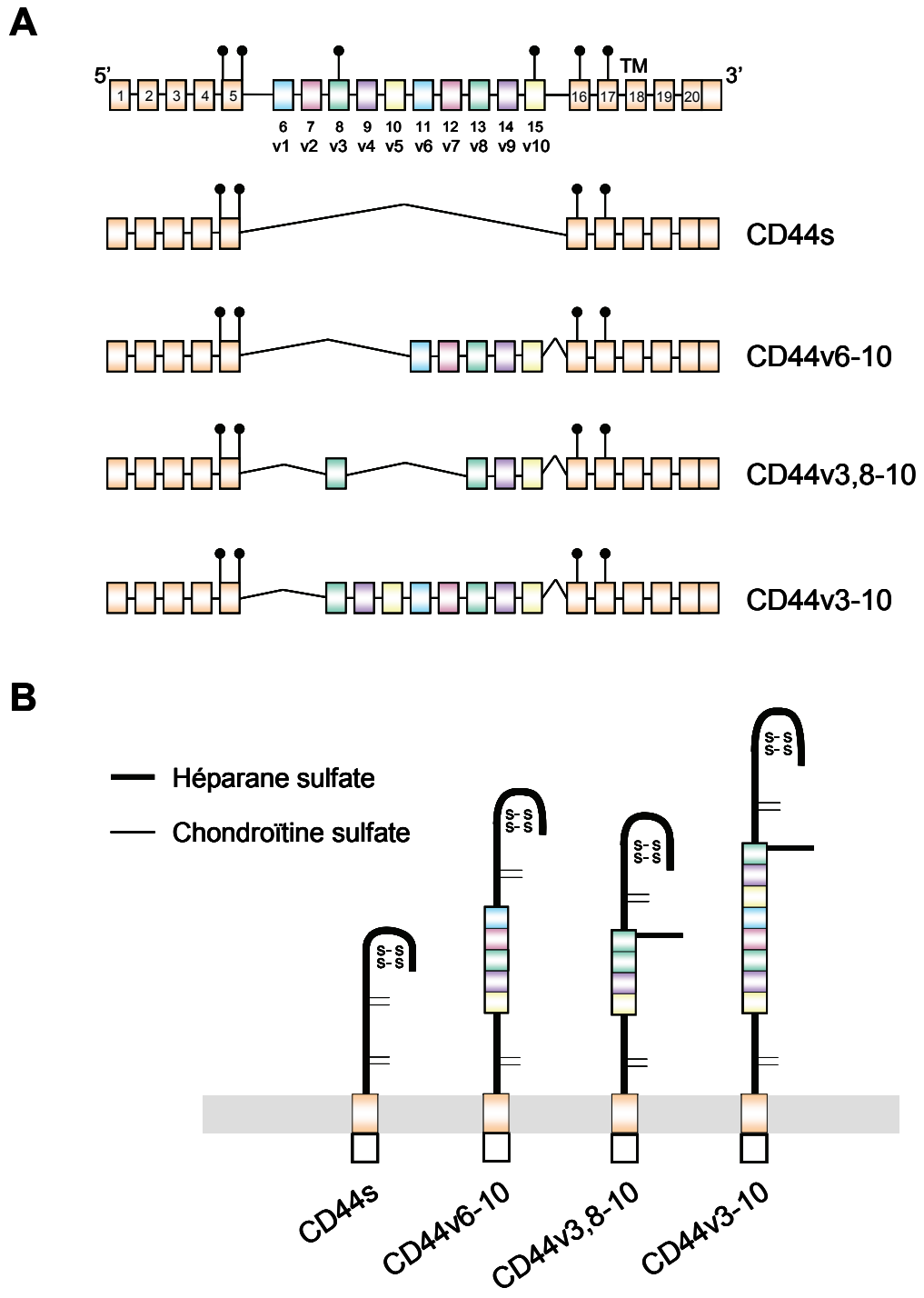


Figure 6 : Représentations schématiques des transcrits (A) et des protéines (B) des isoformes majeures du CD44 (modifiée à partir de Jackson *et al.*, 1995 ; Jackson, 1997).

Les domaines transmembranaire et cytoplasmique sont hautement conservés et le dernier fixe les protéines de la famille ERM et contient des sites de phosphorylation qui régulent la fixation du CD44 aux protéines du cytosquelette (Isacke & Yarwood, 2002; Kramer & Yost, 2003). De plus, on retrouve également une forme soluble du CD44 (sCD44) capable d'entrer en compétition avec les formes membranaires. Le mécanisme majeur à l'origine de cette nouvelle forme semble être un clivage protéolytique de l'ectodomaine du CD44 par les métalloprotéinases (Okamoto *et al.*, 1999; Ahrens *et al.*, 2001; Nagano & Saya, 2004). Toutefois, une synthèse *de novo* par épissage alternatif d'une isoforme dépourvue de domaines transmembranaire et cytoplasmique n'est pas à exclure (Pure & Cuff, 2001).

B.2.4. Le bétaglycan

Le bétaglycan est un protéoglycane transmembranaire de type I, identifié comme étant le récepteur de type III du TGF (*Transforming Growth Factor*)- β en raison de la forte affinité de son « core » protéique pour la cytokine (Lopez-Casillas *et al.*, 1991; Reiss, 1997; Gold, 1999).

Le bétaglycan possède un large domaine extracellulaire N-terminal qui porte les sites d'ancrage pour deux types de GAGs, les CS et les HS. Son domaine intracellulaire C-terminal, de petite taille, peut être phosphorylé et fixer des protéines à domaine PDZ (Lopez-Casillas *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991; Blobel *et al.*, 2001).

Le bétaglycan est largement exprimé par les cellules mésenchymateuses, épithéliales et neuronales. Il est naturellement présent à la surface cellulaire sous forme d'homodimères. La dimérisation n'est pas covalente et n'implique ni le TGF- β ni les chaînes de GAG (Henis *et al.*, 1994; Pepin *et al.*, 1994). Sa fonction principale est de présenter le TGF- β au récepteur protéique de type II, une sérine/thréonine kinase. Une fois activé par le TGF- β , le récepteur de type II recrute et phosphoryle le récepteur de type I, permettant ainsi la transduction du signal (Lopez-Casillas *et al.*, 1994; Derynck & Feng, 1997). Toutefois, le rôle du bétaglycan dans l'activité du TGF- β est controversé puisqu'il a été montré qu'il peut également inhiber la signalisation de certains membres de la famille du TGF- β (Lewis *et al.*, 2000; Eickelberg *et al.*, 2002). Bien que normalement ancré dans la membrane plasmique, le bétaglycan peut subir un clivage protéolytique, ce qui a pour conséquence de libérer des ectodomains solubles (Andres *et al.*, 1989; Lopez-Casillas *et al.*, 1994). Le processus protéolytique est encore mal connu. Toutefois, on retrouve un site de clivage spécifique de certaines protéases dans une région proche de la membrane plasmique. Dans la plupart des cas, cet ectodomaine fixe et

séquestre le TGF- β , agissant alors comme un récepteur antagoniste (Pepin *et al.*, 1995; Philip *et al.*, 1999).

B.3. Les protéoglycanes extracellulaires

Ces protéoglycanes sont sécrétés après biosynthèse complète et ne sont normalement pas liés à la surface cellulaire. On distingue quatre familles : les protéoglycanes de la membrane basale, les hyalectanes, les protéoglycanes riches en leucine et les protéoglycanes circulants.

B.3.1. Les protéoglycanes de la membrane basale

La membrane basale est une matrice extracellulaire particulière qui délimite une frontière entre certaines cellules, endothéliales et épithéliales, et leur tissu conjonctif sous-jacent. Elle est essentiellement constituée de laminine, de nidogène, de collagène de type IV, de fibronectine et possède au moins un type de protéoglycane. Elle joue un rôle primordial dans la morphogenèse, la différenciation cellulaire, l'architecture tissulaire et l'adhérence cellulaire. Chez les mammifères, quatre types de protéoglycanes sont retrouvés dans la membrane basale : le perlécan, l'agrine, les collagènes XVIII, XV et le bamacan. Les trois premiers portent principalement des chaînes HS, alors que les deux derniers sont préférentiellement substitués par des chaînes CS (Iozzo, 1998; 2005).

a) Le perlécan

Le perlécan est le protéoglycane majeur de la membrane basale. Il est largement exprimé dans les membranes basales de divers organes vascularisés tels que le cœur, le foie, la peau, les poumons ou encore les reins (Murdoch *et al.*, 1994). Toutefois, on peut également le retrouver dans des tissus non vascularisés comme les cartilages et les tissus conjonctifs (SundarRaj *et al.*, 1995; Iozzo & Murdoch, 1996; Melrose *et al.*, 2004). A travers ses interactions avec les constituants de la membrane basale, il permet l'assemblage et préserve l'intégrité de cette dernière. Il tient son nom de son apparence en collier de perles que l'on observe en microscopie électronique (Iozzo, 1998; Costell *et al.*, 1999; Hassell *et al.*, 2002).

Le perlécan est l'un des protéoglycanes les plus complexes en raison de ses dimensions et du grand nombre de modifications post-traductionnelles qui le caractérisent. Son « core » protéique possède un poids moléculaire d'environ 400 kDa, mais il peut

atteindre 800 kDa lorsqu'il est substitué par les chaînes de GAG. Il porte quatre sites d'insertion pour les chaînes de GAG, qui peuvent être de nature HS ou CS, même si les chaînes HS sont plus fréquentes (Iozzo, 1998; Bernfield *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2008). Il comprend cinq domaines distincts (domaine I à domaine V) qui sont constitués de différents modules protéiques (Figure 7). Trois sites d'insertion pour les GAGs sont portés par le domaine I, tandis que le quatrième se situe au niveau du domaine V (Dolan *et al.*, 1997; Friedrich *et al.*, 1999). Les différents modules protéiques interagissent avec diverses protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire et la prolifération. Ainsi, le perlécane peut fixer de nombreux facteurs de croissance tels que le FGF (*Fibroblast Growth Factor*)-2, le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ou le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et d'autres constituants de la membrane basale comme le nidogène et la fibronectine (Iozzo, 2005; Whitelock *et al.*, 2008).

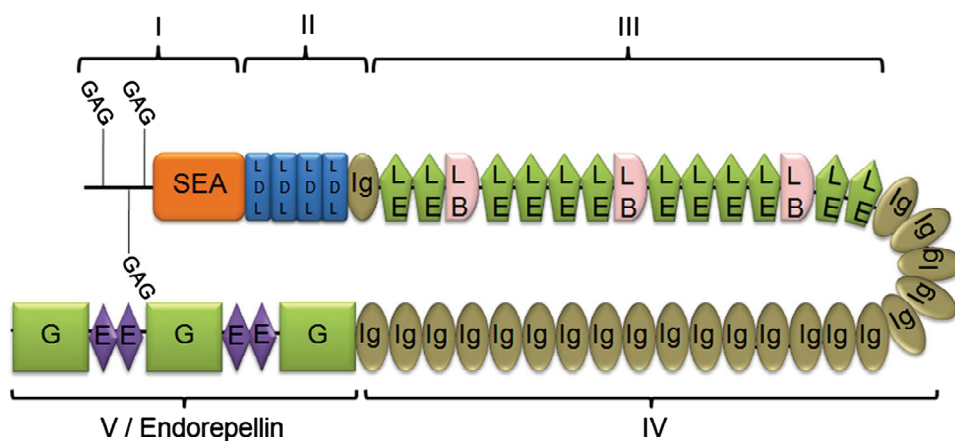


Figure 7 : Représentation schématique de la structure du perlécane. Les cinq domaines sont annotés de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Trois chaînes de GAG, typiquement des HS, sont covalamment liées au domaine protéique I. Un autre site putatif d'insertion des GAGs est présent dans le domaine V mais n'est pas représenté sur le schéma. Le « core » protéique du perlécane est constitué de différents modules protéiques lui permettant d'interagir avec de nombreux ligands. SEA : Sperm protein-enterokinase-agrin, LDL : low-density lipoprotein receptor class A repeat, Ig : Ig-like repeat, LE : laminin-EGF-like domain repeat, LB : laminin domain IV, G : laminin G domain, E : EGF-like domain (Chen *et al.*, 2008).

Le perlécane est principalement sécrété dans la membrane basale, mais il peut aussi être associé à la surface cellulaire à travers des interactions avec les intégrines, en particulier les intégrines $\alpha 2\beta 1$ (Hayashi *et al.*, 1992; Battaglia *et al.*, 1993; Rescan *et al.*, 1993).

Les fonctions du perlécane dans l'angiogenèse sont assez contradictoires. A travers ses interactions avec les facteurs de croissance, il possède un rôle pro-angiogénique. Alors qu'à

l'inverse, l'endorepelline, un fragment protéique issu du clivage protéolytique du domaine V, inhibe l'angiogenèse *via* ses interactions avec les intégrines $\alpha 2\beta 1$ (Bix *et al.*, 2004). Elle interfère également avec les propriétés adhésives des cellules endothéliales et il a été démontré *in vivo* qu'elle inhibe la morphogenèse des capillaires dans les endothélia normaux et tumoraux (Mongiat *et al.*, 2003; Bix *et al.*, 2006).

b) L'agrine

L'agrine est une protéine de plus de 2000 acides aminés qui possède une masse moléculaire prédite de 225 kDa. La N- et la O-glycosylation de son domaine N-terminal peuvent augmenter sa masse moléculaire apparente de 600 kDa (Bezakova & Ruegg, 2003). Trois sites d'insertion pour les HS ont été décrits, ce qui classe l'agrine dans la famille des HSPGs (Tsen *et al.*, 1995). L'agrine est une protéine multidomaine qui montre des similarités structurales avec le perlécan. Elle est fortement exprimée par le système nerveux, mais on la retrouve également dans d'autres tissus comme les reins, les poumons ou le foie (Chen *et al.*, 2008).

Deux isoformes issues d'un épissage alternatif ont été décrites, une isoforme extracellulaire et une isoforme transmembranaire. L'isoforme extracellulaire possède un long domaine N-terminal qui contient un peptide signal clivable permettant la libération de l'agrine dans la membrane basale, tandis que la seconde isoforme porte un domaine N-terminal dépourvu de peptide signal clivable, ce qui convertit l'agrine en une protéine transmembranaire de type II (Burgess *et al.*, 2000; Neumann *et al.*, 2001). L'isoforme transmembranaire est principalement retrouvée dans les tissus dépourvus de membrane basale comme le cerveau. L'épissage affecte l'association de l'agrine avec la matrice ; seule l'isoforme extracellulaire fixe la laminine (Denzer *et al.*, 1995; 1997).

L'agrine est le protéoglycane majeur des jonctions neuromusculaires. Elle y permet l'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine et initie ainsi la différenciation post-synaptique. Mais, l'agrine possède également d'autres fonctions. Il a été montré qu'elle joue un rôle dans la modulation de l'activation des lymphocytes T au niveau des synapses immunologiques (Shaw & Allen, 2001; Bezakova & Ruegg, 2003).

c) Les collagènes XVIII et XV

Le collagène XVIII est un hybride « collagène-protéoglycane » qui appartient à la sous-famille des multiplexines. Cette sous-famille compte également le collagène XV et se caractérise par la présence d'un domaine central organisé en triple hélice non covalente interrompue par des séquences non-collagéniques (Oh *et al.*, 1994; Rehn *et al.*, 1994; Rehn & Pihlajaniemi, 1994). Ce sont ces domaines non-hélicoïdaux qui fournissent la flexibilité nécessaire à la formation de la triple hélice qui diffère des structures typiquement formées par les collagènes fibrillaires (Halfter *et al.*, 1998; Iozzo, 2005).

Le collagène XVIII porte préférentiellement des chaînes HS, même si *in vitro*, des chaînes CS ont été identifiées (Dong *et al.*, 2003). Le collagène XV, lui, porte des chaînes CS. Les deux types de collagènes sont ubiquitaires. Ils participent à l'organisation structurale de la membrane basale et serviraient de lien avec la matrice sous-jacente (Iozzo, 2005). Par exemple, le domaine C-terminal du collagène XVIII interagit fortement avec la laminine et le perlécan, tandis que le domaine N-terminal sert de point d'ancrage à la matrice (Marneros & Olsen, 2005). *In vivo*, le collagène XVIII est essentiel pour la morphogenèse et le fonctionnement de structures anatomiques spécifiques comme les yeux ou le cerveau (Fukai *et al.*, 2002; Ylikarppa *et al.*, 2003; Iozzo, 2005).

Comme le perlécan, le collagène XVIII peut subir un clivage protéolytique par l'élastase, la cathepsine L ou encore la matrilysine et ainsi libérer le domaine C-terminal, l'endostatine, qui possède des activités anti-angiogéniques (O'Reilly *et al.*, 1997; Ferreras *et al.*, 2000; Marneros & Olsen, 2005).

d) Le bamacan

Contrairement aux autres protéoglycanes de la membrane basale, le bamacan est substitué par des chaînes CS. Son « core » protéique est constitué de cinq domaines et porte les GAGs au niveau des domaines II et V (Iozzo, 1998).

Le bamacan est retrouvé dans la quasi-totalité des membranes basales où il est notamment impliqué dans la stabilisation de ces dernières (Ehara *et al.*, 1994; Iozzo, 1998).

De façon surprenante, le bamacan est également une protéine intracellulaire de la famille des SMC3 (*Structural Maintenance of Chromosome 3*) qui sont des protéines impliquées dans l'assemblage de complexes multimériques nucléaires. Cette forme de bamacan jouerait un rôle dans la tumorigenèse (Ghiselli & Iozzo, 2000).

B.3.2. Les hyalectanes

Cette famille de protéoglycane a été décrite pour interagir avec l'AH et les lectines. Elle comprend quatre membres, le versican, l'aggrécan, le brévican et le neurocan, dont le point commun est leur structure à trois domaines globulaires : un domaine N-terminal qui fixe l'AH (domaine G1), un domaine central qui porte les chaînes de GAG (domaine G2) et un domaine C-terminal capable d'interagir avec les lectines (domaine G3) (Figure 8) (Iozzo, 1998; Handley *et al.*, 2006). Les hyalectanes sont des protéoglycane à chaînes CS. Toutefois, l'aggrécan et le neurocan possèdent également quelques chaînes KS. En revanche, aucune chaîne HS n'a été décrite dans la littérature.

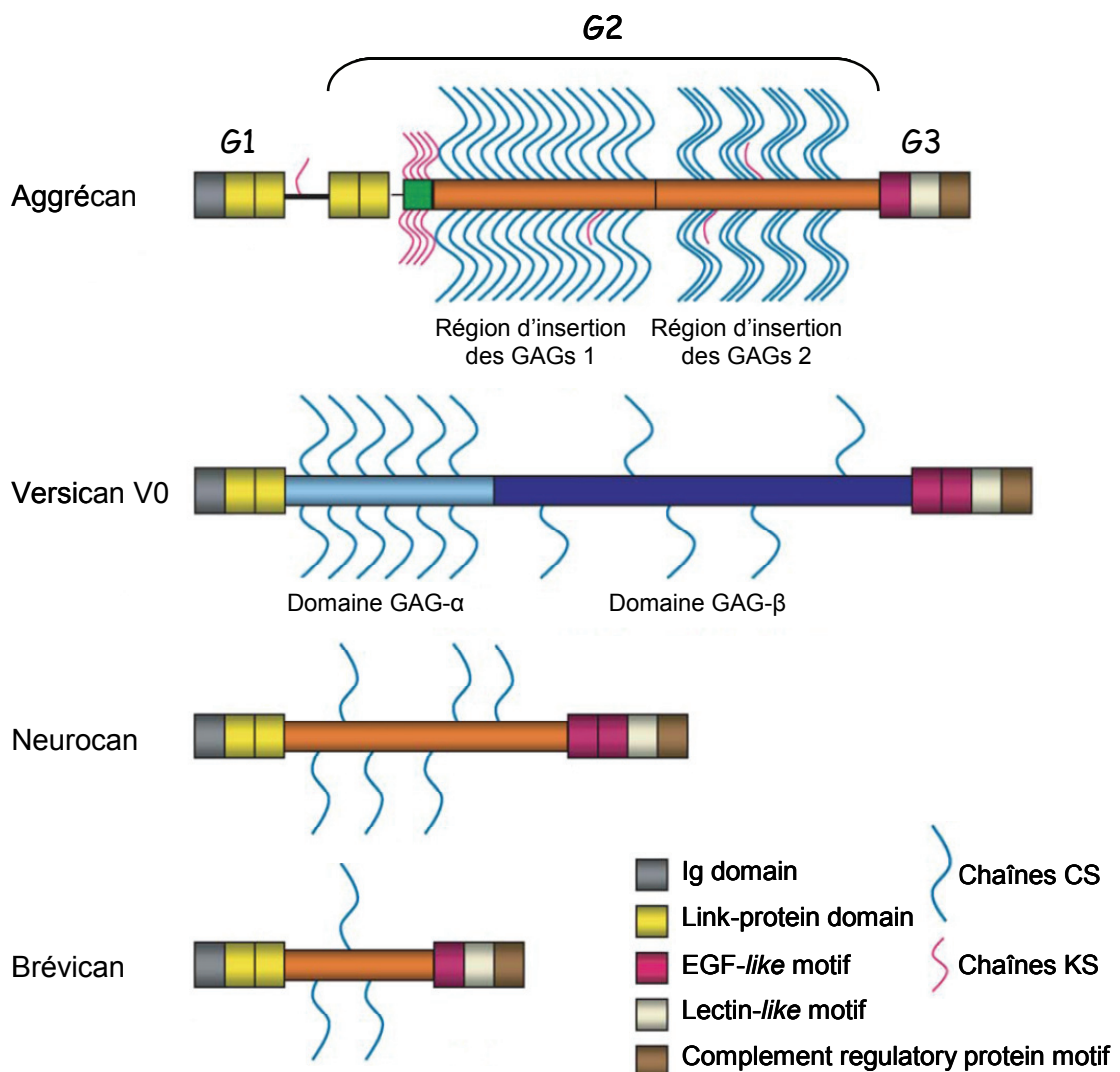


Figure 8 : Représentation schématique des quatre membres des hyalectanes (modifiée à partir de Handley *et al.*, 2006).

a) Le versican

Le versican est le protéoglycane le plus représenté de la famille des hyalectanes. Il est un composant majeur de la plupart des matrices extracellulaires et du cartilage. Ce protéoglycane possède un « core » protéique important (MM = 400 kDa) composé de trois domaines caractéristiques (Iozzo, 1998). Le domaine G1, situé à l'extrémité N-terminale, contient un module Immunoglobuline suivi de deux modules de liaison, qui sont impliqués dans la fixation de l'AH. Le domaine G2 est composé de deux sous-domaines, nommés GAG- α et GAG- β , qui sont codés par deux exons différents. Ces régions portent jusqu'à 30 sites d'attachement pour les chaînes CS, ainsi que d'autres sites de N- et O-glycosylation (Handley *et al.*, 2006). Chez les mammifères, quatre variants (V0 à V4), issus de l'épissage alternatif du domaine G2, ont été identifiés (Dours-Zimmermann & Zimmermann, 1994). Le plus courant, le variant V0, possède les deux sous-domaines GAG- α et - β , tandis que les variants V1 et V2 ne possèdent que le domaine GAG- α ou GAG- β , respectivement. Le dernier variant, V4, lui, n'en possède aucun. Le domaine G3 C-terminal est constitué d'une série de motifs structuraux incluant deux modules de type EGF (*Epithelial Growth Factor*), un module « C-type lectin domain » et un module de type « complement regulatory protein » (Iozzo, 1998; Handley *et al.*, 2006).

Les différents variants sont plus ou moins substitués par les chaînes de GAG, ce qui amène une certaine hétérogénéité qui semble avoir un rôle fonctionnel puisque chaque isoforme présente une expression dépendante du type cellulaire. Par exemple, les variants V0 et V1 sont exprimés par les fibroblastes, les chondrocytes et les hépatocytes, alors que les kératinocytes expriment uniquement le variant V1 (Iozzo, 1998).

Les fonctions du versican sont diverses. Grâce à sa capacité à fixer l'AH, il forme des agrégats qui permettent la rétention d'eau lors des processus de remodelage cellulaire observés après des blessures ou des cas d'inflammation (LeBaron *et al.*, 1992; Delehedde *et al.*, 2001). D'importants dépôts de versican ont été localisés dans les tissus en prolifération, en particulier dans des zones riches en AH associées à l'inflammation (Bensadoun *et al.*, 1997; Nara *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1999; Venkatesan *et al.*, 2000; Johnson, 2001). D'une manière générale, le versican est impliqué dans l'organisation de la matrice extracellulaire, conséquence de ses interactions avec un grand nombre de macromolécules présentes dans la matrice et à la surface cellulaire (Wu *et al.*, 2005; Handley *et al.*, 2006).

b) L'aggrécan

L'aggrécan est le protéoglycane le plus volumineux que l'on ait décrit. Son « core » protéique possède une taille approximative de 220 kDa et présente une organisation générale similaire à celle du versican. Le domaine G2 central porte toutefois un nombre plus important de sites de substitution pour deux types de GAGs. L'aggrécan est, en effet, généralement substitué par une centaine de chaînes CS et une trentaine de chaînes KS (Iozzo, 1998; Handley *et al.*, 2006).

L'aggrécan est retrouvé en grande quantité dans les cartilages où il participe à l'hydratation des tissus. Sa forte affinité pour l'AH lui permet de former de larges complexes multimoléculaires dont la masse peut atteindre 100 000 à 200 000 kDa (Figure 9). Ces structures, où plusieurs centaines de monomères d'aggrécan sont liés à un AH, sont stabilisées par des protéines qui établissent des liaisons entre les différents partenaires (Caterson *et al.*, 2000). Ces complexes, fortement anioniques, ont la propriété de retenir l'eau dans une proportion très importante et confèrent ainsi aux cartilages une élasticité et une résistance aux stress mécaniques (Handley *et al.*, 2006; Roughley, 2006).

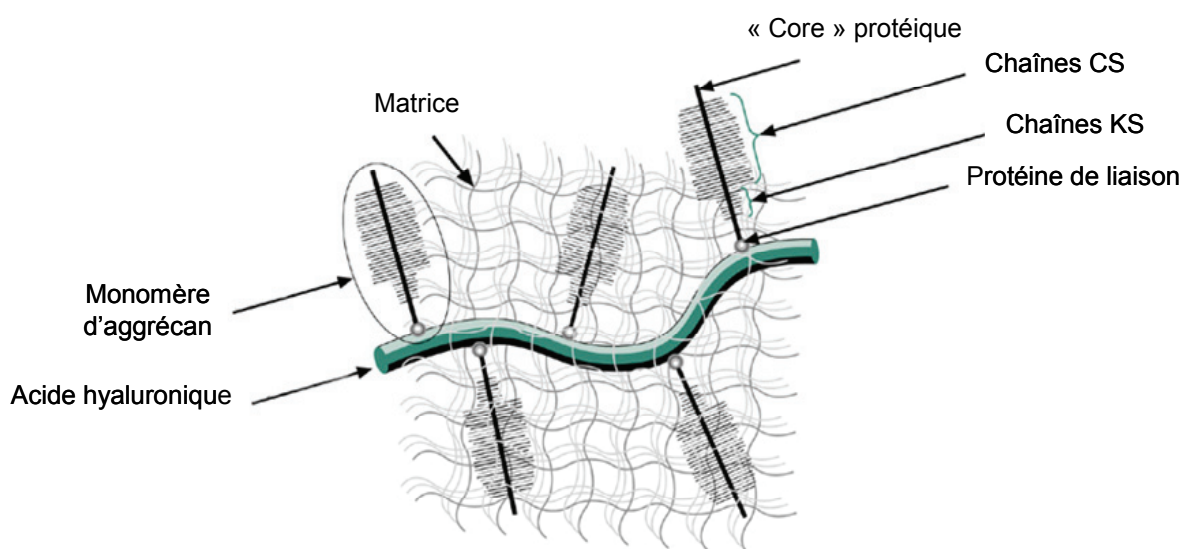


Figure 9 : Complexe macromoléculaire formé par l'aggrécan et l'acide hyaluronique. Les monomères d'aggrécan interagissent avec l'acide hyaluronique, dans un ratio de l'ordre de 100:1, afin de former de gigantesques complexes hydratés. La jonction entre les monomères d'aggrécan et l'acide hyaluronique est stabilisée par des protéines dites de « liaison ».

c) Les autres hyalectanes

Le **neurocan** et le **brévican** sont deux protéoglycanes à chaînes CS que l'on trouve principalement dans le système nerveux (Iozzo, 1998; Handley *et al.*, 2006). Leur expression est dépendante du stade de développement et de la localisation anatomique (Bandtlow & Zimmermann, 2000). Le neurocan est synthétisé par les cellules neuronales et possède une structure similaire aux autres membres des hyalectanes. Il porte en moyenne trois chaînes CS (Rauch *et al.*, 2001). Ce protéoglycane a la particularité d'interagir avec les molécules d'adhérence neuronale, Ng-CAM (*Neuron-Glia Cell Adhesion Molecule*) et N-CAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*), contribuant ainsi à l'inhibition de leurs interactions homophiles et la croissance neuritique. Il semblerait que les chaînes CS soient indispensables pour ces interactions (Margolis & Margolis, 1997; Rauch *et al.*, 2001).

Le brévican est exprimé par les astrocytes du système nerveux central. C'est le plus petit des hyalectanes. Ce protéoglycane possède un domaine G2 très limité qui porte une à trois chaînes CS (Yamada *et al.*, 1994). Toutefois, le brévican, tout comme le neurocan, peut exister sous une forme dépourvue de GAG qui apparaît être la résultante d'un clivage protéolytique du domaine N-terminal (Yamada *et al.*, 1995a). Par ailleurs, une forme membranaire du brévican a été identifiée. Elle dérive de l'épissage alternatif du domaine G3, où celui-ci est remplacé par une ancre lipidique de type GPI (Seidenbecher *et al.*, 1995).

B.3.3. Les protéoglycanes riches en leucine

Cette famille regroupe un grand nombre de protéoglycanes que l'on retrouve dans la matrice extracellulaire. Autrefois, on les appelait protéoglycanes à chaînes DS ou protéoglycanes non-agrégeants car ils portent des chaînes DS et ne fixent pas l'AH. Toutefois, seuls la décorine et le biglycan possèdent des chaînes DS. Les protéoglycanes riches en leucine sont des protéoglycanes de petites tailles (37-45 kDa) qui sont caractérisés par la présence d'un domaine central contenant des séquences répétitives riches en leucine (LRRs, *Leucine-Rich Repeats*) entourées de régions riches en cystéine (Hocking *et al.*, 1998; Handley *et al.*, 2006). Les principaux protéoglycanes de cette famille sont la décorine, le biglycan, le lumican et la fibromoduline (Iozzo, 1998; Roughley, 2006).

a) La décorine

La décorine est le prototype de la famille des protéoglycanes riches en leucine. Elle est présente dans la matrice extracellulaire de la plupart des tissus conjonctifs mais on la retrouve plus particulièrement dans ceux des tendons et des ligaments (Handley *et al.*, 2006). La partie centrale du « core » protéique est constituée de dix séquences LRRs. Les extrémités N- et C-terminales sont caractérisées par la présence de régions riches en cystéine qui sont organisées en boucle grâce à la formation de ponts disulfures. La décorine porte une seule chaîne DS localisée à l'extrémité N-terminale du « core » protéique (Handley *et al.*, 2006; Roughley, 2006). Elle possède également trois sites de N-glycosylation qui semblent nécessaires à la sécrétion extracellulaire (Figure 10) (Seo *et al.*, 2005).

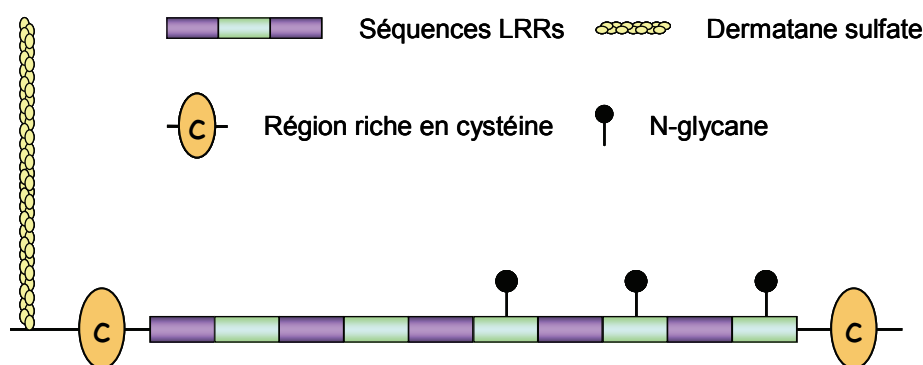


Figure 10 : Représentation schématique de la décorine (d'après Handley *et al.*, 2006).

En interagissant avec les fibrilles de collagène, la décorine régule la formation et la stabilisation des collagènes de type I et II (Vogel *et al.*, 1984). L'utilisation de mutants dépourvus de GAG altère le diamètre des fibrilles de collagène, ce qui suggère que la chaîne DS joue un rôle important dans les étapes précoces de la fibrillogenèse (Ruhland *et al.*, 2007). L'importance de la décorine dans l'organisation de la matrice extracellulaire a été démontrée à l'aide de souris invalidées pour ce gène. La peau de ces souris est particulièrement fragile et relâchée et les fibres de collagène présentent une organisation anormale (Danielson *et al.*, 1997).

En plus d'être un composant essentiel de la matrice, la décorine influence plusieurs fonctions cellulaires, comme la division cellulaire, la différenciation ou encore l'adhérence. Le « core » protéique est capable de fixer les TGF- β 1, - β 2, - β 3, faisant de la décorine un réservoir de TGF- β dans le milieu extracellulaire (Yamaguchi *et al.*, 1990; Hildebrand *et al.*, 1994; Kresse & Schonherr, 2001) et un modulateur de l'activité de ce facteur de croissance

(Iozzo, 1998). La décorine fixe également les récepteurs de l'EGF et de l'IGF (*Insulin-Like Growth Factor*) et modulent ainsi les fonctions cellulaires de ces facteurs (Santra *et al.*, 2002; Schonherr *et al.*, 2005). Enfin, il a été démontré *in vivo* que la décorine est impliquée dans les processus d'angiogenèse en réponse à un stress inflammatoire (Nelimarkka *et al.*, 2001; Fiedler & Eble, 2009).

b) Le biglycan

Le biglycan est un autre membre de la famille des protéoglycanes riches en leucine. Son « core » protéique est substitué par deux chaînes DS (Kresse & Schonherr, 2001). Il est retrouvé dans la matrice extracellulaire des cellules endothéliales, des muscles squelettiques, du cartilage, des os et des tendons (Handley *et al.*, 2006; Roughley, 2006).

Contrairement à la décorine, le biglycan n'inhibe pas la division cellulaire mais l'active dans les cellules stromales de moelle osseuse. La déficience en biglycan chez la souris entraîne un ralentissement de la croissance osseuse et les animaux montrent des signes d'ostéoporose précoce, indiquant que le biglycan est impliqué dans le développement et la régénération des os (Xu *et al.*, 1998; Young *et al.*, 2002). Le « core » protéique interagit avec de nombreuses protéines de la matrice comme la fibronectine, les collagènes I, II ou VI (Hildebrand *et al.*, 1994; Hocking *et al.*, 1998). La surexpression du biglycan a été observée dans des cas d'inflammation pulmonaire (Bensadoun *et al.*, 1997; Venkatesan *et al.*, 2000).

c) Le lumican

Le lumican est un protéoglycane à chaînes KS que l'on retrouve dans la cornée et les parois artérielles (Handley *et al.*, 2006). Le lumican a la particularité d'être exprimé sous la forme d'un protéoglycane ou d'une glycoprotéine non sulfatée dans les tissus conjonctifs d'autres organes comme les poumons, les reins ou le cœur (Chakravarti *et al.*, 1998; Hocking *et al.*, 1998). Il possède également la propriété de fixer les collagènes de type I et II et joue ainsi un rôle de régulateur de la fibrillogenèse du collagène, processus critique pour la transparence de la cornée (Chakravarti *et al.*, 1998; Ezura *et al.*, 2000). Des souris invalidées pour l'expression du lumican présentent des fibres de collagène anormalement épaisses ainsi qu'une opacité de la cornée (Chakravarti *et al.*, 1998). Le lumican faiblement sulfaté est présent dans les cornées pathologiques et contribuerait au recrutement des macrophages dans les régions inflammatoires (Funderburgh *et al.*, 1997).

d) La fibromoduline

La fibromoduline est un autre protéoglycane riche en leucine dont le « core » protéique peut porter jusqu'à cinq chaînes KS (Hocking *et al.*, 1998). Elle est retrouvée dans la matrice extracellulaire des cartilages et des tendons. Comme la décorine, la fibromoduline fixe les collagènes de type I et II et influence donc la fibrillogenèse du collagène et la structure des fibrilles résultantes (Svensson *et al.*, 1999; Ezura *et al.*, 2000; Viola *et al.*, 2007). Dans certaines pathologies, comme les fibroses pulmonaires, une altération de l'expression de la fibromoduline affecte l'organisation du collagène (Svensson *et al.*, 1999; Venkatesan *et al.*, 2000).

B.3.4. Les protéoglycanes circulants

a) Le protéoglycane-100

Le protéoglycane-100 ou PG-100 est un protéoglycane de 106 kDa qui porte une unique chaîne CS. Il est principalement sécrété par les macrophages mais on le retrouve également dans le milieu de culture de cellules d'ostéosarcomes ou de cellules endothéliales (Schwarz *et al.*, 1990; Nelimarkka *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1998). De façon intéressante, il a été démontré que le PG-100 possède la même séquence protéique que le M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*)-1 qui constitue le principal régulateur de la survie, de la prolifération et de la différenciation des phagocytes mononucléaires (Chitu & Stanley, 2006). Partenheimer *et al.* (1995) ont démontré que la chaîne CS du PG-100 influence l'activité biologique du protéoglycane. L'activité M-CSF-1 serait, en effet, issue de la dégradation du PG-100 qui générerait un fragment actif de 50 kDa dépourvu de la chaîne de GAG. Ainsi, en permettant le stockage du PG-100 dans l'environnement extracellulaire, la chaîne CS inhiberait son activité lorsqu'elle n'est pas nécessaire (Partenheimer *et al.*, 1995).

b) La bikunine

La bikunine tient son nom des deux domaines de type Kunitz que porte la protéine. Le domaine Kunitz est structuralement bien caractérisé : il s'agit d'un polypeptide de 7 kDa qui possède trois ponts disulfures. Ce domaine a été défini comme étant un inhibiteur de protéases (Gebhard *et al.*, 1990). L'unique chaîne CS portée par la bikunine, qui fait d'elle un protéoglycane, est ancrée dans la partie N-terminale de la protéine qui est sensible à la protéolyse. Outre ces domaines, le « core » protéique est composé d'une séquence de cinq

résidus d'acide aminé faisant le lien entre eux et de courtes régions N- et C-terminales (Zhuo *et al.*, 2002). La bikunine est un protéoglycane atypique. En effet, le « core » protéique est exprimé dans le réticulum endoplasmique sous la forme d'un précurseur polypeptidique portant à la fois le « core » protéique de la bikunine et l' α -1-microglobuline. C'est sur ce précurseur que la chaîne CS est ajoutée, dans l'appareil de Golgi, sur la partie constituant la bikunine. Une liaison covalente est alors formée entre la chaîne CS et un ou deux polypeptides appelés, respectivement, chaîne lourde 3 ou 1 et 2. Cette liaison peu courante chez les GAGs permettrait la protéolyse du précurseur libérant ainsi l' α -1-microglobuline et la bikunine (Fries & Blom, 2000). Cette dernière semble, dans 90 % des cas, liée avec la ou les chaînes lourdes pour former un complexe nommé pré- α -inhibiteur (avec la chaîne lourde 3) ou inter- α -inhibiteur (avec les chaînes lourdes 1 et 2) (Figure 11).

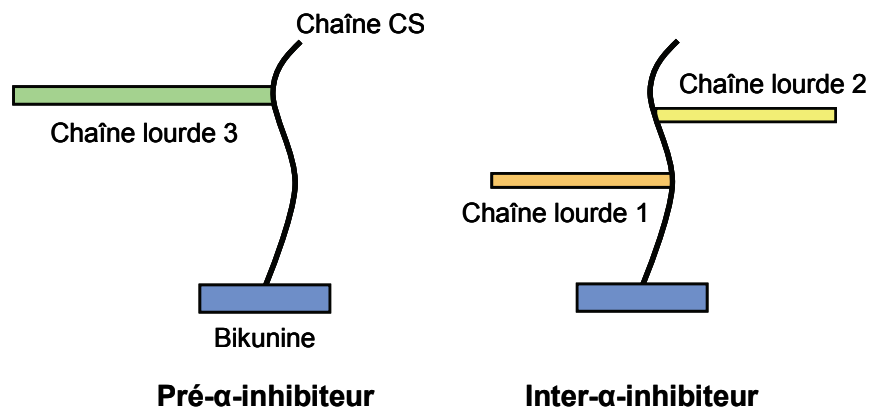


Figure 11 : Représentation schématique des deux formes de bikunine. Dans ces complexes, une ou deux chaînes polypeptidiques, chaîne lourde 3 ou 1 et 2, sont liées de façon covalente à la chaîne CS de la bikunine (adaptée de Fries & Blom, 2000).

A l'heure actuelle, les fonctions associées à la bikunine sont mal définies (Fries & Blom, 2000). Il est connu qu'elle est capable d'inhiber certaines protéases telles que la trypsine, la chymotrypsine, la cathepsine G ou encore la plasmine. *In vitro* et *in vivo*, elle peut prévenir le processus métastatique des cellules tumorales, probablement en bloquant l'action de la plasmine membranaire. Enfin, plus récemment, il a été montré que la bikunine est capable d'inhiber l'induction du TNF (*Tumor Necrosis Factor*)- α par le lipopolysaccharide (LPS) dans les macrophages et ce de façon dose-dépendante (Matsuzaki *et al.*, 2004). *In vivo*, elle permet la survie de souris traitées avec une dose létale de LPS. Ce protéoglycane pourrait donc être un bon candidat pour le traitement de pathologies inflammatoires.

c) L'endocan

L'endocan, encore appelé ESM (*Endothelial Cell Specific Molecule*)-1, est un protéoglycane soluble de 50 kDa. Il porte une unique chaîne DS (Lassalle *et al.*, 1996; Bechard *et al.*, 2000; 2001). L'endocan a la particularité d'être un protéoglycane circulant. Il est principalement exprimé par les cellules endothéliales (Lassalle *et al.*, 1996; Aitkenhead *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2002). Cependant, l'expression d'endocan a également été observée dans d'autres types cellulaires tels que les adipocytes, les cellules de mélanomes ou encore des cellules issues de glioblastomes (Ross *et al.*, 2000; Hendrix *et al.*, 2003; Wellner *et al.*, 2003). Il joue un rôle clé dans la régulation de processus biologiques tels que l'adhérence cellulaire, l'inflammation et la tumorigenèse (Sarrazin *et al.*, 2006). Sa sécrétion est significativement augmentée chez les patients présentant un sepsis ou un cancer (Bechard *et al.*, 2000; Scherpereel *et al.*, 2003; Grigoriu *et al.*, 2006; Scherpereel *et al.*, 2006).

d) L'apolipoprotéine O

Pour la première fois, une apolipoprotéine, l'apolipoprotéine O (apoO), a été caractérisée comme appartenant à la famille des protéoglycanes. En effet, un traitement à la chondroïtinase ABC a permis de démontrer qu'elle est substituée par une ou plusieurs chaînes CS. L'apoO est particulièrement abondante dans le cœur. Elle induit l'efflux de cholestérol depuis les macrophages et il est possible que ce nouveau protéoglycane soit impliqué dans des mécanismes de protection du myocarde contre l'accumulation de lipides (Lamant *et al.*, 2006).

CHAPITRE II

Les héparanes sulfates, des régulateurs
essentiels de nombreux médiateurs
extracellulaires

Des approches utilisant l'héparine dans des expériences de compétition ou le traitement des cellules à l'héparinase ou au chlorate ont permis de caractériser un large répertoire de protéines capables d'interagir spécifiquement avec les chaînes HS. A ce jour, une centaine de HBPs (*Heparin-Binding Proteins*) ont été identifiées. Parmi ces ligands, on distingue des protéines de la matrice extracellulaire et des facteurs solubles tels que des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines, des inhibiteurs de protéases ou encore des protéines virales. En fixant ces facteurs extracellulaires, les chaînes HS possèdent un rôle essentiel dans l'activité de ces protéines et se retrouvent ainsi impliquées dans des processus physiologiques et pathologiques très variés (Figure 12) (Salmivirta *et al.*, 1996; Bernfield *et al.*, 1999; Casu & Lindahl, 2001; Capila & Linhardt, 2002; Whitelock & Iozzo, 2005; Bishop *et al.*, 2007; Kirkpatrick & Selleck, 2007; Lindahl & Li, 2009).

A - Implication des héparanes sulfates dans divers processus biologiques

A.1. Augmentation de l'activité des protéines par changement conformationnel

L'interaction de l'héparine avec l'antithrombine III (AT-III) est la première interaction héparine/protéine à avoir été caractérisée. Pour cela, l'AT-III est considérée comme le prototype des HBPs (Bourin & Lindahl, 1993; Rosenberg *et al.*, 1997; Petitou *et al.*, 2003). L'AT-III est une serpine, c'est-à-dire un inhibiteur de protéases à sérine, impliquée dans la régulation de la cascade de coagulation. De part son interaction avec cette protéine, l'héparine possède un rôle anticoagulant et est notamment utilisée en clinique. En 1973, Rosenberg & Damus ont été les premiers à suggérer que la fixation de l'héparine à l'AT-III entraîne un changement conformationnel de la protéine, lui permettant d'exercer son activité d'inhibiteur envers les protéases à sérine de la cascade de coagulation telles que la thrombine ou le facteur Xa (Rosenberg & Damus, 1973). Le mécanisme de cette inhibition a largement été étudié. Les différentes études ont permis de mettre en évidence que le changement conformationnel de l'AT-III, induit par la fixation de l'héparine, est fondamental puisqu'il permet à la fois d'augmenter l'affinité entre les deux partenaires et d'exposer la boucle réactive de l'AT-III,

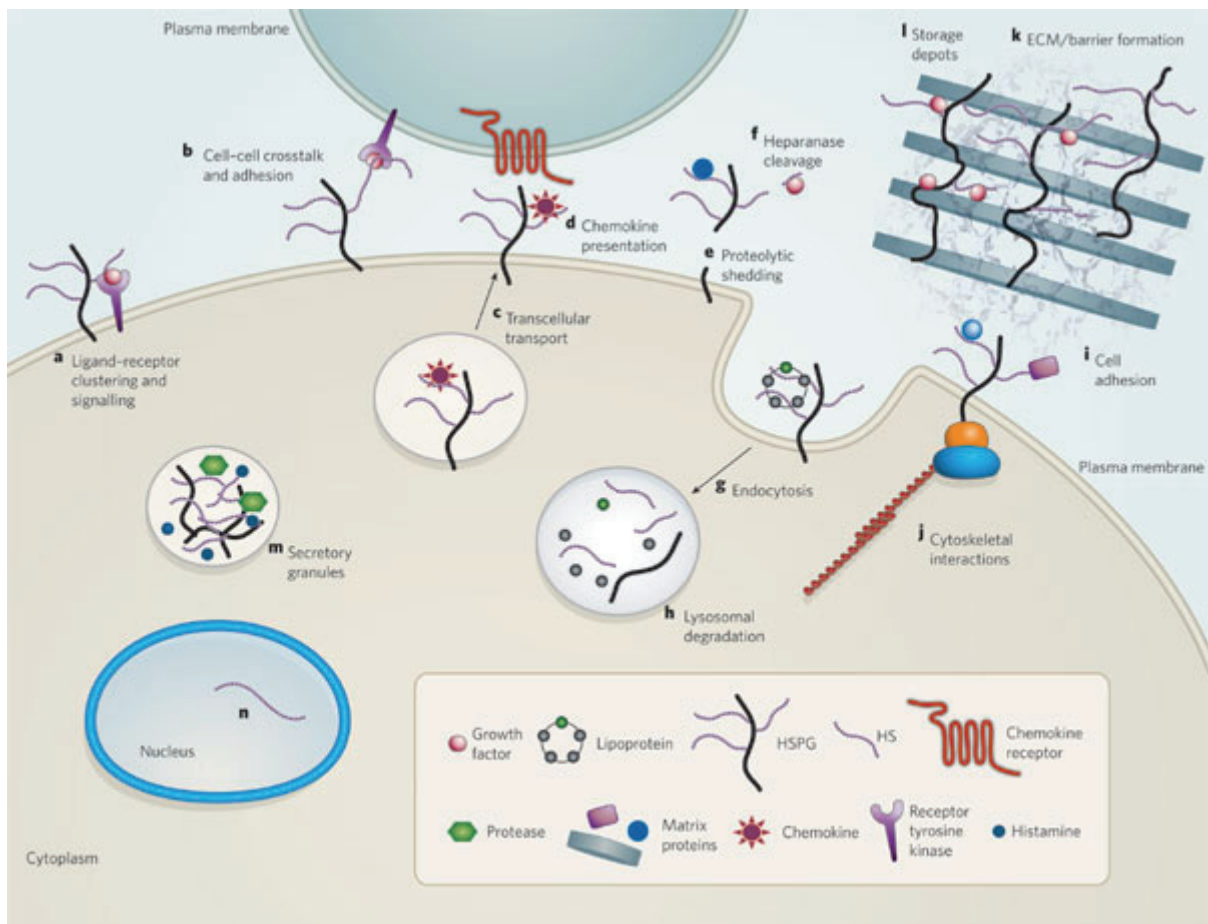


Figure 12 : Les interactions HS/protéine dans divers processus physiologiques. Les HSPGs jouent un rôle dans la présentation des facteurs de croissance à leurs récepteurs à tyrosine kinase, qui sont présents soit sur la même cellule **(a)**, soit sur une cellule adjacente **(b)**. Ils transportent les chimiokines à travers la cellule et les présentent à la surface cellulaire **(c, d)**. Le clivage protéolytique du « core » protéique mène à sa libération dans le milieu extracellulaire **(e)** et les héparanases clivent les chaînes HS **(f)**, libérant ainsi les ligands fixés. Les HSPGs de la surface cellulaire peuvent être endocytés **(g)**, puis recyclés à la surface cellulaire ou dégradés dans le lysosome **(h)**. Les HSPGs peuvent également faciliter l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire **(i)** et former des pontages avec le cytosquelette **(j)**. Les HSPGs extracellulaires sont impliqués dans l'assemblage de la matrice extracellulaire, dans sa résistance aux forces compressives et dans le maintien de ses propriétés rhéologiques **(k)**. Ils constituent également un réservoir de facteurs de croissance ou de chimiokines **(l)**. Grâce à ses chaînes d'héparine, la serglycine permet le stockage de protéases dans les granules de sécrétion des mastocytes **(m)**. Enfin, certaines études suggèrent la présence de chaînes HS dans le noyau **(n)**, bien que le rôle de cette localisation n'ait pas encore été déterminé (Bishop *et al.*, 2007).

facilitant ainsi la reconnaissance des protéases à sérine (Figure 13) (Andersson *et al.*, 1977; Danishefsky *et al.*, 1977; Villaneuva & Danishefsky, 1977; Holmer *et al.*, 1979; Li *et al.*, 2004).

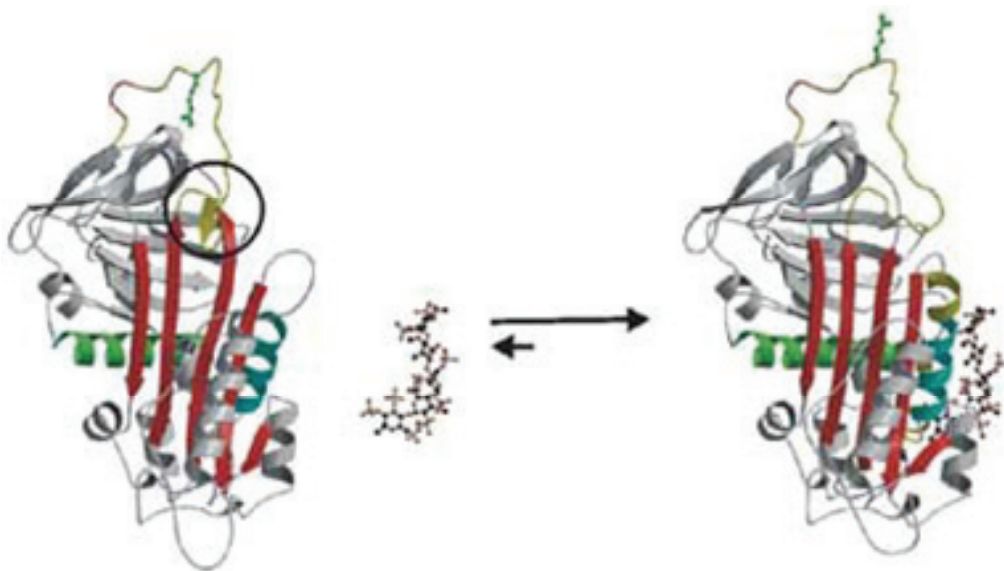


Figure 13 : Changement conformationnel de l'AT-III induit par la fixation d'un pentasaccharide héparinique. La fixation du pentasaccharide spécifique de l'AT-III induit un changement de conformation de cette dernière. Celui-ci se traduit par l'expulsion d'une région (entourée par un cercle noir) de la RCL (*Reactive Center Loop* représentée en jaune) en dehors de la partie globulaire de la protéine. L'expulsion de cette région augmente la flexibilité de la RCL et libère une arginine (représentée en vert sur la boucle). Cette arginine et la flexibilité de la boucle permettent d'engager l'interaction avec la thrombine et son inhibition (modifiée à partir de Li *et al.*, 2004).

Des modifications conformationnelles induites par la fixation de l'héparine et des HS ont également été observées pour d'autres ligands tels que le FGF-2 ou encore HB-GAM (*Heparin-Binding Growth-Associated Molecule*) (Prestrelski *et al.*, 1992; Kilpelainen *et al.*, 2000). Néanmoins, contrairement à l'AT-III, ces changements conformationnels n'ont été reliés à aucune fonction.

A.2. Protection et stockage des protéines

La fixation des protéines aux chaînes HS leur confère certains avantages biologiques comme par exemple la protection contre la dégradation par les protéases extracellulaires. Ces dernières sont très importantes au niveau des sites de néovascularisation, d'invasion cellulaire ou d'inflammation. Ainsi, le FGF-2 lié à l'héparine ou aux chaînes HS est protégé de la protéolyse par la plasmine (Saksela *et al.*, 1988). Durant l'inflammation, l'héparine et les

chaînes HS peuvent inactiver l'élastase libérée par les neutrophiles, protégeant ainsi l'IL (*Interleukin*)-8 d'une dégradation rapide par la protéase (Webb *et al.*, 1993; Cadene *et al.*, 1995). L'interaction avec l'héparine et les HS protège le TGF- β de la dégradation protéolytique *in vitro* et prévient la formation de complexes inactifs avec la β 2-macroglobuline (McCaffrey *et al.*, 1989; 1994a; 1994b; Lyon *et al.*, 1997). Les HS permettent également de protéger de la protéolyse d'autres facteurs tels que l'IL-7, SDF (*Stromal Cell-Derived Factor*)-1 ou encore l'IFN (*Interferon*) γ (Lortat-Jacob & Grimaud, 1991; Clarke *et al.*, 1995; Lortat-Jacob *et al.*, 1996; Sadir *et al.*, 2004). Par ailleurs, il a été montré que la fixation des facteurs de croissance aux chaînes HS peut également les protéger contre la dénaturation chimique et thermique (Gospodarowicz & Cheng, 1986). Plus surprenant, le facteur de croissance, lui-même, peut avoir un rôle protecteur vis-à-vis des HS. En effet, dans des cellules CHO, il a été montré que le FGF-2 inhibe le clivage des chaînes HS par les héparanases (Tumova & Bame, 1997; Tumova *et al.*, 1999).

Les HS de la surface cellulaire et de la matrice extracellulaire jouent un rôle important dans l'activité des facteurs de croissance et des cytokines en fournissant un réservoir à ces molécules. Ce réservoir permet de localiser et de limiter la diffusion et l'activité des molécules stockées. Cette fonction particulière des chaînes HS a été mise en évidence pour plusieurs facteurs extracellulaires comme le FGF-2, le TGF- β , le VEGF et l'IL-8 (McCaffrey *et al.*, 1989; Houck *et al.*, 1992; Webb *et al.*, 1993; Lyon *et al.*, 1997; Colin *et al.*, 1999; Dowd *et al.*, 1999). Piégés au sein de cette réserve locale, ces facteurs vont ensuite être libérés et pouvoir agir de façon ciblée et donc plus efficace sur leur environnement direct. La libération de ces facteurs stockés se produit lors du remodelage tissulaire. Ce processus, qui existe dans des conditions physiologiques, peut être amplifié lors de phénomènes biologiques fondamentaux tels que la morphogenèse ou dans des pathologies impliquant un remodelage intense des tissus comme le cancer et les maladies inflammatoires (Ihrcke *et al.*, 1998; Bame, 2001; Vlodaysky & Friedmann, 2001).

La mobilisation des facteurs mis en réserve fait intervenir deux types d'enzymes : des héparanases qui clivent les chaînes HS et des protéases, majoritairement représentées par les métalloprotéinases, qui coupent le « core » protéique des HSPGs (Quaranta, 2000; Bame, 2001; Gotte, 2003). Les HSPGs solubles et les fragments de chaînes HS ainsi libérés dans le milieu extracellulaire conservent les mêmes propriétés de fixation que leurs précurseurs cellulaires. Alors que les fragments héparaniques peuvent réguler la fixation des ligands à la surface cellulaire et leur stabilisation, ils peuvent également entrer en compétition avec les HSPGs de surface dans la fixation des facteurs solubles (Tumova *et al.*, 1999).

A.3. Oligomérisation et présentation des protéines

Les chimiokines sont une famille de petites protéines (8-12 kDa). Plus de 50 membres ont été classés en quatre familles (C, CC, CXC, CX₃C) sur la base de l'arrangement d'un motif conservé riche en cystéines localisé dans leur région N-terminale. Presque toutes les chimiokines interagissent avec les HS (Rossi & Zlotnik, 2000; Taylor & Gallo, 2006; Hamel *et al.*, 2009).

La formation d'un gradient de chimiokines et leur présentation à la surface luminale des cellules endothéliales sont des événements cruciaux pour le recrutement des leucocytes circulants sur les sites de l'inflammation (Parish, 2006). Plusieurs évidences *in vivo* démontrent le rôle fondamental des HSPGs dans la distribution et l'activité de ces ligands (Proudfoot *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). En modifiant le site de fixation aux GAGs de trois chimiokines (MCP (*Monocyte Chemoattractant Protein*)-1, MIP (*Macrophage Inflammatory Protein*)-1 β et RANTES (*Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*)), Proudfoot *et al.* (2003) ont montré que celles-ci ne présentaient plus d'activité chimio-attractante *in vivo* alors que cette activité était conservée *in vitro*. Des résultats similaires ont été obtenus plus récemment chez des souris présentant des altérations structurales des HS (Wang *et al.*, 2005). Ainsi, en fixant les chimiokines produites au niveau des sites de l'inflammation, les HSPGs exprimés à la surface luminale des cellules endothéliales évitent leur dilution dans le flux sanguin et permettent la formation d'un gradient solide de facteurs chimio-attractants (Tanaka *et al.*, 1993b; Gilat *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1998b; Kuschert *et al.*, 1999).

La plupart des chimiokines forment des dimères ou des tétramères en solution (Lortat-Jacob *et al.*, 2002). Il a été démontré que la fixation de l'héparine ou des HS induit ou favorise cette oligomérisation *in vitro* (Hoogewerf *et al.*, 1997; Imberty *et al.*, 2007). D'ailleurs, la sécrétion par des cellules T cytotoxiques de complexes multimériques de CC chimiokines associées à des protéoglycanes a été reportée (Wagner *et al.*, 1998). Proudfoot *et al.* (2003) ont étudié le rôle de cette oligomérisation dans l'activité des chimiokines. En utilisant les mutants monomériques des trois chimiokines (MCP-1, MIP-1 β et RANTES), ils ont mis en évidence que ces variants, bien que pleinement actifs *in vitro*, sont incapables de recruter les leucocytes dans un modèle *in vivo* de chimiotactisme. Ce résultat est en accord avec le précédent et suggère que la fixation aux GAGs et la capacité à former des oligomères sont indispensables à l'activité de certaines chimiokines *in vivo*, bien qu'elles ne soient pas nécessaires pour l'activation des récepteurs *in vitro* (Proudfoot *et al.*, 2003). Ainsi, selon les

auteurs, l'oligomérisation des chimiokines permettrait d'augmenter leur concentration locale à la surface cellulaire favorisant ainsi l'activation de leurs récepteurs. En outre, la formation des complexes chimiokines/HS peut également moduler la conformation des protéines et leur permettre d'exposer de nouveaux sites de fixation aux récepteurs, qui n'étaient pas disponibles jusqu'alors.

A.4. Participation aux complexes de signalisation

Une des propriétés communes des HBPs est leur capacité à interagir avec un récepteur fonctionnel et des GAGs sulfatés, par l'intermédiaire de deux régions distinctes de la molécule (Turnbull *et al.*, 2001; Capila & Linhardt, 2002). Ainsi, en fixant les facteurs extracellulaires *via* leurs chaînes HS, les HSPGs permettraient leur présentation au récepteur fonctionnel et réguleraient leurs activités.

Les mécanismes par lesquels les HSPGs modulent la formation des complexes de signalisation ont largement été étudiés à travers la famille des FGFs. Sur les 22 membres identifiés, 11 d'entre eux fixent spécifiquement les HS (Ornitz & Itoh, 2001; Mulloy & Rider, 2006). La transduction du signal est permise par des récepteurs à tyrosine kinase (FGFR1 à FGFR4) qui possèdent également des sites de fixation à l'héparine et aux HS (Eswarakumar *et al.*, 2005). La fixation du facteur de croissance induit la dimérisation du récepteur et la transphosphorylation des domaines à tyrosine kinase cytoplasmiques, qui engendre leur activation et la transduction du signal (Fernig & Gallagher, 1994). L'héparine et les HS participent à l'assemblage d'un complexe ternaire (FGF:HS:FGFR) et modulent l'activité des récepteurs (Rapraeger *et al.*, 1991; Yayon *et al.*, 1991; Delehedde *et al.*, 2000). Même si les facteurs de croissance sont capables de fixer leur récepteur en absence de chaînes HS, l'interaction avec l'oligosaccharide stabilise le complexe de signalisation (Nugent & Edelman, 1992; Pantoliano *et al.*, 1994) et permet l'émergence d'un signal soutenu qui est généralement requis pour les activités biologiques (Rapraeger *et al.*, 1991; Delehedde *et al.*, 2000). Par exemple, dans des fibroblastes déficients pour l'expression des HSPGs ou traités à l'héparinase, la fixation du FGF-2 sur son récepteur protéique est encore capable de générer une cascade de signaux intracellulaires, conduisant notamment à l'activation des voies de signalisation. Cependant, ces signaux ne possèdent pas l'amplitude requise pour induire la prolifération des cellules. L'addition de fragments d'héparine suffit à restaurer l'activité mitogène du FGF-2. La présentation du facteur de croissance à son récepteur par les chaînes HS apparaît donc nécessaire pour lui permettre d'induire la prolifération cellulaire. En effet,

en permettant la dimérisation du FGF-2 et en stabilisant l'interaction entre le facteur et son récepteur protéique, les chaînes HS permettent la persistance des signaux intracellulaires indispensables pour l'activité mitogène de ce facteur (Delehedde *et al.*, 2000). La présentation de certaines HBPs par les GAGs apparaît donc nécessaire pour induire des réponses cellulaires optimales.

Des informations plus détaillées au regard de l'interaction de l'héparine et des HS avec le complexe FGF/FGFR ont été fournies grâce à la cristallisation des complexes ternaires (Figure 14) (Faham *et al.*, 1996; DiGabriele *et al.*, 1998; Plotnikov *et al.*, 1999; Pellegrini *et al.*, 2000; Plotnikov *et al.*, 2000; Schlessinger *et al.*, 2000).

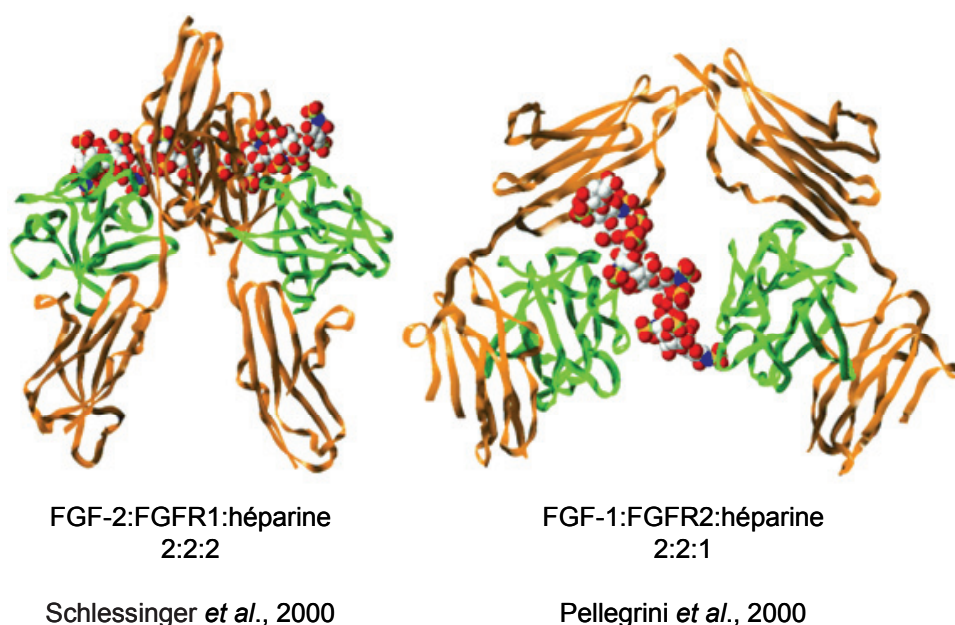


Figure 14 : Structure cristallographique des complexes ternaires (FGF:FGFR:héparine). Les facteurs de croissance sont représentés en vert et leurs récepteurs en orange. Les oligosaccharides hépariniques sont, quant à eux, modélisés (d'après Capila & Linhardt, 2002).

Deux types de complexes, comptant chacun deux molécules de FGFs et deux FGFRs, ont été obtenus. Pellegrini *et al.* (2000) ont réalisé la structure cristalline du FGF-1 en complexe avec son récepteur FGFR2 et des décasaccharides hépariniques. Ils ont ainsi montré que ce complexe est assemblé autour d'une unique chaîne oligosaccharidique fixant deux facteurs de croissance liés à deux récepteurs. Dans ce complexe asymétrique à stœchiométrie 2:2:1, la fixation de l'héparine implique des contacts avec les deux molécules de FGF-1 mais avec un seul des deux récepteurs (Pellegrini *et al.*, 2000). En parallèle, la structure cristalline du FGF-2 avec son récepteur et des oligosaccharides hépariniques indique que les deux paires

FGF-2/FGFR1 interagissent avec deux oligosaccharides et forment ainsi un complexe symétrique à stœchiométrie 2:2:2, à l'intérieur duquel les chaînes d'héparine établissent de nombreux contacts avec les FGF-2 et FGFR1 (Schlessinger *et al.*, 2000). La controverse au sujet de ces modèles n'est toujours pas résolue (Harmer *et al.*, 2004; Mohammadi *et al.*, 2005). Toutefois, une étude récente suggère que l'activité mitogène du FGF-2 serait associée à la dimérisation du facteur de croissance selon le mode asymétrique de formation du complexe ternaire (Goodger *et al.*, 2008).

A.5. Organisation de la matrice extracellulaire

Les chaînes HS sont capables de fixer des protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, la laminine et le collagène. La fibronectine interagit principalement avec les chaînes HS par son domaine HepII, situé dans son extrémité C-terminale (Echtermeyer *et al.*, 1999). Les laminines, protéines hétérotrimériques, possèdent de nombreux domaines de fixation aux chaînes HS. Le module LG4 situé dans le domaine globulaire C-terminal des chaînes $\alpha 3$ et $\alpha 4$ des laminines constitue un site de haute affinité pour les HS (Utani *et al.*, 2001; Matsuura *et al.*, 2004). Les chaînes HS se lient également à de nombreux collagènes avec des affinités variables, l'interaction HS/collagène V étant de loin la plus forte (LeBaron *et al.*, 1989). Toutes ces interactions font partie intégrante de l'organisation de la matrice et ont un rôle majeur dans l'adhérence cellulaire *via* les HSPGs membranaires.

A.6. Internalisation des protéines

Les HSPGs régulent l'internalisation et la clairance de certains ligands. En effet, comme nous le détaillerons dans le chapitre suivant, le recyclage des protéoglycanes est initié par l'endocytose de ceux-ci. Lors de leur internalisation, il n'est donc pas exclu que des protéines liées aux chaînes HS des HSPGs soient co-internalisées. Ce phénomène a notamment été démontré pour les protéines telles que l'AT-III, le complexe follistatine/activine, la vitronectine, la thrombospondine ou encore le FGF-2 et la lipoprotéine lipase (Bernfield *et al.*, 1999).

Il est connu que les HSPGs modulent le métabolisme des lipoprotéines en participant à la clairance de ces molécules (Mahley & Ji, 1999). Récemment, la réduction partielle de la sulfatation des HS hépatiques à l'aide de l'utilisation du système Cre-LoxP chez la souris a permis de mettre en évidence que les HS favorisent la fixation et l'internalisation des

lipoprotéines riches en triglycéride et en cholestérol, et ce indépendamment des membres de la famille des récepteurs des LDLs (*Low-Density Lipoproteins*) (MacArthur *et al.*, 2007; Bishop *et al.*, 2008). Les études réalisées *in vitro* suggèrent l'implication des syndécans et du perlécan dans ce phénomène (Fuki *et al.*, 1997; Zeng *et al.*, 1998). Toutefois, la relevance *in vivo* de ces HSPGs n'a pas été démontrée. Des études complémentaires sont donc indispensables, pour à la fois, déterminer la nature de la protéine fixant les HS et identifier le ou les « cores » protéiques impliqués dans ce phénomène.

A.7. Fixation des agents pathogènes

En dehors de leurs interactions avec les facteurs endogènes, les chaînes HS peuvent également permettre la fixation de divers agents infectieux (Spillmann, 2001; Capila & Linhardt, 2002). Parmi les pathogènes utilisant les HS comme sites d'ancrage, on distingue des parasites comme *Plasmodium falciparum* (Frevert *et al.*, 1993) et des bactéries telles que *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus* ou *Helicobacter pylori* (Liang *et al.*, 1992; Ascencio *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1993; Noel *et al.*, 1994; Geuijen *et al.*, 1996).

De nombreux virus détournent également les HS afin d'infecter leurs cellules cibles (Spillmann, 2001; Liu & Thorp, 2002). Parmi eux, on peut citer le HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), les herpès-virus, les cytomégalovirus et certains papillomavirus (WuDunn & Spear, 1989; Shieh *et al.*, 1992; Compton *et al.*, 1993; Patel *et al.*, 1993; Roderiquez *et al.*, 1995; Giroglou *et al.*, 2001). L'adsorption initiale d'un virus à la surface de sa cible cellulaire constitue une étape essentielle de l'invasion virale. Dans la majorité des cas, l'interaction virus/HSPGs est une étape préalable à l'interaction virus/récepteurs cellulaires. De plus, dans certains cas, elle peut également représenter une étape critique de l'infection virale (Spillmann, 2001).

Trois types d'interactions ont été reportés : (a) les HSPGs fixent et concentrent le virus à la surface d'une cellule permissive et favorisent ainsi l'interaction secondaire du virus avec un co-récepteur. Ce cas est décrit pour la majorité des virus (Chen *et al.*, 1997), (b) les HSPGs de cellules non permissives capturent le virus à leur surface et le présentent en *trans* aux cellules cibles (*e.g.* HIV-1) (Bobardt *et al.*, 2003) et (c) les HSPGs sont directement impliqués dans le mécanisme d'entrée du virus (*e.g.* HSV-1 (*Herpes Simplex Virus type 1*)) (Shukla *et al.*, 1999). En effet, l'entrée du HSV-1 dans les cellules mammifères est un processus multi-étape. Elle est initiée par l'adsorption du virus à la surface cellulaire grâce aux interactions

entre ses glycoprotéines membranaires virales gB et gC et les HS (WuDunn & Spear, 1989; Herold *et al.*, 1991; Shieh *et al.*, 1992). La seconde étape, quant à elle, consiste en la fusion cellulaire proprement dite et nécessite la fixation de la glycoprotéine virale gD aux chaînes HS possédant des résidus de glucosamine 3-*O*-sulfatés (Shukla *et al.*, 1999; Tiwari *et al.*, 2004). Les HSPGs membranaires sont également nécessaires à l'attachement du HIV-1 sur ses cellules cibles (Ohshiro *et al.*, 1996; Mondor *et al.*, 1998). Cette interaction impliquerait des résidus basiques situés sur la boucle V3 de la gp120 (Roderiquez *et al.*, 1995). Il a également été montré que les syndécans jouent un rôle dans l'infectiosité du HIV-1. En effet, ils favorisent l'attachement du HIV-1 et représentent une classe abondante de récepteurs sur les macrophages (Saphire *et al.*, 2001). D'autre part, les syndécans des cellules endothéliales sont capables de capturer et de protéger le HIV-1. Le virus garde alors toutes ses propriétés infectieuses, dans l'attente d'être présenté aux lymphocytes T circulants (Bobardt *et al.*, 2003).

B - L'interaction héparane sulfate/protéine

De part leur extrême diversité structurale, l'héparine et les HS sont impliqués dans la fixation d'une myriade de protéines. Cette propriété s'explique par leur polymorphisme élevé qui repose sur la longueur des chaînes, le degré de sulfatation et l'organisation des différentes régions sulfatées. A cela s'ajoute une certaine flexibilité conformationnelle qui renforce la complexité et peut influencer la fixation des protéines (Lindhahl *et al.*, 1998; Esko & Lindahl, 2001; Ori *et al.*, 2008).

B.1. Caractéristiques de l'interaction

L'interaction de l'héparine et des HS avec les protéines est principalement de nature électrostatique (Rabenstein, 2002). Au pH physiologique, l'héparine et les HS sont des polyanions pour lesquels une partie de leurs charges négatives est neutralisée par des ions de charges opposées. La fixation de ces contre-ions réduit les forces répulsives entre les groupements chargés, sulfates et carboxyles, de la chaîne polysaccharidique, même si ce phénomène est énergétiquement défavorable (Hileman *et al.*, 1998). Ainsi, la fixation des protéines sur l'héparine et les HS constitue un processus d'échange d'ions où les résidus d'acide aminé chargés positivement de la protéine remplacent les contre-ions. La libération d'entropie favorable générée par cet échange est appelée « effet polyélectrolyte » et constitue

la principale source d'énergie libre de l'interaction entre l'héparine/HS et les protéines (Mascotti & Lohman, 1995). La participation de composantes non-ioniques dans cette interaction a été évaluée entre le FGF-2 et l'héparine par calorimétrie de titration isotherme. Cette étude a démontré que les interactions électrostatiques représentent uniquement 30 % de l'énergie libre de fixation. Ainsi, les composantes non-ioniques, telles que les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes, occupent une place majeure dans cette fixation (Thompson *et al.*, 1994). L'analyse des structures cristallines des FGF-1 et FGF-2 en complexe avec l'héparine a confirmé cette hypothèse, montrant l'importance des liaisons de van der Waals dans les interactions protéine-sucre (Pellegrini *et al.*, 2000; Schlessinger *et al.*, 2000).

La structure tridimensionnelle de l'héparine et des HS semble également être importante pour la fixation des protéines. En solution, l'héparine est un polysaccharide linéaire qui possède une structure hélicoïdale (Mulloy *et al.*, 1993). La présence des résidus de IdoUA confère une certaine flexibilité conformationnelle à la chaîne. En effet, l'acide L-iduronique peut adopter plusieurs conformations pyranosiques (1C_4 , 4C_1 et 2S_0) contre une seule pour l'acide D-glucuronique (1C_4) (Figure 15) (Mulloy & Forster, 2000). La barrière énergétique entre ces formes n'est pas très élevée, l'oscillation entre les différents conformères est donc assez rapide (Capila & Linhardt, 2002). La conformation chaise ou bateau est influencée par la substitution de la glucosamine liée en position non réductrice des IdoUA. Par exemple, la forme 2S_0 prédomine lorsque le résidu de IdoUA2S est lié à une glucosamine 6-O-sulfatée (Murphy *et al.*, 2008). Les liaisons glycosidiques sont, elles, assez rigides et expliquent pourquoi la structure de la chaîne d'héparine n'évolue pas en fonction de la conformation des résidus de IdoUA (Mulloy & Forster, 2000; Sasisekharan *et al.*, 2006). Les différentes conformations des IdoUA orientent les groupements 2-O-sulfates et carboxyles dans différentes positions relatives à l'hélice, ce qui peut également influencer la fixation des protéines.

Très peu d'informations sont disponibles sur la structure tridimensionnelle des HS. Bien que les domaines NS des HS adoptent probablement la même structure hélicoïdale que celle de l'héparine, la conformation des domaines NA est moins certaine. Il est connu que ces domaines ne possèdent pas la flexibilité apportée par les résidus de IdoUA, mais conservent leur capacité à tourner autour des liaisons glycosidiques. De plus, le degré de rotation des résidus de GlcUA est plus important que celui observé pour les résidus de IdoUA, ce qui suggère que les séquences NA pourraient faciliter le positionnement de deux domaines NS à l'intérieur d'une même chaîne héparanique (Mulloy & Forster, 2000; Coombe & Kett, 2005).

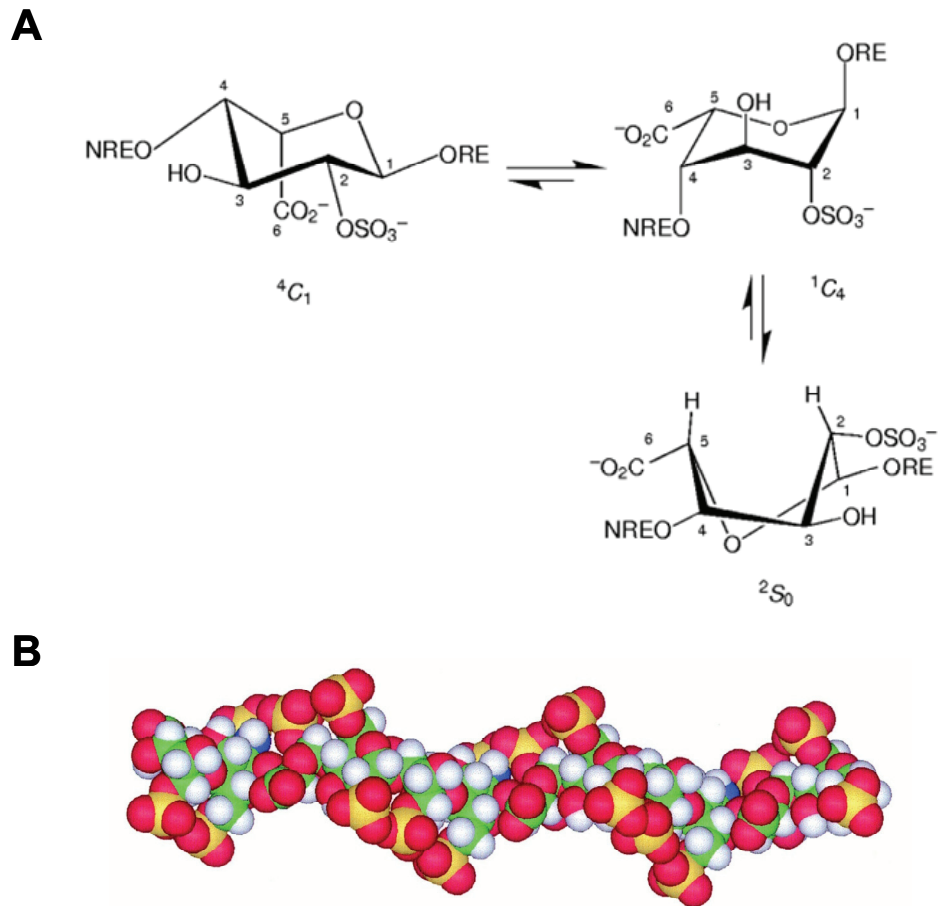


Figure 15 : Flexibilité conformationnelle de l'héparine et des HS. (A) Représentation des différentes conformations de l'acide iduronique dans l'héparine et les HS. **(B)** Structure hélicoïdale de l'héparine obtenue par résonance magnétique nucléaire. Les groupements sulfates sont représentés en rouge et jaune (modifiée à partir de Mulloy & Forster, 2000 et Capila & Linhardt, 2002).

La première caractérisation des domaines de fixation à l'héparine (HBD pour *Heparin-Binding Domain*) a été réalisée en 1989 (Cardin & Weintraub, 1989). Ils sont composés d'un nombre important de résidus d'acide aminé basiques tels que l'arginine, la lysine et, dans certains cas, l'histidine (Fromm *et al.*, 1995; Caldwell *et al.*, 1996). Ces domaines HBDs sont retrouvés dans la majorité des protéines fixant l'héparine et les HS. Sur la base de la distribution des résidus d'acide aminé basiques et hydrophobes, on distingue trois types de séquences consensus : -XBBXBX-, -XBBBXXBX- et -XBBBXXBBBXXBBX-, où B représente un acide aminé basique et X un acide aminé hydrophobe (Rabenstein, 2002). La modélisation moléculaire de ces séquences a démontré leur tendance à adopter des conformations facilitant l'interaction entre les résidus basiques des protéines et les groupements anioniques du polysaccharide. En effet, ces séquences consensus peuvent adopter une structure secondaire permettant l'exposition des acides aminés

basiques à l'extérieur de la protéine et le positionnement des résidus hydrophobes à l'intérieur de la structure protéique (Hileman *et al.*, 1998).

La régulation des interactions entre l'héparine/HS et les protéines par le microenvironnement a été décrite (Coombe & Kett, 2005). En effet, des variations de pH peuvent avoir d'importantes conséquences sur la capacité de certaines protéines à fixer l'héparine ou les HS. C'est le cas, par exemple, pour le peptide bêta-amyloïde, le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*), SDF-1 ou encore PECAM (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*)-1 (Wettrich *et al.*, 1999; Veldkamp *et al.*, 2005; Coombe *et al.*, 2008; Gandhi *et al.*, 2008). L'effet du pH a plus particulièrement lieu lorsque des résidus d'histidine sont présents dans le domaine de fixation à l'héparine. En effet, ces résidus renferment une chaîne latérale qui possède un pKa proche de 6. Ainsi, lorsque le pH physiologique diminue, comme constaté lors de l'inflammation ou du cancer, une grande proportion des résidus d'histidine devient protonée, ce qui favorise la formation des interactions électrostatiques avec les groupements sulfates de l'héparine et des HS (Gandhi & Mancera, 2008). La fixation de l'héparine/HS aux protéines peut également être favorisée par les cations divalents tels que le zinc (*e.g.* endostatine, IL-5) ou le calcium (*e.g.* annexine 2, annexine V, L-sélectine) (Norgard-Sumnicht *et al.*, 1993; Lipscombe *et al.*, 1998; Capila *et al.*, 2001; Ricard-Blum *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2006). Alors que pour l'annexine 2, le sucre et la protéine fixent les cations ; dans les autres cas, les interactions avec les cations semblent être réduites à la protéine. Dans ce dernier cas, le rôle des cations serait d'induire une conformation favorable pour la fixation du polysaccharide (Ori *et al.*, 2008). *In vivo*, l'effet de ces ions peut être local et apporter une réelle spécificité. En effet, alors que le taux circulant de zinc dans le sang est très faible, il est 30 à 60 fois plus élevé dans les plaquettes. Ainsi, il est probable qu'au niveau des sites d'activation des plaquettes, une augmentation de la concentration locale en zinc influence l'affinité et la spécificité de nombreuses interactions entre les protéines et les HS (Coombe & Kett, 2005).

B.2. Spécificité des sites de fixation

Etant donné que les HS possèdent de nombreux groupements chargés négativement, il n'est pas étonnant que de nombreuses protéines puissent s'y fixer par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques engageant leurs résidus d'acide aminé basiques (Capila & Linhardt, 2002; Gandhi & Mancera, 2008). Toutefois, il est maintenant établi que ces interactions sont beaucoup plus spécifiques. En effet, la composition en disaccharides,

l'arrangement des domaines NA et NS, ainsi que les résidus modifiés des régions *N*-sulfatées des HS, définissent des sites de fixation spécifiques et de haute affinité pour leurs ligands protéiques.

Même si le nombre de HBPs ne cesse d'augmenter, il existe peu d'informations sur la nature précise des sites de fixation héparaniques. Actuellement, ces sites de fixation peuvent être regroupés selon deux critères : (a) une organisation particulière des domaines NS et NA/NS, et (b) la présence de séquences « signatures » composées de modifications rares (Esko & Lindahl, 2001; Capila & Linhardt, 2002; Esko & Selleck, 2002).

De nombreux sites présents dans l'héparine et les domaines NS des HS interagissent avec les facteurs de croissance tels que le FGF-2 ou le HGF (*Hepatocyte Growth Factor*). Ces facteurs reconnaissent l'unité disaccharidique [IdoUA2S-GlcNS^{+/-}6S] (Turnbull *et al.*, 1992; Lyon *et al.*, 1994). Il est important de noter que l'interaction HBP/HS est également directement dépendante d'un nombre minimal d'unités disaccharidiques composant le motif héparanique. La technologie des biocapteurs optiques est un outil adapté à la détermination de la taille minimale d'un oligosaccharide capable de fixer une HBP. Ainsi, Delehedde *et al.* (2002a; 2002b) ont montré qu'un tétrasaccharide était suffisant pour permettre la fixation du HGF et du FGF-2. Toutefois, il est intéressant de constater que la taille de fixation d'un motif héparanique pour un ligand protéique ne correspond pas obligatoirement à celle du motif induisant une réponse cellulaire optimale. En effet, alors que des oligosaccharides de degré de polymérisation 4 (dp4) suffisent à fixer le HGF, l'activité mitogène maximale de ce facteur est observée pour des dps plus grands (Delehedde *et al.*, 2002b). De la même façon, des dp10 ou dp12 sont nécessaires pour observer l'activité proliférative optimale du FGF-2 (Delehedde *et al.*, 2002a). Les interactions peuvent également être dépendantes de la distribution des séquences NA et NA/NS, comme cela a été décrit pour l'IL-8, l'IFN γ , le PF (*Platelet Factor*) 4, le TGF- β ou encore MIP-1 α (Lortat-Jacob *et al.*, 1995; Lyon *et al.*, 1997; Stringer & Gallagher, 1997; Spillmann *et al.*, 1998; Stringer *et al.*, 2002). Ces interactions sont permises par la flexibilité des domaines NA qui assistent l'interaction simultanée de deux domaines NS et induit la formation de dimères. Ainsi, l'IL-8 reconnaît les disaccharides trisulfatés [IdoUA2S-GlcNS6S] contenus dans les domaines NS et la dimérisation de la chimiokine est permise par la séparation de deux hexasaccharides NS par au moins sept unités disaccharidiques NA (Spillmann *et al.*, 1998).

Un exemple bien connu de motif comprenant une séquence « signature » retrouvée dans l'héparine et les HS produits par les cellules endothéliales est le motif d'interaction avec l'AT-III. Cette protéine reconnaît le disaccharide [GlcUA-GlcNS3S^{+/-}6S] à l'intérieur de la

séquence pentasaccharidique [GlcNS/Ac6S-GlcUA-GlcNS3S^{+/-}6S-IdoUA2S-GlcNS6S]. En se fixant à l'AT-III, le pentasaccharide favorise l'inactivation de la thrombine et d'autres facteurs de la cascade de coagulation (Hook *et al.*, 1976; Rosenberg *et al.*, 1978; Lindahl *et al.*, 1979; 1980; Casu *et al.*, 1981; Atha *et al.*, 1984; Petitou *et al.*, 2003). Un exemple plus récent de motif héparanique comportant une modification rare est la séquence permettant la fixation de la glycoprotéine gD de l'herpès-virus et par conséquent l'infection virale de la cellule cible (Shukla *et al.*, 1999). La glycoprotéine gD reconnaît un octasaccharide comportant l'unité disaccharidique [IdoUA2S-GlcNH₂3S^{+/-}6S] (Liu *et al.*, 2002). Parfois, certains groupements peuvent être nécessaires à l'activité biologique d'une HBP, sans être pour autant indispensable à sa fixation. Ainsi, dans le cas du FGF-2, les groupements 6-*O*-sulfates ne sont pas nécessaires à la fixation du facteur de croissance. En revanche, leur présence est essentielle à l'activité mitogène du FGF-2, suggérant que les groupements 6-*O*-sulfates sont impliqués dans l'interaction avec le récepteur protéique du FGF-2 (Pye *et al.*, 1998).

La détermination des motifs de fixation des HBPs représente un enjeu dans le traitement de certaines maladies. En effet, la connaissance de la structure fine des motifs de fixation de certaines HBPs pourrait permettre la synthèse de dérivés hépariniques, sans pouvoir anticoagulant, qui serviraient d'antagonistes de fixation sur les protéoglycanes (Spillmann, 2001). Ces antagonistes pourraient servir dans de nouvelles thérapies biologiques dans la lutte contre les maladies inflammatoires chroniques, le cancer et les infections virales. Par exemple, la synthèse chimique de motifs hépariniques a montré que les interactions de l'IFN γ avec les HS et son récepteur cellulaire sont inhibées *in vitro* par un composé synthétique (2O₁₀). Ce composé, formé de deux octasaccharides reliés par un bras de dix unités de polyéthylène glycol, module les réponses biologiques induites par l'IFN γ . L'utilisation thérapeutique de ce composé pourrait donc être envisagée pour le traitement de pathologies où l'IFN γ joue un rôle central (Sarrazin *et al.*, 2005).

CHAPITRE III

Métabolisme des héparanes sulfates

A – Biosynthèse des héparanes sulfates

Contrairement aux autres GAGs, les HS montrent une grande hétérogénéité structurale qui conduit à l'apparition de motifs reconnus par les HBPs. En effet, comme nous l'avons détaillé dans le chapitre précédent, les HSPGs interagissent *via* leurs chaînes HS avec de nombreux ligands protéiques et sont ainsi impliqués dans des processus biologiques variés, autant physiologiques que pathologiques. Les motifs de fixation pour les HBPs apparaissent au cours de la biosynthèse des HS et il est désormais évident que la régulation fine de ce mécanisme est à l'origine de la diversité structurale des sites de fixation spécifiques (Lindahl *et al.*, 1998; Esko & Lindahl, 2001; Capila & Linhardt, 2002; Kreuger *et al.*, 2006; Ori *et al.*, 2008; Lindahl & Li, 2009).

A.1. Schéma général

La formation des chaînes HS est un processus golgien qui comprend trois phases distinctes : l'initiation, l'élongation et la maturation de la chaîne polysaccharidique. Ces différentes étapes font intervenir un grand nombre d'enzymes impliquées dans la formation du polymère (*i.e.* glycosyltransférases) et dans la modification du précurseur polysaccharidique ainsi formé (*i.e.* sulfotransférases et épimérase) (Figure 16) (Esko & Lindahl, 2001; Esko & Selleck, 2002).

A.1.1. L'initiation

La synthèse des HS est initiée après la traduction du « core » protéique par le transfert d'un résidu de xylose, à partir de l'UDP-xylose, sur un résidu spécifique de sérine. Chez les vertébrés, deux xylosyltransférases (XylT-I et XylT-II) ont été clonées et caractérisées (Gotting *et al.*, 2000; Kuhn *et al.*, 2001; Ponighaus *et al.*, 2007; Voglmeir *et al.*, 2007).

Les sites d'attachement pour les GAGs sur le « core » protéique ont largement été étudiés. En général, ils consistent en un dipeptide Ser-Gly entouré d'un ou plusieurs résidus d'acide aminé acides (Mann *et al.*, 1990; Zhang & Esko, 1994; Esko & Zhang, 1996). La substitution d'un site consensus particulier varie considérablement d'un « core » protéique à un autre. Il est suggéré que cette variabilité soit le résultat de déterminants structuraux qui peuvent bloquer l'action des xylosyltransférases. En effet, les résidus de sérine peuvent être phosphorylés, acylés ou glycosylés (Esko & Selleck, 2002).

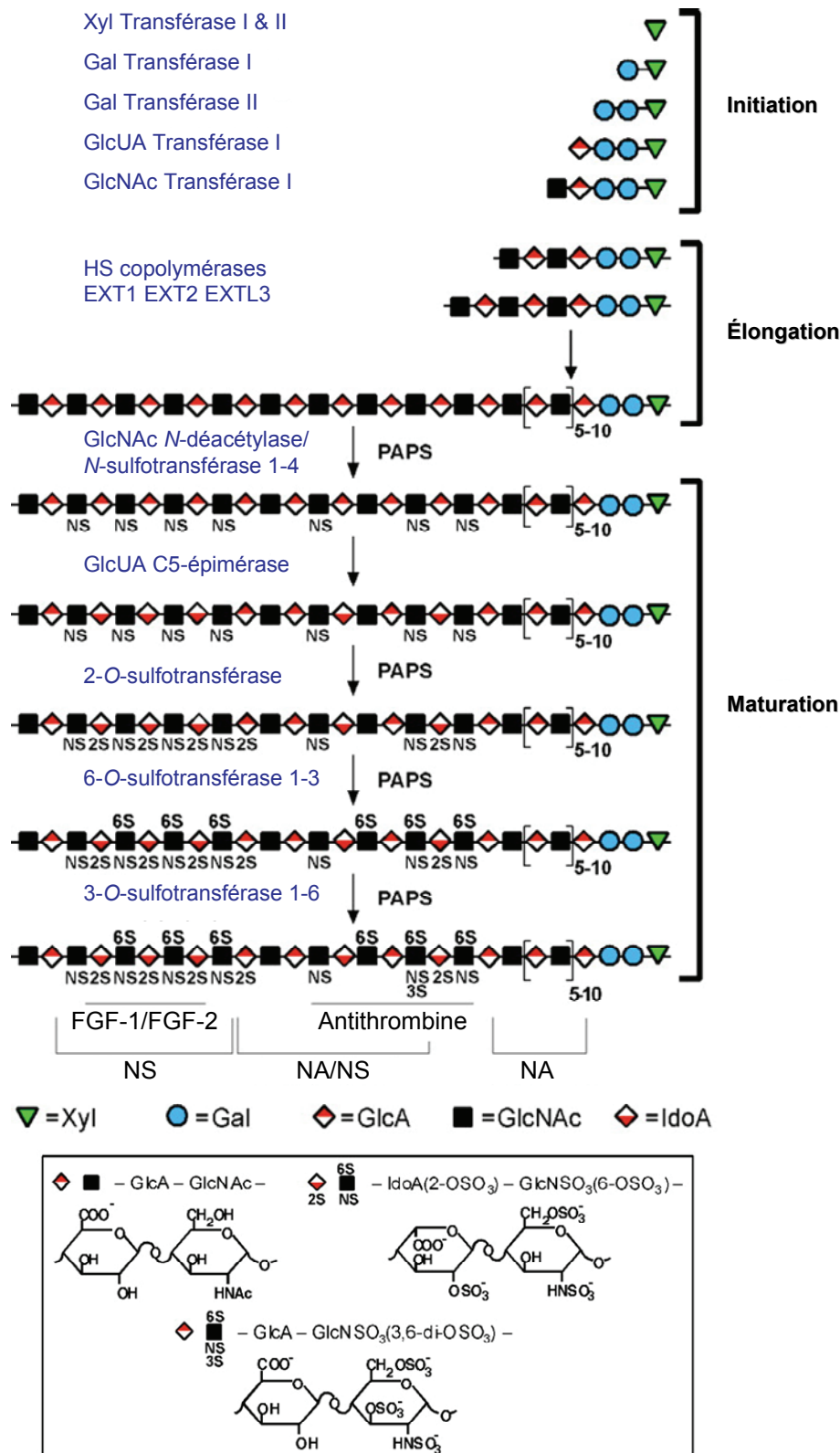


Figure 16 : Biosynthèse des héparanes sulfates. Chaque monosaccharide est représenté par un symbole géométrique décrit dans la légende. Les domaines structuraux (NA, NA/NS, NS) ainsi que les régions impliquées dans la fixation de ligands spécifiques sont précisés. Les familles des enzymes impliquées dans la biosynthèse des HS sont indiquées et seront décrites plus en détail dans la partie A.2 (d'après Esko & Lindahl, 2001).

L'ajout de deux résidus de galactose par les galactosyltransférases I et II (GalT-I et GalT-II) et d'un résidu de GlcUA par la glucuronosyltransférase I (GlcAT-I) complète la formation du lien tétrasaccharidique $\text{GlcUA}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Xyl}\beta 1-O\text{-[Ser]}$, commun aux galactosaminoglycanes (CS et DS) et aux glucosaminoglycanes (Figure 17) (HS et héparine) (Kitagawa *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 1999; Bai *et al.*, 2001).

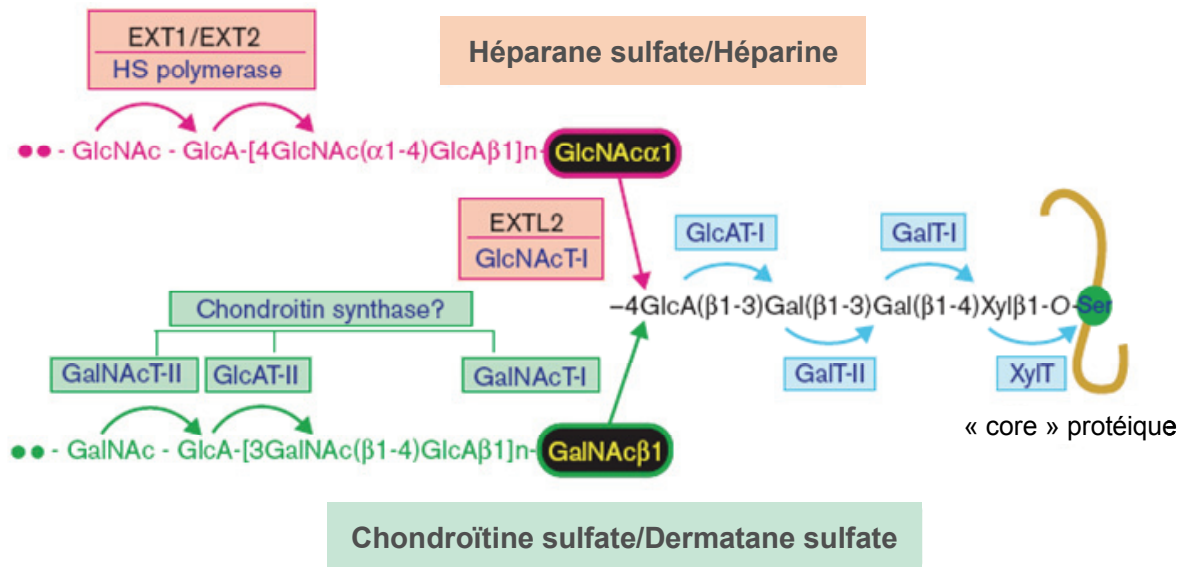


Figure 17 : Biosynthèse des glucosaminoglycanes (HS et héparine) et des galactosaminoglycanes (CS et DS). Les GAGs sulfatés sont liés sur un résidu de sérine spécifique du « core » protéique *via* un lien tétrasaccharidique, $\text{GlcUA}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Xyl}\beta 1-O\text{-Ser}$. La synthèse du tétrasaccharide est initiée par l'addition d'un résidu de xylose sur la sérine ; elle est suivie par l'addition de deux résidus de galactose et d'un résidu d'acide glucuronique. Chaque réaction est catalysée par une glycosyltransférase spécifique (xylosyltransférase [XylT], galactosyltransférase I et II [GalT-I, GalT-II] et glucuronosyltransférase I [GlcAT-I], respectivement). Les chaînes HS/héparine sont synthétisées une fois le premier résidu de GlcNAc transféré par la GlcNAc transférase I (GlcNAcT-I/EXTL2), alors que les CS/DS sont formés suite à l'ajout du résidu de GalNAc par la GalNAc transférase I (GalNAcT-I) (modifiée à partir de Sugahara & Kitagawa, 2000).

Le lien tétrasaccharidique peut être modifié par sulfatation et phosphorylation (Fransson *et al.*, 2000; Sugahara & Kitagawa, 2000). Curieusement, l'étude structurale des liens tétrasaccharidiques portés par le syndécan-1, un protéoglycane hybride qui porte à la fois des chaînes CS/DS et HS, a montré que seuls les CS/DS possèdent des résidus de galactose 4-*O*-sulfatés ou 6-*O*-sulfatés (Ueno *et al.*, 2001). Les groupements sulfates portés par les résidus de galactose pourraient donc bloquer la formation des chaînes HS en faveur de celle des CS/DS. La 2-*O*-phosphorylation des résidus de xylose a, quant à elle, été décrite pour les CS/DS et HS de diverses espèces et semble affecter le transfert des résidus de galactose et de GlcUA (Fransson *et al.*, 1985; Shibata *et al.*, 1992; Sugahara *et al.*, 1992a; 1992b; Moses *et*

al., 1997; Ueno *et al.*, 2001). Les expériences *in vitro* montrent que la 2-*O*-phosphorylation des résidus de xylose bloque l'activité de la GalT-I mais favorise celle de la GlcAT-I (Gulberti *et al.*, 2005; Tone *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation des résidus de xylose prend place après le transfert du premier résidu de galactose et avant celui du résidu d'acide glucuronique. Plus récemment, la protéine FAM20B a été identifiée comme étant la kinase impliquée dans cette phosphorylation (Koike *et al.*, 2009). La surexpression de cette protéine dans des cellules Hela augmente la quantité de chaînes HS et CS produites par ces cellules, ce qui suggère que la 2-*O*-phosphorylation des résidus de xylose pourrait être impliquée dans la régulation du nombre de chaînes de GAG présentes à la surface cellulaire.

A.1.2. L'élongation

Les voies respectives de biosynthèse des HS et des CS/DS divergent après la formation du lien tétrasaccharidique. L'addition d'un résidu de GlcNAc en α 1-4 ou d'un résidu de GalNAc en β 1-4, catalysée par les *N*-acétylglucosaminyltransférase I (GlcNAcT-I) et *N*-acétylgalactosaminyltransférase I (GalNAcT-I), dirige vers les voies de biosynthèse des HS et des CS/DS, respectivement (Figure 17) (Rohrmann *et al.*, 1985; Fritz *et al.*, 1994). Le mécanisme qui détermine la synthèse de l'une ou l'autre des familles reste obscur. En plus de la sulfatation des résidus de galactose, il semblerait que l'activité des deux transférases soit dépendante de séquences protéiques particulières localisées à proximité du site d'insertion des GAGs (Sugahara & Kitagawa, 2000).

Après l'attachement du premier résidu de GlcNAc, la formation des chaînes HS s'effectue par additions successives de résidus de GlcUA en β 1-4 et de GlcNAc en α 1-4. La polymérisation est catalysée par les EXTs (*Exostosins*), une famille de gènes suppresseurs de tumeur. En effet, un dysfonctionnement de ces gènes est responsable de l'HME (*Hereditary Multiple Exostoses*), une maladie autosomale dominante caractérisée par des excroissances osseuses (Duncan *et al.*, 2001; Zak *et al.*, 2002). Cinq membres de la famille des EXTs ont été décrits (EXT1, EXT2, EXTL1, EXTL2, EXTL3). EXT1 et EXT2 possèdent les deux activités enzymatiques, *N*-acétylglucosaminyltransférase (GlcNAcT-II) et glucuronosyltransférase (GlcAT-II). Même si, *in vitro*, EXT1 est capable de polymériser seul le polysaccharide, il a été démontré que les deux isoenzymes sont nécessaires à l'élongation de la chaîne HS (Busse & Kusche-Gullberg, 2003; Kim *et al.*, 2003). La comparaison des séquences protéiques des différentes EXTs et les études réalisées par mutagenèse dirigée suggèrent que les enzymes EXT1 et EXT2 portent deux domaines catalytiques : un domaine C-terminal responsable de

l'activité GlcNAc transférase et un domaine N-terminal portant l'activité GlcUA transférase (Wei *et al.*, 2000; Cheung *et al.*, 2001). L'ensemble des EXTLs possèdent une activité GlcNAc transférase. EXTL1 ajoute des résidus de GlcNAc sur l'extrémité non réductrice du polysaccharide grandissant (activité GlcNAcT-II), EXTL3 catalyse l'ajout de résidus de GlcNAc sur le lien tétrasaccharidique (activité GlcNAcT-I) et sur la chaîne naissante (activité GlcNAcT-II), et EXTL2 exhibe une activité GlcNAcT-I (Kitagawa *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001). Alors que le rôle biologique de EXTL1 et EXTL2 dans la biosynthèse des HS n'a pas encore été démontré, il est désormais clairement établi que EXT1, EXT2 et EXTL3 participe à l'élongation de la chaîne HS (Busse *et al.*, 2007).

La longueur des chaînes, qui varie entre 40 et 160 disaccharides, dépend du type cellulaire (Esko & Selleck, 2002). Le processus de terminaison reste à l'heure actuelle encore mal connu, la chaîne peut se terminer soit par un résidu de GlcUA, soit par un résidu de GlcNAc.

Plusieurs évidences suggèrent que la formation du polymère et la modification de ce dernier ont lieu simultanément. En effet, il a été montré que l'ajout de 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS), le donneur de sulfate universel, dans des microsomes stimule la polymérisation des HS, ce qui suggère que la polymérisation et la sulfatation sont couplées (Lidholt *et al.*, 1989). De plus, Lidholt & Lindahl (1992) ont montré que l'activité GlcUA transférase possède une préférence marquée pour la séquence terminale GlcNAc-GlcUA-GlcNS, alors que le transfert de GlcNAc est indépendant du profil de *N*-substitution de l'accepteur.

A.1.3. La maturation

La maturation des HS est un processus complexe au cours duquel le polymère précurseur non sulfaté, formé par la répétition du disaccharide [GlcUA-GlcNAc]_n, subit une série de modifications séquentielles, au cours desquelles la modification enzymatique apportée à une étape sert de substrat à la réaction suivante (Esko & Selleck, 2002; Kusche-Gullberg & Kjellen, 2003). La maturation du polymère comprend cinq étapes : (a) une *N*-déacétylation suivie d'une *N*-sulfatation de certains résidus de GlcNAc, (b) la formation de résidus de IdoUA par C₅-épimérisation des résidus de GlcUA localisés à l'extrémité réductrice d'unités GlcNS, (c) la 2-*O*-sulfatation partielle des résidus de IdoUA formés et occasionnellement de résidus de GlcUA, (d) l'addition de groupements 6-*O*-sulfates et (e)

enfin plus rarement de groupements 3-*O*-sulfates sur certaines glucosamines (Lindahl *et al.*, 1998; Esko & Lindahl, 2001; Lindahl & Li, 2009).

La maturation des HS est orchestrée par une C₅-épipimérase et quatre classes de sulfotransférases (les *N*-déacétylase/*N*-sulfotransférases et les 2-*O*-, 6-*O*- et 3-*O*-sulfotransférases) qui catalysent le transfert de groupements sulfates à partir du donneur de sulfate universel, le PAPS, sur le polysaccharide grandissant. L'ensemble de ces enzymes ont été purifiées et clonées. Alors qu'il n'existe qu'une forme de 2-*O*-sulfotransférase (2-OST) et une C₅-épipimérase, quatre *N*-déacétylase/*N*-sulfotransférases (NDSTs), trois 6-*O*-sulfotransférases (6-OSTs) et sept 3-*O*-sulfotransférases (3-OSTs) ont été caractérisées. Peu d'informations sont connues au sujet des domaines catalytiques et de la concentration relative de chaque enzyme ; toutefois, l'ordre des réactions, la spécificité des enzymes et leur profil d'expression ont largement été étudiés. Ces enzymes, dont l'expression est dépendante du type cellulaire, possèdent des activités et des spécificités de substrats différentes, ce qui confère une grande hétérogénéité structurale aux HS et offre ainsi un large éventail de motifs de fixation pour les ligands protéiques (Habuchi, 2000; Sasisekharan & Venkataraman, 2000; Kusche-Gullberg & Kjellen, 2003).

A.2. Les enzymes de maturation

A.2.1. Les glucosaminyl *N*-déacétylase/*N*-sulfotransférases

La sulfatation du polymère précurseur est initiée par une *N*-déacétylation suivie d'une *N*-sulfatation de certains résidus de GlcNAc. Ces deux réactions sont catalysées par une classe d'enzymes bifonctionnelles, les *N*-déacétylase/*N*-sulfotransférases. Il s'agit de la première réaction impliquée dans la modification du polysaccharide et elle constitue un prérequis nécessaire pour les réactions suivantes. La *N*-sulfatation est spécifique des HS, elle n'est retrouvée ni chez les CS/DS ni chez les KS (Grobe *et al.*, 2002; Kjellen, 2003).

a) Structure

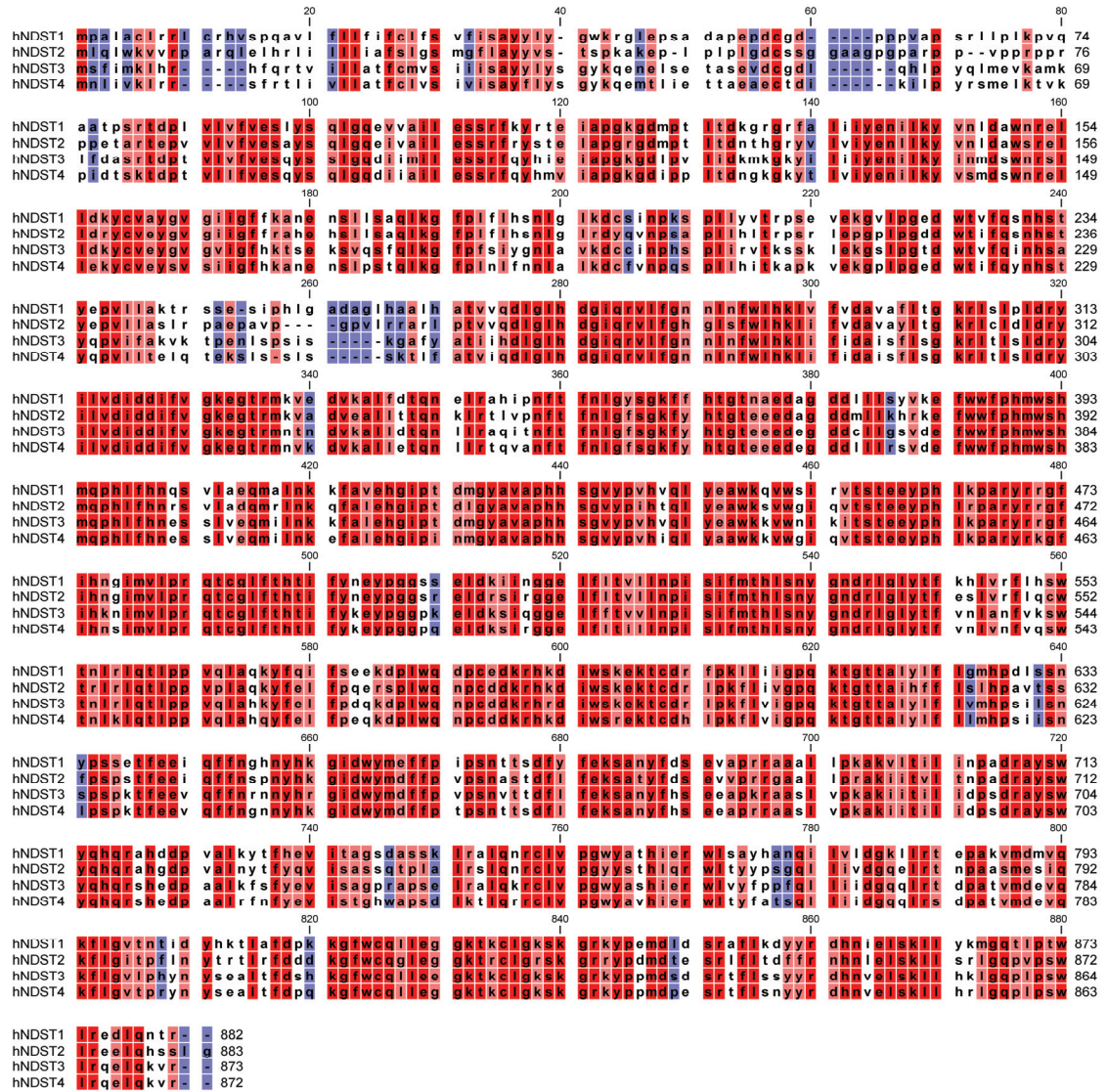
Chez les vertébrés, quatre NDSTs (NDST1 à NDST4) ont été purifiées, clonées et caractérisées (Tableau 2) (Brandan & Hirschberg, 1988; Pettersson *et al.*, 1991; Hashimoto *et al.*, 1992; Eriksson *et al.*, 1994; Orellana *et al.*, 1994; Aikawa & Esko, 1999; Aikawa *et al.*, 2001).

Tableau 2 : Les différentes N-déacétylase/N-sulfotransférases.

Gène			
	Localisation chromosomique	Organisation génomique	Taille du cDNA
<i>Ndst1</i>	5q33.1	15 exons	8030 pb (CDS : 2646 pb)
<i>Ndst2</i>	10q22	15 exons	4006 pb (CDS : 2649 pb)
<i>Ndst3</i>	4q26	14 exons	5961 pb (CDS : 2619 pb)
<i>Ndst4</i>	4q25-q26	14 exons	3359 pb (CDS : 2616 pb)
Protéine			
	Nombre d'acides aminés	Masse moléculaire (Da)	
NDST1	882	100 868	
NDST2	883	100 874	
NDST3	873	100 825	
NDST4	872	100 715	

Les quatre membres de cette famille de protéines sont codés par des gènes distincts qui présentent une organisation intron-exon identique (Gladwin *et al.*, 1996; Humphries *et al.*, 1997; 1998; Aikawa & Esko, 1999; Aikawa *et al.*, 2001). La similarité des séquences protéiques et la localisation contigüe des gènes codant pour la NDST3 et la NDST4 suggèrent que les NDSTs ont évolué à partir d'un même gène ancestral. La comparaison des séquences des NDST1 et NDST2 révèle que les deux isoenzymes possèdent 70 % de similarité et portent également des séquences à 90 % identiques (Humphries *et al.*, 1998). La NDST3 possèdent 86 % et 82 % de similarité avec les NDST1 et NDST2, respectivement ; tandis que la NDST4 possèdent 70 %, 66 % et 80 % d'identité avec les NDST1, NDST2 et NDST3 (Figure 18) (Aikawa & Esko, 1999; Aikawa *et al.*, 2001). L'ensemble des NDSTs possèdent également plusieurs régions conservées qui seraient impliquées dans la fixation des substrats et la catalyse.

A



B

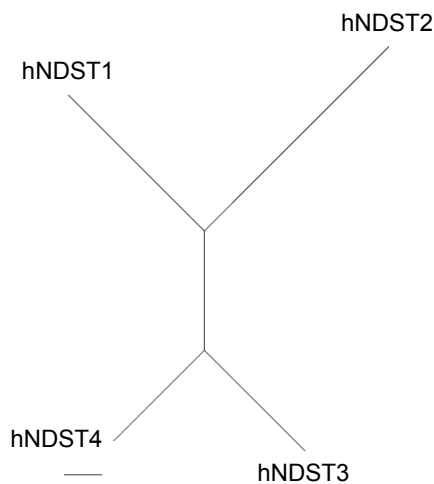


Figure 18 : Comparaison des séquences protéiques des différents NDSTs humaines. (A)

Alignement multiple des NDSTs humaines. Les séquences en acides aminés sont alignées entre elles. Un dégradé de couleur variant du rouge au bleu est utilisé pour mettre en évidence l'homologie de séquence (Rouge : acide aminé identique ; Bleu : acide aminé différent). **(B)** Arbre phylogénétique des NDSTs humaines. La distance entre les isoenzymes est proportionnelle au nombre de résidus d'acide aminé différents.

Comme l'ont démontré Humphries *et al.* (1997) et Pinhal *et al.* (2001), les NDSTs sont des protéines résidentes de l'appareil de golgi. Elles possèdent toutes une topologie similaire à celle décrite pour les glycosyltransférases impliquées dans la synthèse des glycoprotéines et des glycolipides (Paulson & Colley, 1989; Humphries *et al.*, 1997; Pinhal *et al.*, 2001). Ce sont des protéines transmembranaires de type II qui possèdent une courte région cytoplasmique N-terminale (12 à 18 acides aminés), une région transmembranaire et une région « tige » d'environ 40 acides aminés, suivie d'une région catalytique luminale globulaire. L'utilisation de protéines golgiennes chimériques ou mutées a révélé que les régions transmembranaire et « tige » sont requises pour la localisation et la rétention golgienne (Russo *et al.*, 1992; Teasdale *et al.*, 1992; Wong *et al.*, 1992; Machamer, 1993; Nilsson & Warren, 1994). Ce résultat a été confirmé pour la NDST1 puisque l'utilisation d'une forme tronquée dépourvue de l'extrémité C-terminale globulaire n'affecte en rien sa localisation golgienne (Humphries *et al.*, 1997). Les séquences en acides aminés des régions concernées sont peu conservées, ce qui laisse présager que les isoenzymes peuvent occuper des compartiments différents du complexe golgien.

Les études concernant l'activité catalytique des différentes NDSTs ont mis en évidence que ces enzymes monomériques portent deux sites actifs indépendants, responsables de la *N*-déacétylation et de la *N*-sulfatation, ce qui font d'elles des enzymes bifonctionnelles (Wei *et al.*, 1993; Eriksson *et al.*, 1994; Mandon *et al.*, 1994; Orellana *et al.*, 1994; Aikawa & Esko, 1999; Aikawa *et al.*, 2001; Bengtsson *et al.*, 2003). Aussi, l'expression recombinante des NDSTs sous forme tronquée a permis de démontrer que l'activité *N*-sulfotransférase est portée par la partie C-terminale de la région catalytique, tandis que le domaine N-terminal possède l'activité *N*-déacétylase (Berninson & Hirschberg, 1998; Duncan *et al.*, 2006).

Alors qu'à ce jour la structure de la région responsable de l'activité *N*-déacétylase n'a toujours pas été étudiée, le domaine *N*-sulfotransférase de la NDST1 humaine a été cristallisé en complexe avec le PAP (*3'*-phosphoadenosine *5'*-phosphate) (Figure 19) (Kakuta *et al.*, 1999). Ce domaine possède une structure sphérique présentant un sillon ouvert. Il est composé de cinq brins β parallèles (β 1, β 2, β 3, β 4 et β 5) reliés entre eux par des hélices α . L'extrémité C-terminale est formée par trois brins β antiparallèles (β 6, β 7 et β 8) et est stabilisée par un pont disulfure. La comparaison des séquences protéiques d'un grand nombre de sulfotransférases suggère que le domaine *N*-sulfotransférase des NDSTs porte deux sites de fixation pour le PAPS, nommés 5'PSB (*5'*-phosphosulfate Binding Motif) et 3'PB (*3'*-phosphate Binding Motif) (Kakuta *et al.*, 1997; 1998). Ces sites de fixation seraient portés par les régions structurales α 1, α 6, β 1 et β 7, tandis que l'hélice α 6 et la boucle entre les domaines

$\beta 2$ et $\alpha 2$ formerait le sillon ouvert dont l'ouverture est assez large pour contenir un hexasaccharide (Kakuta *et al.*, 1999). Le résidu de Lys-614 de la NDST1 est connu pour être conservé dans d'autres glucosaminyl sulfotransférases. Bien que ce résidu joue un rôle critique dans l'activité de la NDST1, la base structurale de son implication dans la catalyse reste à découvrir (Sueyoshi *et al.*, 1998). Par mutagenèse dirigée, certains résidus d'acide aminé impliqués dans la fixation du polysaccharide ont été identifiés, il s'agit des résidus Phe-640, Glu-641, Glu-642, Ile-643, Gln-644 et Asn-647 (Kakuta *et al.*, 2003).

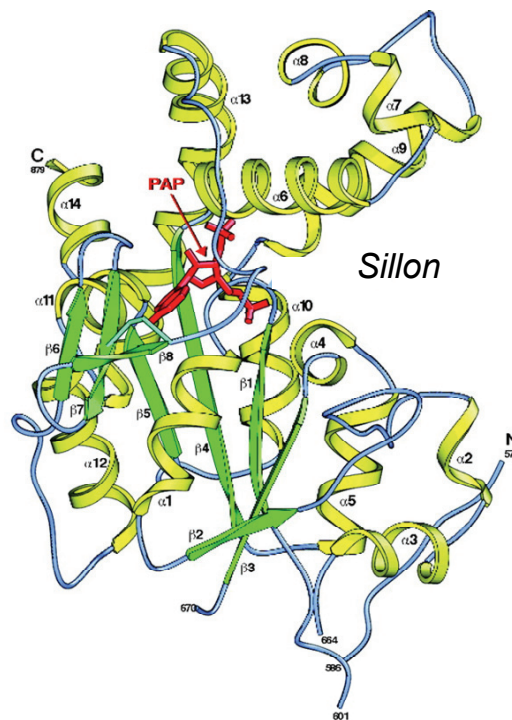


Figure 19 : Représentation de la structure cristalline de la NDST1 en complexe avec le PAP. Les hélices α sont représentées en jaune, les brins β en vert et les boucles en bleu. Le PAP est schématisé en rouge (d'après Kakuta *et al.*, 1999).

En utilisant cette structure cristalline, les domaines *N*-sulfotransférases de l'ensemble des isoenzymes humaines et murines ont été modélisés. De façon intéressante, le profil des charges de surface et la forme du domaine catalytique diffèrent d'une isoforme à l'autre, mais se révèlent être conservés entre les espèces, ce qui suggère des spécificités de substrat différentes (Aikawa *et al.*, 2001).

b) Activités

L'importance des NDSTs dans la maturation des HS a, dans un premier temps, été démontrée grâce à l'utilisation d'une lignée cellulaire déficiente en NDST1. En effet, les premières études ont montré que les cellules CHO *pgsE-606* produisent des HS faiblement *N*- et *O*-sulfatés (Bame & Esko, 1989; Bame *et al.*, 1991; Ishihara *et al.*, 1992; Bame *et al.*, 1994; Aikawa & Esko, 1999). Ces résultats démontrent que le degré de *N*-sulfatation détermine la teneur en *O*-sulfatation et que, par conséquent, la *N*-déacétylation/*N*-sulfatation des résidus de GlcNAc, catalysée par les NDSTs, constitue l'étape critique de la maturation.

Bien que l'ensemble des NDSTs présentent une activité catalytique *in vitro*, de nombreuses données suggèrent qu'elles ne sont probablement pas redondantes. En effet, les cellules HEK293 surexprimant la NDST1 ou la NDST2 synthétisent des HS aux profils de sulfatation différents (Cheung *et al.*, 1996; Pikas *et al.*, 2000). Bien qu'une augmentation de la *N*-sulfatation soit observée dans les deux cas, les cellules stablement transfectées par la NDST2 produisent des HS présentant un taux de *N*-sulfatation plus élevé et des domaines NS plus étendus que ceux purifiés à partir des cellules transfectées par la NDST1. Ces résultats suggèrent que le niveau d'expression ainsi que les propriétés spécifiques propres à chaque NDST semblent déterminer le profil de *N*-sulfatation des HS (Pikas *et al.*, 2000).

Ces observations ont été confirmées par des expériences d'inactivation génique réalisées chez la souris qui mettent clairement en évidence la contribution spécifique de chaque isoenzyme dans la biosynthèse des HS. En effet, alors que l'inactivation d'expression de la NDST1 engendre une létalité néonatale des souris, expliquée par une diminution globale de la sulfatation des chaînes HS (Fan *et al.*, 2000; Ringvall *et al.*, 2000; Ledin *et al.*, 2004; Grobe *et al.*, 2005), les souris invalidées pour la NDST2 sont viables, fertiles et expriment des chaînes HS sulfatées. Les souris *Ndst2*^{-/-} expriment un phénotype restreint aux mastocytes qui sont réduits en nombre et possèdent des granules défectueuses, conséquence d'un défaut de sulfatation de l'héparine (Forsberg *et al.*, 1999; Humphries *et al.*, 1999; Tchougounova & Pejler, 2001; Henningson *et al.*, 2002; Ledin *et al.*, 2004). Ces différents phénotypes suggèrent que la NDST1 serait requise pour la *N*-sulfatation partielle et permettrait l'initiation des autres étapes de maturation, tandis que le rôle de la NDST2 serait de compléter et d'étendre les sections *N*-sulfatées de l'héparine et des HS hautement sulfatés.

La comparaison des propriétés enzymatiques des quatre isoformes ont montré des différences surprenantes dans le ratio des activités *N*-déacétylase et *N*-sulfotransférase (Aikawa *et al.*, 2001). Alors que la NDST3 montre une haute activité *N*-déacétylase et une

très faible activité *N*-sulfotransférase, le rapport inverse est observé pour la NDST4. Les ratios pour les NDST1 et NDST2 sont moins remarquables, elles présentent toutes deux des activités *N*-sulfotransférase et *N*-déacétylase élevées et similaires.

Les glucosamines *N*-non substituées sont rares (0,7 à 4 %) et on a longtemps pensé qu'il s'agissait d'artéfacts expérimentaux reflétant la perte de groupements *N*-sulfates lors de la préparation des HS (Hook *et al.*, 1982). Toutefois, la présence de ces résidus dans les tissus natifs a désormais clairement été démontrée (Norgard-Sumnicht & Varki, 1995; van den Born *et al.*, 1995; Toida *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 2001; Westling & Lindahl, 2002). Le mécanisme de formation des GlcNH₂ durant la biosynthèse reste encore à découvrir mais l'intervention d'une déacétylase ou d'une endo-sulfamidase peut être envisagée. A ce jour, aucune des deux enzymes n'a été identifiée. En revanche, la NDST3 semble être un bon candidat. Il est probable que la NDST3, avec sa haute activité *N*-déacétylase, joue un rôle dans la génération de ces résidus particuliers de glucosamine (Westling & Lindahl, 2002). L'invalidation d'expression de la NDST3 chez la souris n'affecte ni le développement ni la physiologie des mutants et la structure des HS n'est que faiblement modifiée (Pallerla *et al.*, 2008). Alors que cette invalidation n'a pas permis de conclure quant au rôle de la NDST3 dans la génération des GlcNH₂, Holmborn *et al.* (2004) ont montré de façon indirecte que cette isoenzyme n'est pas impliquée dans la *N*-sulfatation des HS, mais pourrait agir en tant que déacétylase. En effet, des cellules souches embryonnaire de souris *Ndst1*^{-/-}/*Ndst2*^{-/-} présentent une inhibition totale de la *N*-sulfatation, alors que le taux de GlcNH₂ reste inchangé (Holmborn *et al.*, 2004).

c) Régulation de l'expression

▪ Contrôle transcriptionnel

Très peu d'informations sont disponibles sur la régulation transcriptionnelle des NDSTs. Toutefois, les études réalisées par Northern Blot et RT-PCR démontrent que leur expression est dépendante du type cellulaire et du stade de développement. Les transcrits codant pour la NDST1 et la NDST2 sont largement exprimés par l'ensemble des tissus adultes et embryonnaires (Humphries *et al.*, 1997; 1998; Kusche-Gullberg *et al.*, 1998; Toma *et al.*, 1998; Aikawa & Esko, 1999; Aikawa *et al.*, 2001; Yabe *et al.*, 2005; Pallerla *et al.*, 2008). A l'inverse, la NDST3 et la NDST4 possèdent des profils d'expression plus restreints. La NDST3 est fortement exprimée dans le cerveau adulte et les tissus embryonnaires, mais on la retrouve également dans une moindre mesure dans d'autres tissus adultes comme le rein, le cœur ou le foie (Aikawa & Esko, 1999; Aikawa *et al.*, 2001; Yabe *et al.*, 2005; Pallerla *et al.*,

2008). Comparée aux autres NDSTs, la NDST4 possède un niveau d'expression très modeste. En effet, on ne retrouve qu'une faible quantité de NDST4 dans le cerveau adulte et les tissus embryonnaires (Aikawa *et al.*, 2001; Yabe *et al.*, 2005; Pallerla *et al.*, 2008). Les invalidations réalisées chez la souris ont démontré qu'il n'existe pas de compensation transcriptionnelle entre les différentes isoformes. Effectivement, l'absence des NDST1 ou NDST2 dans les souris invalidées n'affecte d'aucune façon l'expression des autres isoformes (Ledin *et al.*, 2006).

Quelques études ont mis en évidence des variations d'expression de certaines NDSTs dans plusieurs pathologies telles que le cancer, le diabète ou encore l'inflammation. Ainsi, dans des cellules endothéliales exprimant stablement le proto-oncogène *ras*, la décroissance du taux de *O*-sulfatation des HS a été corrélée à la diminution du niveau d'expression des transcrits de certaines enzymes de maturation, telles que la NDST1 (Lopes *et al.*, 2006b). Le diabète étant également une pathologie au cours de laquelle une réduction notable du taux de *O*-sulfatation des HS est observée (Kjellen *et al.*, 1983), l'implication des NDSTs dans cette pathologie a été étudiée à l'aide de modèles cellulaires et animaux. La culture d'adipocytes ou de fibroblastes en présence de concentrations élevées en glucose n'a pas d'effet sur l'expression des transcrits codant pour la NDST1 ni sur la *N*-sulfatation des HS (Parthasarathy *et al.*, 2000; Yard *et al.*, 2002). Une diminution de 50 % du taux d'expression de la NDST1 est toutefois observée *in vitro* dans des cellules vasculaires de muscle lisse cultivées dans un milieu riche en glucose (Fukuda *et al.*, 1997), ce qui suggère une régulation différentielle *in vitro* dépendante du type cellulaire. Ce dernier résultat a été confirmé *in vivo* puisque, deux semaines après l'induction d'un diabète de type I chez le rat, le taux de transcrits codant pour la NDST1 est réduit de moitié (Williams *et al.*, 2005). La réponse inflammatoire s'accompagne d'un remodelage structural des chaînes HS portées à la surface cellulaire. A l'aide de plusieurs modèles utilisant divers types cellulaires et stimuli inflammatoires, différents travaux ont corrélé ces modifications structurales aux variations d'expression des sulfotransférases et notamment des NDSTs. Ainsi, chez la souris, suite à une lésion vasculaire, la NDST1 voit son taux de transcrits augmenter d'un facteur 40 (Adhikari *et al.*, 2008). La culture d'astrocytes en présence de TGF- β inhibe fortement l'expression des NDST1, NDST2 et NDST3, tandis que le TGF- α possède un effet moins marqué en inhibant l'expression de la NDST3 de 50 % (Properzi *et al.*, 2008). Suite à la stimulation par le TNF- α de cellules endothéliales HMVEC, seule l'expression de la NDST3 est affectée, son taux d'expression étant réduit d'un facteur 7. La stimulation de ces mêmes cellules par le LPS n'a qu'un léger effet sur l'expression des NDSTs, le taux d'expression de la NDST1 est augmenté

d'un facteur 2,5, alors que la NDST2 et la NDST3 voient leur expression diminuer d'un facteur 1,5 et 3,5, respectivement (Krenn *et al.*, 2008). L'utilisation d'une autre lignée cellulaire endothéliale, la lignée HMEC-1, aboutit à des résultats différents puisque dans cette étude la culture de ces cellules en présence de TNF- α ou de IFN γ induit une augmentation du taux d'expression de la NDST1 et de la NDST2 (Carter *et al.*, 2003). Par conséquent, même si des variations d'expression sont observées pour chaque stimulus inflammatoire, elles semblent dépendre de la nature du stimulus et du modèle utilisé, ce qui indique que le remodelage des chaînes HS au cours de l'inflammation constitue un processus très spécifique.

L'expression abondante de la NDST2 dans les mastocytes peut être expliquée par la présence de deux facteurs de transcription que l'on retrouve principalement dans ces cellules. En effet, Morii *et al.* (2001) ont démontré que les deux facteurs de transcription, MIFT (*mi Transcription Factor*) et GABP (*GA-Binding Protein*) régulent l'expression de la NDST2. Alors qu'en se fixant sur un motif GGAA localisé dans la région promotrice du gène codant pour la NDST2, GABP augmente la transcription de cette dernière, MIFT inhibe l'expression de la NDST2 en perturbant la localisation cellulaire du facteur de transcription GABP (Morii *et al.*, 2001).

▪ Contrôle traductionnel

Une étude concernant les séquences 5'-UTR (*5'-Untranslated Region*) des NDSTs a mis en évidence l'existence d'une régulation traductionnelle (Grobe & Esko, 2002). Les séquences 5'-UTR des messagers sont généralement courtes (50 à 70 nucléotides), contiennent une coiffe en 5', constituée d'une guanine méthylée, et sont dépourvues de structure secondaire (Gray & Wickens, 1998; van der Velden & Thomas, 1999; Cazzola & Skoda, 2000). Ces caractéristiques autorisent une traduction conventionnelle que l'on observe pour la majorité des ARNm eucaryotes et viraux (Kozak, 1999; Pestova *et al.*, 2001). En clonant et en caractérisant les régions 5'-UTR des différentes NDSTs humaines et murines, Grobe & Esko (2002) ont mis en évidence que l'ensemble des NDSTs présentent des séquences 5'-UTR anormalement longues (250 à 720 nucléotides), qui possèdent de nombreuses structures secondaires ainsi que de multiples codons AUG en amont du véritable site d'initiation de la traduction. Ces 5'-UTR complexes ne sont retrouvés que dans 10 % des transcrits qui codent généralement pour des protéines hautement régulées telles que les proto-oncogènes, les facteurs de croissance et leurs récepteurs (van der Velden & Thomas, 1999; Willis, 1999). Ainsi, il a été montré que les séquences 5'-UTR des NDST1 à 4 sont capables

de réguler leur traduction *in vivo*, et ce en fonction du type cellulaire et des conditions de culture. Les expériences de traduction *in vitro* et de mutagenèse dirigée suggèrent, quant à elles, la présence de sites IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) dans les régions 5'-UTR des NDST2, NDST3 et NDST4, qui sont décrits pour permettre une traduction indépendante de la coiffe et offrir ainsi un nouveau niveau de contrôle sur l'expression protéique (Grobe & Esko, 2002).

A.2.2. La glucuronyl C₅-épipimérase

L'épipimérisation de certains résidus d'acide D-glucuronique en acide L-iduronique est la seconde modification apportée au cours de la maturation des HS. Elle est catalysée par la glucuronyl C₅-épipimérase qui agit à proximité des glucosamines N-sulfatées. La C₅-épipimérase spécifique des HS n'intervient aucunement dans la biosynthèse des DS pour lesquels une autre épimérase a été décrite (Malmstrom & Aberg, 1982). Cette épimérisation est unique dans la mesure où elle n'a lieu qu'au niveau du polymère sur des résidus déjà incorporés dans la chaîne polysaccharidique (Valla *et al.*, 2001).

a) Structure

Chez les vertébrés, la C₅-épipimérase est représentée par une seule isoforme (Malmstrom *et al.*, 1980; Campbell *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1997; Crawford *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001). Son gène *Hsepi*, localisé sur le chromosome 15 (15q23), est composé de cinq exons et son ADNc de 5043 pb contient un cadre ouvert de lecture de 1851 nucléotides (Crawford *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001).

La C₅-épipimérase (70 kDa) est une protéine transmembranaire de type II. Elle contient un domaine N-terminal de 11 acides aminés, suivi d'un domaine transmembranaire, d'une région « tige » et d'une région globulaire hautement conservée entre les espèces. La surexpression d'une forme marquée de l'enzyme dans des cellules CHO a permis de démontrer sa localisation golgienne (Crawford *et al.*, 2001; Pinhal *et al.*, 2001).

La comparaison des différentes séquences protéiques a mis en évidence que l'enzyme purifiée est dépourvue des 174 résidus d'acide aminé N-terminaux (Campbell *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1997; Crawford *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001). En effet, alors que la forme recombinante est exprimée sous la forme d'un simple polypeptide, l'épipimérase purifiée est constituée de deux fragments qui semblent être générés par clivage protéolytique. Le mécanisme et la fonction de ce clivage restent inconnus, mais il est établi que le peptide clivé reste associé à la

portion catalytique de l'enzyme et n'affecte en rien son activité (Hagner-McWhirter *et al.*, 2000a; 2000b; Li *et al.*, 2001).

b) Activités

La réaction catalysée par la C₅-épipimérase consiste en une élimination/addition d'un proton en position C5 de l'acide hexuronique, qui s'accompagne ou non d'une inversion de configuration. L'épipimérisation nécessite la formation d'un carbanion intermédiaire et s'effectue sans aucune rupture de la chaîne polysaccharidique (Figure 20) (Lindahl *et al.*, 1976; Prihar *et al.*, 1980; Valla *et al.*, 2001).

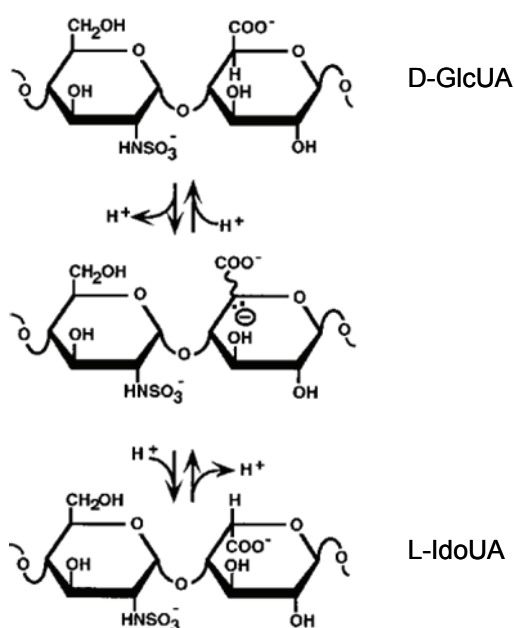


Figure 20 : Mécanisme de la réaction de C₅-épipimérisation. La réaction implique la formation d'un carbanion intermédiaire. Le proton en position C5 de l'acide hexuronique est échangeable avec le milieu, phénomène qui peut s'accompagner d'une inversion de configuration. La séquence du haut illustre l'unité disaccharidique répétitive du polysaccharide K5 N-sulfaté ; la séquence du bas représente le disaccharide majeur de l'héparine O-désulfatée (Hagner-McWhirter *et al.*, 2000b).

In vitro, la réaction est totalement réversible. L'incubation de l'épipimérase avec des substrats polysaccharidiques appropriés (polysaccharide K5 N-sulfaté et héparine O-désulfatée) en présence d'eau tritiée a montré un marquage progressif en position C5 des acides hexuroniques cibles, et ce pour les deux sortes de résidus, GlcUA et IdoUA (Hagner-McWhirter *et al.*, 2000a). Toutefois, l'analyse structurale des HS isolés à partir de cellules HEK293 cultivées en présence de D-[5-³H]Gal, le précurseur de l'UDP-GlcUA, a révélé que

l'ensemble des résidus de GlcUA ont conservé le marquage en position C5, ce qui suggère qu'*in vivo* l'épimérisation est irréversible (Hagner-McWhirter *et al.*, 2004).

La reconnaissance du substrat dépend du profil de *N*-substitution. En effet, l'enzyme agit sur les acides uroniques localisés à l'extrémité réductrice de résidus de glucosamine *N*-sulfatés, ce qui explique pourquoi les résidus de IdoUA sont absents des domaines *N*-acétylés mais sont retrouvés en grand nombre dans les régions *N*-sulfatées et les régions NA/NS (Jacobsson *et al.*, 1979; 1984; Campbell *et al.*, 1994; Maccarana *et al.*, 1996; Hagner-McWhirter *et al.*, 2000a). De plus, il est clairement établi que la *O*-sulfatation inhibe la C₅-épimérisation (Jacobsson *et al.*, 1984; Hagner-McWhirter *et al.*, 2000a; 2004). Cette spécificité démontre que l'épimérisation a lieu après la *N*-déacétylation/*N*-sulfatation et avant que les glucosamines ne soient *O*-sulfatées.

L'invalidation génique de la C₅-épimérase chez la souris engendre des structures héparaniques anormales, complètement dépourvues de résidu de IdoUA et présentant des profils de *O*-sulfatation inhabituels. Ces souris *Hsep1^{-/-}* possèdent de nombreux défauts développementaux et décèdent rapidement après la naissance, ce qui confirme l'importance de la C₅-épimérisation dans la maturation des HS (Li *et al.*, 2003; Ledin *et al.*, 2004). Le même phénotype est observé pour des mastocytes murins *Hsep1^{-/-}* pour lesquels il a été établi que l'héparine qu'ils produisent est totalement dénuée de résidus de IdoUA, démontrant ainsi que la conversion des résidus de GlcUA en IdoUA lors de la biosynthèse de l'héparine est catalysée par la même enzyme que celle décrite pour les HS (Feyerabend *et al.*, 2006).

c) Régulation de l'expression

La C₅-épimérase est une enzyme ubiquitaire que l'on retrouve dans l'ensemble des tissus analysés. Son expression est indépendante du stade de développement puisqu'elle est aussi bien exprimée au cours de l'embryogenèse qu'au stade adulte (Li *et al.*, 2001; Ghiselli & Farber, 2005; Cadwallader & Yost, 2007).

Lors de pathologies comme le cancer ou l'inflammation, son expression est fortement diminuée et s'accompagne d'une modulation de la proportion des résidus de GlcUA et de IdoUA (Lopes *et al.*, 2006b; Grigorieva *et al.*, 2008; Properzi *et al.*, 2008).

A l'heure actuelle, seul Ghiselli & Agrawal (2005) ont étudié le mécanisme de régulation d'expression de la C₅-épimérase. Le clonage et la caractérisation du promoteur humain du gène codant pour cette enzyme leur ont permis l'identification de sites de fixation putatifs pour plusieurs facteurs de transcription. Ils se sont plus particulièrement intéressés à

l'un d'entre eux, le complexe β -caténine/TCF (*T-Cell Factor*) 4, qui a déjà été décrit pour intervenir dans la voie de signalisation dépendante des HS, la voie Wnt (Polakis, 2000). L'expression ectopique de la β -caténine, seul ou avec le facteur TCF4, active l'activité transcriptionnelle du promoteur de la C₅-épimérase, augmente son taux de transcrits, ainsi que son activité enzymatique, ce qui suggère que cette voie est fonctionnelle dans la modulation de l'expression du gène (Ghiselli & Agrawal, 2005).

A.2.3. L'uronosyl 2-O-sulfotransférase

Les uronosyl 2-O-sulfotransférases catalysent le transfert d'un groupement sulfate sur l'hydroxyle en position C2 des acides hexuroniques. La 2-O-sulfatation est une modification que l'on retrouve à la fois chez les HS et les CS/DS. Elle est catalysée par deux enzymes distinctes présentant 50 % de similarité (Kobayashi *et al.*, 1999).

a) Structure

Comme la C₅-épimérase, la 2-OST est codée par un gène unique (*Hs2st*) dont le produit est hautement conservé entre les espèces (Kobayashi *et al.*, 1996; 1997; Bullock *et al.*, 1998; Rong *et al.*, 2000; Nogami *et al.*, 2004). Le gène *Hs2st* a été localisé sur le chromosome 1 (1p31.1-p22.1), il est composé de sept exons et l'ADNc de 6770 pb contient un cadre ouvert de lecture de 1068 nucléotides qui code pour une protéine de 41 kDa.

La 2-OST est une protéine transmembranaire de type II, résidente de l'appareil de Golgi (Kobayashi *et al.*, 1997; Pinhal *et al.*, 2001). Sur la base de son homologie avec d'autres sulfotransférases dont la structure cristalline avait déjà été décrite, Xu *et al.* (2007) ont réalisé une étude structurale de la 2-OST par mutagenèse systématique qui a permis d'identifier six résidus d'acide aminé impliqués dans la fixation du PAPS (K83, T84, S86, T87, R164 et S172), cinq résidus indispensables pour la fixation du substrat (R80, R178, D181, R189 et R288) et enfin deux résidus d'histidine (H140 et H142) nécessaires pour l'activité catalytique de l'enzyme. Plus récemment, Bethea *et al.* (2008) ont caractérisé les résidus d'acide aminé responsables de la spécificité de substrat de la 2-OST. Le mutant R189A transfère uniquement des groupements sulfates sur les résidus de GlcUA du polysaccharide, tandis que les mutants Y94A et H106A transfèrent préférentiellement les groupements sulfates sur les résidus de IdoUA (Bethea *et al.*, 2008).

De façon intéressante, il a été établi par cristallographie et chromatographie de gel filtration que la 2-OST existe sous forme d'homotrimère (Kobayashi *et al.*, 1996; Bethea *et*

al., 2008). A l'intérieur du complexe trimérique, chaque monomère positionnerait leur extrémité N-terminale sur la même face du trimère. Cette orientation est en accord avec leur topologie membranaire de type II et permettrait ainsi aux trois molécules de s'ancrer dans la membrane golgienne *via* leur domaine transmembranaire. Un tel positionnement dissocie les sites actifs les uns des autres, suggérant qu'ils peuvent agir indépendamment (Figure 21) (Bethea *et al.*, 2008).

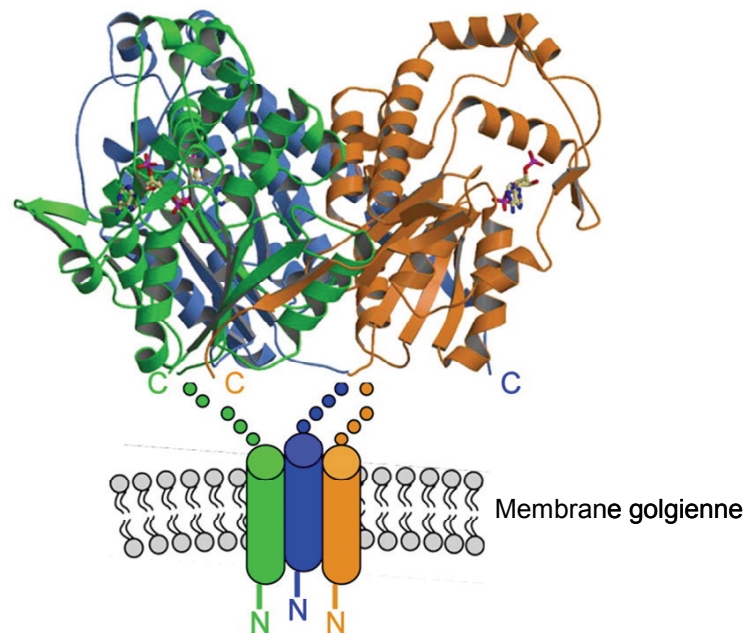


Figure 21 : Complexe trimérique adopté par les monomères de 2-OST. Les domaines catalytiques de chaque monomère sont colorés en vert, orange ou bleu. Le positionnement hypothétique des hélices transmembranaires à l'intérieur de la membrane golgienne a été ajouté à la structure cristalline du complexe (adaptée de Bethea *et al.*, 2008).

b) Activités

La 2-OST agit préférentiellement sur les résidus de IdoUA, mais elle peut également, dans certains cas, sulfater des résidus de GlcUA (Bai & Esko, 1996; Rong *et al.*, 2000; 2001). En effet, l'analyse des HS produits par des cellules CHO mutantes, *pgsF-17*, dépourvues d'activité 2-O-sulfotransférase a révélé que les séquences [IdoUA2S-GlcNS], [IdoUA2S-GlcNS6S] et [GlcUA2S-GlcNS] étaient absentes des structures héparaniques (Bai & Esko, 1996). Cette observation a été confirmée par surexpression de la 2-OST murine dans des cellules HEK293. La transfection stable de l'enzyme dans ces cellules entraîne de manière significative la formation de l'unité disaccharidique [GlcUA2S-GlcNS] qui est très peu représentée dans les cellules contrôles. Cette augmentation s'accompagne d'une diminution

concomitante du taux de résidus de IdoUA2S, expliquant pourquoi dans ces cellules la 2-*O*-sulfatation globale des HS n'est pas affectée (Rong *et al.*, 2000). Ces résultats démontrent que la sulfatation de l'hydroxyle en position C2 des résidus de GlcUA et IdoUA est catalysée par la même enzyme.

Peu d'informations sont disponibles sur la distribution et le rôle fonctionnel de ces résidus de GlcUA2S qui restent rares. En revanche, il est clairement établi que les résidus de IdoUA2S sont presque exclusivement retrouvés dans les domaines NS des HS et sont abondants dans l'héparine, ce qui peut aisément s'expliquer par la spécificité de substrat de la 2-OST (Maccarana *et al.*, 1996; Merry *et al.*, 1999). En effet, la 2-OST transfère des groupements sulfates en position C2 des acides hexuroniques localisés en position réductrice des glucosamines *N*-sulfatées. Il a également été démontré que la 6-*O*-sulfatation de la glucosamine inhibe la réaction, ce qui démontre que la 2-*O*-sulfatation a lieu après la *N*-sulfatation des glucosamines, mais avant leur 6-*O*-sulfatation (Kobayashi *et al.*, 1996; Rong *et al.*, 2000; 2001). En fonction des tissus étudiés, le taux de 2-*O*-sulfatation des résidus de IdoUA varie de 50 à 90 % et augmente avec la longueur des domaines NS, ce qui suggère que d'autres facteurs régulent la 2-*O*-sulfatation (Safaiyan *et al.*, 2000).

L'importance de la 2-*O*-sulfatation a été étudiée chez la souris. Les HS isolés des fibroblastes embryonnaires *Hs2st*^{-/-} possèdent une structure dépourvue de résidu 2-*O*-sulfaté, confirmant qu'il n'existe qu'une isoforme chez la souris (Merry *et al.*, 2001). Les souris invalidées pour la 2-OST décèdent à la naissance d'une agénésie rénale bilatérale, accompagnée de multiples défauts affectant notamment les yeux et le squelette (Bullock *et al.*, 1998; Merry & Wilson, 2002; Wilson *et al.*, 2002). Comme il a été montré que la 2-*O*-sulfatation influence les interactions entre les HS et de nombreux ligands, il avait été suggéré par ces auteurs que le phénotype *Hs2st*^{-/-} était, au moins en partie, dû à la présentation suboptimale des molécules de signalisation sur leurs récepteurs (Bullock *et al.*, 1998). Toutefois, Merry *et al.* (2001) ont démontré que même si l'affinité des HS est réduite pour les FGF-1 et FGF-2, deux facteurs de croissance pour lesquels les groupements 2-*O*-sulfates sont cruciaux pour leur fixation aux HS, la signalisation en réponse à ces facteurs de croissance n'en était pas affectée.

c) Régulation de l'expression

Les études par Northern blot montrent une expression ubiquitaire du transcrit codant pour la 2-OST dans l'ensemble des tissus adultes étudiés (Rong *et al.*, 2001). Chez l'embryon, la 2-OST possède une expression variable en fonction du tissu et du stade de développement, ce qui semble surprenant compte tenu du rôle essentiel de la 2-*O*-sulfatation dans la biosynthèse des HS (Bullock *et al.*, 1998; Cadwallader & Yost, 2007). Ce résultat soulève la possibilité que la 2-OST ne soit pas indispensable dans toutes les cellules au cours du développement précoce.

La 2-*O*-sulfatation jouerait un rôle essentiel dans plusieurs pathologies telles que le cancer et l'inflammation. Il a en effet été mis en évidence *in vitro* et *in vivo* que la réponse inflammatoire s'accompagne d'une augmentation importante de l'expression de la 2-OST, corrélée à un enrichissement des chaînes HS en résidus 2-*O*-sulfatés (Adhikari *et al.*, 2008; Properzi *et al.*, 2008). Alors que Bret *et al.* (2009) ont démontré *in vivo* que des patients atteints de myélomes multiples possèdent un taux élevé de 2-OST qui a notamment été associé à un bon pronostic, le résultat inverse est observé *in vitro* dans un modèle de cellules endothéliales surexprimant l'oncogène *ras* (Lopes *et al.*, 2006b).

A.2.4. Les glucosaminyl 6-*O*-sulfotransférases

L'addition des groupements sulfates sur les hydroxyles en position C6 de certains résidus de glucosamine est catalysée par les glucosaminyl 6-*O*-sulfotransférases. Seuls les HS et les KS possèdent ces résidus de glucosamine 6-*O*-sulfatés qui sont issus de l'action spécifique d'enzymes distinctes (Habuchi, 2000).

a) Structure

Chez les vertébrés, les 6-OSTs constituent une famille d'enzymes pour laquelle trois membres, codés par des gènes distincts, ont été purifiés, clonés et caractérisés (Tableau 3) (Habuchi *et al.*, 1995; 1998; 2000; 2003; Nogami *et al.*, 2004). Chez l'homme et la souris, une isoforme supplémentaire, la 6-OST-2S, a été décrite. Il s'agit d'un variant de la 6-OST-2 dont l'épissage alternatif cause la délétion de 40 résidus d'acide aminé dans la région « tige » laissant le domaine catalytique intact (Habuchi *et al.*, 2003; Nagai *et al.*, 2004).

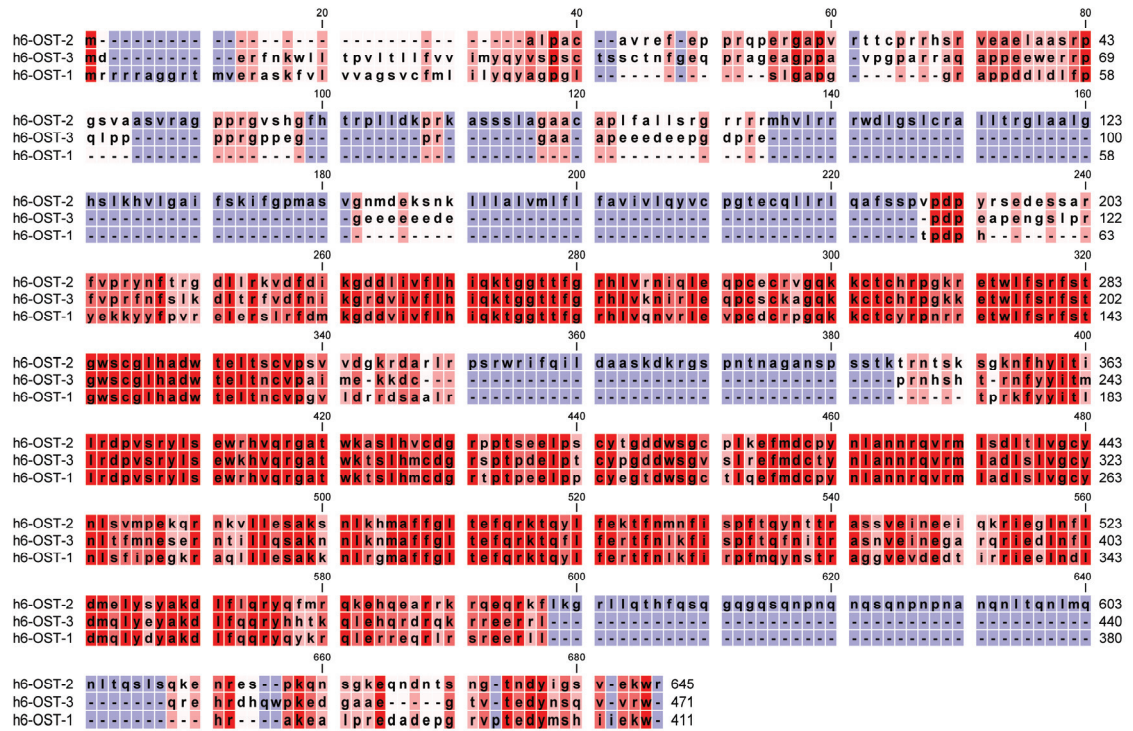
Tableau 3 : Les différentes 6-O-sulfotransférases.

Gène			
	Localisation chromosomique	Organisation génomique	Taille du cDNA
<i>Hs6st1</i>	2q21	2 exons	3966 pb (CDS : 1233 pb)
<i>Hs6st2</i>	Xq26.2	6 exons	4576 pb (CDS : 1935 pb)
<i>Hs6st3</i>	13q32.1	2 exons	7817 pb (CDS : 1413 pb)
Protéine			
	Nombre d'acides aminés	Masse moléculaire (Da)	
6-OST-1	411	48 226	
6-OST-2	645	73 390	
6-OST-3	471	54 844	

Les 6-OSTs sont moins conservées que les autres familles de glucosaminyl sulfotransférases. La séquence en acides aminés de la 6-OST-1 est à 51 et 57 % identique à celle de la 6-OST-2 et de la 6-OST-3, tandis que les 6-OST-2 et 6-OST-3 sont à 50 % identiques entre elles (Figure 22) (Habuchi *et al.*, 2000).

Les 6-OSTs sont des protéines transmembranaires de type II (Habuchi *et al.*, 1998; 2000). La surexpression des différentes isoformes de 6-OSTs couplées à la GFP a permis de mettre en évidence leur localisation golgienne. Elles occuperaient plus précisément le compartiment *trans* de l'appareil de Golgi. L'importance de la région « tige » dans la localisation golgienne des enzymes et le maintien de leur conformation active a été confirmée par mutagenèse dirigée. En effet, la délétion de la région « tige » des 6-OSTs affecte, à la fois, leur localisation golgienne, la formation d'oligomères et leur activité enzymatique (Nagai *et al.*, 2004). Ces résultats sont en accord avec de précédentes études concernant d'autres enzymes résidentes du Golgi, comme la *N*-acétylglucosaminyltransférase I et II ou encore la α 2,6-sialyltransférase I, qui suggèrent que l'oligomérisation des enzymes golgiennes serait dépendante de la région « tige » et pourrait en partie être responsable de leur distribution intracellulaire (Colley, 1997; Chen *et al.*, 2000; Opat *et al.*, 2000).

A



B

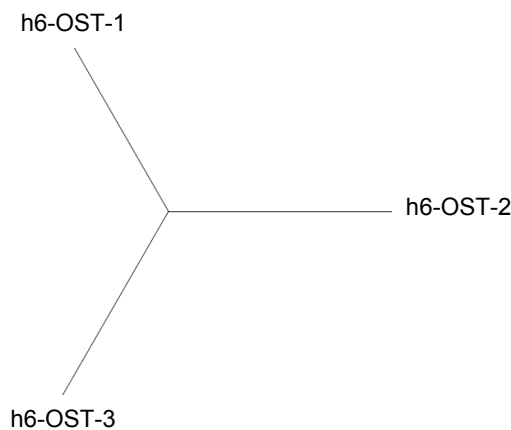


Figure 22 : Comparaison des séquences protéiques des différents 6-OSTs humaines. (A) Alignement multiple des 6-OSTs humaines. Les séquences en acides aminés sont alignées entre elles. Un dégradé de couleur variant du rouge au bleu est utilisé pour mettre en évidence l'homologie de séquence (Rouge : acide aminé identique ; Bleu : acide aminé différent). **(B)** Arbre phylogénétique des 6-OSTs humaines. La distance entre les isoenzymes est proportionnelle au nombre de résidus d'acide aminé différents.

b) Activités

Les groupements 6-*O*-sulfates des HS apparaissent dans des contextes structuraux variés. Approximativement la moitié des groupements 6-*O*-sulfates totaux est retrouvée dans les domaines NS, souvent en juxtaposition avec des résidus de IdoUA2S. Les domaines NA/NS, qui sont largement dépourvus de groupement 2-*O*-sulfate, possèdent un nombre plus limité de groupements 6-*O*-sulfates. Enfin, ces groupements sont également retrouvés, dans certains cas, dans les domaines NA (Maccarana *et al.*, 1996).

Les trois 6-OSTs sont capables de sulfater *in vitro* un grand nombre de structures. Elles catalysent la 6-*O*-sulfatation des glucosamines *N*-acétylées et *N*-sulfatées localisées du côté réducteur d'unités de GlcUA^{+/-}2S ou de IdoUA^{+/-}2S (Zhang *et al.*, 2001; Smeds *et al.*, 2003). Même si elles possèdent des spécificités de substrat similaires, chaque isoforme montre une préférence envers l'isomérisation de l'acide uronique adjacent de la glucosamine *N*-sulfatée cible. Ainsi, la 6-OST-1 sulfate les unités disaccharidiques [IdoUA-GlcNS], la 6-OST-2 reconnaît les deux unités [GlcUA-GlcNS] et [IdoUA-GlcNS], mais la sélectivité dépend de la concentration en substrat, tandis que la 6-OST-3 sulfate ces deux substrats indépendamment de leur concentration (Habuchi *et al.*, 2000). En s'intéressant plus particulièrement à la 6-OST-3, Jemth *et al.* (2003) ont démontré que la 2-*O*-sulfatation favorise l'activité catalytique des 6-OSTs. La 6-*O*-sulfatation envers des substrats possédant au moins deux résidus de IdoUA2S est trois à cinq fois supérieure à celle observée pour des octasaccharides possédant aucun ou un seul de ces résidus (Jemth *et al.*, 2003).

Récemment, des souris déficientes en 6-OST-1 ont été générées et caractérisées (Habuchi *et al.*, 2007; Izvolsky *et al.*, 2008). La plupart des souris *Hs6st1*^{-/-} décèdent au stade embryonnaire d'une placentation anormale occasionnée par un nombre réduit de microvaisseaux placentaires. Quelques souris survivent néanmoins jusque la naissance. Les nouveau-nés ne présentent pas de défauts développementaux majeurs, mais ces souris *Hs6st1*^{-/-} montrent au cours de leur développement un retard de croissance accompagné d'une perte de poids qui généralement causent leur décès. L'analyse des structures héparaniques isolées de divers organes de ces souris a révélé une réduction marquée des glucosamines GlcNS6S et GlcNAc6S, qui suggère un rôle non négligeable de la 6-OST-1 dans la 6-*O*-sulfatation des HS (Habuchi *et al.*, 2007).

c) Régulation de l'expression

L'expression des 6-OSTs est dépendante du type cellulaire et du stade de développement. Chez l'adulte, la 6-OST-1 est principalement exprimée dans le foie, tandis que le transcrite codant pour la 6-OST-2 est particulièrement abondant dans le cerveau et la rate. La 6-OST-3, quant à elle, est exprimée par l'ensemble des tissus étudiés (Habuchi *et al.*, 2000; 2003). Les deux variants de la 6-OST-2 possèdent également une expression différentielle. Contrairement à la forme originale, la forme courte, la 6-OST-2S, est préférentiellement exprimée dans les ovaires, le placenta et les reins fœtaux (Habuchi *et al.*, 2003).

Le profil d'expression de chaque 6-OST varie également au cours du développement embryonnaire (Bink *et al.*, 2003; Sedita *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Yabe *et al.*, 2005; Cadwallader & Yost, 2006b). Chez l'embryon murin, le transcrite codant pour la 6-OST-1 est principalement exprimé dans les tissus neuraux et épithéliaux, alors que la 6-OST-2 est hautement exprimée dans les tissus mésenchymateux. Le transcrite de la 6-OST-3 apparaît plus tard au cours du développement et son expression est plus restrictive (Sedita *et al.*, 2004). Chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, les études menées par hybridation *in situ* ont démontré que les quatre membres de la famille des 6-OSTs possèdent une expression spatiale et temporelle distincte au cours du développement, confortant l'hypothèse selon laquelle des différences fonctionnelles existent *in vivo* entre les membres de la famille (Bink *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Cadwallader & Yost, 2006b).

L'expression des 6-OSTs est modulée au cours de pathologies comme le cancer. *In vivo*, on observe une surexpression de la 6-OST-1 et de la 6-OST-2 au cours du cancer ovarien (Backen *et al.*, 2007). Le résultat inverse est néanmoins observé *in vitro* dans des cellules endothéliales transfectées par l'oncogène *ras* (Lopes *et al.*, 2006b).

Bien qu'il soit clairement établi que les 6-OSTs sont résidentes du Golgi, elles peuvent également être sécrétées puisqu'elles ont été purifiées et caractérisées dans le milieu de culture de cellules CHO (Habuchi *et al.*, 1995). L'utilisation d'un panel d'inhibiteurs de protéases couplée à des expériences de surexpression ont permis à Nagai *et al.* (2007) de démontrer que la sécrétion de la 6-OST-3 est dépendante d'une protéase à activité β -sécrétase, BACE (*Beta Amyloid Cleaving Enzyme*) 1, qui a déjà été décrite pour permettre la sécrétion d'une autre enzyme golgienne, la α 2,6-sialyltransférase I (Kitazume *et al.*, 2001; Kitazume *et al.*, 2003). De façon plus intéressante, ils ont démontré que l'inhibition de BACE1 engendre une accumulation de la 6-OST-3 dans l'appareil de Golgi. Cette accumulation s'accompagne

d'une forte augmentation de l'activité 6-*O*-sulfotransférase (≈ 10 fois) et suggère pour la première fois que les cellules sont capables de réguler le degré de 6-*O*-sulfatation des HS en modulant le niveau d'expression intracellulaire des 6-OSTs (Nagai *et al.*, 2007). En effet, il a déjà été démontré que la concentration golgienne des 6-OSTs est un facteur important puisqu'une expression trop importante de 6-OSTs engendre la biosynthèse de structures HS aberrantes comme une hyper 6-*O*-sulfatation des domaines *N*-sulfatés et *N*-acétylés (Do *et al.*, 2006). Cela suggère que la régulation du niveau d'expression des 6-OSTs est cruciale pour permettre la formation de profils uniques de 6-*O*-sulfatation nécessaires à la fixation de certains ligands.

A.2.5. Les glucosaminyl 3-*O*-sulfotransférases

Les glucosaminyl 3-*O*-sulfotransférases catalysent le transfert d'un groupement sulfate sur l'hydroxyle en position C3 des glucosamines. Cette étape terminale est une modification rare et caractéristique des chaînes HS. Elle conduit à la formation de motifs de fixation spécifiques comme ceux de l'AT-III ou de la glycoprotéine gD de HSV-1 (Kusche-Gullberg & Kjellen, 2003).

a) Structure

Actuellement, sept isoformes (3-OST-1, -2, -3A, -3B, -4, -5 et -6) ont été purifiées, clonées et caractérisées chez les vertébrés (Tableau 4) (Liu *et al.*, 1996; Shworak *et al.*, 1997; 1999; Xia *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2005; Lawrence *et al.*, 2007).

Les 3-OSTs sont codées par des gènes distincts et possèdent une organisation génomique similaire. Il s'agit d'une famille hautement conservée puisque les protéines possèdent plus de 60 % d'homologie dans leur domaine C-terminal sulfotransférase (Figure 23) (Shworak *et al.*, 1997; 1999; Yabe *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2005). Sur la base de leur homologie de séquence, on distingue deux groupes : le groupe I formé de la 3-OST-1 et de la 3-OST-5, et le groupe II constitué des 3-OST-2, -3A, -3B, -4 et -6 (Cadwallader & Yost, 2006a). Les 3-OSTs montrent des similitudes avec les NDSTs, notamment au niveau du domaine sulfotransférase C-terminal (50 %). En revanche, elles n'ont aucune homologie de séquence avec les 6-OSTs, excepté pour les domaines 5'PSB et 3'PB impliqués dans la fixation du PAPS (Shworak *et al.*, 1999; Habuchi *et al.*, 2000; Aikawa *et al.*, 2001).

Tableau 4 : Les 3-O-sulfotransférases.

Gène			
	Localisation chromosomique	Organisation génomique	Taille du cDNA
<i>Hs3st1</i>	4p16	2 exons	1965 pb (CDS : 921 pb)
<i>Hs3st2</i>	16p12	2 exons	1968 pb (CDS : 1101 pb)
<i>Hs3st3A</i>	17p12-p11.2	2 exons	2546 pb (CDS : 1218 pb)
<i>Hs3st3B</i>	17p12-p11.2	2 exons	2032 pb (CDS : 1170 pb)
<i>Hs3st4</i>	16p11.2	2 exons	3203 pb (CDS : 1368 pb)
<i>Hs3st5</i>	6q22.1	2 exons	2744 pb (CDS : 1038 pb)
<i>Hs3st6</i>	16p13.3	2 exons	1063 pb (CDS : 933 pb)
Protéine			
	Nombre d'acides aminés	Masse moléculaire (Da)	
3-OST-1	307	35 773	
3-OST-2	367	41 501	
3-OST-3A	406	44 899	
3-OST-3B	390	43 324	
3-OST-4	456	49 799	
3-OST-5	346	40 408	
3-OST-6	311	34 678	

Hormis la 3-OST-1, qui est décrite comme étant une protéine intraluminaire golgienne, les 3-OSTs sont des protéines transmembranaires de type II résidentes du Golgi (Shworak *et al.*, 1997; 1999). De façon similaire à la 2-OST et aux 6-OSTs, les 3-OSTs existent sous forme oligomérique. Wille *et al.* (2007) ont démontré que même si la 3-OST-3A fixe avec une affinité similaire les HS et les CS, seuls les HS sont capables de favoriser l'oligomérisation de l'enzyme. Cela suggère que la discrimination entre les substrats serait plutôt réalisée *via* la formation d'une structure oligomérique stable, plutôt que par des affinités de ligand différentes (Wille *et al.*, 2007). Ce résultat explique également pourquoi un changement conformationnel de la 3-OST-1 est observé suite à la fixation spécifique des HS (Edavettal *et al.*, 2004a).

L'étude de la structure cristalline du complexe ternaire 3-OST-3A/PAP/tétrasaccharide a mis en évidence que le domaine catalytique de la 3-OST-3A possède une conformation sphérique et présente un large sillon ouvert pouvant accueillir l'oligosaccharide (Figure 24). Le noyau de l'enzyme est composé d'un feuillet β parallèle (β 7- β 6- β 2- β 5- β 3) flanqué d'hélices α . Au centre de cette structure, on retrouve les deux domaines de fixation du PAPS, les sites 5'PSB et 3'PB (Moon *et al.*, 2004).

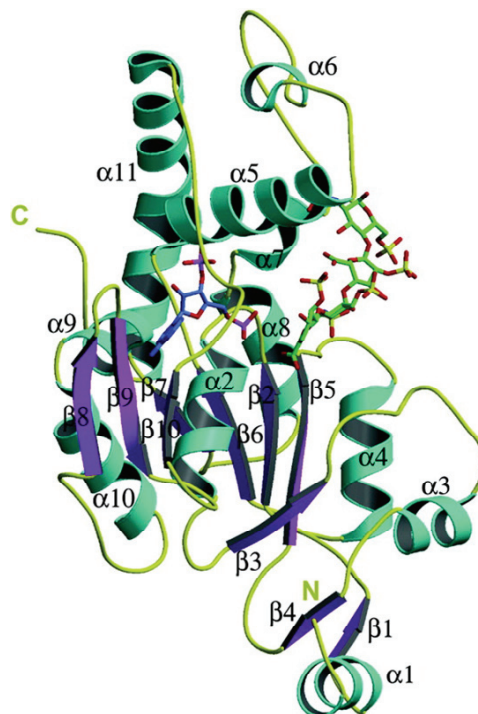


Figure 24 : Structure cristalline du complexe ternaire 3-OST-3/PAP/tétrasaccharide. Les brins β et les hélices α sont colorés en violet et bleu, respectivement. L'oligosaccharide est représenté en vert, le PAP en bleu (Moon *et al.*, 2004).

Même si quelques différences mineures présentes dans les boucles sont décrites, la structure de la 3-OST-3A est relativement similaire à celle des autres isoenzymes (Edavettal *et al.*, 2004b; Xu *et al.*, 2008). Les études menées par mutagenèse dirigée ont permis d'identifier quelques résidus d'acide aminé de la 3-OST-1 impliqués dans la catalyse ou la fixation du substrat (Edavettal *et al.*, 2004b; Munoz *et al.*, 2006). Les résidus d'acide aminé basiques R72, R67, K123 et R276 sont localisés dans le sillon ouvert. Alors que la mutation de ces résidus n'affecte pas la fixation du PAP, ces mutants sont dépourvus d'activité enzymatique, conséquence de leur incapacité à fixer le substrat oligosaccharidique. Le résidu d'acide aminé E90 est un autre résidu intéressant que l'on retrouve chez l'ensemble des isoformes. La mutation de ce résidu, localisé dans le sillon des 3-OSTs, n'affecte ni la fixation du PAP, ni celle des HS. Toutefois, le mutant E90Q est dénué d'activité enzymatique, ce qui suggère que ce résidu peut être la base catalytique de l'activité des 3-OSTs (Munoz *et al.*, 2006).

b) Activités

La 3-*O*-sulfatation des glucosamines est une modification rare (Colliec-Jouault *et al.*, 1994; Shworak *et al.*, 1994). Toutefois, elle est d'une importance cruciale pour au moins deux sites de fixation héparaniques caractérisés, ceux de l'AT-III et de la glycoprotéine gD du HSV-1 (Shukla *et al.*, 1999; Petitou *et al.*, 2003).

Parmi les différents membres de la famille, la 3-OST-1 a très tôt suscité un intérêt en raison de son rôle dans la formation du site de fixation HS de l'AT-III. En effet, elle catalyse le transfert d'un groupement sulfate sur une glucosamine *N*-sulfatée localisée en position réductrice d'un résidu de GlcUA (Shworak *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999). De façon surprenante, les souris déficientes en 3-OST-1 sont viables et ne montrent pas le phénotype pro-coagulant attendu, en dépit d'une réduction marquée du taux de HS fixant l'antithrombine (Shworak *et al.*, 2002; HajMohammadi *et al.*, 2003; Weitz, 2003). Ce résultat suggère que d'autres GAGs peuvent compenser la réduction de l'activité anticoagulante des HS. Les chaînes CS de la thrombomoduline pourraient être de bons candidats étant donné qu'elles favorisent la réactivité du couple thrombine/thrombomoduline avec l'AT-III (Nawa *et al.*, 1990; Koyama *et al.*, 1991).

Les 3-OST-3 ont également fait l'objet de nombreuses études en raison de leur implication dans la génération du motif de fixation de la glycoprotéine gD du HSV-1 (Shukla *et al.*, 1999; Tiwari *et al.*, 2004). Les deux isoenzymes, 3-OST-3A et 3-OST-3B, possèdent

rigoureusement la même activité (Liu *et al.*, 1999b). Elles transfèrent un groupement sulfate sur une glucosamine *N*-non substituée liée à un acide iduronique 2-*O*-sulfaté (Liu *et al.*, 1999a; 1999b; 2002). Plus tard, il a clairement été démontré le rôle des autres isoformes appartenant au groupe II dans l'entrée et la propagation du HSV-1 (Tiwari *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2006; Lawrence *et al.*, 2007). Les 3-OST-2, -4 et probablement -6 sont capables de transférer un groupement sulfate sur une glucosamine *N*-non substituée et sont donc à l'origine de la génération du site de liaison de la glycoprotéine gD du HSV-1 (Liu *et al.*, 1999b; Xu *et al.*, 2005; Lawrence *et al.*, 2007).

La 3-OST-5 est l'isoforme qui présente la plus large spécificité de substrat. Elle est capable de transférer un groupement sulfate sur une glucosamine indifféremment *N*-sulfatée ou *N*-non substituée. Ainsi, les HS modifiés par la 3-OST-5 sont dotés de l'activité anticoagulante et de la capacité à favoriser l'entrée du virus HSV-1 (Xia *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Mochizuki *et al.*, 2003; Duncan *et al.*, 2004; Tiwari *et al.*, 2004; Chen & Liu, 2005).

Plus récemment, Mochizuki *et al.* (2008) ont montré que toutes ces isoformes, excepté la 3-OST-1, catalysent *in vitro* la formation de disaccharides tétrasulfatés [IdoUA2S-GlcNS3S6S]. Toutefois, cette modification est très rare dans les chaînes HS tissulaires puisqu'elle ne représente que 0,15 % des disaccharides, mis à part dans la rate où sa présence peut atteindre 1 % (Mochizuki *et al.*, 2008).

Tableau 5 : Spécificité de substrat des 3-O-sulfotransférases.

Enzyme	Substrat
3-OST-1	-GlcUA-GlcNS ^{+/-} -6S-
3-OST-2	-HexUA2S-GlcNS/NH ₂ -
3-OST-3A	-IdoUA2S-GlcNH ₂ ^{+/-} -6S-
3-OST-3B	-IdoUA2S-GlcNH ₂ ^{+/-} -6S-
3-OST-4	-HexUA2S-GlcNS/NH ₂ -
3-OST-5	-HexUA ^{+/-} 2S-GlcNS/NH ₂ ^{+/-} -6S-
3-OST-6	<i>Inconnu</i>

c) Régulation de l'expression

Les études réalisées par Northern blot et RT-PCR ont mis en évidence que chaque 3-OST possède un profil d'expression spécifique, ce qui suggère que la distribution tissulaire des séquences héparaniques fonctionnelles n'est pas aléatoire mais extrêmement régulée (Tableau 6). Ainsi, tandis que les transcrits codant pour les 3-OST-2 et 3-OST-4 sont exclusivement retrouvés dans le cerveau, les autres isoformes sont exprimées à un niveau basal par de nombreux types cellulaires et sont retrouvées en grande quantité dans certains tissus qui leurs sont spécifiques (Shworak *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 2002; Mochizuki *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005; Lawrence *et al.*, 2007; Mochizuki *et al.*, 2008).

Tableau 6 : Répartition tissulaire des 3-O-sulfotransférases.

Enzyme	Profil d'expression
3-OST-1	Large (surtout cerveau, rein)
3-OST-2	Cerveau
3-OST-3A	Large (surtout cœur, placenta)
3-OST-3B	Large (surtout foie, placenta)
3-OST-4	Cerveau
3-OST-5	Muscles squelettiques, cerveau
3-OST-6	Foie, rein

En accord avec les travaux de Yabe *et al.* (2005), une distribution spatiale et temporelle des transcrits codant pour les 3-OSTs a été décrite (Cadwallader & Yost, 2006a). Ainsi, chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, on différencie deux types d'expressions : certains gènes sont exprimés ubiquitairement au cours du développement, tandis que d'autres possèdent une expression plus restreinte et caractéristique. La plupart des tissus examinés expriment au moins un membre de chaque groupe (I ou II) et chaque groupe comporte au moins une isoforme qui présente une expression basale et ubiquitaire et une isoforme dont l'expression est plus spécifique (Cadwallader & Yost, 2006a).

Plusieurs publications ont mis en évidence la sous-expression de la 3-OST-2 dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses et de nombreux cancers humains (Miyamoto *et al.*, 2003; Tsutsumi *et al.*, 2003; Bret *et al.*, 2009). Cette sous-régulation est attribuée à l'hyper-méthylation des îlots CpG localisés dans la région 5' du gène codant pour la 3-OST-2 et

suggère le rôle éventuel de cette isoforme dans le contrôle de la transformation maligne des cellules (Miyamoto *et al.*, 2003). De façon opposée, la 3-OST-1 voit également son expression régulée au cours du cancer puisqu'une augmentation drastique de son taux de transcrits, concomitante avec la formation de séquences héparaniques de haute affinité pour l'AT-III, est observée dans des cellules différenciées de tératocarcinome (Zhang *et al.*, 1998; 1999). Parallèlement à ces travaux, il a également été démontré que l'expression des 3-OSTs peut être modulée dans des cellules inflammatoires par des stimuli exogènes. Alors que le LPS diminue l'expression de l'ensemble des isoformes dans les cellules endothéliales HMVEC, le TNF- α inhibe l'expression de la 3-OST-1 et de la 3-OST-4, mais induit celle de la 3-OST-3B dans ces cellules (Krenn *et al.*, 2008).

A.3. Le concept du « GAGosome »

Les données actuelles concernant la structure des HS démontrent l'extrême diversité en ce qui concerne le niveau de sulfatation et l'organisation des domaines (Maccarana *et al.*, 1996; Ledin *et al.*, 2004). L'analyse de la composition des HS isolés à partir de divers tissus ont mis en évidence des différences tissu-spécifiques qui apparaissent reproductibles à l'intérieur d'une même espèce (Ledin *et al.*, 2004; van den Born *et al.*, 2005; Ten Dam *et al.*, 2006; Kurup *et al.*, 2007). Ces observations suggèrent que la biosynthèse des HS est soumise à un contrôle strict. Jusqu'à présent, peu d'éléments sont connus sur les mécanismes de sa régulation. L'absence d'une matrice, comme l'ARN dans la synthèse protéique, suggère que la régulation de la biosynthèse des HS est en grande partie exercée par l'ensemble des enzymes de biosynthèse qui possèdent une expression dépendante du type cellulaire et qui présentent toutes des activités et des spécificités de substrat différentes.

Le concept du « GAGosome » a été introduit par Esko & Selleck (2002) pour définir un complexe physique entre les différentes enzymes, et potentiellement d'autres protéines, impliquées dans l'assemblage des chaînes HS (Figure 25). Selon leur modèle, la structure des chaînes HS serait déterminée par l'action concertée des différentes enzymes et ce en fonction de la composition et de la stœchiométrie du complexe (Esko & Selleck, 2002).

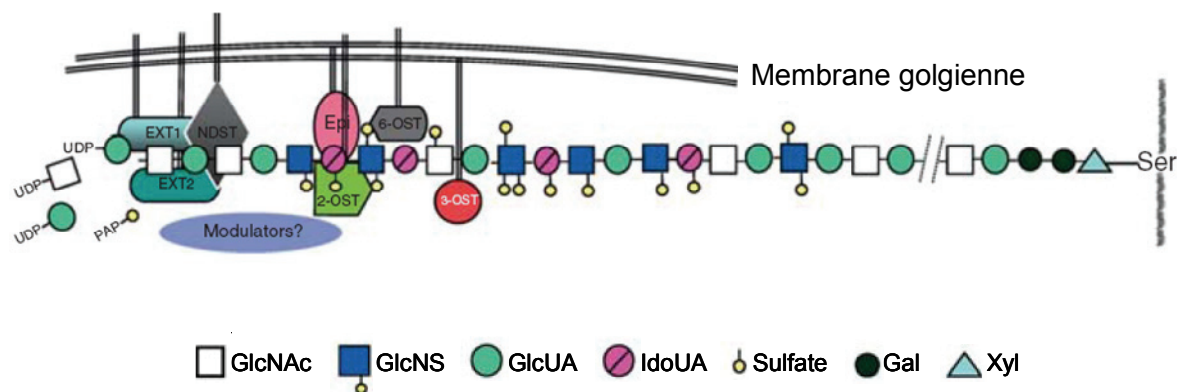


Figure 25 : Représentation schématique du « GAGosome » (adaptée de Lindahl & Li, 2009).

Cette théorie est en accord avec plusieurs données expérimentales. Les études réalisées sur la biosynthèse de l'héparine dans un système microsomal ont mis en évidence que la biosynthèse d'une chaîne complète d'héparine s'effectue en moins de 30 secondes (Hook *et al.*, 1975). Ainsi, cette synthèse extrêmement rapide pourrait s'expliquer par l'existence d'un complexe enzymatique capable de catalyser l'ensemble des réactions en un court laps de temps. Cette hypothèse est confortée par la proximité entre les différentes enzymes puisque des interactions physiques entre plusieurs d'entre elles, incluant les couples EXT1/EXT2, EXT2/NDST1 et C₅-épipimérase/2-OST (McCormick *et al.*, 2000; Senay *et al.*, 2000; Pinhal *et al.*, 2001; Busse *et al.*, 2007; Presto *et al.*, 2008), ont été démontrées. Le concept du « GAGosome » a récemment été repris par Carlsson *et al.* (2008) qui ont démontré *in vitro* le mode d'action processif de la N-sulfatation, catalysée par la NDST1 ou la NDST2 en présence de PAPS. Enfin, la complexité de l'appareil biosynthétique est suggérée par les manipulations génétiques sur la souris qui ont révélées des structures HS inattendues. La présence de groupements 6-O-sulfates dans des HS dépourvus de N-sulfate indique que l'ordre des réactions peut être modifié (Holmborn *et al.*, 2004). De plus, les souris transgéniques *Hsepi*^{-/-} ou *Hs2st*^{-/-} montrent une augmentation notable de la N- et de la O-sulfatation qui semble compenser la diminution du taux de résidus de IdoUA2S et qui va à l'encontre du modèle accepté selon lequel les NDSTs créent les substrats requis pour les modifications suivantes (Figure 26) (Merry *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003).

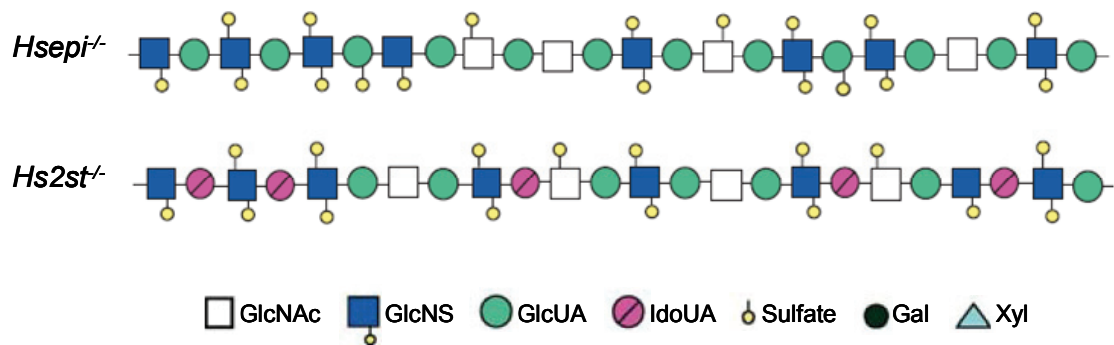


Figure 26 : Effets de la délétion des gènes codant pour les enzymes de biosynthèse sur la structure des HS. Les séquences décrites sont arbitraires mais basées sur la composition des HS isolés à partir des mutants (Lindahl & Li, 2009).

B - Dégradation des héparanes sulfates

Comme nous venons de le décrire, la biosynthèse des HS est un processus hautement régulé. L'action concertée des différentes enzymes de biosynthèse est responsable de l'extrême diversité des motifs HS qui mènent à la fixation spécifique des HBPs sur leurs cellules cibles. Toutefois, les interactions entre les HS et leurs ligands peuvent également être régulées à d'autres niveaux, soit par la modification post-biosynthétique de ces mêmes chaînes oligosaccharidiques, soit par leur dégradation partielle ou totale (Yanagishita & Hascall, 1992; Bishop *et al.*, 2007; Lamanna *et al.*, 2007).

B.1. Remodelage fonctionnel des héparanes sulfates ou « processing »

Les chaînes HS peuvent être partiellement dégradées par des endo- β -glucuronidases extracellulaires, les héparanases. Ces enzymes, dont l'action est dépendante de la séquence oligosaccharidique, agissent sur un nombre limité de sites et génèrent ainsi des fragments héparaniques de hauts poids moléculaires (5 à 7 kDa) (Bame, 2001; Gong *et al.*, 2003). A ce jour, trois héparanases ont été identifiées. La CTAP (*Connective Tissue Activating Peptide*)-III dérive de la protéolyse d'une chimiokine de 10 kDa, la PBP (*Platelet Basic Protein*), exprimée lors d'un phénomène d'inflammation ou de cicatrisation (Hoogewerf *et al.*, 1995; Proudfoot *et al.*, 1997). L'héparanase Hpa1 possède la particularité d'être synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif dont le clivage de l'extrémité N-terminale génère l'enzyme active (Hulett *et al.*, 1999; Vlodaysky *et al.*, 1999). Ainsi, l'héparanase Hpa1 est en réalité un

hétérodimère constitué de la protéine de 50 kDa associée au peptide de 8 kDa issu de la protéolyse de la prohéparanase (Fairbanks *et al.*, 1999). L'héparanase Hpa1 est sécrétée par une grande variété de cellules incluant les plaquettes, les cellules tumorales et inflammatoires (Bame, 2001; Vlodaysky & Friedmann, 2001). D'ailleurs, l'héparanase a fait l'objet de nombreuses études pour son implication dans la croissance et l'invasion tumorale (Parish *et al.*, 2001; Vlodaysky & Goldshmidt, 2001; Vlodaysky *et al.*, 2002; McKenzie, 2007; Vreys & David, 2007; Nasser, 2008). Elle a été localisée dans le sous-endothélium, ce qui suggère qu'elle est déjà présente au niveau des sites de dégradation des HSPGs (Dempsey *et al.*, 2000). L'héparanase Hpa2 possède 40 % d'homologie avec Hpa1 (McKenzie *et al.*, 2000). Toutefois, le rôle de cette héparanase reste inconnu ; il n'a toujours pas été démontré que cette protéine possède une activité enzymatique.

Le rôle premier attribué aux héparanases extracellulaires est le remodelage de la matrice extracellulaire suite à une blessure ou une inflammation afin de promouvoir des phénomènes tels que la migration leucocytaire et l'angiogenèse (Vlodaysky *et al.*, 1992; Hoogewerf *et al.*, 1995; Ihrcke *et al.*, 1998; Dempsey *et al.*, 2000; Zcharia *et al.*, 2005). Elles sont également impliquées dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire à travers la mobilisation des facteurs de croissance fixés aux HSPGs extracellulaires (Ishai-Michaeli *et al.*, 1990). Les fragments héparaniques générés par les héparanases peuvent réguler la fixation des HBPs à la surface cellulaire, leur stabilisation et encore leur transport vers un autre site d'action (Pillarsetti *et al.*, 1997; Sperinde & Nugent, 1998; Tumova *et al.*, 1999). Enfin, il semble également que les héparanases jouent un rôle important dans la maladie d'Alzheimer puisque la dégradation des chaînes HS prévient la formation des complexes de type bêta-amyloïde/HSPG que l'on retrouve au niveau des plaques séniles (Snow *et al.*, 1994; Bame *et al.*, 1997).

Plus récemment, il a été mis en évidence que la diversité structurale des HS peut également être apportée par l'action post-biosynthétique d'endosulfatases extracellulaires (Gorsi & Stringer, 2007; Lamanna *et al.*, 2007). Ainsi, Qsulf1 et Qsulf2 sont deux 6-*O*-endosulfatases capables de remodeler l'état de 6-*O*-sulfatation des HS (Dhoot *et al.*, 2001; Ai *et al.*, 2006). Les deux enzymes possèdent la même activité, elles éliminent toutes deux les groupements 6-*O*-sulfates des disaccharides trisulfatés [IdoUA2S-GlcNS6S] localisés dans les régions NS des HS (Ai *et al.*, 2003; 2006). Ces enzymes sont associées à la membrane cellulaire et possèdent la particularité d'agir sur les HS localisés à la surface cellulaire ou dans la matrice extracellulaire. Des orthologues de ces protéines ont été identifiés dans plusieurs

espèces comme la caille, la souris, l'homme et le rat (Dhoot *et al.*, 2001; Morimoto-Tomita *et al.*, 2002; Ohto *et al.*, 2002; Ai *et al.*, 2006).

De multiples études ont démontré que la 6-*O*-sulfatation module les interactions entre les HS et leurs ligands (Capila & Linhardt, 2002; Esko & Selleck, 2002). Ainsi, en éliminant sélectivement les groupements 6-*O*-sulfates, les 6-*O*-endosulfatases affectent les propriétés de fixation des HS et influencent la fonction de plusieurs HBPs telles que Wnt, BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) ou encore le FGF-2 (Dhoot *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2003; 2004; Viviano *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Uchimura *et al.*, 2006; Ai *et al.*, 2007; Langsdorf *et al.*, 2007). Les conséquences de ces modifications dépendent de la nature de l'interaction entre la séquence héparanique et son ligand. Ainsi, Dhoot *et al.* (2001) et Ai *et al.* (2003) ont démontré que Qsulf1 favorise la signalisation induite par Wnt. Selon le modèle proposé, l'élimination du groupement 6-*O*-sulfate réduit drastiquement l'affinité de Wnt pour les HS, permettant ainsi au facteur de croissance d'interagir et d'activer son récepteur Frizzled avec une haute efficacité (Dhoot *et al.*, 2001; Ai *et al.*, 2003). A l'inverse, dans le cas du FGF-2 où la 6-*O*-sulfatation est requise pour la formation du complexe de signalisation, Qsulf1 possède un effet inhibiteur (Guimond *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2004).

B.2. Recyclage des héparanes sulfates ou « turn-over »

Les HS sont dégradés dans le lysosome *via* un processus spécifique et ordonné faisant intervenir de multiples endo- et exoglycosidases (Figure 27) (Aronson & Davidson, 1968; Yanagishita & Hascall, 1992; Winchester, 1996; 2005).

Les protéoglycanes sont internalisés dans les cellules par endocytose où la dégradation est initiée au sein de l'endosome primaire par la digestion de la partie protéique. Les chaînes HS sont alors partiellement dégradées par des héparanases qui génèrent dans un premier temps des fragments oligosaccharidiques de masse moléculaire d'environ 10 kDa (Bame, 2001). Cette dégradation partielle se poursuit dans l'endosome tardif et engendre des fragments d'environ 5 kDa. Cette étape préliminaire est importante. En générant de nombreuses extrémités non réductrices qui seront reconnues dans l'étape suivante, elle permet une dégradation rapide qui sans cela serait très lente compte tenu de la longueur des chaînes HS.

La dégradation de ces fragments se poursuit et s'achève dans le lysosome grâce à l'action de sulfatases et d'exoglycosidases. Ces enzymes agissent de façon récurrente et séquentielle depuis l'extrémité non réductrice de l'oligosaccharide. La dégradation complète

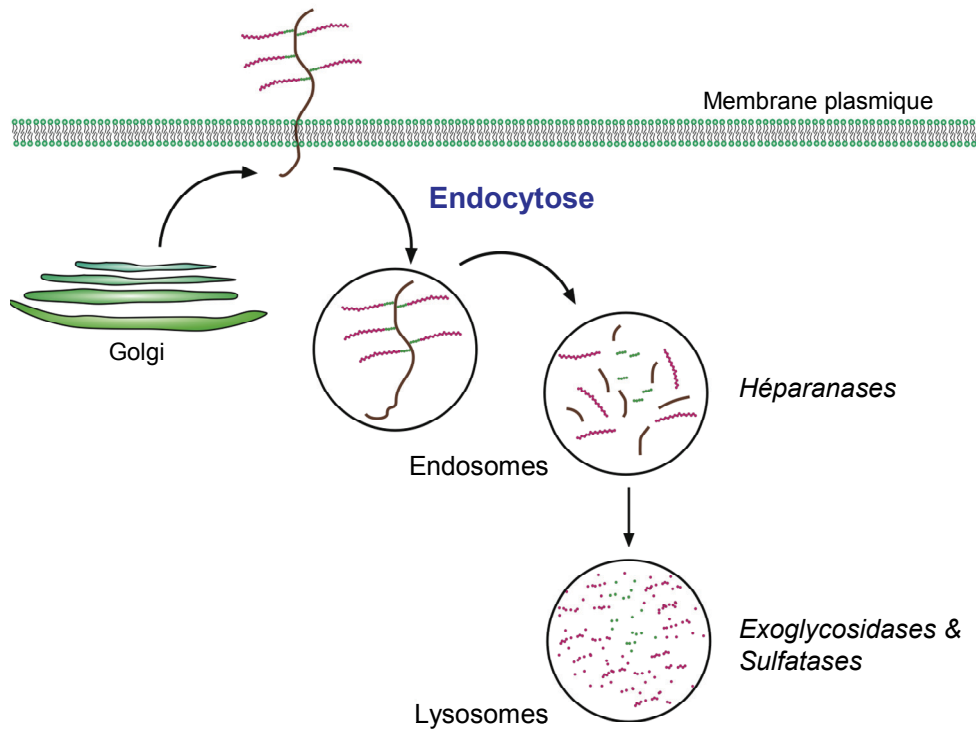


Figure 27 : Schéma général du recyclage des HSPGs par endocytose. Le « core » protéique du protéoglycane est représenté en marron, les chaînes HS sont en vert et rose (adaptée de Yanagishita & Hascall, 1992).

des HS est de loin la plus complexe. Elle fait intervenir un grand nombre d'enzymes incluant une iduronate-2-sulfatase, une α -L-iduronidase, une héparane *N*-sulfatase, une acétylCoA: α -glucosaminide acétyltransférase, une α -*N*-acétylglucosaminidase, une β -glucuronidase et encore une *N*-acétylglucosamine-6-sulfatase (Figure 28).

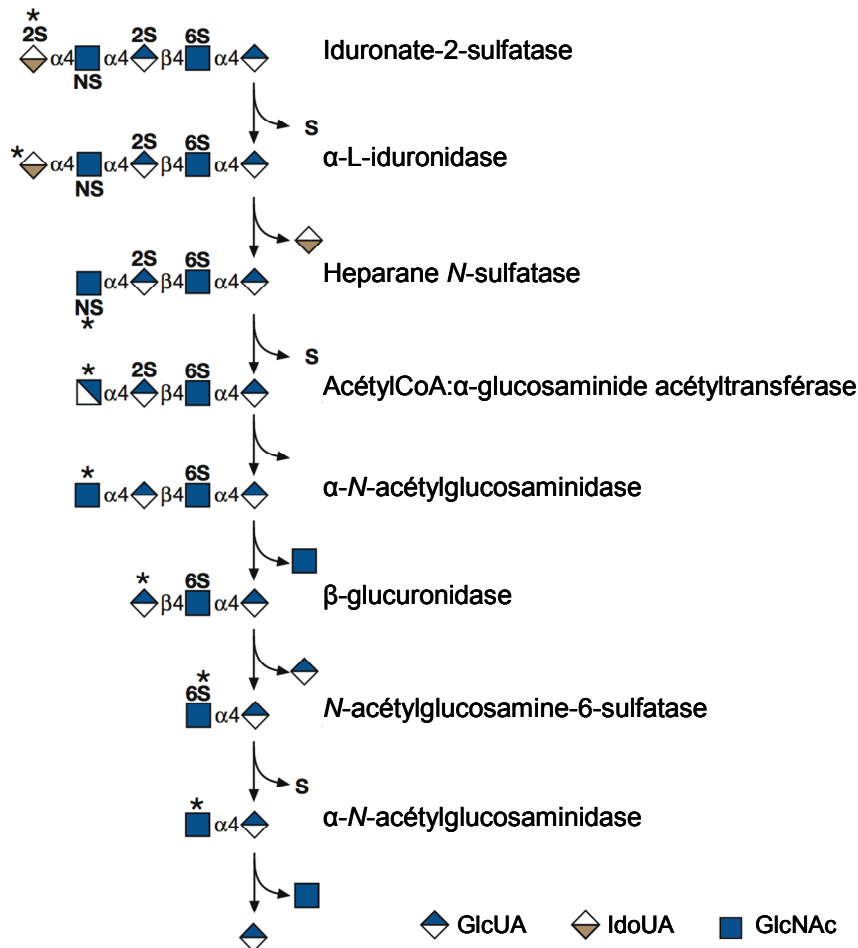


Figure 28 : Exemple type de la dégradation lysosomale d'une chaîne HS.

L'absence ou la déficience d'une de ces enzymes entraîne un blocage du processus de dégradation des polymères héparaniques qui vont alors s'accumuler dans le lysosome. A ce jour, sept déficiences enzymatiques ont ainsi été impliquées dans un défaut de dégradation des HS conduisant chacune à un syndrome parfaitement identifié (Wraith, 1995). Le tableau 7 répertorie ces sept enzymes et le nom des pathologies qui s'y rapportent.

Tableau 7 : Les différentes mucopolysaccharidoses (MPS).

Maladie	Nom	Déficiences enzymatique	Référence bibliographique
MPS I	Hurler Hurler/Scheie Scheie	α -L-iduronidase	Scott <i>et al.</i> , 1992 ; Tieu <i>et al.</i> , 1995 ; Beesley <i>et al.</i> , 2001
MPS II	Hunter	Iduronate-2-sulfatase	Froissart <i>et al.</i> , 2007
MPS III A	Sanfilippo A	Héparane N-sulfatase	Blanch <i>et al.</i> , 1997
MPS III B	Sanfilippo B	α -N-acétylglucosaminidase	Weber <i>et al.</i> , 1999
MPS III C	Sanfilippo C	AcétylCoA: α - glucosaminide acétyltransférase	Ausseil <i>et al.</i> , 2004
MPS III D	Sanfilippo D	N-acétylglucosamine-6- sulfatase	Beesley <i>et al.</i> , 2003
MPS VII	Sly	β -glucuronidase	Tomatsu <i>et al.</i> , 1991

La découverte de fragments tronqués du lien tétrasaccharidique GlcUA(β 1-3)Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Xyl β 1-O-[Ser] terminé par un résidu de xylose ou par un résidu de galactose suggèrent qu'une β -xylosidase et une β -galactosidase existent. Toutefois, les détails concernant la dégradation du lien tétrasaccharidique restent à clarifier (Takagaki *et al.*, 1988).

Travaux Personnels

CHAPITRE I

Identification des glucosaminyl
sulfotransférases impliquées dans la
synthèse du motif HS spécifique de la CyPB

INTRODUCTION

Les cyclophilines sont des protéines à activité enzymatique de type peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase (PPIase), initialement identifiées comme étant les récepteurs d'un médicament à activité immunosuppressive, la cyclosporine A (CsA) (Handschumacher *et al.*, 1984; Fischer *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1989; Schreiber, 1991).

Ce sont des protéines ubiquitaires très conservées au cours de l'évolution. Au sein de cette famille, les cyclophilines A et B (CyPA et CyPB) ont été caractérisées pour leurs propriétés inflammatoires (Bukrinsky, 2002). Les deux protéines possèdent de fortes homologies de séquence dans le noyau central qui contient le site catalytique et la poche de fixation de la CsA. En revanche, elles se différencient par leurs extrémités N- et C-terminales, ce qui leur confère des localisations et fonctions différentes (Ryffel *et al.*, 1993; Galat, 1999). Ainsi, contrairement à la CyPA qui est essentiellement cytosolique, la CyPB est retrouvée dans les vésicules du réticulum endoplasmique et la voie de sécrétion. Il a d'ailleurs été mis en évidence que la CyPB est présente dans la matrice extracellulaire et dans les milieux de sécrétion tels que le lait et le plasma (Spik *et al.*, 1991; Allain *et al.*, 1995; De Ceuninck *et al.*, 2003). Plusieurs études ont montré que les deux cyclophilines interviennent dans la modulation de la réponse inflammatoire. Ainsi, l'expression et la sécrétion des CyPA et CyPB sont augmentées en réponse au LPS et/ou à un stress oxydatif (Sherry *et al.*, 1992; Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 2000; Liao *et al.*, 2000). Les deux protéines possèdent une activité chimio-attractante pour les lymphocytes T, les neutrophiles et les macrophages. En revanche, seule la CyPB est capable d'augmenter l'adhérence de ces cellules sur la matrice extracellulaire et la synthèse de facteurs inflammatoires tels que le TGF- β . L'activité pro-adhésive de la CyPB est liée à l'activation des intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 4\beta 7$ et dépendante des interactions avec les HSPGs membranaires (Sherry *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1992; Allain *et al.*, 2002; Carpentier *et al.*, 2002).

La fixation de la CyPB à la surface de ses cellules cibles fait intervenir deux types de sites de haute affinité ($K_d \approx 10$ nM) : un récepteur protéique identifié au CD147, une glycoprotéine membranaire initialement décrite comme étant un inducteur de métalloprotéinases (Pushkarsky *et al.*, 2001; Yurchenko *et al.*, 2001; 2002), et des chaînes HS portées par des HSPGs membranaires (Denys *et al.*, 1998; Allain *et al.*, 2002). A l'aide de protéines modifiées par mutagenèse dirigée, il a été démontré que la région de la CyPB impliquée dans les interactions avec le récepteur protéique recouvre le noyau central conservé

des cyclophilines, tandis que le domaine de fixation aux chaînes HS requiert les séquences ³KKK⁵ et ¹⁴YFD¹⁶ localisées dans la région N-terminale de la CyPB. Ces deux régions d'interaction sont localisées sur deux pôles diamétralement opposés et permettent ainsi à la CyPB d'interagir simultanément avec ses deux sites de fixation. De plus, le peptide N-terminal est spécifique de la CyPB, ce qui explique pourquoi les autres cyclophilines sont incapables de fixer les HS avec une forte affinité (Denys *et al.*, 1998; Carpentier *et al.*, 1999).

La fixation des CyPA et CyPB induit un chimiotactisme des lymphocytes T, des neutrophiles et des macrophages par un mécanisme lié à la génération d'un flux calcique et l'activation de la voie p44/p42 MAPK (Yurchenko *et al.*, 2001; Allain *et al.*, 2002). Ces réponses sont dépendantes du CD147, mais il semble que les HSPGs soient impliqués dans les réponses de plus forte amplitude induites par la CyPB. En effet, le signal calcique et l'activation de la voie MAPK induits par la CyPB sont plus importants que ceux induits par la CyPA ou les mutants CyPB_{KKK}- et CyPB_{ΔYFD}, dépourvus de leur capacité de fixation aux HSPGs. De plus, l'élimination des chaînes HS par traitement à l'héparinase I inhibe la phosphorylation de ERK1/2. Quant à l'activité pro-adhésive de la CyPB, elle est strictement dépendante des HSPGs présents à la surface des cellules cibles. En effet, la CyPA ou les mutants CyPB_{KKK}- et CyPB_{ΔYFD} sont incapables d'induire l'adhérence des cellules, et la CyPB n'a plus d'activité pro-adhésive pour les cellules traitées par l'héparinase I (Yurchenko *et al.*, 2001; Allain *et al.*, 2002; Carpentier *et al.*, 2002; Yurchenko *et al.*, 2002). Plus récemment, l'utilisation d'anticorps anti-HSPG bloquants et l'invalidation des HSPGs par ARN interférence ont permis de démontrer que les activités de la CyPB sont dépendantes d'un seul HSPG, le syndécan-1 (Pakula *et al.*, 2007). De plus, nous avons également démontré que l'adhérence des lymphocytes T et des monocytes/macrophages à la fibronectine induite par la CyPB nécessite la formation d'un complexe multimoléculaire constitué de l'association du complexe syndécan-1/CD147 à une protéine activatrice des intégrines β1, le CD98 (Melchior *et al.*, 2008). L'ensemble de ces données indiquent que la fixation de la CyPB sur les chaînes HS du syndécan-1 est nécessaire pour sa présentation au CD147, ce qui permet le recrutement du CD98 et l'induction de signaux intracellulaires d'amplitude suffisante pour obtenir les réponses observées chez les cellules cibles de la CyPB.

Les deux sites de fixation membranaires de la CyPB, CD147 et syndécan-1, sont présents à la surface d'un grand nombre de cellules. Toutefois, la majorité de ces cellules ne fixe pas la CyPB. Ainsi, il a été montré que les macrophages, les neutrophiles et seuls 20 à 40 % des lymphocytes T circulants répondent à la CyPB, alors que d'autres cellules telles que

les lymphocytes B, les éosinophiles et la majorité des cellules non inflammatoires ne fixent pas la CyPB. Ces résultats indiquent que la présence du CD147 et du syndécan-1 est nécessaire mais insuffisante pour expliquer la spécificité d'action de la CyPB. En revanche, il a été démontré que la variabilité structurale des chaînes HS est dépendante du type cellulaire. Il est donc envisageable que la reconnaissance de la CyPB soit uniquement liée à la présence d'un motif héparinique porté par les chaînes HS du syndécan-1 présent sur les cellules cibles de la CyPB.

Afin de vérifier cette hypothèse, la caractérisation du motif HS impliqué dans les interactions avec la CyPB a été entreprise au Laboratoire. Grâce à une méthode de retard sur gel en condition non dénaturante couplée à l'utilisation d'oligosaccharides fluorescents, il a été démontré que la taille minimale du motif héparinique reconnu par la CyPB est un octasaccharide (Figure 29) (Vanpouille *et al.*, 2004).

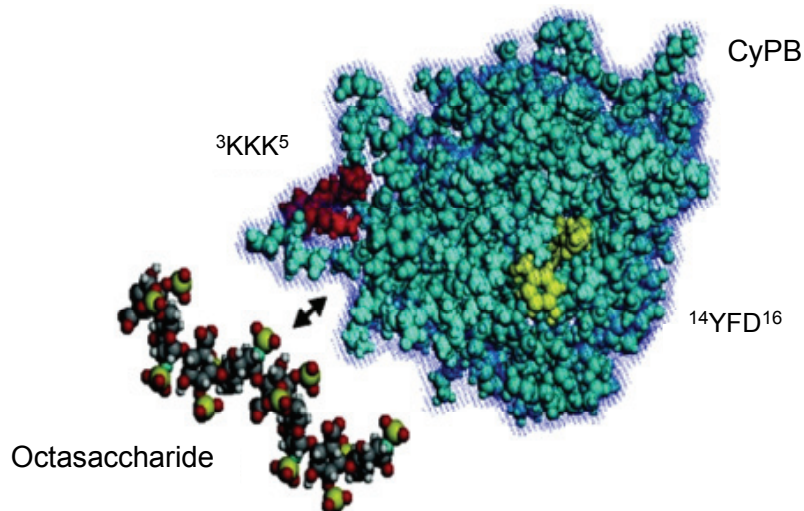


Figure 29 : Représentation tridimensionnelle de la CyPB et d'un octasaccharide héparinique. Les tripeptides, $^3\text{KKK}^5$ et $^{14}\text{YFD}^{16}$, interagissant avec l'octasaccharide sont indiqués. Ils sont arrangés dans la structure de la CyPB de telle façon qu'ils délimitent une gouttière dans laquelle un motif octasaccharidique peut se loger (d'après Vanpouille *et al.*, 2004).

La structure de l'héparine est similaire aux régions fortement sulfatées des HS et des travaux antérieurs réalisés au Laboratoire ont montré que l'héparine et les HS présents à la surface cellulaire des lymphocytes T possèdent les mêmes capacités d'interaction avec la CyPB (Denys *et al.*, 1998). Ainsi, afin de déterminer les singularités structurales du motif de fixation de la CyPB, nous avons réalisé des expériences de compétition de fixation de la CyPB par des dérivés hépariniques modifiés par voie chimique.

Les données actuelles suggèrent que la diversité structurale des motifs HS reconnus par les HBPs est issue de la régulation fine de la voie de biosynthèse. Chaque famille d'enzymes impliquée dans ce processus est représentée par plusieurs isoformes qui possèdent des spécificités de substrat différentes et sont exprimées à des taux variables selon le type cellulaire. En complément de l'analyse structurale proprement dite, nous avons donc exploré les relations existant entre l'expression des différentes glucosaminyl sulfotransférases et les réponses induites par la CyPB, afin de corréler l'existence du site de fixation spécifique de la CyPB sur ses cellules cibles à l'expression et à l'activité de certaines sulfotransférases.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans *The Journal of Biological Chemistry* et d'un article soumis à publication dans ce même journal :

Publication 1 :

Vanpouille, C., **Deligny, A.**, Delehedde, M., Denys, A., Melchior, A., Lienard, X., Lyon, M., Mazurier, J., Fernig, D. G. & Allain, F. 2007, The heparin/heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B contains a 3-*O*-sulfated *N*-unsubstituted glucosamine residue, *J Biol Chem*, **282**, 24416-24429.

Publication 2 :

Deligny, A., Denys, A., Marcant, A., Melchior, A., Mazurier, J., van Kuppevelt, T. H. & Allain, F. *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase 2 contributes to the synthesis of heparan sulfate motifs with cyclophilin B-binding and activating properties (en révision dans *J Biol Chem*).

PUBLICATION 1

The Heparin/Heparan Sulfate Sequence That Interacts with Cyclophilin B Contains a 3-O-Sulfated *N*-Unsubstituted Glucosamine Residue*

Received for publication, March 2, 2007, and in revised form, June 12, 2007. Published, JBC Papers in Press, June 22, 2007, DOI 10.1074/jbc.M701835200

Christophe Vanpouille^{‡1}, Audrey Deligny[‡], Maryse Delehedde^{§2}, Agnès Denys[‡], Aurélie Melchior[‡], Xavier Liénard[‡], Malcolm Lyon[¶], Joël Mazurier[‡], David G. Fernig[§], and Fabrice Allain^{‡3}

From the [‡]Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche Number 8576 du CNRS, Institut de Recherche Fédératif No. 147, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France, the [§]School of Biological Sciences, University of Liverpool, Liverpool L69 7ZB, United Kingdom, and the [¶]Department of Medical Oncology, University of Manchester, Christie Hospital, Manchester M20 4BX, United Kingdom

Many of the biological functions of heparan sulfate (HS) proteoglycans can be attributed to specialized structures within HS moieties, which are thought to modulate binding and function of various effector proteins. Cyclophilin B (CyPB), which was initially identified as a cyclosporin A-binding protein, triggers migration and integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes by a mechanism dependent on interaction with cell surface HS. Here we determined the structural features of HS that are responsible for the specific binding of CyPB. In addition to the involvement of 2-*O*, 6-*O*, and *N*-sulfate groups, we also demonstrated that binding of CyPB was dependent on the presence of *N*-unsubstituted glucosamine residues (GlcNH₂), which have been reported to be precursors for sulfation by 3-*O*-sulfotransferases-3 (3-OST-3). Interestingly, 3-OST-3B isoform was found to be the main 3-OST isoenzyme expressed in peripheral blood T lymphocytes and Jurkat T cells. Moreover, down-regulation of the expression of 3-OST-3 by RNA interference potently reduced CyPB binding and consequent activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases. Altogether, our results strongly support the hypothesis that 3-*O*-sulfation of GlcNH₂ residues could be a key modification that provides specialized HS structures for CyPB binding to responsive cells. Given that 3-*O*-sulfation of GlcNH₂-containing HS by 3-OST-3 also provides binding sites for glycoprotein gD of herpes simplex virus type I, these findings suggest an intriguing structural linkage between the HS sequences involved in CyPB binding and viral infection.

Heparan sulfate (HS)⁴ proteoglycans on the cell surface or in the extracellular matrix are involved in developmental, regen-

eratory, and inflammatory processes, as a consequence of their interactions with multiple proteins. These interactions are mediated mainly via the HS moieties of the proteoglycans, which bind to growth factors, cytokines, matrix components, enzymes, and enzyme inhibitors and thereby regulate tissue distribution, biological availability, and activity of the proteins. Characterization of heparin/HS oligosaccharides with high affinity to proteins such as antithrombin and growth factors has led to the identification of specialized protein binding domains with structural features exhibiting varying degrees of specificity (1–3). The structural distinctions in these functional heparin/HS domains are derived from enzymatic modifications in the Golgi apparatus of the nascent polymer composed of alternating *D*-glucuronic acid (GlcUA) and *N*-acetylated *D*-glucosamine (GlcNAc) units. The nonsulfated precursor is first subject to partial *N*-deacetylation/*N*-sulfation of GlcNAc residues, which leads to the occurrence of consecutively *N*-sulfated regions, regions that escape modification and remains *N*-acetylated, and regions of alternating *N*-acetylated and *N*-sulfated disaccharide units. Sometimes, the *N*-deacetylation/*N*-sulfation reaction is partial, giving rise to *N*-unsubstituted glucosamine units (GlcNH₂). The further modification reactions include C₅ epimerization of some GlcUA into *L*-iduronic acid (IdoUA), 2-*O*-sulfation of IdoUA, and 6-*O*-sulfation of GlcN units. Rarely, *O*-sulfation also occurs at position 2 of GlcUA and at position 3 of *N*-sulfated GlcN (GlcNS) and of GlcNH₂ units, the latter modifications are hallmarks for the respective binding HS domains of antithrombin and glycoprotein gD of herpes simplex virus type I (HSV-1). These modifications are regulated by HS biosynthetic enzymes, including *N*-deacetylases/*N*-sulfotransferases, 2-*O*-sulfotransferase (2-OST), 3-*O*-sulfotransferases (3-OST), 6-*O*-sulfotransferases (6-OST), and C₅-epimerase. Importantly, spatially and temporary coordinated modifications of nascent HS precursor by these enzymes are

*This work was supported by the CNRS, the Université des Sciences et Technologies de Lille, France, the Cancer and Polio Research Fund, and the North West Cancer Research Fund, UK. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Present address: Laboratory of Molecular and Cellular Biophysics, NICHD, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892.

² Present address: ENDOTIS Pharma, Parc Eurasanté, 59120 Loos, France.

³ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-3-20-33-72-39; Fax: 33-3-20-43-65-55; E-mail: fabrice.allain@univ-lille1.fr.

⁴ The abbreviations used are: HS, heparan sulfate; ANTS, 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid; CyPB, cyclophilin B; dp, degree of polymeriza-

tion; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FGF-2, fibroblast growth factor-2; ΔFMV, variation of fluorescence mean value; GFP, green fluorescent protein; GlcN, *D*-glucosamine, GlcNAc, *N*-acetylated *D*-glucosamine; GlcNH₂, *N*-unsubstituted *D*-glucosamine; GlcNS, *N*-sulfated *D*-glucosamine; GlcUA, *D*-glucuronic acid; HGF, hepatocyte growth factor; HSV-1, herpes simplex virus type I; IdoUA, *L*-iduronic acid; MAPK, mitogen-activated protein kinase; OST, *O*-sulfotransferase; siRNA, small-interfering RNA; BSA, bovine serum albumin; HGF, hepatocyte growth factor.

thought to control the activities of HS-binding proteins, presumably through the interactions with structurally distinct HS species from different cell types and tissue loci (3, 4). In support of this idea, immunohistochemical studies of tissues with antibodies to HS epitopes have demonstrated differences within HS in distinct cellular environments (5). Structural characterization of the binding heparin/HS domain of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) has illustrated the importance of contiguous stretches of the disulfated disaccharide IdoUA2S-GlcNS \pm 6S for efficient interaction. Surprisingly, experimental data have demonstrated that 6-O-sulfation of GlcNS, although not directly involved in the binding of the protein to heparin/HS, is an absolute requirement for proliferative activity of FGF-2 (6, 7). Therefore, the structural heterogeneity of HS could explain the remarkable tissue-specific activities of FGF-2, with regard to the ability of HS to form active complexes with the protein and its cognate signaling receptor on responsive cells (8). Another example of binding heparin/HS domain specifically involved in protein interaction is the well defined pentasaccharide required for the binding and activity of antithrombin-III. The most distinguishing feature of this motif is the unusual 3-O-sulfated GlcNS unit, which is essential for high affinity binding of antithrombin and anti-coagulant activity (9, 10).

With regard to the ability of HS domains to form active complexes with extracellular soluble mediators, it could be hypothesized that many of the regulatory functions attributed to proteoglycans may actually be related to the interactions with cell-specific HS species. A class of recently identified inflammatory mediators is secreted cyclophilins (11–14), which are mostly known as cyclosporin A-binding proteins (15, 16). We demonstrated that cyclophilin B (CyPB) triggers chemotaxis and integrin-mediated adhesion of T lymphocytes mainly of the CD4⁺/CD45RO⁺ phenotype (11). These activities are dependent on the interactions with two types of binding sites, CD147 and cell surface HS. By using site-directed mutated ligands, we demonstrated that the peptides ³KKK⁵ and ¹⁴YFD¹⁶, which are located in the N-terminal extension of CyPB, are required for efficient binding of CyPB to heparin and cell surface HS expressed on T cells (17). CyPB_{KKK}, for which the sequence ³KKK⁵ was replaced by AAA, and CyPB_{ΔYFD}, which corresponds to the protein depleted of the sequence ¹⁴YFD¹⁶, were both deficient in their capability to induce cell adhesion to fibronectin (18). Most recently, we found that octasaccharides are the minimal length unit required for efficient binding of CyPB to heparin and cell surface HS of T lymphocytes. Molecular modeling confirmed that ³KKK⁵ and ¹⁴YFD¹⁶ tripeptides were spatially arranged in the three-dimensional structure of the protein, so that they may act synergistically to form a binding site for an octasaccharide (19). Therefore, an intriguing possibility is that the pro-migratory activity of CyPB may be dependent on interaction with specific binding HS domain present at the cell surface of responsive T cells.

The focus of this study was to characterize structural features within cell surface HS, which could explain the specific interaction with CyPB. Heparin is structurally related to the sulfated regions of HS, and we demonstrated that heparin and cell surface HS of T lymphocytes share the same capability to interact with CyPB (20). Therefore, heparin and chemically modified

derivatives were used to determine the structural features within HS for optimal CyPB binding. In addition to the requirement of *N*- and *O*-sulfate groups, which is a common feature for binding of numerous heparin-binding proteins, we demonstrated that interaction of CyPB with heparin/HS was strictly dependent on the presence of GlcNH₂ residues. 3-OST are represented by seven distinct isoenzymes that are expressed at distinct levels in various human tissues, suggesting their involvement in making tissue-specific HS with different biological functions (9, 21, 22). Interestingly, certain isoforms of 3-OST have been reported to sulfate GlcNH₂-containing disaccharides within HS (23, 24). Therefore, we explored the relationships between the expression of multiple 3-OST isoforms and the responses triggered by CyPB binding to T cells. Our results suggest an intriguing implication of the GlcNH₂ residue and 3-O-sulfation by 3-OST3B isoform in efficient binding of CyPB to responsive T cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials and Cells—Human recombinant CyPB and FGF-2 were produced and purified as described (25, 26). Hepatocyte growth factor (HGF) was from R & D Systems (Abingdon, UK). Heparin-derived octasaccharides were prepared from partial heparinase I (EC 4.2.2.7) digests of pig mucosal heparin (Sigma), as described (19), the main disaccharide unit (>75%) being IdoUA2S-GlcNS6S. Biotinylated bovine serum albumin (BSA) conjugated to heparin via its reducing end was purchased from Sigma. *N*-Desulfated, *N*-desulfated *N*-reacetylated, and *N*-acetylated heparin derivatives were produced as described (27). 2-*O*-Desulfated and 6-*O*-desulfated heparins were a generous gift from B. Mulloy (National Institute for Biological Standards and Control, Herts, UK). Cell surface HS were purified from peripheral blood T lymphocytes as described (19). Briefly, cell surface proteoglycans were purified by anion exchange chromatography on DEAE-Sepharose (Amersham Biosciences) and treated by enzymatic digestion of anionic contaminants by sequential treatments with chondroitinase ABC (EC 4.2.2.4), DNase I (EC 3.1.21.1), and neuraminidase (EC 3.2.1.18) (all enzymes from Sigma). Glycopeptides were then obtained by digestion with Pronase E (EC 3.4.24.4) (Sigma) overnight at 37 °C and subjected to nonreductive β -elimination. The liberated glycosylamines were converted in reducing oligosaccharides through the addition of boric acid and freeze-dried before use. Reagents for electrophoresis were from BioRad. The pan-extracellular signal-regulated kinase (ERK) antibodies, which recognize p44/42 mitogen-activated protein kinases (MAPK) regardless of their phosphorylation status, and the antibodies to phosphorylated forms of p44/42 MAPK were purchased from Sigma and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), respectively. Secondary peroxidase-labeled anti-IgG antibodies were from Amersham Biosciences. All other chemicals, except where otherwise mentioned, were purchased from Sigma.

Human citrated venous blood samples were obtained from the local blood transfusion center (Etablissement de Transfusion Sanguine, Lille, France). Isolation of peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes was conducted by exhaustive negative selection as described (11, 28). The purity of the CD4⁺ T cell

Involvement of GlcNH₂3S in CyPB Binding to HS

population was assessed by flow cytometry and found to be >95%. Heparinase-treated T lymphocytes were obtained by incubating cells with 0.75 unit of heparinase I/10⁶ cells for 2 h at 37 °C (11, 20). Human lymphoblastic Jurkat T cells (clone E6-1, ATCC TIB-152) and promonocytic leukemia THP-1 cells (88081201, ECACC, Porton Down, Salisbury, UK) were routinely cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 10 mM gentamycin, in a 5% CO₂-enriched atmosphere at 37 °C. To induce responsiveness to CyPB, THP-1 cells were differentiated for 72 h with 50 nM 1,25-dihydroxyvitamin D₃, as described (29). Human epithelial carcinoma HeLa cells (ATCC-CCL2) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium containing fetal calf serum, L-glutamine, and gentamycin, as above.

Biotinylation of Heparin and Oligosaccharides—*N*-Hydroxysuccinimide-LC-biotin (Pierce) was used to biotinylate heparin through internal free amino groups, as described (30). According to the manufacturer (Sigma), biotinylated heparin-BSA contains 50% (w/w) heparin and 3–5 biotin residues per molecule of conjugate. Heparin chains were linked via reductive amination of the terminal reducing sugar to BSA with a heterobifunctional cross-linking reagent, and conjugation of biotin to the albumin moiety was performed via biotinamidocaproic acid (31). To check whether biotinylation did not lead to partial derivatization of free amino groups of heparin, we quantified the amount of biotin residues that are distributed between glycanic and protein moieties of heparin-BSA conjugate, by using 4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid. Briefly, biotinylated heparin-BSA conjugate was treated with either 0.75 unit/ml heparinase I or 1% Pronase (w/v) overnight at 37 °C, in order to liberate biotin residues that would be covalently linked to heparin or albumin moieties, respectively. Products of enzymatic digestion were then separated from not degraded material by gel filtration, and the amount of biotin in solution was determined by competition with known amounts of 4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid bound to avidin, according to the protocol provided by Pierce. As expected, biotin residues were only recovered in the Pronase-sensitive fraction, indicating that the procedure of biotinylation of heparin-BSA conjugate has only modified primary amino groups of some lysine residues in the albumin moiety. Therefore, this type of chemical linkage would allow access of ligands to the full length of the glycanic polymer and provide heparin biosensor surfaces with high binding capacity. Heparin-derived oligosaccharides were biotinylated at their reducing ends, as described in Ref. 32. Briefly, oligosaccharides and biotin-*X-X*-hydrazide (Calbiochem) were allowed to react for 2 h at room temperature. Unreacted biotin reagent was removed by ion exchange chromatography, and successful biotinylation of oligosaccharides was confirmed by a dot-plot procedure (32).

Immobilization of Heparin and Oligosaccharides—Streptavidin was immobilized on planar aminosilane surfaces according to the recommendations of the manufacturer (IASys, Neosensors, Durham, UK) and then allowed to react with biotinylated derivatives. Glycosaminoglycans give a variable and poor response in optical biosensors (32–34). Therefore, the amount of biotinylated molecules immobilized onto the cuvettes was titrated indirectly by measuring the response to a concentration

of HGF above the K_d value (35, 36). Sufficient amounts of each size of oligosaccharides or heparin were immobilized to yield a response of no more than 100 arc seconds (600 arc seconds corresponds to 1 ng of protein/mm² of the cuvette surface) in the presence of 25 nM HGF. The distribution of bound HGF, and by inference immobilized heparin or oligosaccharides on the surface of the biosensor cuvette, was inspected by examination of the resonance scan in the course of the association phase of binding reactions. This allowed showing that at all times HGF was distributed uniformly on the sensor surface and therefore was not aggregated. In addition, controls demonstrated that in phosphate-buffered saline supplemented with 0.2% Tween 20 (PBS-T, phosphate buffered saline/Tween 20), CyPB, FGF-2, or HGF did not bind to aminosilane surface or to a streptavidin surface derivatized with biotin hydrazide (results not shown).

Optical Biosensor Binding Assays—A binding assay consisted of adding the ligands at a known concentration in 5 μ l of PBS-T into a cuvette containing either heparin- or oligosaccharide-derivatized aminosilane surface equilibrated in 45 μ l of PBS-T. The association reaction was followed over 250 s. The cuvette was then washed three times with 50 μ l of PBS-T, and the dissociation of bound ligand into the bulk PBS-T was followed over time. The surface was regenerated by washing twice with 50 μ l of 2 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7.2. All biosensor experiments were carried out at least three times on at least two different surfaces. Binding parameters were calculated from the association and dissociation phases of the binding reactions as described previously (30, 32–35). A single binding assay yielded four binding parameters as follows: the initial rate of association, the on-rate constant (k_{on}), and the extent of binding, all calculated from the association phase, and the off-rate constant (k_{off}), calculated from the dissociation phase. To avoid artificial second phase binding due either to rates of diffusion of soluble ligands approaching or exceeding the rate of association or to steric hindrance at the binding surface, k_{on} was only determined at low concentrations of ligands, whereas k_{off} was preferentially measured in separate experiments, using higher concentrations of CyPB and competing heparin (100 μ g/ml) in the dissociation buffer to avoid any rebinding artifacts (34). The equilibrium constant (K_d) was calculated both from the ratio of the dissociation and association rate constants and, independently, from the extent of binding at the equilibrium in order to provide an estimate of the self-consistency of the results. A single binding site model fitted the data at least as well as a two-site binding model in both the competitive binding assays and the kinetic experiments. Therefore, the binding reaction between the ligands and immobilized heparin was deemed to be monophasic, and a single site model was used to calculate all binding parameters using the nonlinear curve fitting FastFit software (Neosensors). In competitive binding assays, an aminosilane cuvette derivatized with biotinylated BSA-heparin was used with a customized program for the Iasys Auto+ instrument (Neosensors). The cuvette was equilibrated at 20 °C in 40 μ l of PBS-T, and 5 μ l of the relevant dilutions of chemically modified heparins in PBS-T was added. Once the base line was stable, 5 μ l of CyPB was added to initiate the association phase. The binding reaction was continued for 5 min. The surface was

washed three times with 50 μ l of PBS-T and was regenerated with 2 M NaCl. No change was detected in the amount of CyPB bound to immobilized heparin in the absence of competing heparin derivatives at the start and the end of the experiments. The extent of binding was calculated by fitting the association curve to a single site binding model using the nonlinear curve fitting FastFit software.

Deaminative Cleavage of Heparin/HS with Nitrous Acid—To affect *N*-unsubstituted or *N*-sulfated GlcN residues, heparin, cell surface HS, and heparin-derived octasaccharides were cleaved with nitrous acid at high pH (pH 4.0) or at low pH (pH 1.5), respectively (37). In both reactions, freshly prepared reagent was added to the dry oligosaccharide sample and incubated for the indicated times at room temperature. Reactions were stopped by the addition of saturated Na₂CO₃ solution, and the cleavage products were desalted on a Sephadex G-10 column (Amersham Biosciences). To separate CyPB-specific and nonspecific octasaccharides, heparin-derived octasaccharides were incubated with CyPB in 20 mM phosphate, 400 mM NaCl buffer, and the complexes formed by the association of the protein with specific octasaccharides were purified by gel filtration on a Sephadex G-25 column. Following desalting, specifically bound octasaccharides were eluted from the complex by incubation overnight with 1 M NaCl, desalted, and dried under vacuum. In some experiments, octasaccharides were labeled with the fluorescent probe 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid (ANTS) at the reducing end and then treated with nitrous acid. Fluorescent derivatization was performed by reductive amination as described previously (19). Briefly, dried sample (5–50 nmol) was dissolved in 5 μ l of acetic acid/water (3:17, v/v) containing 0.2 M ANTS (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) and 5 μ l of dimethyl sulfoxide containing 1 M sodium cyanoborohydride (Fluka, Buchs, Switzerland). The mixture was incubated at 37 °C for 16 h, desalted on a 10-ml desalting column of Sephadex G-15 column (Amersham Biosciences) equilibrated in water, and thereafter dried under vacuum by using a centrifugal vacuum evaporator. In parallel experiments, octasaccharides were first cleaved by nitrous acid and the degradation products were then derivatized with ANTS. In both cases, the cleavage products were resolved by electrophoresis.

Carbohydrate Electrophoresis and Mobility Shift Assay—Heparin, cell surface HS, and products from either deaminative cleavage or heparinase-I digestion (4 μ g per sample) were incubated in the absence or presence of CyPB (4 μ g) in 40 μ l of electrophoresis binding buffer, containing 20 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9, for 30 min at room temperature. The samples were then supplemented with 10 μ l of 60% (v/v) glycerol and subjected to electrophoresis in a 10% (w/v) native polyacrylamide gel in 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4. Electrophoresis was carried at 100 V for 2–3 h at 4 °C, in an SE 600 Standard gel system (18 \times 16 cm) (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco). The electrophoretic buffer used was 40 mM Tris, 40 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0. A mixture of bromphenol blue and phenol red was used as electrophoresis markers. The position of free and CyPB-bound oligosaccharides was then visualized by staining the gel with 0.08% (w/v) aqueous azure A (38). To check the

position of CyPB, the gel was transferred onto nitrocellulose (Sartorius, Göttingen, Germany) and immunostained with specific rabbit polyclonal anti-CyPB antibodies as described (19). ANTS-labeled oligosaccharides were mixed in electrophoresis buffer, supplemented with 60% glycerol (8:2, v/v), and subjected to electrophoresis in a 20% (w/v) native polyacrylamide gel (1 μ g per lane, 5 μ l). Electrophoresis was carried at 100 V for 1–2 h at 4 °C in an SE 250 Mighty Small II mini-gel system (10 \times 8 cm) (Hoefer). At the end of the electrophoresis, images were acquired with the gel Doc 2000 Image analysis apparatus from Bio-Rad, equipped with a 365 nm UV-transilluminator. Analysis was performed with the supplied software Quantity One.

Flow Cytometry Analysis—Phenotype of peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes was determined by incubating cells (5 \times 10⁵ cells per sample) in Dulbecco's phosphate-buffered saline containing 0.5% BSA (DPBS/BSA) supplemented with the appropriate monoclonal anti-CD antibodies or the respective isotype-matched control IgG for 1 h at 4 °C (28). After washing, cells were labeled for 1 h at 4 °C with fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgG (1/64). For the detection of cell surface HS, T cells were first washed rapidly in DPBS containing 0.6 M NaCl, in order to remove cationic molecules that could mask HS epitopes, and thereafter incubated with mouse monoclonal anti-HS antibody (clone MAB2040, Chemicon Int., Temecula, CA; 1/100) or irrelevant control antibodies (1/2000) for 1 h at 4 °C in DPBS/BSA. After washing, fluorescein-conjugated anti-mouse IgM antibodies were added for another 1-h incubation. Cells were washed twice and immediately used for analysis. Data were monitored on a flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences) and analyzed with Cellquest software. Results are expressed as variations of fluorescence mean values (Δ FMV %) (28).

Cell Binding Assays—For competitive binding assays, interaction between CyPB and cell surface HS was performed in 96-well microtiter plates (Nunc-Polylabo, Strasbourg, France), essentially as described (18). Briefly, peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes (10 \times 10⁶ cells per ml in DPBS/BSA) were allowed to adhere to immobilized CyPB (1 μ g per well) in the presence of increasing concentrations of heparin derivatives for 1 h at 20 °C. After washing with PBS, adherent cells were fixed with 3% (v/v) formaldehyde, pH 7.8, stained with 1% (w/v) methylene blue in 100 mM borate buffer, pH 8.2, and then lysed with 0.1 M HCl. The absorbance, which is proportional to the number of adhered cells, was measured at 590 nm with a microplate Bio-Rad reader model 550. Cell adhesion was estimated by using standard curves in which absorbance was related to cell numbers. Results were obtained from at least three separate experiments performed with CD4⁺ T lymphocytes from different donors and are expressed as percentage of initially added cells that remained fixed to the adhesive substrate. Statistical significance was determined using the Student's *t* test, and *p* values <0.05 were considered as significant.

Semi-quantitative RT-PCR—Total RNA was extracted from 5 \times 10⁶ cells using a NucleoSpin RNA II kit, according to the instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Reverse transcription was performed from 2 μ g of total RNA with an oligo(dT) primer and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI). The PCRs

Involvement of GlcNH₂3S in CyPB Binding to HS

were carried out using Readymix RedTaq PCR mix. The synthetic primers for 3-OST-1, -2, -3A, -3B, -4, -5, and -6 were designed according to the published cDNA sequences (NCBI accession numbers: NM_005114, NM_006043, NM_006042, NM_006041, NM_006040, NM_153612 and NM_001009606, respectively). Primer sets and expected sizes of PCR products were as follows: 3-OST-1, 5'-TTC CCT GCT GCG GCA CTT CAT-3' (sense) and 5'-ACG GGT AGG GCT TGT GCT TCT-3' (antisense), product size 582 bp; 3-OST-2, 5'-GAA TAA GCC CAC GAA AGG AAA-3' (sense) and 5'-TAT GGG CAG AAA GGA GAA TGA-3' (antisense), product size 272 bp; 3-OST3A, 5'-GAG GCG GCC TGG GAA GAA GAG T-3' (sense) and 5'-AGC TGC GGT CGA AGA AGT GGG-3' (antisense), product size 247 bp; 3-OST-3B, 5'-ACT CCC CAA GCC CCA TCT CCA-3' (sense) and 5'-ATG AGG CCC GCT GTC CTG TTT-3' (antisense), product size 433 bp; 3-OST-4, 5'-GAA GCC TTC TTT CCA AGA GCC-3' (sense) and 5'-GGT AAG GTA ACC TCC CAC CAA-3' (antisense), product size 232 bp; 3-OST-5, 5'-ACT GGG AGG ACA TTG AAC TGG-3' (sense) and 5'-AAA GAT GCG ACT ATG CAG ACA-3' (antisense), product size 239 bp; 3-OST6, 5'-CGA AGC TGA TCG TGG TGG TGC-3' (sense) and 5'-CCC TTG GTG GCG TTG AAG TAG AAG-3' (antisense), product size 334 bp. Optimal semi-quantitative PCR conditions were established to remain in the exponential phase of amplification. The following conditions were retained: 32 cycles of reaction consisting of 60 s for denaturation at 94 °C, 60 s for annealing at 60 °C for 3-OST-1, -2, -3B, -5, and -6, and at 67 °C for 3-OST-3A and -4, and 90 s for elongation at 72 °C. The housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was amplified in each sample to normalize for total mRNA input and confirm efficiency of complementary DNA synthesis. The amplification products were separated by electrophoresis in 2% (w/v) agarose gel containing ethidium bromide and analyzed. Images were acquired with the Gel Doc 2000 Image analysis apparatus and analyzed with the supplied software Quantity-One (Bio-Rad). The sequence of each amplified product was confirmed by sequencing (Genoscreen, Lille, France).

RNA Interference—Synthetic siRNA duplexes with symmetric 3'-deoxythymidine overhangs (Eurogentec, Seraing, Belgium) were used to carry out RNA interference. A synthetic siRNA duplex (si3-OST-3), corresponding to the 3-OST-3 mRNA sequence 5'-CGG ACA AGC ACU UCU ACU UTT-3' (nucleotides 1808–1826 and 1295–1313 of human 3-OST-3A and 3-OST-3B sequences, respectively), was used to inhibit the expression of mRNAs encoding 3-OST-3 isoforms. The sequence was subjected to a BLAST search analysis, and no significant identity to others sequences could be detected. To check the specificity of the RNA interference, a siRNA duplex (siGFP) corresponding to GFP was used as a negative control, 5'-GAA CGG CAU CAA GGU GAA CTT-3'. Cells were transfected with 2 μg of siRNA duplexes in serum-free medium using DreamFect reagent (OZ-Biosciences, Marseilles, France), according to the manufacturer's instructions. To monitor the transfection efficacy, a fluorescein-tagged siRNA duplex was used, and the transfection rate was evaluated by fluorescence-activated cell sorter and found to be >85%. The cell responsiveness to CyPB was analyzed 72 h post-transfection.

Analysis of p44/42 MAPK Activation—Jurkat T cells were cultured overnight in the absence of serum and then stimulated by 50 nM CyPB at 37 °C. At various times, cells (2×10^6 per sample) were washed in cold PBS and lysed for 3 h at 4 °C in 100 μl of lysis buffer (20 mM phosphate buffer, pH 7.4, 350 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 20% (v/v) glycerol) supplemented with 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, and protease inhibitor mixture (Roche Applied Science). The lysates were clarified by centrifugation at $10,000 \times g$ for 30 min at 4 °C and used for immunoblotting. Proteins were separated on 10% (w/v) SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. The blots were blocked for 1 h at room temperature in 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.6 (TBS-T TBS-T, Tris-buffered saline/Tween 20), supplemented with 3% (w/v) BSA. Membranes were then incubated for 2 h at room temperature with the appropriate primary antibodies in TBS-T supplemented with 1% (w/v) BSA. After washing, immunoreactive proteins were visualized with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1-h incubation, 1/5000), by using a chemiluminescence detection kit (ECL) (Amersham Biosciences).

RESULTS

Kinetics of CyPB Binding to Heparin-derived Oligosaccharides—We recently reported that an octasaccharide is the minimal structural unit that interacts with CyPB in solution (19). To extend these results, the kinetics of the interactions between CyPB and reducing-end biotinylated oligosaccharides immobilized on a streptavidin-derivatized cuvette were determined in an optical biosensor. As expected, CyPB failed to bind to a biosensor surface where hexasaccharide has been immobilized. Conversely, the binding of CyPB to an octasaccharide was typical (Fig. 1A). The binding reaction was fast because it reached a maximum extent within 2–3 min. Importantly, binding was always monophasic, and there was no evidence for secondary binding sites. Thus, the distribution of the data points around a one-site model was random and within the limits of instrument noise (Fig. 1B). Moreover, the plot of k_{on} , which represents the observed on-rate, determined using a one-site binding model, against concentrations of CyPB was linear, indicating that binding was not limited by diffusion (Fig. 1C). The interaction of CyPB with the longer oligosaccharide was similarly monophasic (data not shown), and thus a one-site binding model was used for all data analyses (Table 1). The association rate constant (k_a) of CyPB for octasaccharides was relatively fast. Increasing the length from dp8 to dp14 did not change significantly the value of k_a . The dissociation rate constant (k_d) was measured independently using high concentration of CyPB and including heparin (100 μg/ml) in the dissociation buffer to prevent re-binding (34). Overall, k_d did not vary with the length of the oligosaccharides. Therefore, the dissociation constant (K_d) for the interaction between CyPB and oligosaccharides, determined from the kinetic parameters, was similar and in the range of 10–50 nM (Table 1). The K_d of CyPB for the oligosaccharides was also calculated from the amount of CyPB binding observed near equilibrium. Overall, the values correspond to those determined from the kinetic parameters. Therefore, binding data are internally self-consistent and are likely to reflect the intrinsic

values for these interactions. Moreover, these values are close to the one previously described for CyPB binding to cell surface HS ($K_d \sim 10$ nM) (20), indicating that the use of optical biosensor to examine the interactions between CyPB and immobilized oligosaccharides reports accurately on the binding of CyPB to heparin/HS.

Competitive Binding Assays with Chemically Modified Heparins—To examine the structural features of heparin that are required for CyPB binding, we first used a streptavidin-coated cuvette for which immobilization of heparin was performed through biotinylation of internal free amino groups

(Fig. 2A, panel a). Indeed, we have routinely used this biosensor surface to examine the interactions with FGF-2 and HGF (32, 33, 36). As reported previously, we found that FGF-2, for which *N*- and 2-*O* sulfate groups are the main structural requirements for interaction with heparin (6, 7, 30), efficiently bound to this biosensor surface. In contrast, CyPB failed to interact with heparin immobilized via its internal free amino groups. Binding was indeed not distinguishable from nonspecific interaction, even at a concentration of 12.5 μ M equivalent to 1000 \times K_d . Therefore, the procedure of heparin immobilization, which led to unavailability of GlcNH₂ residues and/or surrounding environment, was probably related to the inability of CyPB to interact with this biosensor surface.

The use of biotinylated albumin-heparin conjugate has been already reported to provide heparin biosensor surface with high binding capacity (39). As expected, both FGF-2 and CyPB were found to bind to the heparin-BSA conjugate immobilized onto a streptavidin-derivatized cuvette (Fig. 2A, panel b). Surprisingly, a 3-fold lower response was observed, however, in the binding reaction with CyPB compared with FGF-2. CyPB and FGF-2 have similar molecular masses (21 and 18 kDa, respectively), and both the ligands were used at a concentration equivalent to 5 \times K_d . Moreover, we checked that biotinylation of heparin-BSA conjugate did not lead to partial derivatization of free amino groups of the heparin moiety, indicating that the conjugate allows access of ligands to the full length of heparin. Nevertheless, the overall content of unsubstituted amino groups is very low in heparin by comparison with *N*- and 2-*O*-sulfated groups. Thus, the difference in the binding of CyPB and FGF-2 to immobilized heparin-BSA conjugate is likely to be due to limiting structural features in heparin that enables interaction with CyPB.

The kinetics of the interaction of CyPB with immobilized heparin-BSA conjugate was similar to the ones observed with oligosaccharides immobilized via reducing-end biotinylation. Binding was always monophasic, and no evidence was found for secondary binding sites (Fig. 2B). The dissociation constant calculated from the maximum extent of binding (K_d equilibrium) was similar to the value calculated from the kinetic parameters, indicating that these binding data are internally self-consistent (Table 1). Interestingly, CyPB possessed a relatively fast k_a for the heparin-BSA conjugate compared with immobilized oligosaccharides. Nevertheless, the K_d values were in the same range

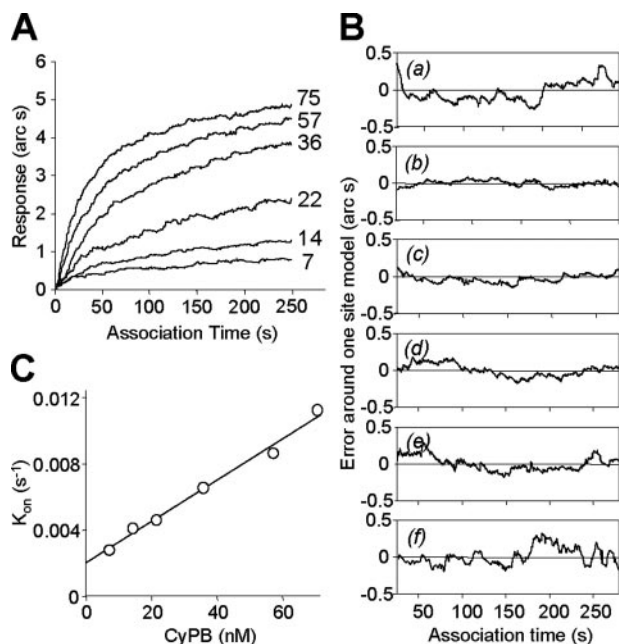


FIGURE 1. Binding of CyPB to immobilized heparin octasaccharides. The binding kinetics of CyPB to octasaccharides immobilized via reducing-end biotinylation was measured as described under "Experimental Procedures." Data shown are the result of one representative experiment of three. *A*, representative set of binding interactions of CyPB with octasaccharides. CyPB at different concentrations was added to an octasaccharide-derivatized cuvette, and the association reaction was followed for 250 s, by which time at least 90% of the fitted one site binding curve was covered. The concentrations of CyPB in nM is indicated. *B*, distribution of the data points (jagged line) around a one-site binding model is shown for each of the concentrations of CyPB used in the binding assay in *A*. Instrument noise was ± 0.5 arc s. Concentrations of CyPB are as follows: panel a, 7 nM; panel b, 14 nM; panel c, 22 nM; panel d, 36 nM; panel e, 57 nM; and panel f, 75 nM. *C*, plot of the k_{on} , calculated by nonlinear regression from the curves in *A*, using a one-site binding model, against concentrations of CyPB.

TABLE 1
Kinetics of CyPB binding to immobilized oligosaccharides and heparin-BSA conjugate

Binding parameters were determined in an optical biosensor ("Experimental Procedures").

	k_a^a $M^{-1} \cdot s^{-1}$	r^b	k_d^c s^{-1}	K_d (kinetic) ^d nM	K_e (equilibrium) ^e nM
Length of oligosaccharides					
-dp8	127,000 \pm 88,000	0.924	0.0021 \pm 0.0004	16 \pm 4	36 \pm 9
-dp10	104,000 \pm 66,000	0.905	0.0028 \pm 0.0003	27 \pm 4	28 \pm 7
-dp12	93,000 \pm 35,000	0.908	0.0033 \pm 0.0005	35 \pm 13	45 \pm 5
-dp14	196,000 \pm 61,000	0.921	0.0025 \pm 0.0002	13 \pm 3	29 \pm 7
Heparin-BSA conjugate	644,000 \pm 196,000	0.923	0.0106 \pm 0.0015	16 \pm 8	14 \pm 4

^a S.E. of the k_a was derived from the deviation of the data from a one-site binding model, calculated by matrix inversion using the FastFit software provided with the instrument.

Three independent sets of k_{on} were measured, and the three resulting values for k_a and their errors were combined.

^b The correlation coefficient of the linear regression through the k_{on} values is represented by r .

^c The k_d is the mean \pm S.E. of five values, obtained at high concentrations of CyPB, in the presence of competing heparin.

^d The K_d (kinetic) was calculated from the ratio of k_d/k_a , and its S.E. is the combined S.E. of the two kinetics parameters.

^e The K_d (equilibrium) was calculated from the extent of binding at equilibrium, and its S.E. is the combined S.E. of three independent determinations of K_d .

Involvement of GlcNH₂3S in CyPB Binding to HS

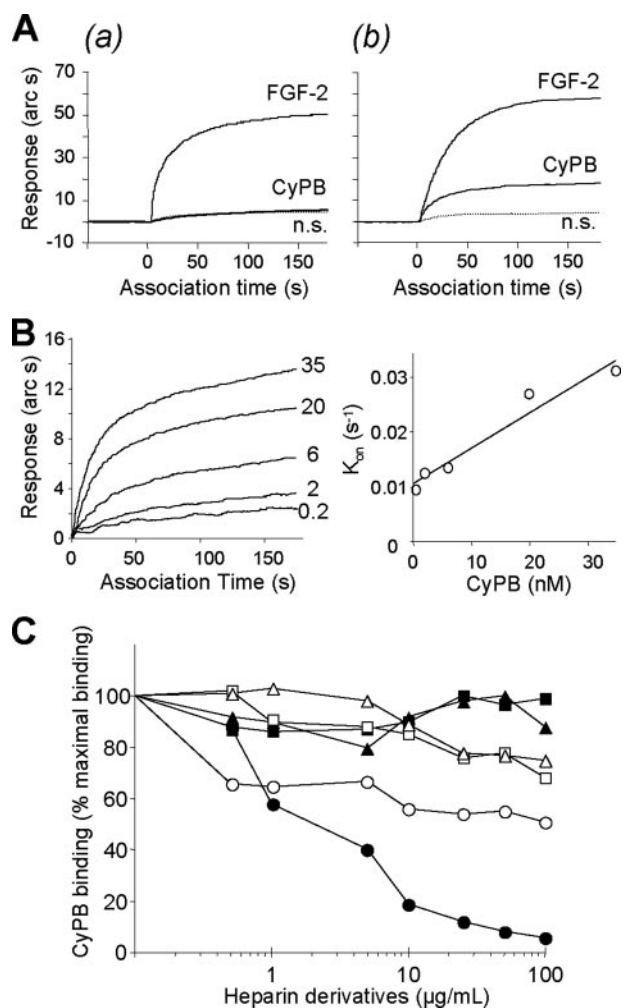


FIGURE 2. Competition of CyPB binding to immobilized heparin by chemically modified heparin derivatives. A, binding reactions of CyPB (75 nM) and FGF-2 (60 nM) to heparin were analyzed by using streptavidin-coated cuvettes where heparin was immobilized either via direct biotinylation of internal free amino groups of the polysaccharide (*panel a*) or via interaction with biotinylated BSA-heparin in which heparin was conjugated to the protein moiety through its reducing end (*panel b*). Nonspecific binding (*n.s.*) was obtained by adding CyPB to a streptavidin-coated cuvette in the absence of immobilized heparin. Data are representative of three independently performed experiments. B, binding kinetics of CyPB to biotinylated heparin-BSA conjugate was measured as described under "Experimental Procedures." CyPB at different concentrations was added to a cuvette where heparin was immobilized via interaction with biotinylated BSA-heparin conjugate, and the association reaction was followed until at least 90% of the fitted one-site binding curve was covered. The concentrations of CyPB in nM are indicated on the representative set of binding interactions of CyPB with heparin. Plot of the k_{on} , calculated by nonlinear regression using a one-site binding model, against concentrations of CyPB, is shown. C, for competitive binding experiments, the extent of binding of CyPB (75 nM) to heparin immobilized on an aminosilane surface was measured in the presence of increasing concentrations of unmodified (●) or modified heparins: *N*-desulfated (■), *N*-desulfated-*N*-reacetylated (▲), *N*-acetylated (○), 2-*O*-desulfated (□), and 6-*O*-desulfated (Δ) heparin derivatives. Maximal binding of CyPB in the absence of competing heparins was 20 arc s. The amount of CyPB bound to immobilized heparin was calculated as a percentage of this maximal value. Errors for individual points were less than 5% of the mean values and are omitted for clarity. Data are representative of three independently performed experiments.

as those obtained for interactions with oligosaccharides immobilized via reducing-end biotinylation, because of a higher k_a (Table 1). The differences in the rate constants probably reflect the fact that the probability of binding events was higher for heparin compared with the one for oligosaccharides, per-

haps because access to the full length of the polysaccharide may facilitate encounter with structural information that enables interaction with CyPB.

To identify these structural features, the capability of chemically modified heparins to compete for CyPB binding to immobilized heparin was then analyzed (Fig. 2C). Unmodified heparin was used as a control to ensure that soluble heparin concentrations were high enough to get a full inhibition of CyPB binding to the cuvette. The IC_{50} of soluble unmodified heparin was found at around 2 μg/ml, and more than 90% of CyPB binding could be competed with 25 μg/ml heparin. In contrast, *N*-desulfated and *N*-desulfated/*N*-reacetylated heparins were far less effective competitors of CyPB binding to immobilized heparin, because high concentrations of these two chemically modified heparins only reduced CyPB binding by 20%. In the same way, 2-*O*- and 6-*O*-desulfated heparins were poor competitors. These data indicate that 6-*O*-, 2-*O*-, and *N*-sulfated groups are crucial for the interaction between CyPB and heparin. These results are, however, not surprising because involvement of sulfated groups for efficient binding is a common feature of numerous heparin-binding proteins. Interestingly, *N*-acetylated heparin was not as efficient as unmodified heparin to inhibit CyPB binding onto the cuvette. No more than 50% of inhibition could be obtained in the presence of high concentrations of this chemically modified heparin. The modification of this heparin derivative was acetylation of unsubstituted amino groups, further indicating that unsubstituted amino groups are critically required for CyPB binding to heparin. Taken together, these data suggest that CyPB does require unusual and rare modification in addition to sulfation to interact with heparin.

Involvement of GlcNH₂ in CyPB Binding to Heparin and Cell Surface HS—In the next experiments, we analyzed the requirement of free amino group of GlcNH₂ in the binding of CyPB to heparin and cell surface HS derived from peripheral blood CD4⁺ T cells. To this end, we used an approach based on the ability of HNO₂ at pH 4.0 to specifically target GlcNH₂ residues within heparin/HS and convert them to terminal 2,5-anhydromannose residues (37). Thereafter, the binding of CyPB to chemically treated heparin or HS was visualized by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). HNO₂ treatment of heparin at pH 4.0 produced oligosaccharides whose size decreased for the first 45 min and remained unchanged thereafter (Fig. 3A, *panel a*). We previously reported that the minimal length unit for CyPB binding was an octasaccharide (19). Interestingly, most of the oligosaccharides produced by HNO₂ treatment at pH 4.0 were of $dp \geq 14$, ruling out the possibility that a loss in CyPB binding was because of the presence of short heparin-derived products. In the absence of any treatment, CyPB formed a complex with heparin, which was retained at the top of the gel. The intensity of the complex decreased over the time course of degradation by HNO₂, suggesting that the cleavage of heparin at GlcNH₂ residues paralleled the loss of binding sites for CyPB. Indeed, 20 min of HNO₂ treatment reduced the intensity of the complex by 50%, whereas no more than 20% of the protein was retained after 45 min of treatment (Fig. 3A, *panel b*). To confirm these findings, the gel was transferred onto nitrocellulose and immunostained with anti-CyPB anti-

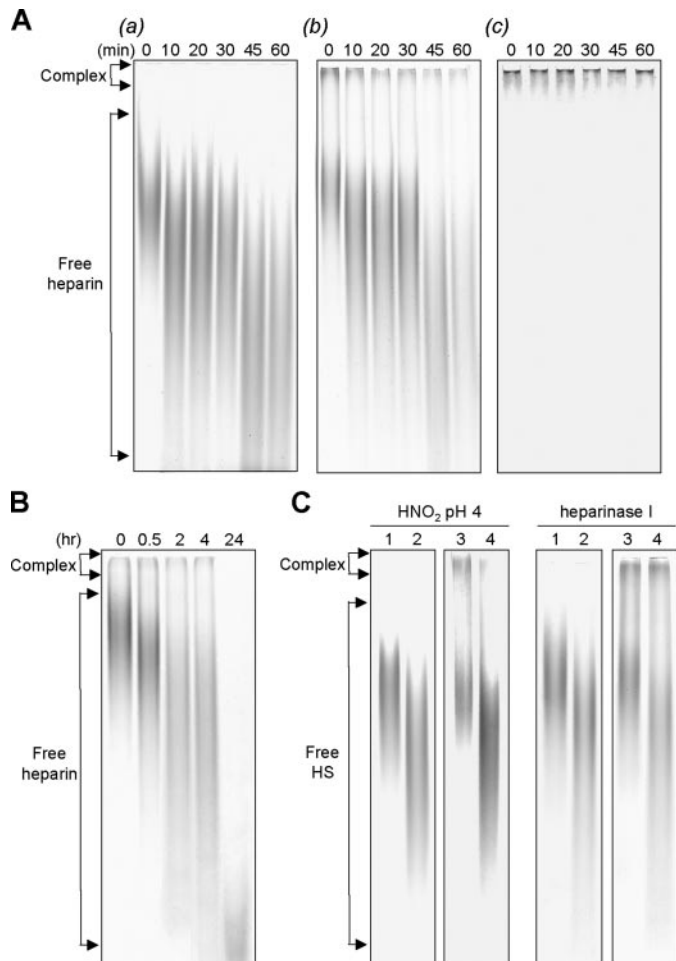


FIGURE 3. Involvement of free amino groups in the binding of CyPB to heparin and cell surface HS. *A*, heparin was treated with nitrous acid, pH 4.0, for the indicated times and next subjected to electrophoresis (4 μ g per lane) in the absence (*panel a*) or presence (*panel b*) of 4 μ g of CyPB. The profile of migration of free and CyPB-bound oligosaccharides was then visualized by staining the gel with azure A. *Panel c*, gel was transferred onto nitrocellulose, and the protein was immunostained with rabbit polyclonal anti-CyPB antibodies. *B*, heparin was treated with heparinase I (0.75 unit/mg of heparin) for the indicated times and next subjected to EMSA (4 μ g per lane) in the presence of 4 μ g of CyPB. The profile of migration of free and CyPB-bound oligosaccharides was visualized by staining the gel with azure A. *C*, cell surface HS chains purified from peripheral blood T lymphocytes were either not treated (*lanes 1 and 3*) or treated (*lanes 2 and 4*) with nitrous acid, pH 4.0, for 45 min or heparinase I for 2 h. Thereafter, samples were subjected to electrophoresis (4 μ g per lane) in the absence (*lanes 1 and 2*) or the presence of 4 μ g of CyPB (*lanes 3 and 4*). The profile of migration of free and CyPB-bound oligosaccharides was visualized with azure A. Representative gels of at least three separate experiments are shown.

bodies. As expected, the protein was only visualized at the top of the gel, indicating that interaction of CyPB with oligosaccharides did not lead to the formation of small complexes that could migrate within the gel (Fig. 3*A*, *panel c*). To obtain further evidence on the crucial role of GlcNH₂ residues, we then tested the interaction of CyPB with oligosaccharides obtained from digestion with heparinase I, which preferentially cleaves heparin and HS at GlcNS \pm 6S-IdoA2S linkages but has no activity on GlcNH₂ residues (27, 40). As expected, partial digestion of heparin, which generated large oligosaccharides higher than dp14, did not significantly reduced the intensity of the complex. Conversely, long term depolymerization of heparin by heparinase I (24-h incubation) led to a dramatic loss in CyPB binding,

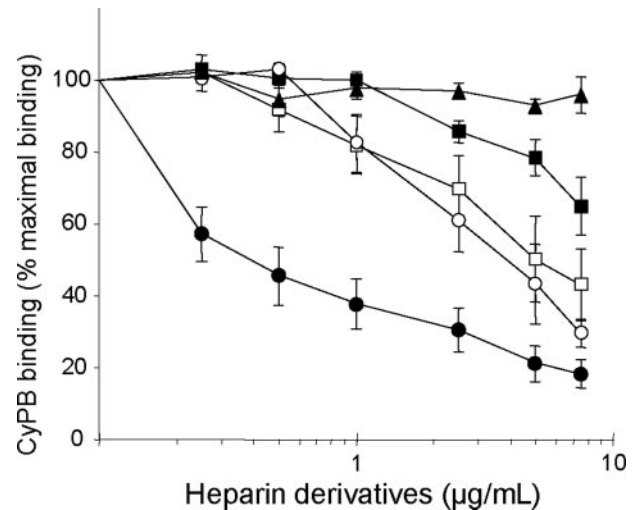


FIGURE 4. Inhibitory effect of *N*-modified heparin derivatives on the binding of purified T lymphocytes to immobilized CyPB. Cells were allowed to adhere into CyPB-coated plates (1 μ g per well) in the absence (control) or presence of increasing concentrations of heparin derivatives: unmodified (●), *N*-desulfated (■), *N*-desulfated-*N*-reacetylated (▲), *N*-acetylated (○) heparins, and heparin-derived oligosaccharides obtained by treatment with nitrous acid, pH 4.0 (□). Results are expressed as percentages of cells remaining associated to the coated well by comparison with control. Data are means \pm S.E. of triplicates from at least three separate experiments.

which was because of the generation of short oligosaccharides (Fig. 3*B*). We then reproduced the same experiment with cell surface HS. As already described (19), the interaction between CyPB and HS derived from CD4⁺ T lymphocytes could be visualized as a shifted band at the top of the gel. A 45-min treatment by HNO₂ at pH 4.0 reduced by 80% the intensity of the complex, indicating that cleavage of HS at GlcNH₂ residues dramatically reduced the binding of CyPB. Conversely, partial digestion of HS with heparinase I (2-h incubation) did not significantly reduce the intensity of the complex (Fig. 3*C*). Therefore, these data indicate that only part of the GlcNS content would be necessary for interaction, whereas GlcNH₂ residues and/or the neighboring environment represent the limiting structural features that enable specific binding of CyPB to heparin/HS.

To further demonstrate the requirement of GlcNH₂ in the binding of CyPB to cell surface HS, we analyzed the ability of chemically *N*-modified heparins to inhibit the binding of peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes to immobilized CyPB (Fig. 4). As reported previously, unmodified heparin potently inhibited the interaction between T cells and immobilized CyPB (20), with a IC₅₀ of 0.3 μ g/ml. Interestingly, a similar 50% inhibition required a 10-fold higher concentration of either *N*-acetylated heparin or oligosaccharides obtained from degradation of heparin by HNO₂ at pH 4.0. Taking into account that both competitors did not contain unsubstituted amino groups, these data further support a role for GlcNH₂ in the binding to CyPB. Finally, we found that *N*-desulfated heparin was a poor competitor, whereas *N*-desulfated/*N*-reacetylated heparin was devoid of any inhibitory properties. Altogether, these results clearly demonstrate that the efficient binding of CyPB to cell surface HS of peripheral CD4⁺ T lymphocytes requires interaction with both GlcNS and GlcNH₂ residues.

Involvement of GlcNH₂3S in CyPB Binding to HS

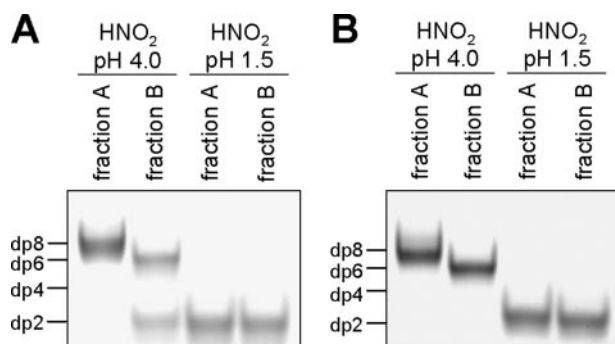


FIGURE 5. Analysis of the *N*-substituent pattern of CyPB-binding octasaccharides by nitrous acid degradation. Following incubation of heparin-derived octasaccharides with CyPB, nonspecific octasaccharides (*fraction A*) were separated from the complex formed by the association of CyPB with specific octasaccharides by gel filtration. Thereafter, the complex was dissociated by treatment with 1 M NaCl, and CyPB-specific octasaccharides (*fraction B*) were separated from the protein by gel filtration. *A*, electrophoresis of octasaccharides after scission with nitrous acid at either pH 4.0 or pH 1.5. Fractions A and B were individually treated with nitrous acid. The cleavage products were then derivatized with ANTS and subjected to electrophoresis (1 μ g of initially treated octasaccharide per lane). *B*, electrophoresis of ANTS-labeled octasaccharides after treatment with nitrous acid at either pH 4.0 or pH 1.5. Fractions A and B were labeled with ANTS prior treatment with nitrous acid, and next subjected to electrophoresis (1 μ g per lane). The fluorescent profiles of migration of ANTS-labeled oligosaccharides were imaged after exposure to UV transilluminator for 0.60 s. The position and the degree of polymerization of standard oligosaccharides are indicated. Representative gels of three separate experiments are shown.

Analysis of the *N*-Substituent Pattern of the CyPB-binding Heparin Unit—We recently used an approach based on carbohydrate electrophoresis with ANTS-labeled oligosaccharides to demonstrate that an octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of CyPB to heparin and cell surface HS (19). To further confirm the involvement of a GlcNH₂ residue in the interactions with CyPB, we then evaluated the susceptibility of this minimal heparin unit to nitrous acid degradation. To this end, heparin-derived octasaccharides were first separated according to their capability to interact with the protein. Following gel filtration to remove unbound octasaccharides (*fraction A*), the complex formed by the association of CyPB with specific octasaccharides was incubated in the presence of 1 M NaCl, and initially bound octasaccharides were separated from the protein by gel filtration (*fractions B*). Then both fractions were individually treated with HNO₂, pH 4.0, and the products of degradation were derivatized with ANTS and subjected to electrophoresis. As shown in Fig. 5A, most of the octasaccharides that did not bind CyPB were resistant to nitrous acid cleavage at pH 4.0, indicating that they did not contain any detectable amount of GlcNH₂ residues. In contrast, octasaccharides that bound CyPB were susceptible to HNO₂ cleavage at pH 4.0. Indeed, the profile of elution of treated fraction B was characterized by the presence of two degradation products, which corresponded to disaccharides and hexasaccharides. Moreover, an estimation of relative amounts of each product suggested the presence of a single GlcNH₂ unit per octasaccharide. In parallel experiments, the same fractions were subjected to low pH nitrous acid treatment, which results in specific scission at *N*-sulfated disaccharides with a concomitant loss of the *N*-sulfate groups. Treatment of fraction A essentially resulted in the liberation of disaccharides, indicating that unbound octasaccharides mainly contained GlcNS resi-

dues. This result was expected because the major disaccharide unit in heparin is IdoUA2S-GlcNS6S. Surprisingly, treatment of fraction B also resulted in the liberation of disaccharides. We could expect that these oligosaccharides, which contain GlcNH₂ residues, were partially resistant to attack by low pH nitrous acid and generated degradation products larger than disaccharides. Such an unexpected cleavage was however reported by Liu *et al.* (23, 24), who demonstrated that low pH nitrous acid also targets 3-*O*-sulfated GlcNH₂ residues within heparin sequence. Therefore, these data indicate that the heparin-derived octasaccharide that binds CyPB is likely to contain one 3-*O*-sulfated GlcNH₂ and neighboring GlcNS \pm 6S.

We therefore used the same approach to obtain information on the position of the GlcNH₂ residue within the binding heparin unit. To this end, octasaccharides of both the fractions A and B were first labeled with ANTS at the reducing end of the molecule and then treated with HNO₂, pH 4.0. The products of hydrolysis were subsequently separated by electrophoresis (Fig. 5B). The ANTS moiety served as a tag to differentiate oligosaccharides derived from the reducing end of the parent compounds. Treatment of fraction B resulted in the liberation of a fluorescent product that migrated as dp6 standard. No fluorescent disaccharides could be visualized, indicating that the heparin unit that interacts with CyPB contains a GlcNH₂ at position 2 from the nonreducing end of the octasaccharide. As expected, the degradation products obtained from the fraction A migrated as dp8 standard. Finally, treatment of both fractions at pH 1.5 resulted in the liberation of disaccharides, thus confirming the preceding findings. Altogether, these results indicate that CyPB does not bind to octasaccharides for which GlcNH₂ residues are lacking or not correctly positioned.

Role of 3-OST-3 in the Generation of Binding Sites for CyPB—The different 3-OST isoforms exhibit distinct substrate specificities and thereby generate specialized HS sequences with diversified biological functions. For instance, 3-OST-3 isoenzymes, which are represented by two closely related isoforms with similar substrate specificity, *i.e.* 3-OST-3A and 3-OST-3B, introduce a sulfate substituent to the 3-OH position of GlcNH₂ residues within the disaccharide unit IdoUA2S-GlcNH₂ \pm 6S and thereby generate a 3-*O*-sulfated GlcNH₂ residue within the HS (23, 24). To test whether the presence of GlcNH₂ residue is correlated with the ability of 3-OST to generate a binding unit for CyPB, we analyzed by RT-PCR the relative expression of 3-OST isoenzymes in responsive T cells. As shown in Fig. 6, purified CD4⁺ T lymphocytes and Jurkat T cells predominantly expressed mRNA encoding 3-OST-3B, whereas other 3-OST isoforms were only slightly detected or absent. As control, we then analyzed the expression pattern of mRNAs encoding 3-OST isoenzymes in epithelial HeLa cells and promonocytic leukemia THP-1 cells. Indeed, we recently reported that THP-1 cells are highly responsive to CyPB, by a mechanism dependent on the interactions with cell surface HS (29). In contrast, we have observed that although HeLa cells produce high levels of HS by comparison with T lymphocytes, they are devoid of high affinity binding sites for CyPB (data not shown). Interestingly, we found that THP-1 cells mainly express mRNAs encoding 3-OST-3A, 3-OST-3B, and 3-OST-5. Conversely, 3-OST-5 was the main isoenzyme expressed in HeLa cells, whereas

mRNAs that encode 3-OST-1, 3-OST-2, 3-OST-3B, and 3-OST-6 were barely detected. Therefore, the findings that high expression of mRNA encoding 3-OST-3 isoenzymes correlates with cellular binding of CyPB supports the hypothesis

that the GlcNH₂ residue present in the HS motif that interacts with CyPB could be 3-O-sulfated.

To gain insights into the relationships between 3-OST-3 expression and generation of binding sites for CyPB, we then developed a model based on the use of RNA interference. The 3-OST-3 siRNA was first tested for its ability to suppress mRNAs encoding 3-OST-3 isoforms specifically (Fig. 7A). As expected, transfection of Jurkat T cells and HeLa cells resulted in a significant 3-OST-3B mRNA down-regulation. Inhibition was found to reach 90% at day 2 in Jurkat T cells, by comparison with control cells. A significant decrease in the expression of mRNAs encoding 3-OST-3A and 3-OST-3B was also observed in THP-1 cells, indicating that the siRNA was efficient to reduce the expression of both the 3-OST-3 isoforms. Moreover, the expression of other mRNAs encoding 3-OST isoforms was not affected in Jurkat T cells, HeLa cells, and THP-1 cells, indicating that the siRNA specifically targets 3-OST-3 isoforms. Finally, no significant decrease in the expression of mRNAs encoding 3-OST-3 or other 3-OST isoforms could be detected in the presence of irrelevant siRNA, confirming the specificity of the method. We then examined the effect of 3-OST-3 mRNA down-regulation on the expression of cell surface HS by flow cytometry (Fig. 7B). As expected, transfection of Jurkat T cells with 3-OST-3 siRNA did not significantly modify the cell surface immunostaining with anti-HS antibodies, by comparison with nontransfected cells or cells transfected with irrelevant siRNA ($\Delta\text{FMV} = 198 \pm 21\%$ versus 219 ± 18 and $191 \pm 25\%$, respectively). As a control, we found a 4-fold decrease in cell surface immunostaining following treatment with heparinase I ($\Delta\text{FMV} = 56 \pm 13\%$), confirming that suppression of mRNA encoding 3-OST-3 had no detectable inhibitory effect on the expression of HS at the cell surface.

We then analyzed the interaction between CyPB and cell-surface HS in transfected cells. As a control, we first checked that CyPB binding was potently inhibited (>75% of initial binding) by heparinase I treatment. Interestingly, knock-down of 3-OST-3 reduced CyPB binding by more than 60%, indicating that 3-O-sulfation of GlcN residues is required for the interactions between the protein and cell surface HS (Fig. 8A). We recently demonstrated that the main intracellular event initiated by CyPB binding to T lymphocytes is the activation of the p44/42 MAPK pathway (29). When analyzing the phosphorylated status of ERK1/2, we found that transfection of Jurkat T cells with 3-OST-3 siRNA dramatically reduced the ability of CyPB to activate p44/42 MAPK, indicating that expression of 3-OST-3B is also required for the

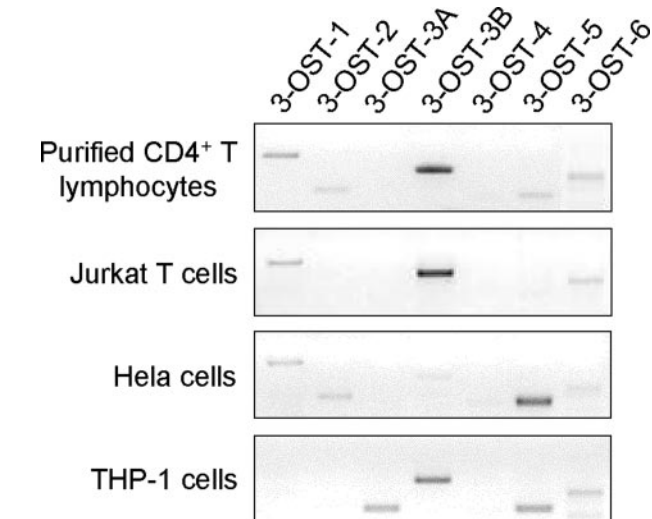


FIGURE 6. RT-PCR analysis of the expression of mRNAs encoding 3-OST isoenzymes. Total RNA was extracted from purified peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes, lymphoblastic Jurkat T cells, epithelia HeLa cells, and leukemia promonocytic THP-1 cells, and 2 μg was used for cDNA synthesis amplified by specific primers for individual 3-OST isoforms ($n = 32$ cycles of amplification). The product sizes are as follows: 3-OST-1, 582 bp; 3-OST-2, 272 bp; 3-OST-3A, 247 bp; 3-OST-3B, 433 bp; 3-OST-4, 232 bp; 3-OST-5, 239 bp; 3-OST-6, 334 bp. The results shown are representative of at least three separate experiments for each cell type.

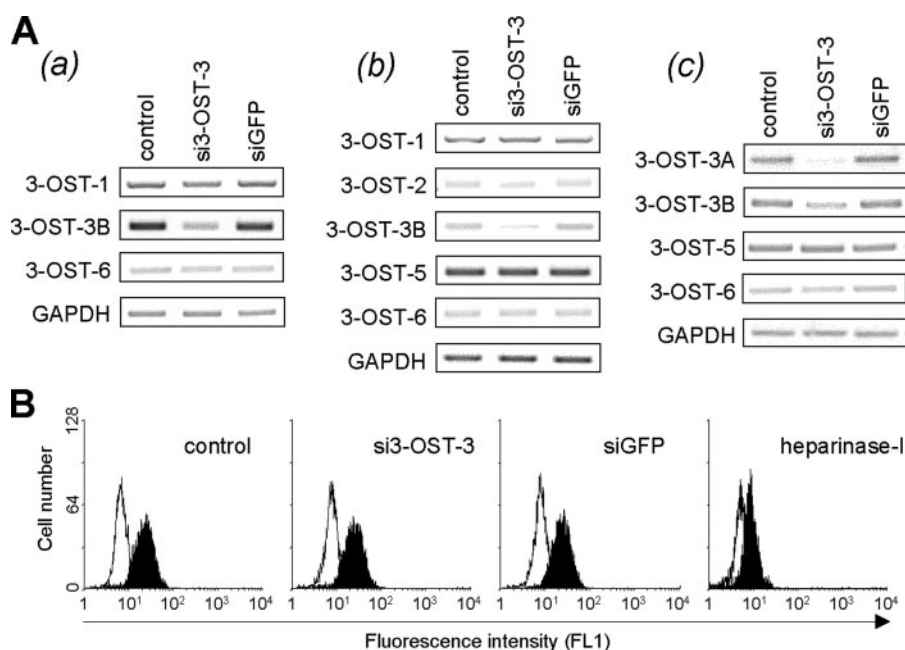


FIGURE 7. Inhibition of the expression of mRNAs encoding 3-OST-3 isoenzymes by RNA interference. Cells were either untreated (*control*) or transfected with siRNA for 3-OST-3 (*si3-OST-3*) or GFP (*siGFP*). *A*, expression of specific mRNAs encoding 3-OST isoenzymes was analyzed in Jurkat T cells (*panel a*), HeLa cells (*panel b*), and THP-1 cells (*panel c*) by semi-quantitative RT-PCR, 48 h post-transfection. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) mRNA was used to normalize for input of total RNA. *B*, expression of cell surface HS was analyzed in Jurkat T cells by flow cytometry. Cells were stained with either monoclonal anti-HS antibody (*filled histogram*) or isotype-matched control antibody (*open histogram*). Heparinase I-treated cells were used as a control to estimate the loss of HS at the surface of Jurkat T cells. The results shown are representative of at least three separate experiments.

Involvement of GlcNH₂3S in CyPB Binding to HS

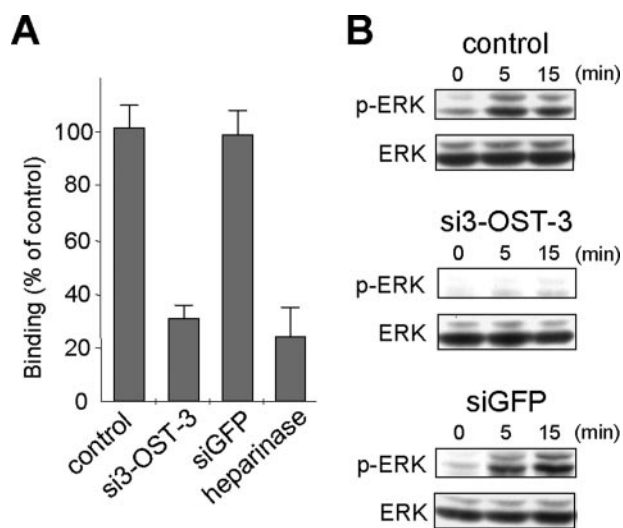


FIGURE 8. Involvement of 3-OST-3 in the generation of CyPB-binding sites. *A*, involvement of 3-OST-3 in the generation of CyPB-binding sites was analyzed by measuring the binding of nontransfected (*control*) versus transfected Jurkat T cells (*si3-OST-3* or *siGFP*) to immobilized CyPB (1 μ g/well), 72 h post-transfection. Heparinase I-treated cells were used as a control to estimate the participation of HS in the interaction. Each bar of histograms represents mean \pm S.D. of triplicate. *B*, Jurkat T cells (72 h post-transfection) were either stimulated or not in the presence of 50 nM CyPB for various times, and the activation of p44/p42 MAPK was analyzed by using anti-phosphorylated ERK1/2 (*p-ERK*). Parallel immunoblotting with anti-total ERK1/2 confirmed equal loading of samples. Representative results from three independent experiments are shown.

initiation of signaling events (Fig. 8*B*). Taken together, these findings suggest that efficient binding of CyPB and consequent induction of cell responses are dependent on the presence of a specific 3-*O*-sulfated HS motif.

DISCUSSION

The fine structure of HS varies considerably depending on the tissue of origin, developmental stage, and pathophysiological conditions, and it is thought that rare structural sequences within HS species contribute to selective protein binding. Such a diversity of structure is imposed by tightly regulated patterns of sulfation and epimerization upon the basic polysaccharide backbone during synthesis within the Golgi (1–4). We have reported that HS are absolutely required for CyPB to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T cells to the extracellular matrix (11). In this study, we attempted to determine the structural features of HS that are responsible for the specific binding of CyPB to responsive cells.

To gain insights into the relationship of structural information and biological activity, we currently used heparin and its derivatives in our binding experiments, because we previously demonstrated that binding of CyPB to heparin and cell surface HS from T lymphocytes was quite similar (19, 20). In a first set of experiments, we used reducing-end immobilized oligosaccharides from dp6 to dp14 to examine the kinetics of the interactions. Indeed, the observation that different methods of immobilizing heparin onto biosensor surfaces can affect the affinity of interactions (41) has made the use of pure heparin oligosaccharides immobilized via reducing-end biotinylation more appropriate to determine the binding parameters (32, 36). Previous studies have demonstrated that the minimal binding

unit within heparin that could interact with CyPB in solution was an octasaccharide (19). As expected, we confirmed here that CyPB failed to bind to immobilized hexasaccharides. Conversely, kinetic studies showed that oligosaccharides of dp \geq 8 all bind CyPB and that the affinity for octasaccharides is similar to that for longer oligosaccharides. We then examined the structural features of heparin that are required for CyPB binding. In previous works, we routinely used a streptavidin-coated cuvette for which immobilization of heparin or HS was performed via biotinylation of internal free amino groups (30, 32, 33, 35, 36). Although this method of immobilizing heparin was reported to affect the binding capacity of some proteins (41), we had not observed any significant changes in the binding affinities of FGF-2 and HGF by comparison with immobilization via reducing end of oligosaccharides (32, 36). Unfortunately, we found here that CyPB failed to bind onto this biosensor cuvette. This observation confirms that immobilizing heparin via free intrachain amino groups can dramatically affect the binding of some particular heparin-binding proteins, probably by blocking interactions with GlcNH₂ residues and/or surrounding environment. We then used a biotinylated albumin-BSA conjugate, in which conjugation of biotin to the protein moiety allowed access of CyPB to the full length of the polymer (39). As expected, the binding affinity K_d of CyPB for this conjugate was similar to those obtained with oligosaccharides immobilized via reducing-end biotinylation. Moreover, these values are close to the one previously described for CyPB binding to cell surface HS ($K_d \sim 10$ nM) (20), indicating that the use of this cuvette reports accurately on the interactions between CyPB and heparin/HS. Interestingly, we observed that binding of FGF-2 to immobilized heparin-BSA conjugate was higher compared with that of CyPB. This discrepancy could not be attributed to differences in the binding affinities, because we previously reported that the K_d of FGF-2 for heparin or oligosaccharides was in the same range to that of CyPB (32, 33). Actually, *N*- and 2-*O* sulfate groups, which are the main structural requirements for interaction with FGF-2 (6, 7, 30), are not limiting structural features in heparin. In contrast, the overall content of free amino groups is very low in heparin/HS (27, 42). Thus, requirement of GlcNH₂ residues and/or surrounding environment for interaction is likely to represent the limiting structural information that explains the lower binding of CyPB to immobilized heparin-BSA. Competitive binding experiments performed with chemically modified heparins further support this hypothesis. We found that 2-*O*, 6-*O*, and *N*-sulfate groups were required for the binding of CyPB. These results were expected because involvement of sulfate groups is a common feature in the interaction of numerous proteins to heparin/HS. Most importantly, we also demonstrated that *N*-acetylated heparin was a poor competitor of CyPB to binding to immobilized heparin, highlighting the crucial role of free amino group of GlcNH₂ in the interactions.

To validate the findings obtained with the optical biosensor approach, we then analyzed the interaction of CyPB with heparin and cell surface HS by EMSA. Cleavage of heparin/HS with nitrous acid at pH 4.0, which targets GlcNH₂ residues, dramatically reduced the interactions with CyPB in solution. Conversely, partial digestion of heparin/HS with heparinase I did

not significantly modify the interaction with CyPB in solution. Finally, we further demonstrated that *N*-acetylated heparin or fragments of heparin treated with nitrous acid at pH 4.0 were poor competitors of CyPB to binding to the cell membrane of T lymphocytes. Altogether, these findings demonstrate that binding of CyPB is not simply the consequence of electrostatic interactions between basic residues in the protein and negative charges on the polysaccharide, but also the result of specific contacts between the protein and a rare modification in the heparin/HS-binding unit.

The occurrence of GlcNH₂ units was first believed to reflect artificial loss of *N*-sulfate groups during handling of HS samples. Moreover, the mechanism of GlcNH₂ formation during HS biosynthesis remains largely unclear. Nevertheless, accumulating data have demonstrated a functional relevance of such a modification in biological and pathological phenomena. A monoclonal antibody that recognizes GlcNH₂ units in HS was reported to stain basement membranes and epithelial and mesenchymal tissues (5). The presence of GlcNH₂ residues was found to correlate with the ability of L-selectin to bind to endothelial cells (43), although the interaction was not critically dependent on GlcNH₂ residues (44). It was proposed that GlcNH₂ residues provide a cleavage site for endogenous NO-derived nitrite and thus contribute to recycling of glypican-1 (45). The overall content of GlcNH₂ is generally low and varies between HS species from 1.2 to 7.5% (w/w) of total GlcN content (27, 42). GlcNH₂ residues are preferentially located in the transition zones between *N*-sulfated and *N*-acetylated region within HS (46, 47). Recently, Westling and Lindahl (42) have analyzed the sequences around GlcNH₂ residues in HS from diverse preparations. They confirmed that the GlcNH₂-containing sequences are predominantly located within the *N*-acetylated domains or in transition sequences between *N*-acetylated and *N*-sulfated domains. Moreover, they found that the structures upstream and downstream of GlcNH₂ residues are highly diverse. Thus, 20–30% of the adjacent disaccharide units could be *N*-sulfated. Although most of the uronic acid residues immediately upstream of GlcNH₂ are GlcUA, some of these units may be subjected to C₅-epimerization and 2-*O*-sulfation. GlcNH₂ residues may be also 6-*O*-sulfated and even 3-*O*-sulfated, and the highly sulfated but *N*-unsubstituted unit IdoUA2S-GlcNH₂ ± 6S would be located to the highly sulfated domain of HS chains. Interestingly, we demonstrated here that the GlcNH₂ residue within the heparin-derived octasaccharide that binds CyPB could be cleaved by low pH nitrous acid. Such an unexpected cleavage was reported by Liu *et al.* (23, 24), who demonstrated that nitrous acid at pH 1.5 also targets 3-*O*-sulfated GlcNH₂ residues within heparin sequence. Therefore, these data indicate that the heparin sequence that binds CyPB is likely to contain one 3-*O*-sulfated GlcNH₂. We also demonstrated that the GlcNH₂ residue required for interaction of CyPB with heparin is located at position 2 from the nonreducing end of specific octasaccharides. In our experiments, heparinase I was used to generate heparin-derived octasaccharides. As this enzyme cleaves HS essentially where GlcNS ± 6S-IdoUA2S linkage occurs (27, 40), these data indicate that

the uronic acid residue immediately upstream to GlcNH₂ could be IdoUA2S, suggesting that the heparin sequence that binds CyPB probably contains the disaccharide unit IdoUA2S-GlcNH₂3S ± 6S. This disaccharide unit was found to be the main GlcNH₂-containing unit in intestinal HS, although it could not be detected in HS from the aorta. Moreover, GlcNH₂-containing disaccharide units were also identified as targets for certain 3-OST isoforms that introduce a sulfate substituent at C₃ and thereby provide a binding site for HSV-1 glycoprotein gD (20, 48, 49). Altogether, these data strongly support the hypothesis that biosynthetic mechanisms, whereby GlcNH₂ residues are implicated, are dependent on the tissue of origin and may provide specialized and rare structural sequences that selectively interact with distinct effector proteins.

The different 3-OST isoforms are expressed at distinct levels in various human tissues, suggesting their involvement in making tissue-specific HS with different biological functions. For instance, 3-OST1 transfers sulfate groups to the 3-OH position of the GlcNS residue that is linked to a GlcUA residue at the nonreducing end (GlcUA-GlcNS ± 6S) and provides a binding site for antithrombin III (9). HS modified by 3-OST-2, -3A, -3B, -4, and -6 bind to HSV-1 gD and assist viral entry (21, 22, 50, 51). By contrast, 3-OST-5 exhibits broad substrate specificity and transfers a sulfate group on the hydroxyl group in C₃ of GlcNS or GlcNH₂ (52). To identify whether the HS sequence that binds CyPB could be 3-*O*-sulfated, we then analyzed the expression pattern of 3-OST isoenzymes in peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes, Jurkat T cells, and THP-1 cells. We found that these cells, which are responsive to CyPB, mainly express mRNA encoding 3-OST-3B alone or in combination with 3-OST-3A. Interestingly, specific down-regulation of the expression of the mRNA encoding these isoenzymes by siRNA potently reduced binding of CyPB to Jurkat T cells and consequent activation of p44/42 MAPK pathway, indicating that 3-OST-3B is a key enzyme in the biosynthesis of the HS sequence involved in the interaction with CyPB. 3-OST-3 isoforms transfer sulfate groups to the 3-OH position of GlcNH₂ residue that is linked to an adjacent upstream IdoUA2S residue (IdoUA2S-GlcNH₂ ± 6S) (23, 24, 48). Therefore, the unique substrate specificity of 3-OST-3 further supports the hypothesis that the binding HS unit for CyPB contains the disaccharide unit IdoUA2S-GlcNH₂3S ± 6S.

Infection by HSV-1 requires a two-step process, *i.e.* attachment followed by entry into cells, and it is known that HS are involved in assisting viral binding as well as viral entry. An HS motif containing IdoUA2S and GlcNS(Ac)6S residues is sufficient to make the initial contact with HSV-1 via interaction with the virion envelope glycoprotein gC or in some cases glycoprotein gB. After attachment, interaction with glycoprotein gD triggers the fusion between the viral envelope and cell membrane leading to entry of the virus. Several cellular receptors for HSV-1 gD have been described, including a member of the tumor necrosis factor receptor family, named HVEM, and two members of the immunoglobulin superfamily, designated as nectin-1 and nectin-2 (53, 54). In addition, a specific 3-*O*-sulfated HS was reported to give rise to another family of binding sites for gD and to assist viral entry in some target cells (21, 22,

Involvement of GlcNH₂3S in CyPB Binding to HS

50, 51). Interestingly, 3-OST-3 was suggested to provide unique binding sites for the glycoprotein gD via the generation of the disaccharide IdoUA2S-GlcNH₂3S ± 6S (23, 24, 48, 49). Actually, 3-OST-3-modified HS units are rarely found in HS, suggesting that the specific HS sequence required for binding of CyPB and glycoprotein gD could be the same. In this way, our findings that mRNAs encoding 3-OST-3 isoforms were barely expressed in HeLa cells correlate with the absence of high affinity binding sites for CyPB on epithelial cells and the requirement of nectin-1 as an entry receptor for HSV-1 within these cells (49). Finally, several lines of evidence indicate that HS proteoglycans do not only stabilize the interaction of CyPB with cognate signaling receptor but also act as co-stimulatory molecules to initiate signaling events, cytoskeleton rearrangement, and integrin activation (11, 12, 19, 29). These observations suggest that HSV-1 might hijack 3-O-sulfated HS proteoglycans recognized by CyPB and take them out of their original functions to facilitate its entry within some target cells.

In conclusion, we demonstrated here that efficient binding of CyPB to HS is dependent on the presence of a GlcNH₂ residue and the expression of 3-OST-3 in responsive cells, supporting the notion that this interaction is the result of specific contacts between CyPB and well defined modifications in HS. Growing data suggest a role for secreted cyclophilins in the development and/or progression of physiological inflammatory responses and pathological disorders (13, 14, 55, 56). Because the interaction of cyclophilins with cell surface HS is a key step for inducing cellular signaling events, our results provide new information for further determining the regulatory functions of HS proteoglycans in assisting the activity of extracellular cyclophilins, as well as in the development of synthetic HS-derived oligosaccharides, which may serve as therapeutic agents for treating inflammatory disorders.

Acknowledgment—We thank J. T. Gallagher for helpful discussion.

REFERENCES

1. Esko, J. D., and Lindahl, U. (2001) *J. Clin. Invest.* **108**, 169–173
2. Turnbull, J., Powell, A., and Guimond, S. (2001) *Trends Cell Biol.* **11**, 75–82
3. Capila, I., and Linhardt, R. J. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 390–412
4. Esko, J. D., and Selleck, S. B. (2002) *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 435–471
5. van den Born, J., Salmivirta, K., Henttinen, T., Ostman, N., Ishimaru, T., Miyaura, S., Yoshida, K., and Salmivirta, M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 20516–20523
6. Turnbull, J. E., Fernig, D. G., Ke, Y., Wilkinson, M. C., and Gallagher, J. T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10337–10341
7. Guimond, S. E., and Turnbull, J. E. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 1343–1346
8. Allen, B. L., and Rapraeger, A. C. (2003) *J. Cell Biol.* **163**, 637–648
9. Shworak, N. W., Liu, J., Fritze, L. M., Schwartz, J. J., Zhang, L., Logeart, D., and Rosenberg, R. D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28008–28019
10. Petitou, M., Casu, B., and Lindahl, U. (2003) *Biochimie (Paris)* **85**, 83–89
11. Allain, F., Vanpouille, C., Carpentier, M., Slomianny, M.-C., Durieux, S., and Spik, G. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 2714–2719
12. Yurchenko, V., Zybarch, G., O'Connor, M., Dai, W. W., Franchin, G., Hao, T., Guo, H., Hung, H. C., Toole, B., Gallay, P., Sherry, B., and Bukrinsky, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 22959–22965
13. Arora, K., Gwinn, W. M., Bower, M. A., Watson, A., Okwumabua, I., MacDonald, H. R., Bukrinsky, M. I., and Constant, S. L. (2005) *J. Immunol.* **175**, 517–522
14. Gwinn, W. M., Damsker, J. M., Falahati, R., Okwumabua, I., Kelly-Welch, A., Keegan, A. D., Vanpouille, C., Lee, J. J., Dent, L. A., Leitenberg, D., Bukrinsky, M. I., and Constant, S. L. (2006) *J. Immunol.* **177**, 4870–4879
15. Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J., and Speicher, D. W. (1984) *Science* **226**, 544–547
16. Schreiber, S. L. (1991) *Science* **251**, 283–287
17. Carpentier, M., Allain, F., Haendler, B., Denys, A., Mariller, C., Benaïssa, M., and Spik, G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 10990–10998
18. Carpentier, M., Allain, F., Slomianny, M.-C., Durieux, S., Vanpouille, C., Haendler, B., and Spik, G. (2002) *Biochemistry* **41**, 5222–5229
19. Vanpouille, C., Denys, A., Carpentier, M., Pakula, R., Mazurier, J., and Allain, F. (2004) *Biochem. J.* **382**, 733–740
20. Denys, A., Allain, F., Carpentier, M., and Spik, G. (1998) *Biochem. J.* **336**, 689–697
21. Shukla, D., Liu, J., Blaiblock, P., Shworak, N. W., Bai, X. M., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D., and Spear, P. G. (1999) *Cell* **99**, 13–22
22. Xu, D., Tiwari, V., Xia, G., Clement, C., Shukla, D., and Liu, J. (2005) *Biochem. J.* **385**, 451–459
23. Liu, J., Shriver, Z., Blaiblock, P., Yoshida, K., Sasisekharan, R., and Rosenberg, R. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 38155–38162
24. Liu, J., Shworak, N. W., Sinay, P., Schwartz, J. J., Zhang, L., Fritze, L. M., and Rosenberg, R. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5185–5192
25. Ke, L. D., Karaganis, A. G., and Shain, S. A. (1992) *Protein Expression Purif.* **3**, 497–507
26. Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Stedman, K., Kocher, H. P., Keller, R., Hiestand, P. C., and Movva, N. R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10735–10738
27. Wei, Z., Lyon, M., and Gallagher, J. T. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 15742–15748
28. Denys, A., Allain, F., Foxwell, B., and Spik, G. (1997) *Immunology* **91**, 609–617
29. Pakula, R., Melchior, A., Denys, A., Vanpouille, C., Mazurier, J., and Allain, F. (2007) *Glycobiology* **17**, 492–503
30. Rahmoune, H., Chen, H. L., Gallagher, J. T., Rudland, P. S., and Fernig, D. G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 7303–7310
31. Sasaki, H., Hayashi, A., Kitagaki-Ogawa, H., Matsumoto, I., and Seno, N. (1987) *J. Chromatogr.* **400**, 123–132
32. Delehedde, M., Lyon, M., Gallagher, J. T., Rudland, P. S., and Fernig, D. G. (2002) *Biochem. J.* **366**, 235–244
33. Kinsella, L., Chen, H. L., Smith, J. A., Rudland, P. S., and Fernig, D. G. (1998) *Glycoconj. J.* **15**, 419–422
34. Fernig, D. G. (2001) *Methods Mol. Biol.* **171**, 505–518
35. Rahmoune, H., Rudland, P. S., Gallagher, J. T., and Fernig, D. G. (1998) *Biochemistry* **37**, 6003–6008
36. Delehedde, M., Lyon, M., Vidyasagar, R., McDonnell, T. J., and Fernig, D. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 12456–12462
37. Shively, J. E., and Conrad, H. E. (1976) *Biochemistry* **15**, 3932–3942
38. Lyon, M., and Gallagher, J. T. (1990) *Anal. Biochem.* **185**, 63–70
39. Beattie, J., Phillips, K., Shand, J. H., Szymonowska, M., Flint, D. J., and Allan, G. J. (2005) *J. Mol. Endocrinol.* **34**, 163–175
40. Yamada, S., Murakami, T., Tsudda, H., Yoshida, K., and Sugahara, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 8696–8705
41. Osmond, R. J., Kett, W. C., Skett, S. E., and Coombe, D. R. (2002) *Anal. Biochem.* **310**, 199–207
42. Westling, C., and Lindahl, U. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 49247–49255
43. Norgard-Sumnicht, K., and Varki, A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12012–12024
44. Celie, J. W., Keuning, E. D., Beelen, R. H., Drager, A. M., Zweegman, S., Kessler, F. L., Soininen, R., and van den Born, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 26965–26973
45. Mani, K., Jönsson, M., Edgren, G., Belting, M., and Fransson, L. A. (2000) *Glycobiology* **10**, 577–586
46. van den Born, J., Gunnarsson, K., Bakker, M. A., Kjellen, L., Kusche-Gullberg, M., Maccarana, M., Berden, J. H., and Lindahl, U. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 31303–31309
47. Ding, K., Jonsson, M., Mani, K., Sandgren, S., Belting, M., and Fransson, L. A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 3885–3895
48. Liu, J., Shriver, Z., Pope, M., Thorp, S. C., Duncan, M. B., Copeland, R. J.,

- Raska, C. S., Yoshida, K., Eisenberg, R. J., Cohen, G., Linhardt, R. J., and Sasisekharan, R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 33456–33467
49. Tiwari, V., Clement, C., Xu, D., Valyi-Nagy, T., Yue, B. Y., Liu, J., and Shukla, D. (2006) *J. Virol.* **80**, 8970–8980
50. O'Donnell, C. D., Tiwari, V., Oh, M. J., and Shukla, D. (2005) *Virology* **346**, 452–459
51. Tiwari, V., O'Donnell, C. D., Oh, M. J., Valyi-Nagy, T., and Shukla, D. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 930–937
52. Xia, G., Chen, J., Tiwari, V., Ju, W., Li, J. P., Malmstrom, A., Shukla, D., and Liu, J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 37912–37919
53. Shukla, D., and Spear, P. G. (2001) *J. Clin. Investig.* **108**, 503–510
54. Spear, P. G., and Longnecker, R. (2003) *J. Virol.* **77**, 10179–10185
55. Tegeder, I., Schumacher, A., John, S., Geiger, H., Geisslinger, G., Bang, H., and Brune, K. (1997) *J. Clin. Immunol.* **17**, 380–386
56. De Ceuninck, F., Allain, F., Caliez, A., Spik, G., and Vanhoutte, P. M. (2003) *Arthritis Rheum.* **48**, 2197–2206

PUBLICATION 2

N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase-2 contributes to the synthesis of heparan sulfate motifs with cyclophilin B-binding and activating properties

Audrey Deligny¹, Agnès Denys¹, Adeline Marcant¹, Aurélie Melchior¹, Joël Mazurier¹, Toin H. van Kuppevelt², and Fabrice Allain¹

From the ¹Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche No. 8576 du CNRS, Institut de Recherche Fédératif No. 147, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France, and the ²Department of Matrix Biochemistry, Nijmegen Center for Molecular Life Sciences, Nijmegen, The Netherlands.

Running head: *N*-Sulfation of HS with CyPB-Binding Properties

Address correspondence to Fabrice Allain, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel: 33-3-20-33-72-39; Fax: 33-3-20-43-65-55; E-mail: fabrice.allain@univ-lille1.fr

Cyclophilin B (CyPB) induces migration and adhesion of T lymphocyte subsets and monocytes/macrophages, via a mechanism that requires heparan sulfate (HS) for optimal cell binding and activation. In the present study, we explored whether CyPB binding could be regulated at the biosynthetic stage of HS modifications. We first confirmed that the pattern of *N*-sulfation determines CyPB interaction with heparin and cell surface HS, as evidenced by competitive experiments with heparin derivatives, soluble HS and anti-HS antibodies. In the general scheme of HS biosynthesis, *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferases (NDSTs) catalyze the *N*-sulfation reaction, which is essential for subsequent modification steps. Of the four NDST isoforms, only NDST1 and NDST2 are widely expressed in all tissues analyzed. We showed that responsive cells to CyPB, *i.e.* peripheral blood CD4⁺ lymphocytes, monocytes/macrophages, Jurkat and THP-1 cells, expressed higher level of NDST2 relative to NDST1. Down-regulation of the expression of each isoenzyme by RNA interference reduced the level of *N*-sulfation, as demonstrated by a decrease in cell staining with anti-HS antibodies. However, NDST1 was capable *in vitro* to partially sulfate exogenous substrate in the absence of NDST2 but not *vice-versa*, indicating that both isoenzymes have not redundant but rather complementary activities. Finally, we demonstrated that knockdown of both NDSTs dramatically reduced CyPB binding and consequent activation of p44/p42 MAPK. Altogether, our results indicate that NDST2 contributes to the synthesis of HS motifs with CyPB-binding and activating

properties, probably by increasing the rate of *N*-sulfation in sequences that have been previously modified by NDST1.

Initially identified as cyclosporin A-binding proteins, cyclophilins are peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases involved in various biological processes, including protein folding, mitochondrial functions, apoptosis and regulation of trafficking and signaling (1,2). Besides the repertoire of intracellular functions in which they have been implicated, secreted cyclophilins A and B (CyPB) were reported to be mediators of inflammation and innate immunity. They trigger chemotaxis of neutrophils, T lymphocytes and monocytes/macrophages, by way of interactions with CD147 and cell surface heparan sulfate (HS) (3-7). CyPB also induces integrin-mediated adhesion of CD4⁺ T lymphocytes and monocytes/macrophages to fibronectin, by a mechanism that requires interaction with the HS moieties of syndecan-1 and association of CD147 with CD98, the latter being an activator of β 1 integrins (4,8,9).

HS consists of alternating *N*-acetyl/*N*-sulfate glucosamine (GlcNAc/GlcNS) and glucuronic/iduronic acid (GlcUA/IdoUA) residues clustered in series of domains of relatively high IdoUA content and sulfate density (NS-domains), bounded by short transition zones with intermediate sulfation pattern and separated by *N*-acetylated domains (NA-domains). HS is involved in a plethora of biological processes, which relies on its ability to selectively interact with various proteins. Heparin, which is modified to predominantly IdoUA2S-GlcNS6S disaccharides, has been widely used as a structural surrogate of the NS-domains of HS. In particular,

characterization of heparin oligosaccharides with high affinity to distinct proteins has led to the identification of specialized HS sequences with precisely located *N*- and *O*-sulfate groups (10,11). Our preliminary results have illustrated the importance of a 3-*O*-sulfated *N*-unsubstituted GlcN (GlcNH₂3S) residue in high-affinity CyPB binding to heparin and cell surface HS expressed on peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes and Jurkat T cells (12). In addition to the requirement of this structural modification, we also found that interaction of CyPB with HS/heparin was likely to be dependent on the density of *N*-sulfates. Indeed, CyPB was devoid of any reactivity with *N*-desulfated and *N*-desulfated/*N*-reacetylated heparins. Conversely, the protein displayed comparable high affinities for both heparin and membrane-associated HS on T cells, indicating that the preferred binding site of CyPB on responsive cells is probably located in a heparin-like sequence (6,12,13).

The structural distinctions in HS motifs are derived from enzymatic modifications of the nascent polymer composed of alternating GlcUA and GlcNAc units. The non-sulfated precursor is first subject to partial *N*-deacetylation/*N*-sulfation of GlcNAc residues, which leads to the occurrence of consecutively *N*-sulfated regions, regions that escape modifications and remains *N*-acetylated, and regions of alternating *N*-acetylated and *N*-sulfated disaccharide units. Sometimes, the *N*-deacetylation/*N*-sulfation reaction is incomplete and gives rise to GlcNH₂. The further modifications include C₅-epimerization of some GlcUA into IdoUA, 2-*O*-sulfation of IdoUA and 6-*O*-sulfation of GlcN units. Rarely, *O*-sulfation also occurs at position 3 of GlcNS and GlcNH₂ units. These modifications are regulated by HS biosynthetic enzymes, including *N*-deacetylases/*N*-sulfotransferases (NDSTs), C₅-epimerase and 2-*O*, 3-*O*, 6-*O*-sulfotransferases (2-OST, 3-OSTs, 6-OSTs) (11,14,15). In the general scheme of HS biosynthesis, GlcNAc *N*-deacetylation and *N*-sulfation by NDSTs create the prerequisite substrate needed for the later modifications. Four NDSTs have been cloned and characterized, NDST1 and NDST2 being widely expressed in all the tissues analyzed (16,17). Although both isoenzymes exhibit similar activity *in vitro*, accumulating data have suggested that they are probably not biologically redundant. Lack of

NDST1 affects HS structure in all tissues tested, with a dramatic reduction in *N*- and *O*-sulfation of the polysaccharide (18). In contrast, mice lacking NDST2 develop and reproduce normally, and no significant alteration in tissue HS structure was found. Heparin biosynthesis in mast cells is however severely disturbed (19-21). These studies suggest that NDST1 may be required for initiation of *N*-sulfation of the nascent precursor, while NDST2 could fill in or extend the sections of *N*-sulfated residues in heparin and highly sulfated HS species. Consistent with this hypothesis, it has been demonstrated that the level of *N*-sulfation was higher in cells transfected with NDST2 than with NDST1, confirming that the *N*-sulfation pattern may be isoform-dependent (22).

In the present work, we explored the relationships between the expression of NDST1 and NDST2 and their potential to generate HS motifs for optimal binding of CyPB. We first confirmed that interaction between CyPB and HS/heparin was highly dependent on the density of *N*-sulfate groups. We then demonstrated that CD4⁺ T lymphocytes, monocytes/macrophages, Jurkat and THP-1 cells, which are responsive to CyPB, mainly expressed mRNA encoding NDST2. Finally, we showed that both isoenzymes are not functionally redundant and that NDST2 plays an important role in the generation of HS motifs with CyPB-binding and activating properties.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials - Recombinant human CyPB and human milk lactoferrin were produced and purified as described (23,24). Porcine mucosal heparin, bovine kidney HS, heparinases I (EC 4.2.2.7), II (no EC number assigned) and III (EC 4.2.2.8) and DNase I (EC 3.1.21.1) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Porcine intestine mucosal HS was obtained from Celsius Laboratories (Cincinnati, OH). Rabbit antibodies to extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), which recognize p44/p42 mitogen-activated protein kinases (MAPK) regardless of their phosphorylation status, and mouse antibodies to phosphorylated forms of p44/p42 MAPK were purchased from Sigma and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), respectively. Horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG

antibodies were from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). The expression level of cell surface glycosaminoglycans (GAGs) was analyzed by using phage display-derived vesicular stomatitis virus (VSV)-tagged single-chain antibodies, which have been previously described for their ability to specifically recognize different GAG epitopes. The antibodies were as follows: MPB49 (irrelevant), AO4B08, HS4C3, HS4E4, RB4Ea12 (specific of HS epitopes) and IO3H10 (specific of chondroitin sulfate) (25-29). Mouse anti-VSV antibody (P5D4) and fluorescein-conjugated anti-mouse IgG were from Sigma. Reagents for electrophoresis and cell culture were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA), and Lonza BioWhittaker (Basel, Switzerland, MD), respectively. All other chemicals, except where otherwise mentioned, were purchased from Sigma.

Cells - Human lymphoblastic Jurkat T cells (clone E6-1, ATCC TIB-152, Rockville, MD) and promonocytic leukemia THP-1 cells (88081201, ECACC, Porton Down, Salisbury, UK) were routinely cultured in RPMI 1640 supplemented with 10 % (v/v) fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 10 mM gentamycin. To induce responsiveness to CypB, THP-1 cells were differentiated for 72 h with 50 nM 1-25-dihydroxy-vitamine D₃, as described (9). Human epithelial-like cervical tumor cell line Hela (ATCC CCL-2) and breast tumor cell lines MCF7 (ATCC HTB-22), MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), T-47D (ATCC HTB-133) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium, containing 10 % (v/v) FCS, 2 mM L-glutamine and 1 % (w/v) penicillin/streptomycin. Cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂. Human citrated venous blood samples were obtained from the local blood transfusion center (Etablissement de Transfusion Sanguine, Lille, France). Isolation of peripheral blood T lymphocytes and monocytes was conducted by selection with magnetic beads coupled to appropriate antibodies, according to the instructions of the manufacturer (BD Biosciences, San Jose, CA). Stimulation of T lymphocytes was obtained by incubating CD4⁺CD45RA⁺ T cells in the presence of pre-coated anti-CD3 antibody (5 µg/mL) (Immunotech, Marseille, France) in complete RPMI 1640 medium for 16 h. Macrophages were obtained by incubating freshly isolated monocytes (10⁶ cells/mL) in complete

RPMI 1640 medium supplemented with 10 ng/mL M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) (AbCys, Paris, France) for 5 days. The purity of cell populations was assessed by flow cytometry and found > 95 %.

Preparation of HS and Heparin Derivatives - Partially *N*-desulfated heparin was produced as described (30). Briefly, pyridinium salt of heparin was treated with dimethylsulfoxide/water (95:5, v/v) at 20°C for 60 min. The sample was then dialyzed extensively and freeze-dried. Fully *N*-desulfated heparin was a gift of M. Lyon (Department of Medical Oncology, University of Manchester, Christie Hospital, Manchester, UK). The degrees of *N*-desulfation were calculated from the increase in *N*-acetylated disaccharides obtained after *N*-reacetylation and digestion with heparinases (30). Disaccharide analysis revealed 25 % and 92 % reduction in *N*-sulfation for partially and fully *N*-desulfated heparins, respectively, with no significant loss of 2-*O* and 6-*O*-sulfates. Information regarding the density of GlcNS residues was obtained by deamination of HS or oligosaccharides with nitrous acid at pH 1.5 (31). Freshly prepared HNO₂ reagent was added to the dry oligosaccharide sample and incubated for 15 min at room temperature. Reaction was stopped by the addition of saturated Na₂CO₃ solution. The supernatant was immediately desalted on a Sephadex G-10 column (Amersham Biosciences) and dried under vacuum.

Fluorescent derivatization of oligosaccharides was performed by reductive amination as previously described (13). Briefly, dried samples (5-50 nmoles) were dissolved in 5 µL of acetic acid/water (3:17, v/v) containing 0.2 M of 8-aminonaphtalene-1,3,6-trisulfonic acid (ANTS) (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) and 5 µL of dimethylsulfoxide containing 1 M sodium cyanoborohydride (Fluka, Buchs, Switzerland). The mixture was incubated at 37°C for 16 h, desalted on a 10 mL-Sephadex G-15 column and thereafter dried under vacuum.

Real-Time PCR - Total RNA was isolated from 3 x 10⁶ cells using a NucleoSpin RNA II kit, according to the instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Reverse transcription was performed from 2 µg of total RNA with an oligo-dT primer and M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI). PCR amplifications were performed using a

Mx4000 Multiplex Quantitative PCR System (Stratagene, La Jolla, CA). Synthetic primers for NDST1 and NDST2 were designed by using Primer Premier 5.0 (Biosoft Int., Palo Alto, CA), according to the published cDNA sequences (accession numbers: NM_001543 and NM_003635, respectively). Primers sequences were as follows: NDST1, 5'-ACC ACA GCC AGA CTG AAC GTT TGT G-3' (forward) and 5'-ACA GGG AAA TGT CCA GTC TGT CTC C-3' (reverse); NDST2, 5'-TTC CAG TCT GGG CTG ATG TCC CAG C-3' (forward) and 5'-GTA GAT CCC ACT GCC TGG CTA AAG G-3' (reverse). The transcript of *HPRT* (hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transferase) (NM_000194) was used as a control to normalize the expression of our genes of interest: 5'-GAC CAG TCA ACA GGG GAC AT-3' (forward) and 5'-AAC ACT TCG TGG GGT CCT TTT C-3' (reverse). The sequence of each amplified product was confirmed by sequencing (Genoscreen, Lille, France). Each reaction consisted of 25 μ L containing 2 μ L of diluted cDNA sample (1/5), 12.5 μ L Brilliant SYBR Green qPCR master mix (2X) (Stratagene), 1 μ L of forward primer (15 μ M for NDST1 and NDST2, 22.5 μ M for HPRT), 1 μ L of reverse primer (15 μ M) (Eurogentec, Seraing, Belgium) and 8.5 μ L of water. Each PCR reaction also included a reverse transcription negative control and a non-template negative control to check for the absence of genomic DNA and primer dimers, respectively. The conditions of PCR were as follows: 1 cycle of denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 1 min at specific Ta (60°C for NDST1 and NDST2, 51°C for HPRT) and 30 s at 72°C. The fluorescence data were measured at the end of each cycle. A melting curve (55–95°C at 1°C interval) was constructed for each primer pair to check for the presence of one gene-specific peak. The amplification efficiency of each primer pair was performed on serial dilutions of cDNA. Triplicate PCR reactions were prepared for each sample. The point at which the PCR product is first detected above a fixed threshold, termed cycle threshold (Ct), was determined for each sample, and the average Ct of triplicate samples was used for further analysis. The relative quantification of transcripts was calculated as described (32).

RNA Interference - Synthetic small-interfering RNA (siRNA) duplexes with symmetric 3'-

deoxythymidine overhangs (Eurogentec) were used to carry out RNA interference. Two synthetic siRNA duplexes (siNDST1 and siNDST2) corresponding to the NDST1 mRNA sequence 5'-CCU CCG ACU UCU ACU UUG AdTdT-3' (nucleotides 2508-2526) and to the NDST2 mRNA sequence 5'-GGA CCU UAG UUC CCA ACU UdTdT-3' (nucleotides 1591-1609) were used to inhibit the expression of mRNA encoding NDST1 and NDST2. The oligonucleotide sequences were subjected to a BLAST search analysis and no significant identity to other sequences could be detected. A synthetic siRNA duplex (siGFP) corresponding to the green fluorescent protein mRNA sequence 5'-GAA CGG CAU CAA GGU GAA CTT dTdT-3' was used as a negative control. Jurkat T cells were transiently transfected using the nucleofection technology according to Amaxa Biosystems protocol (Amaxa, Cologne, Germany). Briefly, cells were resuspended in 100 μ L of Cell Line Nucleofector Solution V and the cell suspension were nucleofected with 4 μ g of siRNA using the program X-001. After nucleofection, cells were transferred into pre-warmed complete maintenance medium and were cultured as described before. To monitor the transfection efficacy, a fluorescein-tagged siRNA duplex was transfected in parallel and the transfection rate was evaluated by flow cytometry and found >85 %.

Carbohydrate Electrophoresis and Mobility Shift Assay (EMSA) - ANTS-labeled dodecasaccharides (0.6 nmole) and CypB (0.1 nmole) were mixed in 20 μ L of electrophoresis binding buffer, containing 20 mM Tris-HCl pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, and incubated in the absence or presence of heparin derivatives or soluble HS (20 μ g) for 30 min at room temperature. Following addition of 5 μ L of 60 % (v/v) glycerol, the samples were subjected to electrophoresis in a 10 % (w/v) native polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried at 100 V for 1-2 h at 4°C in a Mini-PROTEAN 3 system (Bio-Rad). The electrophoretic buffer used was 40 mM Tris/acetic acid, 1 mM EDTA, pH 7.8. A mixture of bromophenol blue and phenol red was used as electrophoresis markers. At the end of the electrophoresis, images were acquired with the Gel Doc 2000 system from Bio-Rad, equipped with a 365 nm UV-transilluminator. Analysis was performed with supplied software Quantity One.

In Vitro N-Sulfation Assays - Jurkat T cells ($25 \times 10^6/\text{mL}$) were lysed in solubilization buffer containing 50 mM MES, 10 mM MnCl_2 , 10 mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , 1 % Triton X-100 (v/v), pH 7.0, supplemented with protease inhibitor mixture (Roche, Meylan, France) and DNase I, for 16 h at 4°C . Following centrifugation at 10,000 g for 15 min, anionic molecules were removed by chromatography on DEAE-Sepharose and the effluent was used as the source of endogenous enzymes. Desulfated heparin has been commonly used as a sulfate acceptor to quantify *N*-sulfotransferase activity *in vitro* (33). We therefore applied a similar experimental procedure, with the following modifications. Heparin-derived oligosaccharides (dp14) were fully *O*- and *N*-desulfated by treatment with 10 % (v/v) methanol in dimethylsulfoxide at 100°C for 2 h and thereafter *N*-reacetylated as described (30). Thereafter, oligosaccharides were labeled at the reducing end with ANTS and used as sulfate acceptor. The sulfation reaction was performed by incubating cell lysate (100 μg of solubilized proteins) with 5 μg of acceptor and 10 μM of PAPS (3'-phosphoadenosyl 5'-phosphosulfate) in a total volume of 50 μL of solubilization buffer, for 3 h at 37°C . The reaction was stopped by the addition of 200 μL of a solution of 10 % (v/v) ATCA containing 1 M NaCl. After centrifugation and passage through a Sephadex G-15 column equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, the fractions containing oligosaccharides was loaded on a 1-mL DEAE-Sepharose column. After washing with the same buffer containing 0.4 M NaCl, *N*-sulfated oligosaccharides were eluted in the presence of 1.5 M NaCl, desalted, dried under vacuum and subjected to a deaminative cleavage with HNO_2 at pH 1.5. The cleavage products were fractionated on Bio-Gel P-6 (Bio-Rad) column equilibrated in 0.1 M NH_4HCO_3 (20 x 0.8 cm). Fractions of 500 μL were collected and analyzed for fluorescence by using a TriStar LB 941 multimode microplate reader (Berthold, Bad Wildbad, Germany).

Flow Cytofluorimetry Analysis - The expression level of cell surface GAGs was determined by incubating cells (5×10^5 cells per sample) with VSV-tagged single-chain antibodies in Dulbecco's PBS containing 0.5 % BSA (w/v) (DPBS/BSA), for 1 h at 4°C . After washing, mouse anti-VSV antibody (1/1000) was added for

another 1 h-incubation, and cells were stained with fluorescein-conjugated anti-mouse IgG (1/64). The following dilutions were retained: HS4E4, 1/50; HS4C3, 1/150; AO4B08, 1/100; RB4Ea12, 1/100. Non-specific binding was determined individually by using the isotype control antibody MPB49 at the same dilution. Increasing the amount of antibodies did not modify the variations in fluorescence mean values, thus validating the experimental procedure. The expression of cell markers on peripheral blood T lymphocytes and monocytes was determined by incubating cells in DPBS/BSA with the appropriate monoclonal anti-marker antibodies or the respective isotype-matched control IgG (all from Becton Dickinson, Mountain View, CA). After washing, cells were labeled with fluorescein-conjugated anti-mouse IgG. In all experiments, cells were washed twice and immediately used for analysis. Data were monitored on a Becton Dickinson flow cytofluorimeter (FACScalibur) and analyzed with CellQuest software (Mountain View, CA). Results are expressed as variations of fluorescence mean values (ΔFMV %).

Cell Binding Assays - Interaction between immobilized ligands (CyPB or lactoferrin) and cell surface HS was determined in 96-well microtiter plates (Nunc-Polylabo, Strasbourg, France), as described in (34). Briefly, cells (8×10^6 cells per mL in DPBS/BSA) were allowed to adhere to immobilized ligand (1 μg of CyPB or 4 μg of lactoferrin per well, respectively) for 45 min at 20°C . After washing with PBS, adherent cells were fixed with 3 % (w/v) formaldehyde pH 7.8, stained with 1 % (w/v) methylene blue in 100 mM borate buffer, pH 8.2 and lysed with 0.1 M HCl. The absorbance, which is proportional to the number of adhered cells, was measured at 590 nm with a microplate Bio-Rad reader Model 550. Cell adhesion was estimated by using standard curves in which absorbance was related to cell numbers. In control experiments, cells were pretreated for 1 h at 37°C with heparinases (0.2 units/ 10^6 cells) and used for adhesion assays. For competitive binding assays, cells were allowed to adhere to immobilized ligands in the presence of increasing concentrations of heparin derivatives, soluble HS or anti-HS antibodies. Statistical significance was determined using the Student's t-test, and p-values < 0.05 were considered as significant.

Analysis of p44/p42 MAPK Activation -

Activation of p44/p42 MAPK was analyzed essentially as described in (12). Jurkat T cells were cultured overnight in the presence of 1 % (v/v) FCS and stimulated with 50 nM CyPB or 250 nM lactoferrin at 37°C. At various times, cells (10⁶ per sample) were washed in cold PBS and lysed for 3 h at 4°C in 75 µL of lysis buffer (20 mM phosphate, pH 7.4, 350 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, 20 % (v/v) glycerol) supplemented with 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride and protease inhibitor cocktail. The lysates were clarified by centrifugation and used for immunoblotting. Proteins were separated on 10 % (w/v) SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (Schleicher & Schull, Dassel, Germany). The blots were blocked for 1 h at room temperature in 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween-20, 3 % (w/v) BSA. Membrane was probed for 2 h with primary antibodies in Tris buffer supplemented with 1 % (w/v) BSA. After washing, immunoreactive proteins were visualized with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies by using a chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences).

RESULTS

CyPB Binding to HS/heparin is Dependent on N-Sulfate Density - We recently used EMSA with fluorescent oligosaccharides to demonstrate that an octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of CyPB to heparin and cell surface HS (13). In a first set of experiments, we used the same approach to investigate the importance of *N*-sulfate density in CyPB binding. To this end, we analyzed the capability of chemically *N*-desulfated heparin derivatives and soluble HS to compete for the binding of CyPB to a heparin-derived dp12 (Fig. 1A). As previously reported, interaction of CyPB with fluorescent oligosaccharides led to the formation of a complex that did not migrate into the gel and therefore could be visualized at the top of the gel. As expected, a 10-fold excess (w/w) of unmodified heparin was efficient to get a complete inhibition of CyPB binding to ANTS-labeled dp12. In contrast, fully *N*-desulfated heparin was not able to dissociate the complex between CyPB and ANTS-labeled dp12, showing that *N*-

desulfated heparin did not inhibit the interactions between CyPB and fluorescent oligosaccharides (less than 10 % of inhibition). The formation of an apparent stable complex could be visualized in the presence of partially *N*-desulfated heparin. The relative intensity of the complex was reduced by ~35 %, indicating that partial removal of *N*-sulfate groups was sufficient to dramatically alter the capability of heparin to inhibit the interactions between CyPB and fluorescent oligosaccharides. The intensity of the complexes was reduced by almost 70 % and 55 % in the presence of HS from bovine kidney and porcine mucosal, respectively. This indicated that soluble HS were able to inhibit the interaction between CyPB and fluorescent oligosaccharides, although to a lesser extent than unmodified heparin. However, they were more efficient competitors than partially *N*-desulfated heparin. In our hands, partial *N*-desulfation of heparin resulted in a loss of 25 % *N*-sulfate density (71.9 % versus 95.2 % for unmodified heparin). Moreover, treatment with HNO₂ at pH 4 generated fragments of homogeneous size, demonstrating that partial chemical *N*-desulfation was random (data not shown). In contrast, the overall *N*-sulfate densities of bovine kidney and porcine mucosal HS, in which GlcNS are known to be clustered in NS-domains, are 48.3 % and 42.2 % respectively, indicating that CyPB binding is likely to be dependent on *N*-sulfate density and structural arrangement of GlcNS in HS sequences.

To validate these results, we compared the ability of chemically *N*-modified heparins and soluble HS to inhibit the binding of CyPB to Jurkat T cells (Fig. 1B). Unmodified heparin was used as a control to ensure that soluble heparin was effective to give a complete inhibition of CyPB binding to cell surface. The 50 % inhibitory concentration (IC₅₀) of unmodified heparin was approximately 0.5 µg/mL, while the IC₅₀ of partially *N*-desulfated heparin was 100-times higher. Completely *N*-desulfated heparin was devoid of any inhibitory properties. As expected, we found that bovine kidney and mucosal porcine HS were also poor competitors, with IC₅₀ around 10 and 100 µg/mL, respectively.

CyPB Binding to Cell Surface HS is Dependent on the Interaction with Specific N-Sulfated Motifs - To further establish the correlation between structural features of cell surface HS and specific binding of CyPB to responsive cells, flow

cytometric analysis was performed on T lymphocytes and monocytes/macrophages with antibodies recognizing specific sulfated HS epitopes (Table I). The reactivity of anti-HS antibodies was first determined with Jurkat T cells (Fig. 2A). HS4C3 and AO4B08, which react with highly sulfated HS/heparin epitopes, efficiently stained cell surface, even though the epitope recognized by AO4B08 appeared less represented. RB4Ea12, which reacts with a less sulfated epitope, was as efficient as HS4C3 to stain cell surface of Jurkat T cells, while HS4E4, which recognizes distinct HS epitope with low *O*-sulfation, was the less reactive anti-HS antibody.

We reproduced the experiments with peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes and monocytes/macrophages (Fig. 2B). CD4⁺CD45RA⁺ T cells were not significantly immunostained with anti-HS antibodies, indicating that HS was absent or barely expressed on the cell surface of naive T cells. In contrast, a significant staining could be observed on CD4⁺CD45RO⁺ and activated CD4⁺ T cells. Experiments were conducted with peripheral blood T lymphocytes isolated from at least three different healthy donors. Although some inter-individual variations in the fluorescence intensity have been observed, the anti-HS antibody binding profiles were similar. These data indicate that the expression level of HS on CD4⁺ T lymphocytes was dependent on the stage of activation and/or maturation. Fluorescence values were low compared to Jurkat T cells, indicating that HS was less expressed at the surface of primary T cells. However, the profiles of cell immunostaining resembled each other, suggesting that activated/memory CD4⁺ T lymphocytes and Jurkat T cells expressed cell surface HS with similar structural features. Taken into account the reactivity of anti-HS antibodies (Table I), these results indicate that membrane-associated HS on T cells contained *N*-sulfated sequences enriched in IdoUA residues and 3-*O* and 6-*O*-sulfate groups.

The reactivity of antibodies with primary monocytes was low (HS4C3 and RB4Ea12) or not significant (HS4E4 and AO4B08), indicating that these cells express low level of HS. Cell immunostaining with HS4C3, RB4Ea12 and AO4B08 was increased after stimulation with LPS, suggesting that monocyte activation induced the expression of cell surface HS with specific epitopes. Following monocyte differentiation into

macrophages, a low but significant staining was observed with anti-HS antibodies, demonstrating that *in vitro* differentiation of monocytes did not dramatically increase the level of expression of cell surface HS. Finally, we determined the expression of HS on differentiated THP-1 cells, which are used as a cellular model of monocytes/macrophages. All the HS antibodies markedly reacted with surface-associated HS on these cells. Although the intensity of fluorescence was higher with differentiated THP-1 cells, the profile of cell immunostaining resembled that of macrophages, indicating that both cell types express cell surface HS with similar structural features.

To gain insights into the relationships between structural information and biological activity, we analyzed the ability of anti-HS antibodies to inhibit the binding of CyPB to Jurkat and THP-1 cells (Fig. 3). By comparison with irrelevant antibody, we found that HS4E4 did not inhibit the interaction between CyPB and responsive cells, indicating that the HS sequences recognized by both the antibody and CyPB did not overlap. In contrast, HS4C3, RB4Ea12 and AO4B08 efficiently reduced the interaction between CyPB and cell surface HS, confirming that CyPB interacted with *N*-sulfated motifs containing 3-*O* and 6-*O*-sulfate groups. Moreover, AO4B08 was more efficient than HS4C3 and RB4Ea12 to inhibit the interaction. Given that this antibody recognizes highly *N*- and *O*-sulfated epitopes containing internal 2-*O*-sulfated IdoUA residue, these results indicate that HS sequences containing these structural modifications are critically involved in the efficient interaction with CyPB.

NDST2 is Highly Expressed in T Lymphocytes and Monocytes/Macrophages - In the following experiments, we analyzed whether the *N*-sulfate density of the high affinity CyPB-binding sites could be consequent to the relative expression of NDST1 and NDST2. To this end, we first analyzed the respective levels of expression of mRNAs encoding both NDST isoforms by real-time RT-PCR. As shown in Fig. 4, peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes and monocytes/macrophages predominantly expressed mRNA encoding NDST2. The transcript encoding NDST1 was barely detected in naive T lymphocytes by comparison with memory and activated CD4⁺ T cells, while no notable variation in the expression of NDST2 could be distinguished between T cell

subsets. Conversely, the expression of NDST2 in monocytes was clearly modified following cell activation or differentiation, while the same treatment had no significant effect on the level of mRNA encoding NDST1. The level of expression of NDST1 and NDST2 in Jurkat T cells and THP-1 cells (Fig. 4) was lower than in primary cells, which could, however, be due to the transformed phenotype of cell lines. Most interestingly, the profiles of the relative expression of both isoenzymes remained quite similar to those observed in CD4⁺ T lymphocytes and monocytes/macrophages. We then analyzed the expression of mRNAs encoding these enzymes in human epithelia cell lines Hela, MCF7, T-47D and MDA-MB-231 (Fig. 4). Although these cells produce high levels of HS by comparison with T lymphocytes and monocytes/macrophages, they are devoid of high-affinity binding sites for CyPB (12). We found here that transcript encoding NDST1 was the main NDST mRNA expressed in these non-responsive cells. These findings raise the intriguing possibility that the synthesis of HS with CyPB-binding properties could be correlated to cell-type specific variations in the expression of NDST1/NDST2.

N-Sulfation is Differently Altered by Down-Regulation of NDST1 or NDST2 - To gain evidence into the relationships between the expression of NDSTs and the biosynthesis of CyPB-binding sites, we developed a model based on the use of RNA interference. First, we checked that treatment of Jurkat T cells with irrelevant siRNA did not induce any decrease in the expression of mRNAs encoding both NDST1 and NDST2. The specific siRNAs were thereafter tested for their ability to suppress mRNAs encoding NDST1 and NDST2 without cross-reactivity. Cell transfection with siRNA targeting NDST1 (siNDST1) resulted in a significant down-regulation of the corresponding mRNA. Inhibition was found to reach 80 % at day 1, and the inhibitory effect was maintained for 3 days. A similar decrease in the expression of mRNA encoding NDST2 was observed in Jurkat T cells treated with the corresponding siRNA (siNDST2). The expression of mRNA encoding NDST1 isoform was not significantly altered by siNDST2, nor was mRNA encoding NDST2 by siNDST1, demonstrating the specificity of both siRNA used in this assay (Fig. 5A). Notably, we also checked

that the transcripts of other HS biosynthetic enzymes were expressed at the same level in control and siRNA-treated cells, thus indicating that expected changes in the structural and functional properties of HS would only be due to NDST isoform down-regulation (data not shown).

We then analyzed whether silencing the expression of NDST1 or NDST2 led to a consequent decrease in HS *N*-sulfation. To this end, Jurkat T cells were treated with siRNA and immunostained with anti-HS antibodies, 48 h post-transfection. By comparison with non transfected cells or cells transfected with irrelevant siRNA, silencing the expression of NDSTs resulted in a dramatic loss of the reactivity of HS4E4, HS4C3, AO4B08 and RB4Ea12, which all recognize *N*-sulfated epitopes (Fig. 5B). Moreover, specific siRNAs did not reduce cell immunostaining with anti-proteoglycan antibodies, confirming that the loss of reactivity of anti-HS antibodies was due to a decrease in *N*-sulfation of HS moieties rather than inhibition of cell surface expression of proteoglycans (data not shown). Finally, we analyzed the binding of IO3H10 (1/150), which reacts with an epitope in chondroitin sulfate A (27), to check whether down-regulation of NDSTs did not affect sulfation of other cell surface GAGs. Surprisingly, we found that silencing the expression of NDST1, and to a lesser extent of NDST2, increased the binding of IO3H10 to Jurkat T cells. These findings suggest that the loss of HS sulfation had probably made available the amount of sulfate donor to modify other membrane-associated GAGs. Altogether, these data demonstrate that specific silencing mRNAs encoding NDST1 and NDST2 has led to a decrease in the expression and activity of corresponding enzyme, thus indicating that both isoenzymes were active in Jurkat T cells. Although some differences could be observed in the loss of reactivity of anti-HS antibodies, this method was not discriminant enough to reveal whether both isoenzymes differently affect *N*-sulfation of cell surface HS.

To further establish how silencing the expression of NDST1 and NDST2 modified *N*-sulfate density of HS, we used an *in vitro* approach, in which Jurkat T cell lysates were used as enzyme sources and ANTS-labeled desulfated/*N*-reacetylated dp14 as substrates. The oligosaccharides were first incubated with cell

lysates and thereafter treated with HNO₂ pH 1.5, which specifically target GlcNS residues (31). We could expect that *in vitro* modified dp14, which contain newly synthesized GlcNS residues, were sensitive to attack by low pH nitrous acid and generated degradation products smaller than parent oligosaccharides. The products of cleavage were subsequently separated by gel filtration, and the ANTS moiety served as a tag to differentiate small oligosaccharides derived at the reducing end from the parent compounds (Fig. 5C). In the absence of any incubation with cell lysate, treatment by nitrous acid did not modify the elution of fluorescent oligosaccharides, confirming that this substrate did not contain detectable *N*-sulfate groups. In contrast, incubation with cell lysate obtained from control cells and subsequent treatment with HNO₂ resulted in the production of small fluorescent species. The degradation products were mainly eluted as di- and tetrasaccharide standards, indicating that cell lysate contained active NDSTs that have efficiently modified fluorescently tagged oligosaccharides. As expected, down-regulation of the expression of NDST1 dramatically reduced the capability of cell lysate to catalyze *N*-sulfation of oligosaccharides. A little fraction (~10 % of fluorescent oligosaccharides) was sensitive to nitrous acid degradation, indicating that only partial *N*-sulfation has occurred. Given that the expression of NDST2 was not altered in these cells, the fluorescent species that migrated as small oligosaccharides could result from *N*-sulfation by this isoenzyme. Nevertheless, the lack of efficient *N*-sulfation suggested that NDST2 had a weak activity in the absence of NDST1. On the other hand, we found that the expression of NDST1 was reduced by 80 % in transfected cells. Therefore, partial *N*-sulfation could also be the consequence of a remaining pool of NDST1. We reproduced the same experiment with cell lysate in which the expression of NDST2 was down-regulated. Most of oligosaccharides were degraded by HNO₂ treatment, indicating that *N*-sulfation of fluorescent substrate occurred in the absence of NDST2. However, the degradation products were eluted earlier than di- and tetrasaccharides, suggesting that the fluorescent oligosaccharides had a lower density of *N*-sulfate groups and were consequently less sensitive to HNO₂ cleavage. We demonstrated that NDST1 expression was not

altered in cells transfected with siNDST2. Therefore, NDST1 was probably active in the absence of NDST2 and could initiate *N*-sulfation of the fluorescent substrate. However, the loss of NDST2 probably led to a decrease in the addition of *N*-sulfate groups in the fluorescent substrate. These data indicate that NDST1 and NDST2 have not redundant but rather complementary activity, probably acting sequentially to fully modify GlcN residues in HS.

NDST1 and NDST2 Contribute to the Biosynthesis of HS with CyPB-Binding and Activating Properties - To study the biological consequence of silencing NDST expression, we analyzed the interaction between CyPB and cell-surface HS in transfected cells (Fig. 6A). Lactoferrin has been demonstrated to interact with leucocytes and epithelial cells, mainly as a consequence of interaction with *N*-sulfate groups in NS-domains of HS (35, 36). We therefore used this protein as a model of HS-binding ligand in the following experiments. We first checked that binding of Jurkat T cells to immobilized CyPB or lactoferrin was potently inhibited (> 75 % of initial binding) by heparinase treatment, thus confirming that the method was appropriate to analyze interactions between these proteins and cell surface HS. Knockdown of NDST1 mRNA reduced by 60 % the binding of T cells to immobilized CyPB and lactoferrin, indicating that *N*-sulfation of GlcN residues by this isoenzyme was of critical importance to support the interactions. Moreover, these data further suggest that NDST2 was unable to compensate the lack of NDST1 and to initiate HS maturation. We reproduced the same experiment with siRNA specific for NDST2. Interestingly, we found that binding of transfected T cells to CyPB was dramatically reduced (70 % of initial binding). In contrast, down-regulation of the expression of NDST2 was less inhibitory for lactoferrin, since binding of Jurkat T cells was only reduced by ~30 %. Taking into account that NDST1 was fully active to initiate *N*-sulfation in siNDST2-treated cells, these data demonstrate that NDST2 critically contributes to the synthesis of the HS motifs that interact with CyPB.

The main intracellular event following CyPB or lactoferrin binding to T lymphocytes is the activation of p44/p42 MAPK pathway (8,12,37). When analyzing the phosphorylated status of

ERK1/2, we found that transfection of Jurkat T cells with siNDST1 dramatically reduced the ability of CyPB and lactoferrin to activate p44/p42 MAPK. Inhibition was only due to down-regulation of NDST expression, because phorbol myristate acetate (PMA), which is a strong activator of the p44/p42 MAPK pathway, efficiently induced the phosphorylation of ERK1/2 in transfected cells (Fig. 6B). Although down-regulation of the expression of NDST2 slightly affected cell surface binding of lactoferrin, the activation of p44/p42 MAPK was reduced in siNDST2-treated cells. However, the inhibitory effect was not as dramatic as that observed with CyPB. Indeed, activation of p44/p42 MAPK was abolished in transfected cells, indicating that silencing the expression of NDST2 has rendered the cells unresponsive to CyPB (Fig. 6B). Previous results have shown that NDST2 was not required to initiate *N*-sulfation but would rather contribute to increase the density of *N*-sulfate groups. Altogether, these results suggest that *N*-sulfation by NDST1 is sufficient to support the binding of lactoferrin and partial activation of signaling pathway. In contrast, contribution of NDST2 to high *N*-sulfation is absolutely required for generating HS motifs with CyPB-binding and activating properties.

DISCUSSION

The presence of HS proteoglycans (HSPGs) on the surface of peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes and monocytes has been debated for a long time. Although established cell lines, *e.g.* Jurkat and THP-1, have been reported to express cell surface HS, others studies failed to demonstrate the expression of HSPG on the surface of primary CD4⁺ T cells and monocytes (38-41). The relevance of these findings has been complicated by the demonstration that primary CD4⁺ T lymphocytes and monocytes express mRNAs encoding HS sulfotransferases and proteoglycans. Moreover, it has been shown that treatment with heparinases efficiently reduced the binding of HS ligands, thus favoring the idea that HS are expressed on the membrane of primary T cells and monocytes (6,8,42-45). Obviously, this discrepancy is likely to be due to low levels and/or transiently regulated expression of cell surface HSPGs and to difficulties to detect these

molecules by classical biochemical approaches. In support to this idea, recent studies using flow cytometry reported the expression of cell surface HS on primary T lymphocytes and monocytes following immune activation and/or differentiation (42,44,45). Using antibodies that specifically react with distinct HS epitopes, we further demonstrated that the expression of HS was dependent on the degree of cell activation or maturation. We observed a significant expression of HS on the membrane of memory and *in vitro* activated CD4⁺ T cells. In contrast, naive CD4⁺ T cells did not express any detectable levels of cell surface HS. Freshly isolated monocytes and monocyte-derived macrophages express low but significant level of cell surface HS, which was increased following LPS activation. These data suggest that stimulation of CD4⁺ T lymphocytes and monocytes induces changes in the expression of membrane-associated HS, which may be important for the regulation of inflammatory and immune responses.

In our previous works, we demonstrated that 2-*O*, 6-*O*, and *N*-sulfate groups are required for the binding of CyPB to heparin and cell surface HS from CD4⁺ T lymphocytes. These results were expected since involvement of sulfate groups is a common feature of the interaction between proteins and HS/heparin. We showed that 2-*O* and 6-*O*-desulfated heparin derivatives were poor competitors, although they were still capable to interact with CyPB. In contrast, fully *N*-desulfated and *N*-desulfated/*N*-acetylated heparins were devoid of any inhibitory properties, highlighting a critical role of *N*-sulfates in the interactions (12). The present study further supports this hypothesis. We demonstrated that a loss of 25 % in *N*-sulfate density potently reduced the ability of heparin to inhibit the interaction of CyPB with heparin-derived oligosaccharides and cell surface HS. Chemical *N*-desulfation of heparin did not significantly reduce the rate of 6-*O* and 2-*O*-sulfate groups, suggesting that *N*-sulfation rather than 6-*O* and/or 2-*O*-sulfations was of crucial importance in supporting the interaction with CyPB. Soluble HS inhibited the binding of CyPB to fluorescent oligosaccharides to a lesser extent than heparin did. However, they were better competitors than partially *N*-desulfated heparin, indicating that structural arrangement of GlcNS in NS-domains was also important for optimal

binding of CyPB. We showed in our previous work that *N*-acetylated heparin was a poor competitor of CyPB binding to immobilized heparin, thus highlighting a role for GlcNH₂ residues (12). We found here that CyPB binding to partially *N*-desulfated heparin, which contained high level of GlcNH₂ compared to unmodified heparin, was not improved but rather inhibited. Although GlcNH₂ residues are preferentially located in NA-domains and in transition zones between NA- and NS-domains, 6-*O*-sulfated and even 3-*O*-sulfated GlcNH₂ residues may also be located to the highly sulfated NS-domain of some HS species (46). This is in agreement with our previously published data showing that CyPB-binding motifs contain the disaccharide unit IdoUA2S-GlcNH₂3S±6S. Altogether, these results indicate that GlcNH₂ residues are required but not sufficient to support interaction with CyPB and suggest an interesting interplay between the requirement for 3-*O*-sulfated GlcNH₂ and *N*-sulfate density in the interactions.

To further characterize the interaction of CyPB with cell surface HS, we performed competitive binding experiments with anti-HS antibodies. We demonstrated that HS4C3 reduced CyPB binding to responsive cells. HS4C3 was reported to mainly react with GlcNS3S6S-containing sequence (25,28). However, the epitope recognized by HS4C3 was recently demonstrated to colocalize with the HS motifs that interact with glycoprotein gD of HSV-1 (47). Given that a 3-*O*-sulfated GlcNH₂ contributes to the binding of HSV-1 gD to HS/heparin and assists viral entry in target cells (48), these findings support the hypothesis that HS motifs required for binding of CyPB and the envelope protein gD of HSV-1 share common structural features. Finally, we previously reported that the binding reactions of CyPB to heparin and cell surface HS from T lymphocytes were quite similar (6,12,13). Interestingly, we found that AO4B08 was more efficient than HS4C3 and RB4Ea12 to inhibit the interaction. AO4B08 recognizes highly *N*- and *O*-sulfated HS motifs containing internal IdoUA2S residue, which are found in heparin and NS-domains of HS species (26,29). In contrast to AO4B08, HS4E4 was unable to inhibit the interaction between CyPB and T cells. HS4E4 recognizes low-sulfated HS motifs containing IdoUA and *N*-sulfated as well as *N*-acetylated GlcN residues but does not bind to

highly sulfated structures such as some found in heparin and NS-domains of HS (26,29). These results indicate that the high-affinity CyPB-binding site is probably located in a heparin-like structure, which is specifically expressed at the surface of responsive cells.

The structure of HS varies considerably depending on the tissue of origin, the developmental stage and pathophysiological conditions. This variation is based on tight regulated sulfation and epimerization upon the basic polysaccharide backbone during synthesis in the Golgi (11,14,15). In the general scheme of HS maturation, the reactions catalyzed by NDSTs are essential for the subsequent modification steps. Overexpression of NDST1 and NDST2 in HEK293 cells was reported to result in an increased *N*-sulfation of HS produced by these cells, with no parallel increase in *O*-sulfation and C₅-epimerization, thus arguing for a direct relationship between NDST activity and *N*-sulfate density. Moreover, cells stably transfected with NDST2 synthesized HS with higher level of *N*-sulfation by comparison with NDST1-transfected cells, suggesting that the *N*-sulfation pattern may be isoform-dependent (22). To know whether *N*-sulfate density of the high-affinity CyPB-binding site is regulated at the biosynthetic stage, we have analyzed the level of expression of both NDST isoforms in various cell types. Primary T lymphocytes, monocytes/macrophages and related established cell lines, *i.e.* Jurkat and THP-1, predominantly expressed mRNA encoding NDST2. Although cell activation or maturation differently affects the expression of each isoenzyme in T cells and monocytes/macrophages, the level of transcript encoding NDST2 remains higher than that of NDST1 in all cases. These data are in correspondence with previous studies reporting a higher level of NDST2 relative to NDST1 in mast cells (19), lymphoid tissues, *e.g.* thymus and spleen, and whole blood leukocytes (16,49), thus suggesting that high expression of NDST2 may be specific to cells from the hematopoietic lineages. Surprisingly, we found that the level of mRNA expression of NDST2 in naive T cells was comparable to that observed in memory and CD3-activated T cells, even though these cells did not express any detectable level of membrane-associated HS. However, a previous study reported

that CD4⁺ T lymphocytes express intracellular CD44v3, which is exposed at the cell surface following cell stimulation (50). Likewise, we and others have shown that CD4⁺ T lymphocytes and monocytes/macrophages express various HSPGs, *e.g.* syndecans and CD44v3, for which the mRNA level and cell surface expression are increased following cell activation and differentiation (8,42,43). In accordance with these data, we speculate that HSPGs are rapidly exposed to the cell surface upon stimulation of naive T cells. Thereafter, cell differentiation may be accompanied by an increase in HSPG expression, leading to their constitutive association to the cell membrane. Further investigations are in progress to validate this model and to elucidate its relevance to lymphocyte functions. Although epithelial cells produce high level of HS by comparison with T lymphocytes and monocytes/macrophages, they are devoid of any high-affinity binding sites for CyPB (12). Interestingly, we found here that epithelial cell lines express lower level of NDST2 relative to NDST1. Because high expression of NDST2 has been reported to correlate with high *N*-sulfate density in heparin and HS (19,22, 51), we checked the possibility that biosynthesis of HS motifs with CyPB-binding properties could be NDST2-dependent. As expected, down-regulation of the expression of this isoenzyme inhibited the binding of CyPB and consequent activation of p44/p42 MAPK in Jurkat T cells. However, we found that silencing the expression of NDST1 also reduced the binding and activity of CyPB, indicating that both NDSTs are required to synthesize HS motifs with CyPB-binding and activating properties.

Several aspects regarding the regulation of expression of NDST isoforms and the relative contribution of each isoenzyme to the synthesis of HS remain unclear. Systemic inactivation of NDST1 expression affects HS structure in all tissues tested. Animals succumb perinatally, thus supporting the idea that NDST1 plays a crucial role in HS maturation. In contrast, mice carrying a disruption of the gene encoding NDST2 develop and reproduce normally. They have no notable alteration in HS biosynthesis except in mast cells, in which decreased *N*-sulfation of heparin results in defective granule formation (18-20). To investigate the relative contribution of NDST1 and NDST2 to HS biosynthesis, Ledin *et al.* (21) have

analyzed the sulfation pattern of HS in mice with NDST1^{+/-}, NDST2^{-/-} and NDST1^{+/-}/NDST2^{-/-} genotypes. They demonstrated that liver HS from wild-type and knock-out animals all had the same structure despite a significant reduced NDST enzyme activity in NDST1^{+/-}/NDST2^{-/-} embryos. Similar amounts of active NDST2 were present in wild-type and NDST1^{+/-} liver extracts. However, the presence of active NDST2 did not appear to affect HS structure as long as NDST1 was also present. They concluded from their experiments that NDST1 might be preferentially incorporated within the GAGosome, a complex formed by the association of different enzymes of HS biosynthesis, while NDST2 would be frozen out. In the absence of NDST1, NDST2 could occupy the NDST position in the GAGosome and thus takes on *N*-sulfation of HS (21). Another intriguing hypothesis may be that NDST1 is required for partial *N*-sulfation of the nascent precursor and consequent initiation of other modifications, while NDST2 could fill in or extend the sections of *N*-sulfated residues to create highly sulfated domains in some HS species. Previous results have indeed reported that HS is a better substrate for recombinant NDST isoforms than bacterial polysaccharide K5, a surrogate of unsulfated HS precursor, thus suggesting that NDSTs can act on previously modified substrate (52). By using the *Cre-loxP* system of gene inactivation, Wang *et al.* (53) demonstrated that NDST1 and NDST2 contribute to *N*-sulfation of HS at a ratio of approximately 3:1 in endothelial cells. In this model, NDST1 was capable to compensate for the absence of NDST2 but not *vice-versa*, supporting the notion that both isoenzymes are not redundant. Our results are in agreement with these last studies. We demonstrated that down-regulation of the expression of NDST1 dramatically reduced NDST enzymatic activity by comparison with control, indicating that NDST2 was unable to compensate for the absence of NDST1. In contrast, *N*-sulfation still occurred in the absence of NDST2. However, a significant decrease in the *N*-sulfate density was observed, suggesting that NDST1 was not sufficient to fully compensate for the absence of NDST2. According to these results, we proposed a model in which both NDSTs have not redundant but rather complementary enzymatic activities. In responsive cells to CyPB, NDST1 may be

involved in the initiation of HS modifications whereas NDST2 could extend already modified sequences and increase the *N*-sulfate density in HS sequences. This would be possible if NDST1 and NDST2 localized to different Golgi compartments. NDST1 was reported to interact with the HS polymerase EXT2, thus suggesting that it takes part in the first modifications of HS precursor (54). In cells where NDST2 expression is high by comparison with NDST1, NDST2 may act in increasing the level of *N*-sulfation in sequences that have been previously modified by enzymes in a more proximal part of the Golgi network.

Although HS have been reported to interact with a wide range of inflammatory factors, little information on their functions in leukocyte biology and regulation of their biosynthesis is available. In earlier study, Tanaka *et al.* (55) proposed that leukocyte HS could be involved in chemokine-dependent autocrine stimulation of integrin triggering, thus allowing integrin-mediated adhesion to endothelial cells. Most recently, Garner *et al.* (49) demonstrated that conditioned deletion of the gene encoding NDST1 altered the distribution of T cells in the spleen, indicating that cell surface HS may also play a role in regulating the activity of attracting ligands and organization of trafficking regions in lymphoid tissues. We previously reported that CyPB induces chemotaxis and integrin-mediated adhesion of CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes and monocytes/macrophages, suggesting that it contributes to the emigration of these cells from the circulation into areas of tissue inflammation (4,8,9). We demonstrated here that binding of CyPB and consequent activation of target cells are critically dependent on the expression of both NDST1 and NDST2. These results suggest a direct correlation

between the expression of HS biosynthetic enzymes and the responses triggered by chemo-attracting factors. Given that HS structure varies distinctly as a result of cell activation and/or differentiation, modulation of the enzymatic machinery of HS biosynthesis in leukocytes may result in the expression of cell surface HS with distinct binding properties for inflammatory factors. This may play an important role in the regulation of inflammatory and immune responses.

Another conclusion from our studies is that the overall NDST enzymatic activity does not determine the pattern of HS *N*-sulfation. Instead, a critical step of regulation may be the cell-type relative expression of NDST isoforms and the contribution of each isoform to HS modifications. Previous works have suggested that the degree of *N*-sulfation determines the extent of *O*-sulfation. However, 3-OSTs and 6-OSTs are also represented by distinct isoenzymes, indicating that the mechanisms that control the pattern of 3-*O* and 6-*O*-sulfations may be more complicated. In support to this idea, 6-*O*-sulfation may occur in NS- and NA-domains (56). This clearly indicates that more work is needed to establish the cooperation between NDST and other HS biosynthetic enzymes, and to elucidate the mechanisms that control biosynthesis of cell-type specific HS with distinct structural and functional properties. In this context, a growing interest has focused on the use of recombinant enzymes to synthesize HS mimetics with therapeutic application. A better understanding of the tight regulation of HS biosynthesis will be helpful for the selection of recombinant isoenzymes that will take part in the synthesis of oligosaccharides with expected modifications.

REFERENCES

1. Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J., and Speicher, D.W. (1984) *Science* **226**, 544-547
2. Barik, S. (2006) *Cell Mol Life Sc* **63**, 2889-2900
3. Yurchenko, V., O'Connor, M., Dai, W.W., Guo, H, Toole, B., Sherry, B., and Bukrinsky, M. (2001) *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 786-788
4. Allain, F., Vanpouille, C., Carpentier, M., Slomianny, M-C., Durieux, S., and Spik, G. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 2714-2719
5. Yurchenko, V., Constant, S., and Bukrinsky, M. (2006) *Immunology* **117**, 301-309
6. Denys, A., Allain, F., Carpentier, M., and Spik, G. (1998) *Biochem J* **336**, 689-697

7. Arora, K., Gwinn, W.M., Bower, M.A., Watson, A., Okwumabua, I., MacDonald, H.R., Bukrinsky, M.I., and Constant, S.L. (2005) *J Immunol* **175**, 517-522
8. Pakula, R., Melchior, A., Denys, A., Vanpouille, C., Mazurier, J., and Allain, F. (2007) *Glycobiology* **17**, 492-503
9. Melchior, A., Denys, A., Deligny, A., Mazurier, J., and Allain, F. (2008) *Exp. Cell Res.* **314**, 616-628
10. Capila, I., and Linhardt, R. J. (2002) *Angew Chem Int Ed* **41**, 390-412
11. Ori, A., Wilkinson, M.C., Fernig, D.G. (2008) *Front Biosci* **13**, 4309-4338
12. Vanpouille, C., Deligny, A., Delehedde, M., Denys, A., Melchior, A., Liénard, X., Lyon, M., Mazurier, J., Fernig, D.G., and Allain, F. (2007) *J Biol Chem* **282**, 24416-24429
13. Vanpouille, C., Denys, A., Carpentier, M., Pakula, R., Mazurier J., and Allain F. (2004) *Biochem J* **382**, 733-40
14. Turnbull, J., Powell, A., and Guimond, S. (2001) *Trends Cell Biol* **11**, 75-82
15. Esko J.D., and Selleck S.B. (2002) *Annu Rev Biochem* **71**, 435-471
16. Aikawa, J. and Esko, J.D. (1999) *J Biol Chem* **274**, 2690-2695
17. Aikawa, J., Grobe, K., Tsujimoto, M., and Esko, J.D. (2001) *J Biol Chem* **276**, 5876-5882
18. Ringvall, M., Ledin, J., Holmborn, K., van Kuppevelt, T., Ellin, F., Eriksson, I., Olofsson, A.M., Kjellen, L., and Forsberg, E. (2000) *J Biol Chem* **275**, 25926-25930
19. Forsberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L., and Kjellén, L. (1999) *Nature* **400**, 773-776
20. Ledin, J., Staatz, W., Li, J.P., Götte, M., Selleck, S., Kjellén, L., and Spillmann, D. (2004) *J Biol Chem* **279**, 42732-42741
21. Ledin, J., Ringvall, M., Thuveson, M., Eriksson, I., Wilén, M., Kusche-Gullberg, M., Forsberg, E., and Kjellén, L. (2006) *J Biol Chem* **281**, 35727-35734
22. Pikas, D.S., Eriksson, I., and Kjellen, L. (2000) *Biochemistry* **39**, 4552-4558
23. Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquetlet, S., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H., and Vliegenthart, J.F. (1982) *Eur J Biochem* **121**, 413-419
24. Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Stedman, K., Kocher, H. P., Keller, R., Hiestand, P. C., and Movva, N. R. (1991) *J Biol Chem* **266**, 10735-10738
25. van Kuppevelt, T.H., Dennissen, M.A., van Venrooij, W.J., Hoet, R.M., and Veerkamp, J.H. (1998) *J Biol Chem* **273**, 12960-12966
26. Dennissen, M.A., Jenniskens, G.J., Pieffers, M., Versteeg, E.M., Petitou, M., Veerkamp, J.H., and van Kuppevelt, T.H. (2002) *J Biol Chem* **277**, 10982-10986
27. Smetsers, T.F., van de Westerlo, E.M., ten Dam, G.B., Clarijs, R., Versteeg, E.M., van Geloof, W.L., Veerkamp, J.H., van Muijen, G.N., and van Kuppevelt, T.H. (2003) *Cancer Res* **63**, 2965-2970
28. ten Dam, G.B., Kurup, S., van de Westerlo, E.M., Versteeg, E.M., Lindahl, U., Spillmann, D., and van Kuppevelt, T.H. (2006) *J Biol Chem* **281**, 4654-4662
29. Kurup, S., Wijnhoven, T.J., Jenniskens, G.J., Kimata, K., Habuchi, H., Li, J.P., Lindahl, U., van Kuppevelt, T.H., and Spillmann, D. (2007) *J Biol Chem* **282**, 21032-21042
30. Wei, Z., Lyon, M., and Gallagher, J.T. (2005) *J Biol Chem* **280**, 15742-15748
31. Shively, J.E., and Conrad, H.E. (1976) *Biochemistry* **15**, 3932-3942
32. Pfaffl, M.W. (2001) *Nucleic Acids Res* **1**, e45
33. Bame, K.J., Reddy, R.V., and Esko, J.D. (1991) *J Biol Chem* **266**, 12461-12468
34. Carpentier, M., Allain, F., Slomianny, M.-C., Durieux, S., Vanpouille, C., Haendler, B., and Spik, G. (2002) *Biochemistry* **41**, 5222-5229
35. Pejler, G. (1996) *Biochem J* **320**, 897-903
36. Damiens, E., El Yazidi, I., Mazurier, J., Ellass-Rochard, E., Duthille, I., Spik, G., and Boilly-Marer, Y. (1998) *Eur J Cell Biol* **77**, 344-351
37. Dhennin-Duthille, I., Masson, M., Damiens, E., Fillebeen, C., Spik, G., and Mazurier, J. (2000) *J Cell Biochem* **79**, 583-593

38. Clasper, S., Vekemans, S., Fiore, M., Plebanski, M., Wordsworth, P., David, G., and Jackson D.G. (1999). *J Biol Chem* **274**, 24113-24123
39. Ibrahim, J., Griffin, P., Coombe, D.R., Rider, C.C., and James, W. (1999) *Virus Res* **60**, 159-169
40. Manakil, J.F., Sugerman, P.B., Li, H., Seymour, G.J., and Bartold, P.M. (2001) *J Dent Res* **80**, 1704-1710
41. Makatsori, E., Karamanos, N.K., Papadogiannakis, N., Hjerpe, A., Anastassiou, E.D., and Tsegenidis, T. (2001) *Biomed Chromatogr* **15**, 413-417
42. Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D.C., Huang, Y., and Ruscetti, F.W. (2005) *J Virol* **79**, 12692-12702
43. Wegrowski, Y., Milard, A.L., Kotlarz, G., Toulmonde, E., Maquart, F.X., and Bernard, J. (2006) *Clin Exp Immunol* **144**, 485-493
44. den Dekker, E., Grefte, S., Huijs, T., ten Dam, G.B., Versteeg, E.M., van den Berk, L.C., Bladergroen, B.A., van Kuppevelt, T.H., Figdor, C.G., and Torensma, R. (2008) *J Immunol* **180**, 3680-3688
45. Garner, O.B., Yamaguchi, Y., Esko, J.D., and Videm, V. (2008) *Immunology* **125**, 420-429
46. Westling, C., and Lindahl, U. (2002) *J Biol Chem* **277**, 49247-49255
47. Tiwari, V., Ten Dam, G.B., Yue, B.Y., van Kuppevelt, T.H., and Shukla, D. (2007) *FEBS Lett* **581**, 4468-4472
48. Liu, J., Shriver, Z., Pope, M., Thorp, S.C., Duncan, M.B., Copeland, R.J., Raska, C.S., Yoshida, K., Eisenberg, R. J., Cohen, G., Linhardt, R.J., and Sasisekharan, R. (2002) *J Biol Chem* **277**, 33456-33467
49. Pallerla, S.R., Lawrence, R., Lewejohann, L., Pan, Y., Fischer, T., Schlomann, U., Zhang, X., Esko, J.D., and Grobe, K. (2008) *J Biol Chem* **283**, 16885-16894
50. Forster-Horváth, C, Bócsi, J., Rásó, E., Orbán, T.I., Olah, E., Tímár, J., and Ladányi, A. (2001) *Eur J Immunol* **31**, 600-608
51. Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Pikas, D.S., and Kjellén, L. (1998) *J Biol Chem* **273**, 11902-11907
52. van den Born, J., Pikas, D.S., Pisa, B.J., Eriksson, I., Kjellen, L., and Berden J.H. (2003) *Glycobiology* **13**, 1-10
53. Wang, L., Fuster, M., Sriramarao, P., and Esko, J.D. (2005) *Nat Immunol* **6**, 902-910
54. Presto, J., Thuveson, M., Carlsson, P., Busse, M., Wilén, M., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M., and Kjellén, L. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 4751-4756
55. Tanaka, Y., Kimata, K., Wake, A., Mine, S., Morimoto, I., Yamakawa, N., Habuchi, H., Ashikari, S., Yamamoto, H., Sakurai, K., Yoshida, K., Suzuki, S., and Eto, S. (1996) *J Exp Med* **184**, 1987-1997
56. Smeds, E., Habuchi, H., Do, A.T., Hjertson, E., Grundberg, H., Kimata, K., Lindahl, U., and Kusche-Gullberg, M. (2003) *Biochem J* **372**, 371-380

FOOTNOTES

*This investigation was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Université des Sciences et Technologies de Lille, France. We are grateful to Christophe Vanpouille (National Institute of Health, Bethesda, MD) for helpful discussion and Malcolm Lyon (University of Manchester, UK) for providing us with fully *N*-desulfated heparin.

The abbreviations used are: ANTS, 8-aminonaphtalene-1,3,6-trisulfonic acid; CyPB, cyclophilin B; dp, degree of polymerization; DPBS, Dulbecco's PBS; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FCS, fetal calf serum; ΔFMV, variation of fluorescence mean value; GFP, green fluorescent protein; GlcN, D-glucosamine, GlcNAc, *N*-acetylated D-glucosamine; GlcNH₂, *N*-unsubstituted D-glucosamine; GlcNS, *N*-sulfated D-glucosamine; GlcUA, D-glucuronic acid; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase; HS, heparan sulfate; HSPG, HS proteoglycan; IdoUA,

L-iduronic acid; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NDST, *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase; OST, *O*-sulfotransferase; PAPS, 3'-phosphoadenosyl 5'-phosphosulfate; PMA, phorbol myristate acetate; siRNA, small-interfering RNA; VSV, vesicular stomatitis virus.

LEGEND TO FIGURES

FIGURE 1. Competition of CyPB binding to heparin-derived oligosaccharides and cell surface HS. (A) ANTS-labeled dp12 (0.6 nmole) and CyPB (0.1 nmole) were mixed in the absence (control) or presence of heparin derivatives or soluble HS (20 μ g). After a 30 min-incubation, samples were subjected to EMSA. *Lane 1*: control; *lane 2*: fully *N*-desulfated heparin; *lane 3*: partially *N*-desulfated heparin; *lane 4*: porcine mucosal HS; *lane 5*: bovine kidney HS; *lane 6*: unmodified heparin. At the end of the electrophoresis, the profile of migration of ANTS-labeled dp12 was imaged after exposure to UV-transilluminator for 0.60 s. Representative gel of three separate experiments is shown. (B) Inhibition of the interaction of CyPB with cell surface HS was analyzed by measuring the binding of Jurkat T cells to immobilized CyPB (1 μ g/well) in the absence (control) or presence of increasing concentrations of heparin derivatives or soluble HS: unmodified heparin (●), partially *N*-desulfated heparin (■), fully *N*-desulfated heparin (▲), bovine kidney HS (○) and porcine mucosal HS (□). Cell binding was related to the number of initially added cells (0.8×10^6 per well) remaining fixed to the adhesive substrate. Maximal binding in the absence of competitor was $0.52 \pm 0.06 \times 10^6$ cells per well. Results are expressed as percentages of this maximal value. Points are means \pm SD of triplicates from at least three separate experiments.

FIGURE 2. Detection of cell surface HS on T lymphocytes and monocytes/macrophages. Cells were immunostained with VSV-tagged antibodies to HS epitopes or isotype control. After incubation with mouse anti-VSV and fluorescein-conjugated anti-mouse antibodies, fluorescence was detected by flow cytometry. (A) Reactivity of anti-HS antibodies with Jurkat T cells. The black histogram represents staining with anti-HS antibodies and the grey histogram represents the negative control. Data are representative of three separate experiments. (B) Detection of cell surface HS on CD4⁺ T lymphocyte subsets, monocytes/macrophages, Jurkat T cells and THP-1 cells. Data are expressed as Δ FMV % and correspond to means \pm SD from at least three separate experiments obtained with peripheral blood cells from different donors. *, significant difference compared to isotype control ($p < 0.05$).

FIGURE 3. Effect of anti-HS antibodies on the interaction of CyPB with cell surface HS. Jurkat T cells (a) and THP-1 cells (b) were pre-incubated in the presence of anti-HS antibodies or isotype control and allowed to adhere to immobilized CyPB (1 μ g/well). Cell binding was related to the number of initially added cells (0.8×10^6 per well) remaining fixed to the adhesive substrate. Maximal binding obtained in the absence of antibody was estimated at $0.48 \pm 0.08 \times 10^6$ and $0.33 \pm 0.05 \times 10^6$ cells per well for Jurkat and THP-1, respectively. Results are normalized to these control values, which were set at 100 %. Each bar of the histograms represents mean \pm SD of triplicates from three separate experiments. *, significant difference compared to isotype control ($p < 0.05$).

FIGURE 4. Expression of the mRNAs encoding NDST1 and NDST2. Total RNA was extracted from primary CD4⁺ T lymphocytes and monocytes/macrophages, Jurkat T cells, THP-1 cells and from epithelia cell lines (Hela, MCF7, T-47D and MDA-MB-231). Following reverse transcription, variations in the levels of expression of NDST1 and NDST2 transcripts were quantified by real-time PCR, as described in "Experimental procedures". Relative transcript abundance was normalized to endogenous control HPRT mRNA. Data are means \pm SD from triplicates and are representative of at least three experiments performed independently.

FIGURE 5. Inhibition of the expression of mRNAs encoding NDST1 and NDST2 by RNA interference. Two synthetic siRNA duplexes (siNDST1 and siNDST2) were used to specifically inhibit the expression of mRNAs encoding NDST1 and NDST2 in Jurkat T cells. A synthetic siRNA duplex targeting GFP transcript was used as a negative control. **(A)** The expression of specific mRNAs encoding NDST1 and NDST2 isoenzymes was analyzed in transfected Jurkat T cells by qPCR. HPRT mRNA was used to normalize the expression of the genes of interest. Results are presented as percentages of expression of NDST1 and NDST2 in cells transfected with either siNDST1 or siNDST2 by comparison with the expression of both isoenzymes in control cells treated with siGFP. Each bar of the histograms represents mean \pm SD of triplicates from three separate experiments. **(B)** The effect of siRNA treatment on cell surface HS was analyzed by measuring the reactivity of anti-HS antibodies. Jurkat T cells were treated with siRNA that specifically target NDST1, NDST2 or with control siRNA, and stained for HS with HS4E4, HS4C3, RB4Ea12 and AO4B08, or for chondroitin sulfate with IO3H10, 48 h post-transfection. Cell surface staining was analyzed by flow cytometry. Data are presented as Δ FMV % and are means \pm SD of three separate experiments. **(C)** *N*-sulfotransferase activity was analyzed in siRNA-transfected cells by using an *in vitro* *N*-sulfation assay, in which cell lysates were used as enzyme sources to modify fluorescently-tagged desulfated dp14. Jurkat T cells (25×10^6 /mL) were lysed 48 h post-transfection. The sulfation reaction was performed by incubating cell lysate (100 μ g of solubilized proteins) with 5 μ g of substrate and 10 μ M of PAPS. Newly modified *N*-sulfated oligosaccharides were purified and subjected to a deaminative cleavage with HNO_2 at pH 1.5, as described in "Experimental procedures". The products of deaminative cleavage (\bullet) and parent oligosaccharides (\circ) were fractionated on Bio-Gel P-6 column (20 x 0.8 cm) and fractions of 500 μ L were analyzed for fluorescence. Total fluorescence intensity, relative to *N*-sulfotransferase activity in cell lysates, was set at 100 %. Data are representative of three independent experiments.

FIGURE 6. Contribution of NDST1 and NDST2 to the biosynthesis of HS with CyPB-binding and activating properties. **(A)** The involvement of NDST isoenzymes in the generation of HS motifs with binding properties was analyzed by measuring the interaction of siRNA-transfected Jurkat T cells with immobilized CyPB (1 μ g/well) or lactoferrin (4 μ g/well), 48 h post-transfection. Cell binding was related to the number of initially added cells (0.8×10^6 per well) remaining fixed to the adhesive substrate. The binding of siGFP-treated cells (control) to CyPB and lactoferrin was estimated at $0.45 \pm 0.06 \times 10^6$ and at $0.31 \pm 0.05 \times 10^6$ cells per well for CyPB and lactoferrin, respectively. Results are presented as percentages of these maximal values, which were set at 100 %. Heparinase-treated cells were used as a control to estimate the participation of HS in the interaction. Each bar of histograms represents mean \pm SD of three independent experiments. **(B)** The contribution of NDST1 and NDST2 in the generation of HS motifs with functional properties was analyzed by measuring the activation of p44/p42 MAPK in siRNA-transfected cells, 48 h post-transfection. Jurkat T cells were stimulated in the presence of 50 nM CyPB or 250 nM lactoferrin for various times and the phosphorylation of ERK1/2 (p-ERK) was analyzed by Western blot. Parallel immunoblotting with anti-total ERK1/2 confirmed equal loading of samples. PMA was used as a positive control for activation of p44/p42 MAPK in siRNA-transfected cells. Representative results from three independent experiments are shown.

TABLE I
Characteristics of specific anti-HS antibodies

Antibody	Essential modifications	Inhibitory modifications	Preferred oligosaccharide sequence ^a
HS4E4	<i>N</i> -sulfation, <i>N</i> -acetylation, C ₅ epimerization	6- <i>O</i> -sulfation 2- <i>O</i> -sulfation ^b	low-sulfated HS motif
HS4C3	<i>N</i> -sulfation 3- <i>O</i> -sulfation, 6- <i>O</i> -sulfation 2- <i>O</i> -sulfation (minor)		GlcNS6S-GlcUA-GlcNS3S6S- IdoUA2S-GlcNS3S6S
RB4Ea12	<i>N</i> -sulfation, <i>N</i> -acetylation, 6- <i>O</i> -sulfation	probably 2- <i>O</i> -sulfation	GlcNS6S-GlcUA-GlcNS3S6S- IdoUA-GlcNS±3S6S
AO4B08	<i>N</i> -sulfation, C ₅ epimerization 6- <i>O</i> -sulfation (high) 2- <i>O</i> -sulfation ^c		GlcNS±3S6S-IdoUA2S- GlcNS±3S6S

^a Indicated are the most reactive oligosaccharides in an inhibition ELISA approach (26)

^b HS4E4 possibly requires unspecified *O*-sulfated residues

^c AO4B08 requires an internal 2-*O*-sulfated IdoUA residue

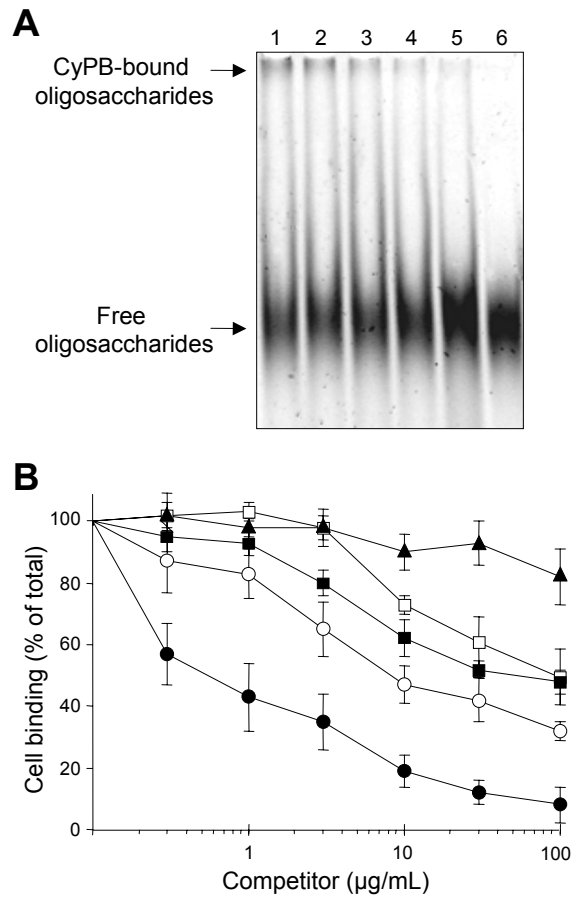


Figure 1

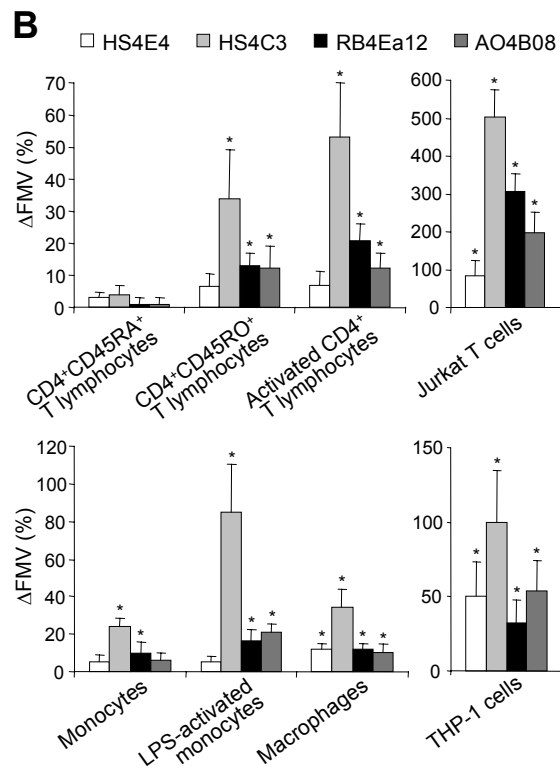
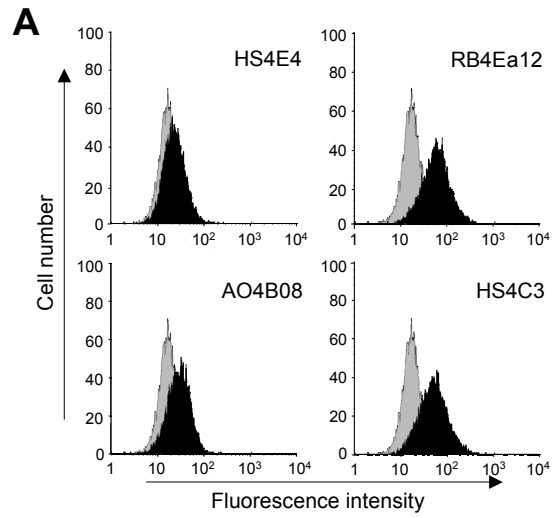


Figure 2

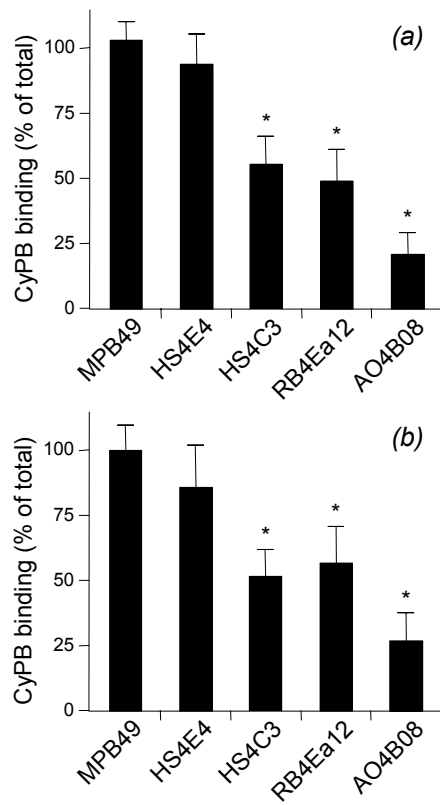


Figure 3

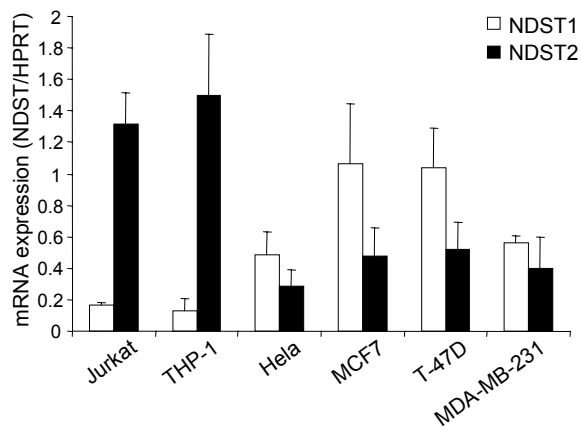
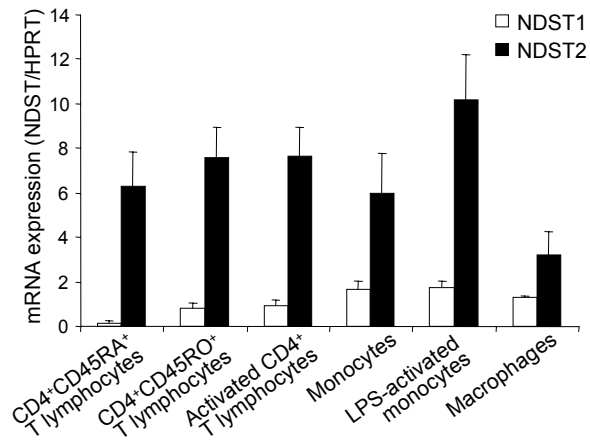


Figure 4

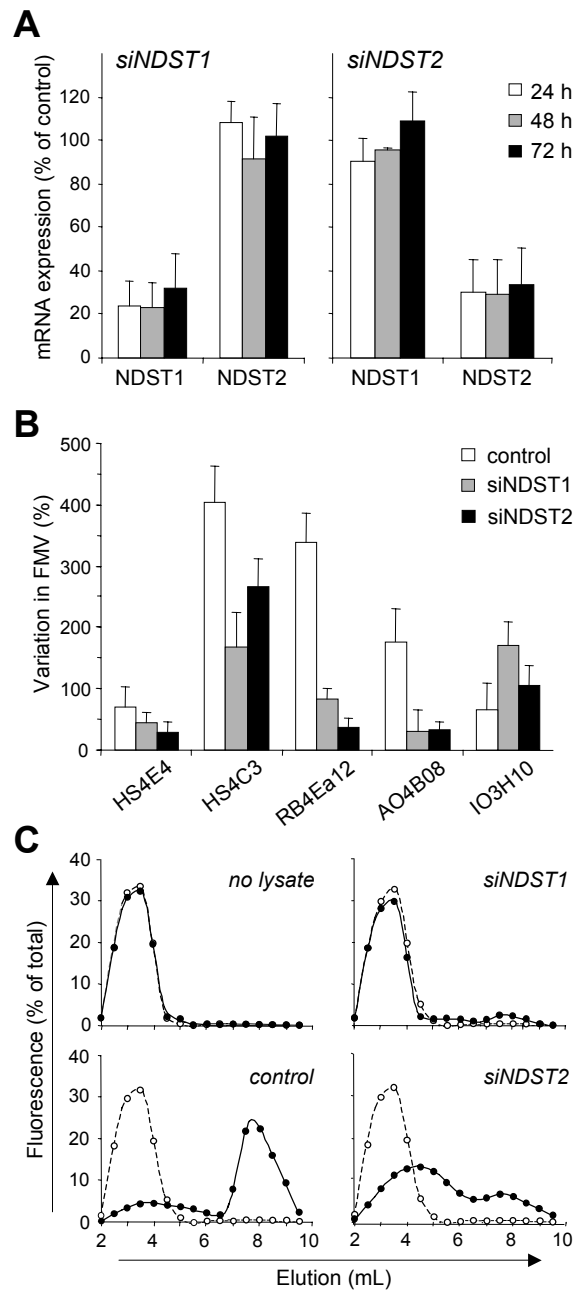
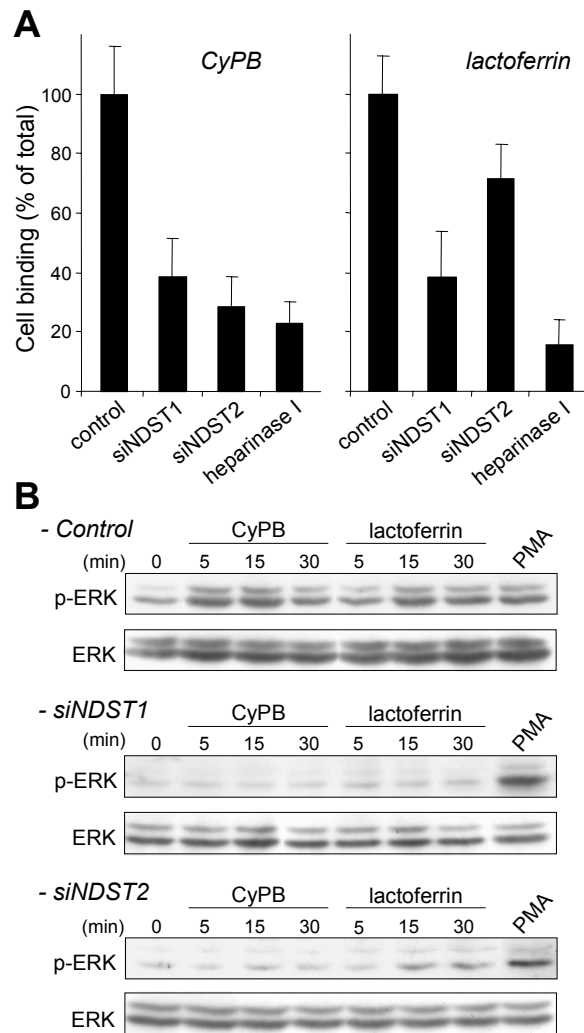


Figure 5



DISCUSSION

La structure des HS varie considérablement en fonction de l'espèce, du tissu, du stade de développement et des conditions physiopathologiques, et il est connu que l'hétérogénéité structurale de ces chaînes offre un large éventail de motifs de fixation pour une myriade de protéines (Esko & Lindahl, 2001; Turnbull *et al.*, 2001; Capila & Linhardt, 2002). Nous avons mis en évidence au Laboratoire que l'adhérence des lymphocytes T à la matrice extracellulaire induite par la CyPB est dépendante des HSPGs (Allain *et al.*, 2002; Pakula *et al.*, 2007). Dans ce contexte, nous avons donc entrepris la caractérisation structurale du site héparanique responsable de la spécificité de fixation de la CyPB à la surface de ses cellules cibles.

Nous avons préalablement démontré qu'un octasaccharide constitue la taille minimale requise pour l'interaction avec la CyPB (Vanpouille *et al.*, 2004). L'étude par biocapteur optique de la fixation de la CyPB sur des oligosaccharides biotinylés *via* l'extrémité réductrice confirme ce résultat. Comme attendu, la CyPB est incapable de se fixer aux oligosaccharides immobilisés de degré de polymérisation inférieur à 8. Afin de déterminer les principales caractéristiques structurales responsables de l'interaction entre la CyPB et l'héparine, les expériences ont, dans un premier temps, été effectuées à l'aide d'une cuvette dérivée à la streptavidine pour laquelle l'immobilisation de l'héparine a été réalisée à travers la biotinylation de ses groupements aminés internes. Toutefois, même si cette méthode d'immobilisation avait déjà été employée dans des études concernant le FGF-2 et le HGF, aucune fixation de la CyPB n'a été observée (Delehede *et al.*, 2002a; 2002b). Cette observation suggère que l'immobilisation de l'héparine *via* ses groupements aminés libres peut gravement affecter la fixation de la CyPB, probablement en bloquant ses interactions avec les résidus de GlcNH₂ et/ou leur environnement. Pour la suite des expériences, des conjugués biotinylés BSA-héparine pour lesquels l'héparine est liée à la partie protéique par son extrémité réductrice ont été utilisés (Beattie *et al.*, 2005). Comme espéré, l'affinité de la CyPB pour ce conjugué est similaire à celle obtenue avec des oligosaccharides immobilisés *via* la biotinylation de l'extrémité réductrice. De plus, le K_d est proche de celui précédemment décrit pour la fixation de la CyPB aux HS de la surface cellulaire (K_d ≈ 10 nM) (Denys *et al.*, 1998), ce qui indique que cette méthode restitue exactement l'interaction entre la CyPB et l'héparine/HS. De façon intéressante, la fixation du FGF-2 sur le conjugué BSA-héparine est plus forte que celle de la CyPB. Cette divergence ne peut pas être attribuée aux différences

d'affinité puisqu'il a été démontré que le K_d du FGF-2 pour l'héparine est du même ordre que celui de la CyPB (Kinsella *et al.*, 1998; Delehedde *et al.*, 2002a). En revanche, les groupements *N*- et 2-*O*-sulfates, qui sont les principaux critères structuraux pour l'interaction avec le FGF-2 (Turnbull *et al.*, 1992; Rahmoune *et al.*, 1998; Guimond & Turnbull, 1999), ne sont pas limitant dans l'héparine ; tandis qu'au contraire, la quantité de groupements aminés libres est très faible dans l'héparine et les HS (Westling & Lindahl, 2002; Wei *et al.*, 2005). Ainsi, la présence de résidus de GlcNH_2 et/ou leur environnement proche apparaît être un élément limitant qui expliquerait la faible fixation de la CyPB sur le conjugué BSA-héparine immobilisé. Les expériences de compétition de fixation réalisées à l'aide d'héparine modifiée confirment cette hypothèse. En effet, l'héparine *N*-acétylée est un faible compétiteur pour la fixation de la CyPB sur l'héparine immobilisée, ce qui confirme le rôle crucial des résidus de GlcNH_2 dans ces interactions.

Dans le but de valider les résultats obtenus par biocapteur optique, nous avons ensuite étudié l'interaction de la CyPB avec l'héparine et les HS par EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*). Nous avons démontré que l'hydrolyse de l'héparine/HS par l'acide nitreux à pH 4,0, décrit pour couper sélectivement l'héparine et ses dérivés derrière les résidus de GlcNH_2 , réduit significativement les interactions avec la CyPB. De plus, nous avons également mis en évidence que l'héparine *N*-acétylée et les fragments d'héparine traitée par l'acide nitreux à pH 4,0 sont de faibles compétiteurs pour la fixation de la CyPB à la surface des lymphocytes T. L'ensemble de ces résultats démontrent que la fixation de la CyPB n'est pas simplement la conséquence des interactions électrostatiques entre les résidus d'acide aminé basique de la protéine et les charges négatives du polysaccharide, mais le résultat de contacts spécifiques entre la protéine et une modification rare présente dans l'héparine/HS.

La présence des résidus de GlcNH_2 a, pendant longtemps, été attribuée à la perte des groupements *N*-sulfates durant la préparation des échantillons (Hook *et al.*, 1982). Toutefois, de nombreuses données démontrent désormais l'importance de cette modification rare dans des phénomènes biologiques et pathologiques (Norgard-Sumnicht & Varki, 1995; van den Born *et al.*, 1995; Toida *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 2001; Westling & Lindahl, 2002). De façon intéressante, Westling & Lindahl (2002) ont analysé les séquences environnantes des résidus de GlcNH_2 dans diverses préparations de HS. Ils ont montré que les résidus de GlcNH_2 sont principalement présents dans les domaines NA et NA/NS des HS. De plus, ils ont mis en évidence que les structures en amont et en aval des GlcNH_2 sont extrêmement diverses. 20 à 30 % des unités disaccharidiques adjacentes peuvent être *N*-sulfatées. Bien que la plupart des résidus d'acide uronique immédiatement en amont des résidus de GlcNH_2 sont généralement

des GlcUA, certains de ces résidus peuvent subir une C₅-épipimérisation et une 2-*O*-sulfatation. Les résidus de GlcNH₂, quant à eux, peuvent être 6-*O*-sulfatés et même 3-*O*-sulfatés. Nous avons démontré que le résidu de GlcNH₂ présent dans l'octasaccharide héparinique spécifique de la CyPB est sensible au traitement par acide nitreux réalisé à pH 1,5. Un tel clivage a déjà été décrit par Liu *et al.* (1999a; 1999b) qui ont démontré que ce traitement cible également les résidus de GlcNH₂ 3-*O*-sulfatés. Cette donnée suggère que la séquence héparinique reconnue par la CyPB possède une GlcNH₂ 3-*O*-sulfatée. Nous avons également mis en évidence que le résidu de GlcNH₂ requis pour l'interaction de la CyPB avec l'héparine est localisé en position 2 non réductrice de l'octasaccharide. Dans nos expériences, nous avons utilisé l'héparinase I pour générer les octasaccharides dérivés de l'héparine. Etant donné que cette enzyme clive les HS au niveau des liaisons GlcNS⁺6S-IdoUA2S (Yamada *et al.*, 1995b; Wei *et al.*, 2005), on peut supposer que l'acide uronique en amont du résidu de GlcNH₂ soit un IdoUA2S, ce qui suggère que la séquence HS spécifique de la CyPB contient probablement le disaccharide [IdoUA2S-GlcNH₂3S⁺6S].

Cette unité disaccharidique a été identifiée comme étant le produit de certaines 3-OSTs, qui introduisent des groupements sulfates sur les hydroxyles en position C3 des glucosamines *N*-non substituées et fournissent ainsi le site de fixation de la glycoprotéine gD du HSV-1 (Liu *et al.*, 1999a; 1999b; Shukla *et al.*, 1999; Tiwari *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2006; Lawrence *et al.*, 2007). Afin de vérifier si la séquence héparinique reconnue par la CyPB est 3-*O*-sulfatée, nous avons étudié le profil d'expression des différentes 3-OSTs dans les lymphocytes T CD4⁺, les cellules T Jurkat et les cellules monocytaires THP-1. Nous avons mis en évidence que ces cellules, fixant la CyPB, expriment majoritairement le transcrite codant pour la 3-OST-3B seule ou en combinaison avec celui de la 3-OST-3A. De façon intéressante, l'inactivation par ARN interférence de l'expression de ces isoenzymes réduit à la fois la fixation de la CyPB à la surface des cellules T Jurkat et l'activation de la voie p44/p42 MAPK, indiquant que la 3-OST-3B est une enzyme clé dans la biosynthèse de la séquence HS impliquée dans l'interaction avec la CyPB. Les 3-OST-3 transfèrent des groupements sulfates sur des résidus de GlcNH₂ en aval d'un résidu de IdoUA2S (Liu *et al.*, 1999a; 1999b; 2002). Ainsi, la spécificité de substrat des 3-OST-3 suggère également que l'unité héparinique de fixation de la CyPB contient l'unité disaccharidique [IdoUA2S-GlcNH₂3S⁺6S] (Figure 30).

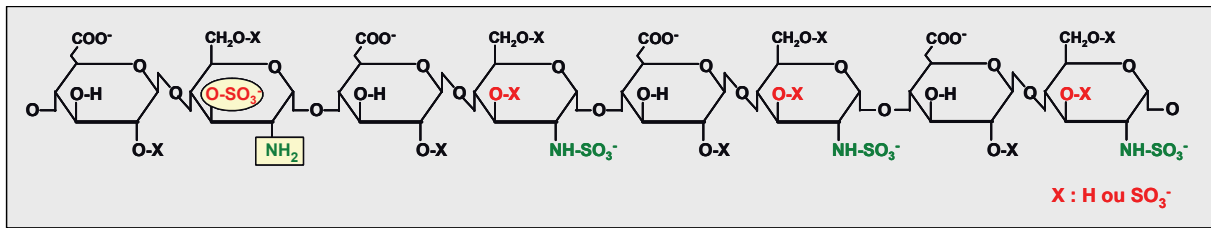


Figure 30 : Caractéristiques structurales du motif héparanique reconnu par la CyPB.

En sus de cette modification structurale particulière, nous avons également démontré que l'interaction de la CyPB avec l'héparine et les HS est dépendante de la densité des groupements *N*-sulfates. En effet, la CyPB est incapable de se fixer aux héparines *N*-désulfatée et *N*-désulfatée/*N*-réacétylée. La *N*-désulfatation chimique de l'héparine n'affecte aucunement le taux des groupements 2-*O*-, 6-*O*- et 3-*O*-sulfates, ce qui suggère que la *N*-sulfatation est cruciale pour l'interaction avec la CyPB.

Nous avons alors caractérisé l'interaction de la CyPB avec les HS membranaires en réalisant des expériences de compétition de fixation à l'aide d'anticorps anti-HS. Nous avons démontré que HS4C3 réduit la fixation de la CyPB à la surface de ses cellules cibles. HS4C3 a été décrit comme réagissant principalement avec une séquence HS possédant des résidus de glucosamine 3-*O*-sulfatés (van Kuppevelt *et al.*, 1998; Ten Dam *et al.*, 2006). Il a récemment été démontré que l'épitope reconnu par HS4C3 colocalise avec le motif HS spécifique de la glycoprotéine gD du HSV-1 (Tiwari *et al.*, 2007). Etant donné que les résidus de GlcNH₂ 3-*O*-sulfatés contribuent à la fixation de la protéine gD à l'héparine/HS et assistent l'entrée virale dans les cellules cibles, ces données suggèrent que les motifs HS requis pour la fixation spécifique de la CyPB et de la protéine gD du HSV-1 portent des caractéristiques structurales communes. Nos précédents travaux ont mis en évidence que la CyPB possède des affinités comparables pour l'héparine et les HS de la surface cellulaire, ce qui suggère que le site de fixation de la CyPB se situe probablement dans une séquence hautement sulfatée (Denys *et al.*, 1998; Vanpouille *et al.*, 2004). De façon intéressante, nous avons montré que AO4B08 est plus efficace que HS4C3 ou RB4Ea12 pour inhiber les interactions entre la CyPB et les HS membranaires. AO4B08 reconnaît des séquences HS *N*- et *O*-sulfatées contenant des résidus de IdoUA2S, que l'on retrouve dans l'héparine et les domaines NS des HS (Dennissen *et al.*, 2002; Kurup *et al.*, 2007). Au contraire d'AO4B08, HS4E4 est incapable d'inhiber l'interaction de la CyPB avec ses cellules cibles. HS4E4 reconnaît des motifs HS faiblement sulfatés contenant des résidus de IdoUA et des glucosamines aussi bien *N*-sulfatées que *N*-acétylées (Dennissen *et al.*, 2002; Kurup *et al.*, 2007). Compte tenu des épitopes reconnus par

les différents anticorps, l'ensemble de ces résultats confirment l'importance de la densité en groupements *N*-sulfates et celle des résidus de GlcNH₂ 3-*O*-sulfatés pour les interactions entre la CyPB et les HS membranaires.

Afin de vérifier si la densité en groupements *N*-sulfates du site de fixation de la CyPB est régulée au cours de la biosynthèse des HS, nous avons étudié l'expression des transcrits codant pour les NDSTs dans de nombreux types cellulaires. Nous avons démontré que les lymphocytes T, les monocytes/macrophages et leur lignée cellulaire respective, *i.e.* Jurkat et THP-1, expriment majoritairement la NDST2. Bien que l'activation et la maturation des cellules affectent différemment l'expression de chaque isoenzyme, le niveau d'expression des transcrits codant pour la NDST2 reste toujours plus élevé que celui de la NDST1. Ces données confirment d'anciennes études ayant relatées un niveau d'expression plus élevé de la NDST2, comparé à celui de la NDST1, dans les mastocytes, les tissus lymphoïdes et les leucocytes isolés du sang (Aikawa & Esko, 1999; Forsberg *et al.*, 1999; Pallerla *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que l'expression élevée de la NDST2 peut être caractéristique des cellules appartenant aux lignées hématopoïétiques. Bien que les cellules épithéliales produisent de grandes quantités de HS en comparaison des lymphocytes T et des monocytes/macrophages, elles sont incapables de fixer spécifiquement la CyPB. De façon intéressante, nous avons montré que les lignées épithéliales expriment faiblement la NDST2 comparé à la NDST1. Etant donné qu'il est clairement établi que l'expression de la NDST2 est corrélée à l'existence de nombreux groupements *N*-sulfates dans l'héparine et les HS (Kusche-Gullberg *et al.*, 1998; Forsberg *et al.*, 1999; Pikas *et al.*, 2000), nous avons vérifié la possibilité que la biosynthèse du motif HS de la CyPB soit dépendante de l'expression et de l'activité de la NDST2. Comme attendu, l'inactivation d'expression par ARN interférence de cette enzyme inhibe la fixation de la CyPB et l'activation de la voie p44/p42 MAPK dans les cellules T Jurkat. De plus, nous avons également montré que l'inhibition de l'expression de la NDST1 réduit la fixation et les activités de la CyPB, ce qui indique que les deux isoenzymes sont requises pour la synthèse du motif HS spécifique de la CyPB.

Au regard de la régulation de l'expression des NDSTs et de la contribution relative de chaque isoforme dans la biosynthèse des HS, de nombreux aspects restent obscurs. L'inactivation génique de la NDST1 chez la souris affecte la structure des HS de tous les tissus testés. Les souris succombent avant la naissance, ce qui suggère que la NDST1 joue un rôle crucial dans la maturation des HS. Les souris *Ndst2*^{-/-}, quant à elles, présentent un développement et une reproduction normale. Aucune altération de la structure des HS n'est observée, excepté pour les mastocytes, lesquels présentent une diminution du taux de *N*-

sulfatation de l'héparine (Forsberg *et al.*, 1999; Ringvall *et al.*, 2000; Ledin *et al.*, 2004). La surexpression de la NDST1 et de la NDST2 dans des cellules HEK293 modifie différemment la *N*-sulfatation des HS produits par ces cellules. Par comparaison aux cellules surexprimant la NDST1, les HS synthétisés par les cellules exprimant stablement la NDST2 exhibent significativement une plus forte densité de *N*-sulfatation, ce qui suggère que le profil de *N*-sulfatation peut dépendre de l'isoforme (Pikas *et al.*, 2000). Dans ce contexte, afin d'étudier la contribution relative de la NDST1 et de la NDST2 dans la biosynthèse des HS, Ledin *et al.* (2006) ont analysé le profil de sulfatation des HS produits par des souris *Ndst1*^{+/-}, *Ndst2*^{-/-} et *Ndst1*^{+/-}/*Ndst2*^{-/-}. Ils ont démontré que les HS hépatiques des souris témoins et invalidées possèdent des structures identiques (Ledin *et al.*, 2006). Des quantités similaires de NDST2 active sont présentes dans les extraits de foie témoin et *Ndst1*^{+/-}. Toutefois, la NDST2 n'apparaît pas affecter la structure des HS tant que la NDST1 est exprimée. Selon la théorie de ces auteurs, la NDST1 serait préférentiellement incorporée dans le « GAGosome » et ce ne serait qu'en l'absence de la NDST1 que la NDST2 pourrait occuper la place de l'enzyme et ainsi sulfater les HS (Ledin *et al.*, 2006). D'autres données suggèrent que la NDST1 serait requise pour la *N*-sulfatation partielle du précurseur et l'initiation des autres modifications de maturation, tandis que la NDST2 compléterait et étendrait les régions *N*-sulfatées des HS initialement modifiées par la NDST1 (Pikas *et al.*, 2000). En accord avec cette idée, il a été démontré que les HS sont de meilleurs substrats pour les NDSTs que le polysaccharide bactérien K5, suggérant que les NDSTs peuvent agir sur des substrats modifiés (van den Born *et al.*, 2003). En utilisant le système Cre-LoxP, Wang *et al.* (2005) ont démontré que la NDST1 et la NDST2 contribuent dans un ratio 3:1 à la *N*-sulfatation des HS de cellules endothéliales. Dans ce modèle, la NDST1 est capable de compenser l'absence de la NDST2. L'inverse n'étant pas valable, ces données suggèrent que les deux isoenzymes ne sont pas redondantes (Wang *et al.*, 2005). Nos travaux sont en accord avec ces résultats. En effet, nous avons démontré que l'inactivation de l'expression de la NDST1 réduit significativement l'activité enzymatique des NDSTs, indiquant que la NDST2 est incapable de compenser l'absence de la NDST1. A l'inverse, la *N*-sulfatation est toujours observée en absence de la NDST2. De façon intéressante, l'inactivation de l'expression de la NDST2 engendre une diminution significative de la densité des groupements *N*-sulfates, ce qui suggère que la NDST1 n'est pas suffisante pour compenser entièrement la perte de la NDST2. L'ensemble de ces données suggèrent que les NDSTs possèdent des activités enzymatiques non redondantes mais complémentaires. Ainsi, dans les cellules cibles de la CyPB, la NDST1 pourrait être impliquée dans l'initiation de la maturation des HS, tandis que le rôle de la

NDST2 serait d'étendre les séquences modifiées et d'augmenter la densité des groupements N-sulfates des HS.

Bien qu'il soit connu que les HS interagissent avec une pléiade de facteurs inflammatoires, peu d'informations sur leurs fonctions dans la biologie des leucocytes sont disponibles. Récemment, Garner *et al.* (2008) ont mis en évidence que la délétion du gène codant pour la NDST1 altère la distribution des cellules T dans le thymus, indiquant que les HS de la surface cellulaire peuvent réguler l'activité des facteurs chimio-attractants. Nous avons montré que la CyPB induit le chimiotactisme et l'adhérence à la fibronectine des lymphocytes T et des monocytes/macrophages, ce qui suggère qu'elle participe à la migration des cellules depuis la circulation sanguine vers les sites de l'inflammation (Allain *et al.*, 2002; Pakula *et al.*, 2007; Melchior *et al.*, 2008). De plus, nous avons montré que la fixation de la CyPB à la surface de ses cellules cibles est dépendante de l'expression des NDST1, NDST2 et de la 3-OST-3B. Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent l'existence d'une corrélation directe entre l'expression des enzymes de biosynthèse des HS et les réponses induites par les facteurs chimio-attractants.

CHAPITRE II

Importance de la 3-*O*-sulfatation
dans les réponses cellulaires induites par
la CyPB et la chimiokine RANTES/CCL5

A – Introduction

Les chimiokines inflammatoires et leurs récepteurs constituent un réseau complexe de molécules qui jouent un rôle essentiel dans les processus de migration et d'activation des leucocytes vers les sites de l'inflammation.

Les chimiokines sont des polypeptides de faible poids moléculaire de 8 à 12 kDa qui, par définition, sont chimio-attractants vis-à-vis d'une pléthore de types cellulaires (Rossi & Zlotnik, 2000; Zlotnik & Yoshie, 2000; Handel *et al.*, 2005; Hamel *et al.*, 2009). A l'heure actuelle, approximativement 50 chimiokines ont été décrites. Parmi elles, toutes ne sont pas inflammatoires. Certaines chimiokines sont dites « constitutives » et sont impliquées dans d'autres processus biologiques aussi variés que l'angiogenèse, le développement neuronal, l'hématopoïèse ou la domiciliation lymphocytaire. Malgré l'absence d'homologie dans leurs séquences primaires, elles ont pour point commun une structure tridimensionnelle relativement homogène. Les chimiokines sont regroupées en quatre familles structurales définies par la position relative de deux résidus de cystéine hautement conservés dans la région N-terminale de la protéine (Tableau 8). On distingue ainsi la famille des α chimiokines (ou CXC chimiokines) dont les membres possèdent un acide aminé entre les deux premiers résidus de cystéine et la famille des β chimiokines (ou CC chimiokines) pour laquelle les deux cystéines sont adjacentes. Les deux familles γ et δ sont représentées par la CX₃C chimiokine (ou fractalkine) et les lymphotactines qui ne possèdent qu'un seul résidu de cystéine (C chimiokines). Les chimiokines ont souvent plusieurs appellations, dont l'une est attribuée dans une nomenclature rationnelle basée sur leurs cystéines N-terminales (CCL1 est la CC chimiokine numéro 1 ; L indiquant qu'il s'agit d'un ligand et non d'un récepteur) (Zlotnik & Yoshie, 2000). Elles agissent sur leurs cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G (Handel *et al.*, 2005; Hamel *et al.*, 2009). Ces derniers sont essentiellement exprimés par les leucocytes, mais ils sont également retrouvés à la surface des cellules épithéliales et endothéliales. Actuellement, 18 d'entre eux ont été identifiés. La divergence entre le nombre de chimiokines et celui des récepteurs témoigne de la redondance du système. En effet, plusieurs chimiokines sont susceptibles de se fixer sur des récepteurs différents au sein d'une même famille et réciproquement (Proudfoot, 2002).

Tableau 8 : Les familles de chimiokines et leurs récepteurs.

Famille	Noms des chimiokines	Récepteurs
CXC chimiokines (famille α)	CXCL 1 à 17	CXCR 1 à 6
CC chimiokines (famille β)	CCL 1 à 28	CCR 1 à 10
C chimiokines (famille γ)	XCL 1 et 2 (lymphotactines)	XCR1
CX ₃ C chimiokine (famille δ)	CX ₃ CL1 (fractalkine)	CX ₃ CR1

La majorité des chimiokines sont des protéines basiques ($pI \approx 9$). Il n'est donc pas étonnant qu'elles soient capables de fixer les GAGs sulfatés tels que l'héparine et les HS (Witt & Lander, 1994; Middleton *et al.*, 1997; Kuschert *et al.*, 1999; Mbemba *et al.*, 2001; Proudfoot *et al.*, 2001). En se fixant sur les GAGs sulfatés de l'endothélium, les chimiokines sont préservées de l'entraînement par le flux sanguin et peuvent interagir avec leurs cellules cibles (Tanaka *et al.*, 1993a; 1993c; Najjam *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998a). Selon ce modèle, les cellules circulantes remonteraient vers le site de l'inflammation en suivant un gradient solide de facteurs chimio-attractants présents sur l'endothélium et dans la matrice extracellulaire (Rot, 1992; Tanaka *et al.*, 1993b; Gilat *et al.*, 1994). En plus de ce rôle de présentation, certaines données suggèrent une participation plus active des protéoglycanes dans l'activité des chimiokines. Par exemple, Gilat *et al.* (1994) ont montré que MIP-1 β /CCL4 et RANTES/CCL5 exercent leur activité pro-adhésive *via* leur interaction avec les GAGs. Toutefois, ces interactions n'apparaissent pas toujours indispensables à l'activité des chimiokines *in vitro* (Koopmann & Krangel, 1997). Les travaux de Proudfoot *et al.* (2003) ont fourni une explication à ces données contradictoires. En effet, en mutant le site de fixation aux GAGs de trois chimiokines (MCP-1/CCL2, MIP-1 β /CCL4 et RANTES/CCL5), ils ont montré que celles-ci ne présentent plus d'activité chimiotactile *in vivo*, alors que cette activité est conservée *in vitro*. De même, bien que pleinement actifs *in vitro*, des variants monomériques de ces chimiokines sont dépourvus d'activité biologique *in vivo* (Proudfoot *et al.*, 2003). Ces données suggèrent que la fixation aux GAGs et la capacité à former des oligomères sont indispensables à l'activité des chimiokines *in vivo*, bien qu'elles ne soient pas nécessaires pour l'activation du récepteur *in vitro*. Plus récemment, d'autres études utilisant des formes mutantes de MCP-3/CCL7 et de la lymphotactine/XCL1, dépourvues de leur domaine de fixation aux GAGs, ont confirmé l'importance des GAGs dans les activités biologiques

induites par les chimiokines *in vivo* (Peterson *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2005). Peu de données bibliographiques concernent les caractéristiques structurales des motifs HS reconnus par les chimiokines. Toutefois, il est établi que l'organisation des sites HS de fixation, souvent composés de deux domaines NS séparés d'une région NA, permet l'oligomérisation des chimiokines (Lortat-Jacob *et al.*, 1995; Spillmann *et al.*, 1998; Stringer *et al.*, 2002; Vives *et al.*, 2002).

Les différents acteurs cellulaires de l'inflammation produisent des protéoglycanes dont la nature des parties protéiques et/ou la structure des chaînes HS peuvent varier en fonction de leur état de différenciation et d'activation (Clasper *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2000; 2005; Wegrowski *et al.*, 2006). Les modifications des HSPGs peuvent alors influencer la fixation des chimiokines et ainsi réguler les réponses des cellules cibles dans les processus inflammatoires. Par exemple, il a été montré que la diminution du taux de *N*-sulfatation des HS altère les mécanismes de migration et d'adhérence des leucocytes *via* l'inhibition des interactions entre la L-sélectine, les chimiokines et leurs motifs HS présents sur les cellules endothéliales (Wang *et al.*, 2005). Ces résultats sont corrélés à d'autres travaux qui ont mis en évidence que l'expression des enzymes de biosynthèse des HS peut être modulée dans les cellules inflammatoires activées par différents stimuli exogènes tels que le LPS, le TNF- α ou l'IFN γ (Carter *et al.*, 2003; Adhikari *et al.*, 2008; Krenn *et al.*, 2008; Properzi *et al.*, 2008). Ces données suggèrent que les variations d'expression des glucosaminyl sulfotransférases au cours de la réaction inflammatoire peuvent réguler les activités des cellules de l'inflammation.

Les 3-OSTs sont représentées par sept isoenzymes qui possèdent des expressions dépendantes du type cellulaire et des spécificités de substrat différentes. Elles sont à l'origine d'une modification rare puisque seul 1 à 7 % des résidus de glucosamine retrouvés dans les HS sont 3-*O*-sulfatés. Pourtant, elles sont d'une importance cruciale pour le site de fixation héparanique de la CyPB. En effet, nous avons montré que les réponses biologiques induites par cette dernière dans les lymphocytes T sont dépendantes de l'expression des 3-OST-3, suggérant que ces enzymes sont impliquées dans la biosynthèse des motifs de fixation pour les facteurs inflammatoires.

Afin de vérifier ces deux hypothèses, nous avons, dans un premier temps, analysé les variations d'expression des transcrits codant pour les 3-OSTs dans les cellules inflammatoires activées ou non par différents stimuli. A l'aide du modèle cellulaire THP-1, nous avons ensuite corrélé ces variations d'expression à celles du profil de 3-*O*-sulfatation des HS. Enfin, nous avons étudié l'implication des 3-OST-3 dans la génération du motif HS reconnu par le

prototype des CC chimiokines inflammatoires, RANTES/CCL5, en réalisant des expériences d'invalidation d'expression de ces enzymes par ARN interférence.

B – Résultats

B.1. Etude de l'expression et de l'activité des 3-O-sulfotransférases dans les cellules inflammatoires

B.1.1. Analyse de l'expression des 3-O-sulfotransférases dans divers types cellulaires

Avant d'étudier les variations d'expression des transcrits codant pour les 3-OSTs en réponse à des stimuli inflammatoires, nous avons déterminé par PCR en temps réel le profil d'expression de ces isoenzymes dans des cellules inflammatoires primaires isolées du sang et diverses lignées cellulaires. Le niveau d'expression de l'ensemble des transcrits codant pour les 3-OSTs est significativement plus élevé dans les lymphocytes T CD4⁺ que dans les monocytes (Figure 31). Toutefois, il est intéressant de noter que les deux populations présentent un profil d'expression similaire. En effet, les monocytes et les lymphocytes T CD4⁺ expriment de façon importante les 3-OST-3 qui constituent les isoenzymes majoritaires. Les transcrits codant pour les 3-OST-1, 3-OST-2 et 3-OST-6 sont plus faiblement exprimés à des taux variables, tandis que les 3-OST-4 et 3-OST-5 ne sont, quant à elles, pas détectées.

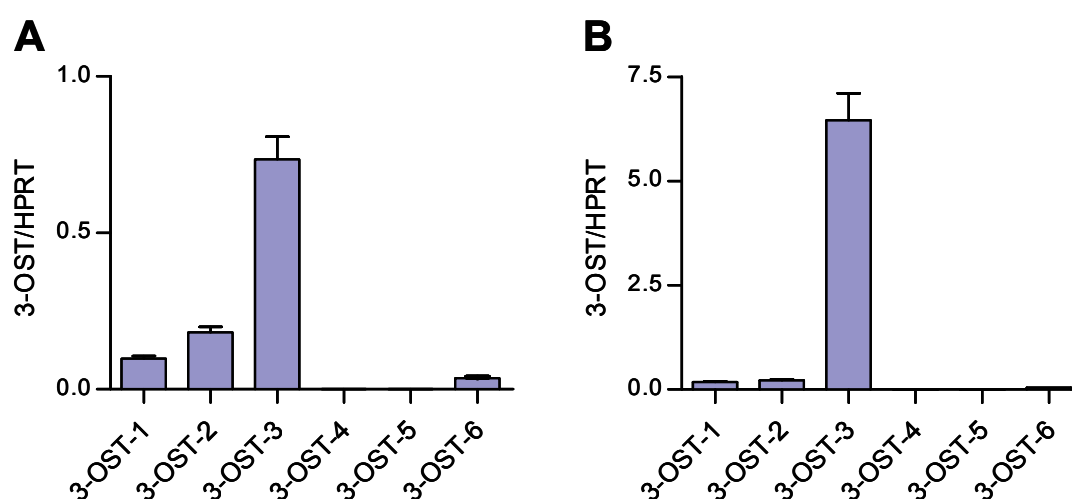


Figure 31 : Profil d'expression des 3-OSTs dans les monocytes (A) et les lymphocytes T CD4⁺ (B) isolés du sang. La quantification relative des transcrits est réalisée par PCR en temps réel. Le taux d'expression de chaque sulfotransférase est normalisé à celui de la HPRT (n = 6).

Les modifications par sulfatation et épimérisation apportées au cours de la maturation des HS sont essentiellement dictées par le profil de *N*-sulfatation généré par les enzymes de *N*-déacétylation/*N*-sulfatation, les NDSTs. Ainsi, afin de normaliser au mieux nos résultats concernant les multiples lignées cellulaires, nous avons rapporté l'expression de chaque 3-OST à celle de la NDST1 pour l'ensemble des lignées cellulaires (Figure 32). En accord avec les données décrites dans la littérature, l'ensemble des isoenzymes sont exprimées à des taux variables dans la lignée cellulaire neuronale SH-SY5Y que nous avons utilisée en tant que contrôle positif d'expression des différentes 3-OSTs. De façon intéressante, les profils d'expression des transcrits codant pour les 3-OSTs dans les cellules monocytaires THP-1 et lymphoblastiques Jurkat sont identiques à ceux observés pour les monocytes et les lymphocytes T CD4⁺ isolés du sang. En effet, ces deux lignées cellulaires expriment majoritairement les 3-OST-3, tandis que les autres isoformes sont plus faiblement détectées ou absentes. En parallèle, nous avons également analysé l'expression des transcrits codant pour les 3-OSTs dans diverses lignées épithéliales humaines MCF7, MDA-MB-231 et Hela. A l'inverse des cellules inflammatoires, les 3-OSTs ne sont que faiblement exprimées dans ces cellules. Ces résultats suggèrent que l'expression élevée des 3-OST-3 peut être corrélée au phénotype inflammatoire des cellules.

B.1.2. Etude des variations d'expression des 3-O-sulfotransférases en réponse à des stimuli inflammatoires

Afin de vérifier si l'expression des 3-OSTs est modulée en réponse à différents stimuli inflammatoires, nous avons cultivé les monocytes primaires en présence de deux facteurs modulateurs de leurs fonctions, la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β et le LPS. L'expression des transcrits codant pour les différentes 3-OSTs a été quantifiée par PCR en temps réel (Figure 33). Les deux conditions de culture induisent significativement l'expression de la 3-OST-1 et des 3-OST-3 selon une cinétique identique. Dès 24 h de stimulation en présence de IL-1 β , les taux d'expression des transcrits codant pour la 3-OST-1 et les 3-OST-3 sont doublés par rapport aux taux de base. La stimulation au LPS possède un effet plus marqué. En effet, après 24 h d'activation au LPS, les expressions de la 3-OST-1 et des 3-OST-3 sont augmentées d'un facteur 12 et 7,5, respectivement. L'ensemble de ces données indiquent que l'expression des transcrits codant pour les 3-OSTs peut être modulée différemment au cours de la réaction inflammatoire et suggèrent que ces enzymes possèdent probablement un rôle crucial dans ce processus.

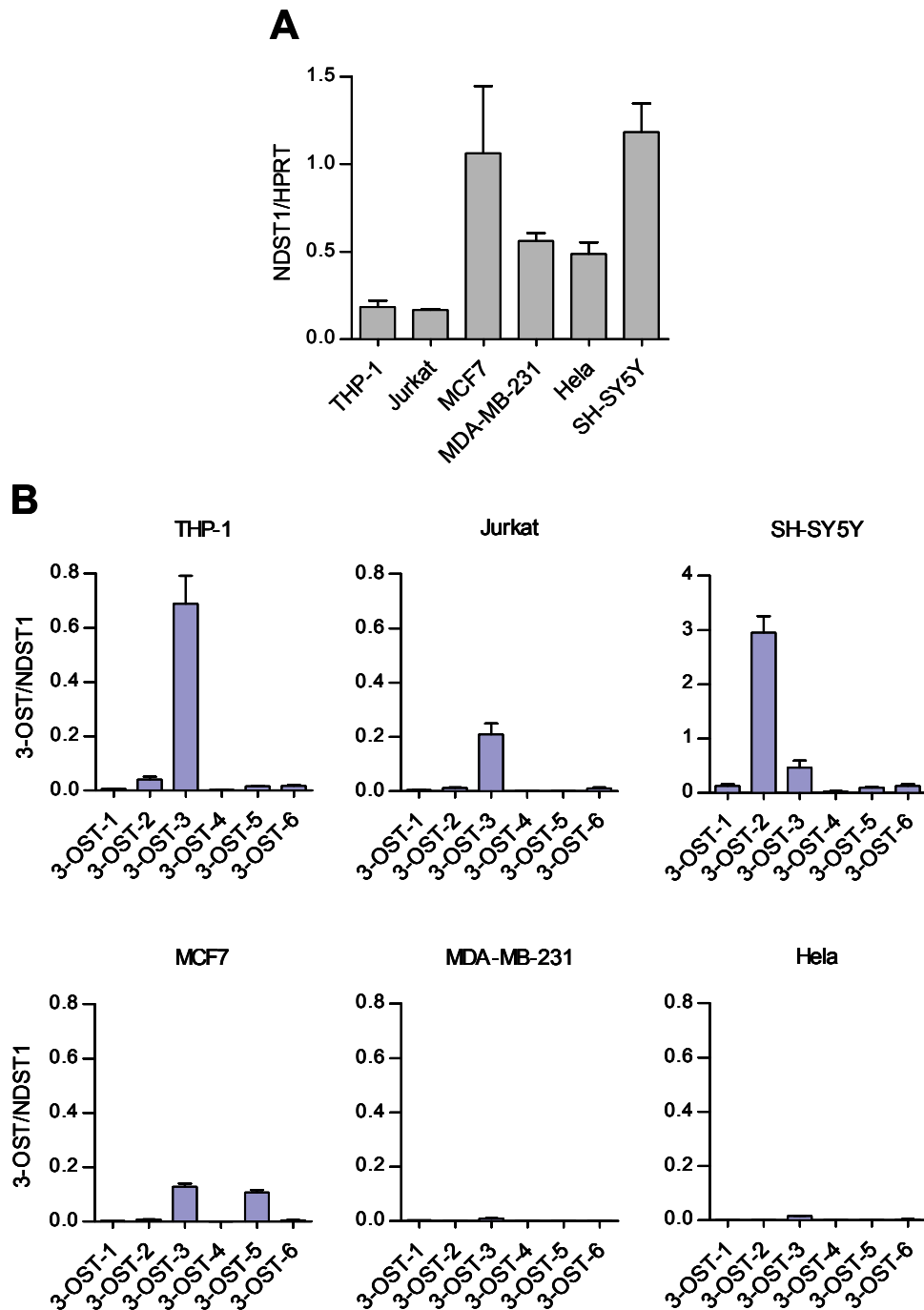


Figure 32 : Quantification relative des transcrits de la NDST1 (A) et des 3-OSTs (B) dans différentes lignées cellulaires. La quantification est effectuée par PCR en temps réel. Le taux d'expression des sulfotransférases est rapporté à celui de la HPRT. L'expression des transcrits de la NDST1 est utilisée pour normaliser l'expression de chaque 3-OST dans les différentes lignées cellulaires (n = 6).

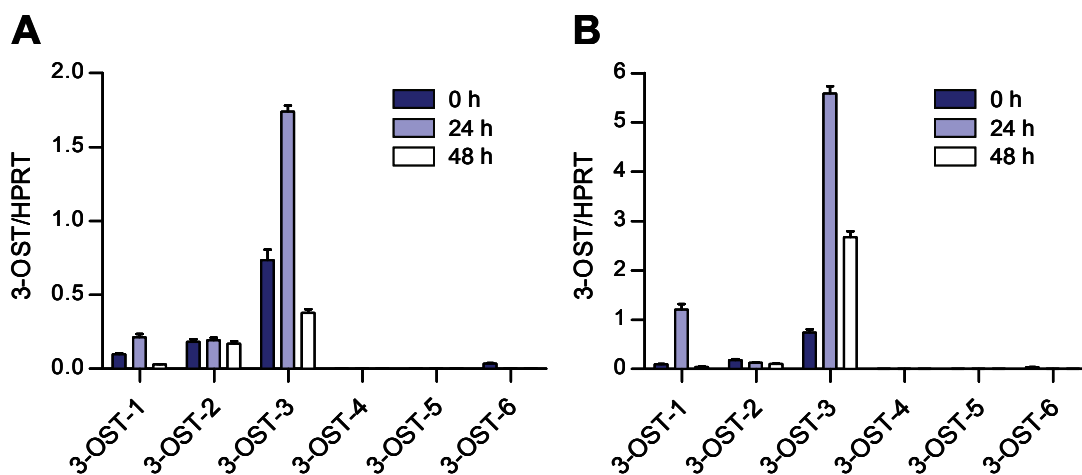


Figure 33 : Expression des transcrits des 3-OSTs dans les monocytes isolés du sang en réponse à différents stimuli inflammatoires. Les cellules sont stimulées en présence de 10 ng/mL de IL-1 β (A) ou de LPS (B). Aux temps indiqués, les cellules sont collectées et l'expression des transcrits est quantifiée par PCR en temps réel. Le taux d'expression de la HPRT est utilisé pour normaliser les données (n = 6).

Les cellules primaires étant difficilement manipulables, nous avons cherché à identifier une lignée cellulaire présentant les mêmes réponses que les monocytes isolés du sang. Nous avons alors reproduit la même expérience que précédemment en utilisant les cellules THP-1 en lieu et place des monocytes. Comme montré dans la figure 34, seule l'expression des 3-OST-3 est induite par le traitement des cellules au LPS. L'expression des 3-OST-3 augmente rapidement dès 4 h et le maximum d'induction est atteint après 8 h de stimulation. A ce point maximal, le taux des transcrits est augmenté d'un facteur 10 par rapport à l'expression basale. L'expression des 3-OST-3 diminue ensuite pour atteindre un taux d'expression 2 fois inférieur au taux maximal après 24 h de stimulation. L'activation des cellules THP-1 par le LPS induit des effets identiques à ceux observés pour les monocytes primaires, ce qui indique que la lignée monocyttaire THP-1 constitue un modèle cellulaire de choix pour nos futures investigations.

B.1.3. Etude des variations de sulfatation des HS membranaires

La fonction des 3-OSTs étant de sulfater les hydroxyles des glucosamines en position C3, nous avons étudié par cytofluorimétrie en flux les modifications structurales des HS présents à la surface des cellules THP-1 en réponse au LPS (Figure 35). Pour cette étude, nous avons utilisé trois anticorps anti-HS qui reconnaissent des épitopes différemment sulfatés (Tableau 9). En absence de stimulus, les trois anticorps se fixent à la surface des cellules THP-1, ce qui indique que les trois motifs sont présents sur les chaînes HS portées par les

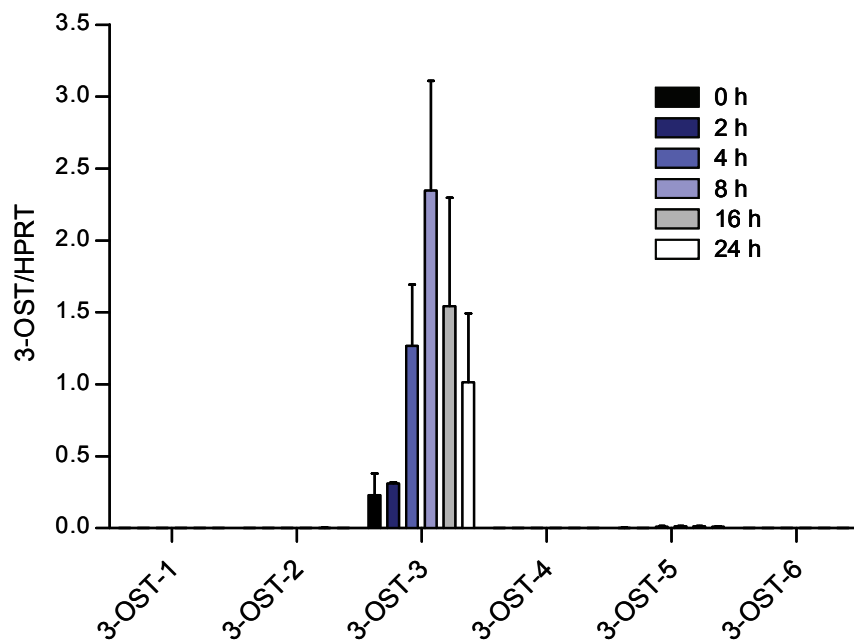


Figure 34 : Profil d'expression des 3-OSTs dans les cellules THP-1 en réponse au LPS. Les cellules sont activées en présence de 10 ng/mL de LPS. Aux temps indiqués, les cellules sont collectées et le taux d'expression des ARNm est déterminé par PCR en temps réel. L'expression de chaque sulfotransférase est normalisée à celle de la HPRT (n = 6).

HSPGs membranaires. La fixation de l'anticorps HS4C3 est supérieure à celle des deux autres anticorps, suggérant que les motifs 3-*O*-sulfatés sont plus représentés que ceux reconnus par AO4B08 et RB4Ea12. Dès 24 h de stimulation par le LPS, la fixation des anticorps HS4C3 et RB4Ea12 est fortement augmentée d'un facteur 3 et 5, respectivement. En revanche, la fixation de AO4B08 n'augmente que légèrement en réponse à ce stimulus inflammatoire.

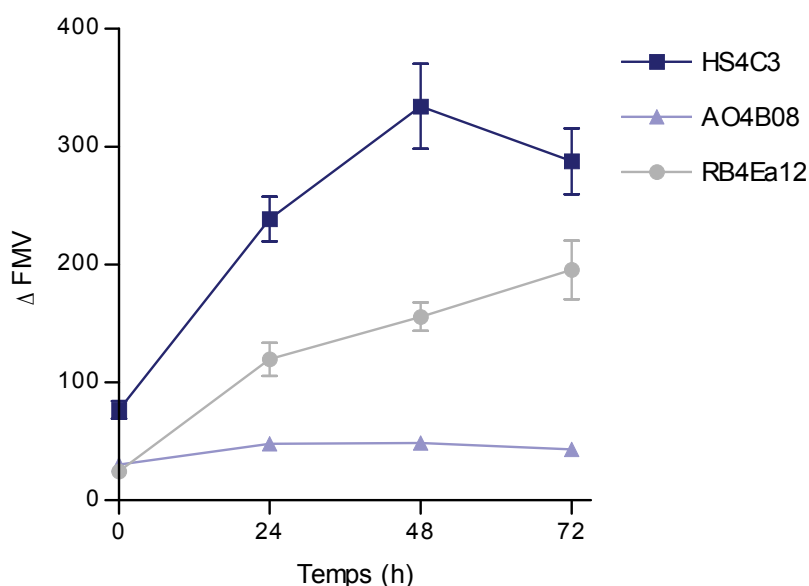


Figure 35 : Effet du LPS sur l'expression des motifs HS à la surface des cellules THP-1. Les cellules sont stimulées en présence de 10 ng/mL de LPS pendant 24, 48 ou 72 h. La détection des motifs HS à la surface cellulaire est réalisée par cytofluorimétrie en flux à l'aide d'anticorps anti-HS (HS4C3, AO4B08 et RB4Ea12). Les résultats sont exprimés en variations de moyenne de fluorescence (Δ FMV) par rapport à l'anticorps irrelevant MPB49 (n = 3).

Les travaux récents réalisés au sein du Laboratoire ont démontré que les cellules THP-1 expriment majoritairement les syndécan-1 et -2 et le CD44v3 (Melchior *et al.*, 2008). Nous avons donc vérifié si la stimulation des cellules THP-1 induit une augmentation de l'expression de ces HSPGs (Figure 36). En absence de LPS, les cellules expriment majoritairement le CD44v3. Les syndécan-1 et -2 sont, quant à eux, faiblement exprimés. Aucune variation significative de l'expression de ces trois HSPGs n'est observée après activation au LPS, ce qui indique que ce dernier n'a pas eu d'effet notable sur le niveau d'expression des HSPGs membranaires. Par conséquent, l'augmentation de fixation des anticorps anti-HS n'est pas la conséquence d'une augmentation du nombre des HSPGs membranaires, mais serait plutôt liée au renouvellement des HSPGs présentant de nouveaux motifs HS. L'ensemble de ces données indiquent que le LPS a modifié la structure des HS, en

augmentant les motifs 3-*O*-sulfatés reconnus par HS4C3 et *N*-sulfatés reconnus par RB4Ea12. Ces résultats sont corrélés à ceux obtenus précédemment par PCR en temps réel et suggèrent une relation directe entre le niveau d'expression des transcrits codant pour les 3-OSTs et le taux de 3-*O*-sulfatation des HS présents à la surface des cellules stimulées.

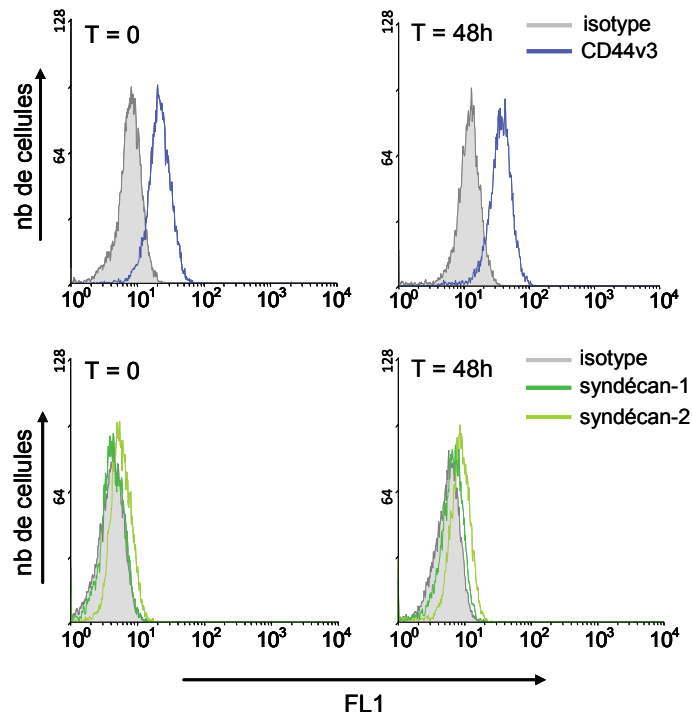


Figure 36 : Expression des HSPGs membranaires à la surface des cellules THP-1. L'expression du CD44v3 et des syndécan-1 et -2 est analysée par cytofluorimétrie en flux après 48 h de stimulation des cellules par 10 ng/mL de LPS ou non. La réactivité des anticorps anti-HSPG est comparée aux anticorps isotypes contrôles. Les résultats sont représentatifs d'au moins deux manipulations indépendantes.

B.2. Rôle des 3-OST-3 dans la synthèse du motif HS de fixation de RANTES

Nous avons mis en évidence que, parmi les sept isoformes de 3-OST, seuls les transcrits codant pour les 3-OST-3 sont fortement exprimés par les cellules THP-1 et que cette expression est sensiblement augmentée suite à l'activation des cellules par un stimulus inflammatoire. Récemment, nous avons démontré que la spécificité de fixation et d'activité de la CypB est dépendante de l'expression des 3-OST-3. Afin de préciser le rôle de ces enzymes et l'importance des groupements 3-*O*-sulfatés dans la biosynthèse du site de fixation spécifique de la chimiokine RANTES, nous avons utilisé une approche similaire à la

précédente en réalisant des expériences d'invalidation d'expression des 3-OST-3 par ARN interférence. Pour chaque manipulation, les effets obtenus pour la chimiokine RANTES ont été comparés à ceux de la CyPB. Les siRNA ayant déjà été caractérisés et utilisés dans les précédentes publications, nous ne discuterons pas de l'efficacité et de la spécificité de ces molécules.

B.2.1. Effet de l'invalidation des 3-OST-3 sur les interactions entre RANTES et les HS membranaires

La fixation de RANTES et de la CyPB à la surface des cellules THP-1 a été analysée par cytofluorimétrie en flux à l'aide d'un dérivé de RANTES biotinylé et de CyPB couplée à la fluorescéine. Comme montré dans la figure 37A, les cellules THP-1 fixent les deux facteurs inflammatoires, indiquant que les sites de fixation membranaires spécifiques de la chimiokine RANTES et de la CyPB sont exprimés à la surface de ces cellules.

Afin d'estimer la part des HS membranaires dans cette fixation, les cellules THP-1 ont préalablement été incubées en présence d'un cocktail d'héparinases (Figure 37B). L'élimination des chaînes HS inhibe la fixation de RANTES et de la CyPB à la surface des cellules THP-1, confirmant l'importance des HSPGs dans leur fixation cellulaire. Les HS membranaires semblent toutefois jouer un rôle plus remarquable dans la fixation cellulaire de la CyPB puisque l'inhibition de sa fixation après traitement des cellules est de l'ordre de 72,5 % contre 48 % pour RANTES. Nos travaux précédents ont montré que les HS produits par des cellules invalidées pour l'expression de la NDST1 sont peu sulfatés. Nous avons donc invalidé la NDST1 dans les cellules THP-1 dans le but de mettre en évidence l'importance de la sulfatation des HS dans la fixation cellulaire de la chimiokine RANTES. Comme attendu, l'invalidation de l'expression de la NDST1 inhibe la fixation de RANTES à la surface des cellules THP-1. L'inhibition de la fixation de RANTES est toutefois moindre par rapport à celle observée après traitement des cellules par les héparinases (33 % *versus* 48 %, respectivement) et peut s'expliquer par l'inhibition de l'expression des transcrits codant pour la NDST1 qui n'est pas totale mais de l'ordre de 75 % (donnée non montrée).

L'invalidation de l'expression des 3-OST-3 possède un effet inhibiteur significatif sur la fixation de la CyPB à la surface des cellules THP-1, ce qui démontre que la fixation cellulaire de la CyPB est dépendante de l'expression des 3-OST-3. L'inhibition de la fixation de RANTES est plus limitée. En effet, alors que la fixation cellulaire de la CyPB est inhibée de l'ordre de 45 % pour les cellules invalidées pour les 3-OST-3, la fixation de RANTES est

diminuée de 18,5 % pour les cellules transfectées par le même siRNA (Figure 37B). Ces données suggèrent que les HS 3-*O*-sulfatés possèdent un rôle de moindre importance pour la fixation de RANTES à la surface des cellules THP-1.

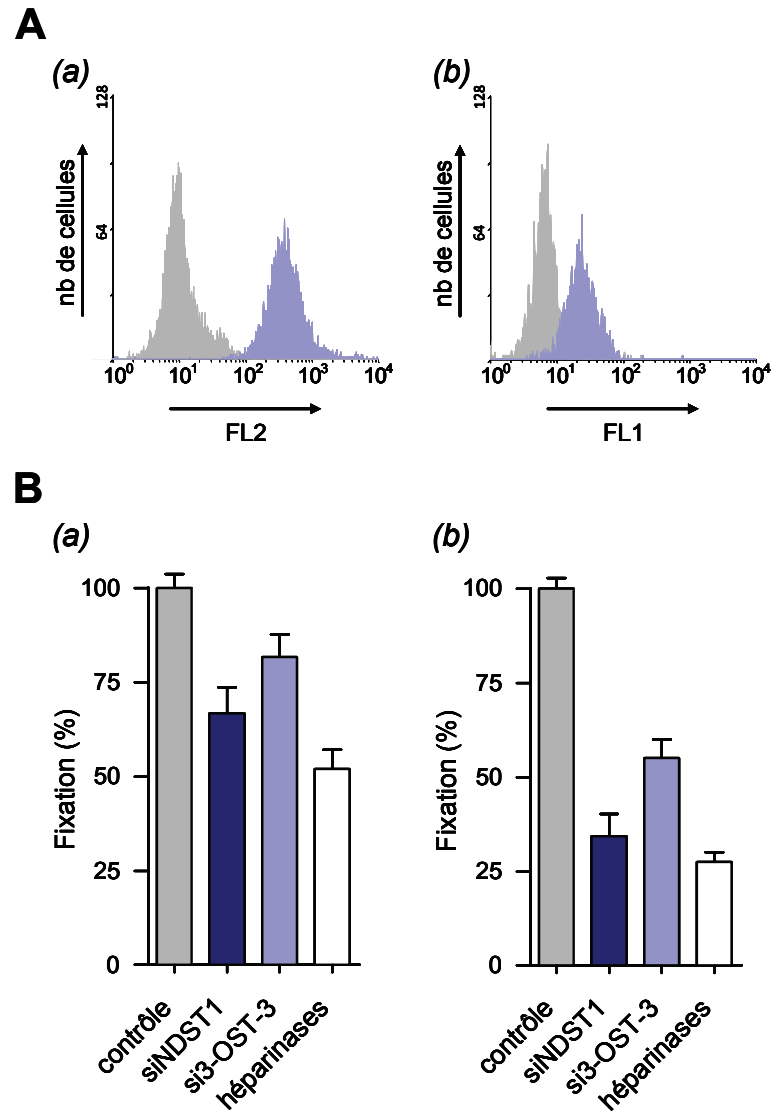


Figure 37 : Effet de l'inactivation des 3-OST-3 sur la fixation de RANTES (a) et de la CyPB (b) à la surface des cellules THP-1. (A) Etude de la fixation cellulaire des deux facteurs inflammatoires. Les cellules THP-1 sont incubées en présence de 50 nM de RANTES biotinylé ou de CyPB couplée à la fluorescéine. Après lavage, la fixation cellulaire est analysée par cytofluorimétrie en flux (histogramme bleu). La fixation non spécifique est déterminée en présence de 100 excès molaire de ligands non marqués (histogramme gris). Ces résultats sont représentatifs d'au moins deux expériences distinctes. **(B)** Effet du siRNA ciblant les 3-OST-3 sur la fixation cellulaire des deux ligands. Les cellules THP-1 sont transfectées par les siRNA correspondants ou par le siGFP (contrôle). 48 h après traitement, les cellules sont prélevées et utilisées pour l'étude de la fixation de RANTES et de la CyPB par cytofluorimétrie en flux. Les cellules traitées par le cocktail d'héparinases sont utilisées comme témoin afin d'estimer la participation des HS dans l'interaction. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle (n = 3).

B.2.2. Effet de l'invalidation des 3-OST-3 sur les activités biologiques de RANTES

a) Activité chimiotactile

RANTES et la CyPB possèdent une activité chimio-attractante et induisent la migration de divers types cellulaires. En premier lieu, nous avons alors étudié la migration des cellules THP-1 en réponse à des concentrations croissantes de RANTES et de CyPB. L'allure des courbes présentées en figure 38A est caractéristique de l'effet induit par de nombreux facteurs chimiotactiles. La migration des cellules THP-1 est augmentée d'un facteur 6 en présence de 5 nM de RANTES et d'un facteur 3,5 en présence de 15 nM de CyPB, confirmant l'activité chimio-attractante de ces protéines envers les cellules THP-1. En présence de fortes concentrations de ligands, la migration atteint rapidement son seuil de base, ce qui s'explique par un phénomène de désensibilisation des cellules. Comparativement à la CyPB, RANTES apparaît être un meilleur facteur pro-migratoire puisque des concentrations faibles induisent une meilleure réponse chimiotactile.

L'invalidation de la NDST1 réduit respectivement de 85 % et de 90 % la migration des cellules THP-1 induite par RANTES et la CyPB, confirmant l'importance de la *N*-sulfatation des HS pour l'activité biologique de ces deux facteurs. De même, la transfection des cellules THP-1 par le siRNA spécifique des 3-OST-3 inhibe significativement la migration des cellules induite par RANTES de 80 %. Ce résultat démontre que les réponses cellulaires induites par RANTES sont dépendantes de la présence d'un motif HS 3-*O*-sulfaté. La manipulation a été reproduite avec la CyPB. Comme attendu, l'invalidation des 3-OST-3 dans les cellules THP-1 inhibe l'activité chimio-attractante de la CyPB de 85 %, confirmant le rôle des 3-OST-3 dans les activités cellulaires de la CyPB (Figure 38B).

b) Activation de la voie p44/p42 MAPK

Le principal événement intracellulaire suivant la fixation de RANTES et de la CyPB à la surface de nombreux types cellulaires est l'activation de la voie p44/p42 MAPK. Nous avons alors étudié la phosphorylation des kinases ERK1/2 induite par ces facteurs dans les cellules THP-1. Comme attendu, une augmentation significative du niveau de phosphorylation des kinases ERK1/2 est observée suite à l'incubation des cellules en présence de 15 nM de RANTES ou de 50 nM de CyPB (Figure 39).

L'activation de la voie p44/p42 MAPK induite par RANTES et la CyPB est fortement inhibée dans les cellules invalidées pour la NDST1, ce qui confirme les résultats obtenus lors

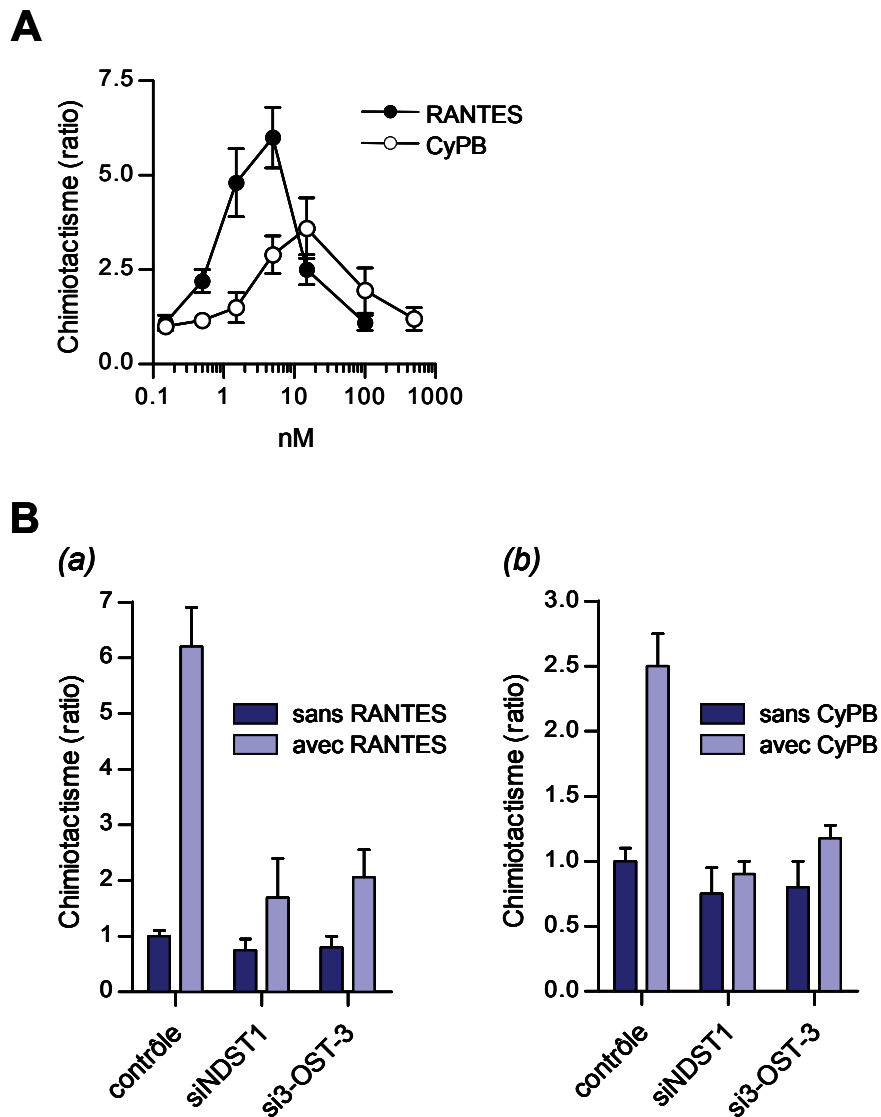


Figure 38 : Effet de l'inactivation des 3-OST-3 sur le chimiotactisme des cellules THP-1. (A) Activité chimiotactile de RANTES et de la CyPB envers les cellules THP-1. L'étude du chimiotactisme est réalisée en présence de concentrations croissantes de facteurs chimio-attractants. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules ayant migrées en présence de ligands divisé par le nombre de cellules ayant spontanément migrées. **(B)** Effet du siRNA ciblant les 3-OST-3 sur l'activité chimio-attractante de RANTES **(a)** et de la CyPB **(b)**. 48 h après transfection, les cellules THP-1 sont collectées, puis utilisées pour étudier l'activité chimiotactile des deux facteurs inflammatoires (5 nM de RANTES ou 15 nM de CyPB) (n = 3).

de l'étude du chimiotactisme. Le PMA, qui est un activateur fort de la voie p44/p42 MAPK, induit la phosphorylation des kinases ERK1/2, démontrant que la transfection n'est pas la cause de cette inhibition. Les résultats obtenus avec les cellules THP-1 invalidées pour les 3-OST-3 confirment nos observations sur le rôle de ces enzymes dans les activités biologiques de RANTES et de la CyPB. En effet, la phosphorylation induite par les deux facteurs est inhibée dans ces cellules invalidées, alors que celle induite par le PMA n'est pas réduite (Figure 39). L'ensemble de ces données indiquent que les événements intracellulaires et les réponses cellulaires induits par RANTES dépendent de l'existence d'un motif HS 3-O-sulfaté porté à la surface de ses cellules cibles.

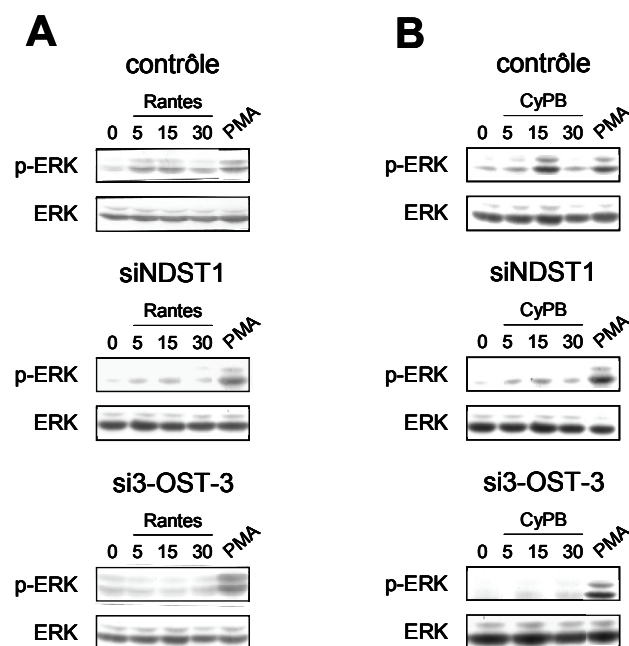


Figure 39 : Effet de l'inactivation des 3-OST-3 sur l'activation de la voie p44/p42 MAPK dans les cellules THP-1. Les cellules invalidées sont incubées en présence de 15 nM de RANTES (A) ou de 50 nM de CyPB (B), puis sont lysées aux temps indiqués. Les pistes supérieures montrent les formes phosphorylées de ERK1/2 alors que les pistes inférieures montrent les formes totales des deux kinases. Le PMA est utilisé en tant que contrôle positif d'activation de la voie p44/p42 MAPK dans les cellules transfectées. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois manipulations indépendantes.

C – Discussion

Les 3-OSTs catalysent le transfert des groupements sulfates sur les hydroxyyles en position C3 des résidus de glucosamine. Cette modification tardive est relativement rare puisqu'elle n'affecte que 1 à 7 % des résidus de glucosamine. Néanmoins, nous avons mis en évidence que la fixation et l'activité de la CyPB sont dépendantes de l'expression de la 3-OST-3B. Récemment, la modulation de l'expression des 3-OSTs dans les cellules inflammatoires en réponse à des stimuli exogènes a été démontrée (Krenn *et al.*, 2008). L'ensemble de ces données suggèrent que les activités des cellules de l'inflammation peuvent être régulées au niveau de l'expression des 3-OSTs, *via* un remodelage profond des motifs HS de fixation au cours de l'inflammation.

Les enzymes qui catalysent la 3-*O*-sulfatation des HS appartiennent à une famille de sept membres, qui possèdent des localisations tissulaires différentes et des spécificités de substrat distinctes (Shworak *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999b; Xia *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2005; Lawrence *et al.*, 2007). En premier lieu, nous avons donc analysé le profil d'expression des transcrits codant pour les 3-OSTs dans les cellules inflammatoires primaires isolées du sang et diverses lignées cellulaires. Notre étude a montré que le phénotype inflammatoire des cellules peut être relié à l'expression dominante des 3-OST-3. En effet, contrairement aux cellules non inflammatoires, les lymphocytes T CD4⁺, les monocytes ainsi que leur lignée cellulaire respective (*i.e.* cellules lymphoblastiques Jurkat et cellules monocytaires THP-1) expriment majoritairement les 3-OST-3. La culture des monocytes primaires et des cellules THP-1 en présence de différents facteurs inflammatoires nous a permis de mettre en évidence que l'expression des 3-OST-3 est significativement augmentée au cours de l'activation des cellules de l'inflammation. Ces résultats sont en accord avec les travaux antérieurs de Krenn *et al.* (2008) et démontrent que l'expression des 3-OSTs peut être modulée au cours de la réaction inflammatoire.

Les variations de sulfatation des HS membranaires au cours de l'activation des cellules ont ensuite été étudiées par cytofluorimétrie en flux à l'aide d'anticorps anti-HS. Il est apparu que la culture des cellules THP-1 en présence de LPS induit l'augmentation de la fixation de l'ensemble des anticorps, tandis qu'aucune variation notable n'est observée au niveau de l'expression des HSPGs membranaires. Ces observations confirment que l'activation des cellules dans un contexte inflammatoire s'accompagne d'une modification structurale des chaînes HS. De façon intéressante, l'augmentation de la fixation de HS4C3 est la plus prononcée. Cet anticorps est le seul à reconnaître spécifiquement des motifs héparaniques

contenant une glucosamine 3-*O*-sulfatée (Dennissen *et al.*, 2002; Ten Dam *et al.*, 2006; Kurup *et al.*, 2007), ce qui démontre que l'augmentation de l'expression des transcrits codant pour les 3-OST-3 est directement corrélée à l'augmentation du taux de 3-*O*-sulfatation des HS présents à la surface des cellules stimulées.

L'invalidation de l'expression des 3-OST-3 par ARN interférence dans les cellules Jurkat nous a permis de démontrer que la fixation et les réponses cellulaires de la CyPB sont dépendantes de la présence d'un motif HS 3-*O*-sulfaté à la surface de ses cellules cibles. Afin de mieux comprendre le rôle de la 3-*O*-sulfatation dans la régulation des réponses inflammatoires, nous avons utilisé la même approche dans les cellules THP-1 et nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux effets de l'invalidation des 3-OST-3 sur la fixation cellulaire et les activités biologiques d'un autre ligand des HS, la chimiokine RANTES/CCL5. En effet, RANTES/CCL5 constitue un deuxième médiateur inflammatoire de choix pour notre étude. Tout comme la CyPB, il possède une activité chimio-attractante et il a été démontré que ses activités sont dépendantes de sa fixation sur certains HSPGs membranaires tels que le syndécan-1, le syndécan-2 et le CD44 (Roscic-Mrkic *et al.*, 2003; Slimani *et al.*, 2003a; 2003b; Charnaux *et al.*, 2005). Comme attendu, l'invalidation de l'expression des 3-OST-3 inhibe la fixation de la CyPB à la surface des cellules THP-1, ce qui confirme l'importance des glucosamines 3-*O*-sulfatées pour l'interaction entre la CyPB et les HS membranaires. A l'inverse, la fixation cellulaire de RANTES/CCL5 n'est que peu affectée, ce qui démontre que la 3-*O*-sulfatation des HS n'est pas nécessaire pour la fixation de la chimiokine. Nous avons ensuite mis en évidence que l'invalidation de l'expression des 3-OST-3 inhibe fortement le chimiotactisme des cellules en présence de CyPB ou de RANTES/CCL5. Ces résultats sont corrélés à l'inhibition de l'activation de la voie p44/p42 MAPK induite par les deux facteurs inflammatoires dans les cellules THP-1 invalidées et démontrent que les réponses cellulaires induites par la CyPB et RANTES/CCL5 sont dépendantes de la présence d'un motif HS 3-*O*-sulfaté porté à la surface de leurs cellules cibles. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les 3-OST-3, et par conséquent les HS 3-*O*-sulfatés, régulent la fixation et les activités de RANTES/CCL5 et de la CyPB *via* deux mécanismes distincts.

Récemment, les travaux réalisés au Laboratoire ont permis de fournir un début de réponse quant à l'implication différentielle des 3-OST-3 dans les réponses induites par les deux facteurs inflammatoires. Au cours de cette étude préliminaire, des oligosaccharides dérivés d'héparine et des HS 3-*O*-sulfatés *in vitro* par une forme soluble de la 3-OST-3B ont été utilisés dans des expériences d'inhibition des réponses cellulaires induites par

RANTES/CCL5 et la CyPB. Nous avons ainsi montré que, contrairement aux HS non modifiés qui sont de pauvres inhibiteurs des réponses cellulaires induites par la CyPB, les HS 3-*O*-sulfatés inhibent fortement la migration des cellules THP-1 induite par la protéine et sont même de meilleurs inhibiteurs que l'héparine. Nous avons précédemment mis en évidence que l'octasaccharide héparanique spécifique de la CyPB possède un résidu de glucosamine 3-*O*-sulfaté qui permet à la fois la fixation et les activités biologiques de la CyPB. En accord avec ces résultats, il est donc possible que, dans ce cas précis, le rôle des 3-OST-3 soit de synthétiser le motif HS reconnu par la CyPB. La même expérience a été reproduite avec la chimiokine RANTES/CCL5. A la différence de la CyPB, nous avons montré que les oligosaccharides de HS sont efficaces pour inhiber la migration induite par RANTES/CCL5. La 3-*O*-sulfatation des oligosaccharides augmente cette activité inhibitrice, qui reste toutefois similaire à celle obtenue avec des oligosaccharides d'héparine de même taille (dp10). L'héparine et les HS contiennent peu de groupements 3-*O*-sulfates, ce qui suggère que le pouvoir inhibiteur des oligosaccharides modifiés est probablement la conséquence de l'augmentation du taux de groupements sulfates. Cette hypothèse est en accord avec les données bibliographiques. En effet, plusieurs études suggèrent l'importance de la densité des groupements sulfates pour la fixation des chimiokines aux GAGs. Par exemple, Meissen *et al.* (2009) ont récemment démontré que la chimiokine MCP-1/CCL2 interagit efficacement avec des octasaccharides ayant une densité de sulfates élevée. Nous avons montré que les HS 3-*O*-sulfatés ne sont pas indispensables pour la fixation cellulaire de RANTES/CCL5, mais sont absolument requis pour ses activités biologiques. L'ensemble de ces données suggèrent que, dans le cas de RANTES/CCL5, la fonction des 3-OSTs serait d'augmenter le taux de groupements sulfates des HS, ce qui permettrait l'induction des réponses cellulaires de la chimiokine, probablement en favorisant son oligomérisation. En effet, la 3-*O*-sulfatation étant une modification rare, de nombreux groupements hydroxyles en position C3 des glucosamines sont libres. Par conséquent, une faible augmentation de l'expression et de l'activité des 3-OSTs au cours de l'inflammation serait suffisante pour les substituer et augmenter efficacement la densité globale en sulfates des HS membranaires. Afin de confirmer cette hypothèse, de plus amples investigations devront être menées en utilisant, par exemple, différents oligosaccharides dont la densité et la position des groupements sulfates auront été contrôlées par synthèse chimique.

D – Matériels et méthodes

D.1. Matériels

La CyPB humaine recombinante est produite en routine au Laboratoire (Spik *et al.*, 1991). Après purification, la CyPB est détoxifiée par passage sur Detoxy-gel (Pierce Chemicals, Rockford, IL, USA). La chimiokine RANTES/CCL5 est commercialisée par PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA) et son dérivé biotinylé (B1-RANTES) nous a généreusement été fourni par le Dr. N. Charnaux (Université de Paris Nord, Bobigny, France). L'héparinase I (E.C. 4.2.2.7), l'héparinase II (aucun code EC attribué) et l'héparinase III (E.C. 4.2.2.8) proviennent de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). L'anticorps polyclonal de lapin anti-ERK1/2 (p44/p42 MAPK) et l'anticorps monoclonal de souris anti-phospho-ERK1/2 (E-4) proviennent de Sigma et de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), respectivement. Les anticorps secondaires anti-IgG conjugués à la peroxydase (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, England) ont également été utilisés pour les immunorévélatons. Les anticorps anti-HS, qui reconnaissent des épitopes distincts en fonction de la position des groupements sulfates et du taux d'épimérisation des acides uroniques, ont été fournis par le Dr. T.H. van Kuppevelt (Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands). Ces anticorps sont issus de la technologie du phage-display et sont étiquetés par un fragment de la glycoprotéine du VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) (Tableau 9).

Tableau 9 : Caractéristiques de reconnaissance des anticorps anti-HS.

Anticorps	Modifications essentielles pour la reconnaissance	Epitope préférentiel reconnu
HS4C3	N-, 2-O-, 6-O- et 3-O-sulfatations	GlcNS6S-GlcUA-GlcNS3S6S-IdoUA2S-GlcNS3S6S
AO4B08	N-, 2-O- et 6-O-sulfatations, C ₅ -épimérisation	GlcNS±3S6S-IdoUA2S-GlcNS±3S6S
RB4Ea12	N-sulfatation, N-acétylation, 6-O-sulfatation	GlcNS6S-GlcUA-GlcNS3S6S-IdoUA-GlcNS±3S6S
MPB49	Irrelevant	

L'ensemble des produits utilisés pour l'électrophorèse et la culture cellulaire proviennent de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) et de Lonza BioWhittaker (Basel, Switzerland), respectivement. Les produits dont l'origine n'est pas précisée sont commercialisés par Sigma.

D.2. Culture cellulaire et isolation des leucocytes du sang

Les cellules lymphoblastiques T humaines Jurkat (clone E6-1, TIB-152, ATCC, Rockville, MD, USA) et les cellules leucémiques promonocytaires THP-1 (88081201, ECACC, Porton Down, Salisbury, UK) sont cultivées en routine dans du milieu RPMI 1640 additionné de 2 mM de L-glutamine, 10 mM de gentamycine et 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF). La différenciation des cellules THP-1 est réalisée par addition de 50 nM de 1- α -25-dihydroxy-vitamine D3 au milieu complet pendant 72 h (Pakula *et al.*, 2007). Les cellules humaines de neuroblastome SH-SY5Y (CRL-2266, ATCC), la lignée cellulaire cancéreuse humaine du col de l'utérus Hela (CCL-2, ATCC) et les lignées cellulaires humaines cancéreuses de sein MCF7 (HTB-22, ATCC), MDA-MB-231 (HTB-26, ATCC) sont maintenues dans du milieu DMEM supplémenté par 2 mM de L-glutamine, 10 % (v/v) de SVF et 1 % (v/v) de pénicilline/streptomycine. Les différentes lignées cellulaires sont cultivées à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité relative. Pour les expériences contrôles, les cellules THP-1 sont incubées en présence des héparinases I, II et III (0,2 unités/10⁶ cellules) pendant 2 h à 37°C.

Les cellules mononuclées sont isolées à partir du sang humain provenant de l'Etablissement Français du Sang (Lille, France). Les lymphocytes T CD4⁺ sont purifiés sur billes magnétiques par sélection négative en présence d'un cocktail d'anticorps (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), afin d'éliminer les cellules portant les marqueurs CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , et CD235a. Les monocytes sont isolés par sélection positive en présence d'anticorps anti-CD14 couplé sur billes magnétiques (BD Biosciences), selon les recommandations du fabricant. La pureté des lymphocytes T CD4⁺ et des monocytes a été estimée par cytofluorimétrie en flux (>95 %). Pour les expériences d'activation, les cellules sont cultivées à 1x10⁶/mL dans du milieu RPMI 1640 additionné de 10 % (v/v) de SVF et incubées en présence ou en absence de 10 ng/mL de IL-1 β (Immunotech, Marseille, France) ou de LPS (type 055B5, Sigma).

D.3. Invalidation des sulfotransférases par ARN interférence

Les duplexes siRNA (*Small-Interfering RNA*) (Eurogentec, Seraing, Belgium) ciblant les transcrits codant pour les 3-OST-3 et la NDST1 ont été présentés et leurs effets caractérisés dans le chapitre I des résultats. Un siRNA supplémentaire ciblant la GFP (*Green Fluorescent Protein*) a été utilisé comme témoin négatif (Eurogentec). L'incorporation des siRNA dans les cellules THP-1 est réalisée par électroporation à l'aide de la technologie Nucleofector (Amaxa, Cologne, Germany) selon un protocole optimisé pour cette lignée cellulaire. Les cellules (6×10^6) sont transfectées par 4 μg de siRNA, puis cultivées dans du milieu RPMI 1640 complet pendant 48 h avant manipulation. L'efficacité de transfection a été estimée par cytofluorimétrie en flux à l'aide d'un siRNA couplé à la fluorescéine et se trouve être supérieure à 85 %.

D.4. Quantification de l'expression des ARNm par RT-PCR

Les ARN totaux sont extraits à partir de 3×10^6 cellules à l'aide du kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Hoerd, France). La réaction de rétrotranscription est réalisée à partir de 2 μg d'ARN totaux grâce à une amorce d'oligo(dT)₁₅ et à la transcriptase réverse M-MLVRT (Promega, Madison, WI, USA).

Les réactions de PCR en temps réel sont réalisées sur un système Mx4000 Multiplex Quantitative PCR (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Les oligonucléotides de synthèse utilisés en tant qu'amorces (Eurogentec) sont listés dans le tableau 10. Le logiciel Primer Premier 5.0 a été utilisé pour désigner les amorces de PCR et la séquence du produit d'amplification de chacun des couples a été vérifiée par séquençage (Genoscreen, Lille, France). Le transcrit codant pour la HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase) est utilisé comme témoin interne pour normaliser l'expression de nos gènes d'intérêt. Pour chaque PCR, 2 μL des ADNc (1/5) sont ajoutés aux 23 μL de mélange réactionnel comportant 12,5 μL de Brilliant SYBR green QPCR master mix (2X) (Stratagene), 1 μL de chaque amorce utilisée à la concentration finale indiquée dans le tableau 10 et 8,5 μL d' H_2O . Le protocole d'amplification, répété 40 fois, comprend une étape de dénaturation de l'ADN (30 s, 95°C), une étape d'hybridation des amorces (1 min, température spécifique) et une étape d'élongation (30 s, 72°C). Les données de fluorescence sont enregistrées à la fin de chaque cycle. L'absence d'amplification non spécifique est vérifiée par génération de la courbe de dissociation. L'efficacité relative d'amplification de chaque couple d'amorces est déterminée en utilisant des dilutions sériées du même produit de rétrotranscription. Chaque amplification

est réalisée en triplicate et la quantification relative de l'expression des gènes est réalisée selon la méthodologie décrite par Pfaffl (2001).

Tableau 10 : Présentation des amorces et des conditions de PCR.

Gène	Numéro d'accèsion	Séquences des amorces sens (S) et anti-sens (AS)	Concentrations (nM)	Ta (°C)
<i>3-O5T-1</i>	NM_005114	S : 5'-TTATCTCCTCGGCGATTCTTG-3' AS : 5'-TAGCCAGTCACTAACTGCTTCTCCAT-3'	900 600	67
<i>3-O5T-2</i>	NM_006043	S : 5'-GAATAAGCCACGAAAGGAAA-3' AS : 5'-TATGGGCAGAAAGGAGAATGA-3'	900 600	60
<i>3-O5T-3</i>	A : NM_006042 B : NM_006041	S : 5'-CCATCCAGATCGGCATCTACGC-3' AS : 5'-TGCTTGTCCTGATGATCCTCTTG-3'	300 900	68
<i>3-O5T-4</i>	NM_006040	S : 5'-GACTCATCCTCGCATTGACCCA-3' AS : 5'-TCATTTATCACCTCTTCTGTTCC-3'	300 600	67
<i>3-O5T-5</i>	NM_153612	S : 5'-TGGGAGCTTGGATAGGCTACA-3' AS : 5'-TGGAGGCGAACCTGCTCC-3'	600 600	60
<i>3-O5T-6</i>	NM_001009606	S : 5'-CAAGGGCTTCCCCTGCCTCAAAG-3' AS : 5'-AGCATCCCCAGGGTGCCGCTCA-3'	600 900	68
<i>NDST1</i>	NM_001543	S : 5'-ACCACAGCCAGACTGAACGTTTGTG-3' AS : 5'-ACAGGAAATGTCCAGTCTGTCTCC-3'	600 600	60
<i>HPRT</i>	NM_000194	S : 5'-GACCAGTCAACAGGGGACAT-3' AS : 5'-AACACTTCGTGGGGTCTTTTC-3'	900 600	51

D.5. Analyse par cytofluorimétrie en flux

Le niveau d'expression des HS à la surface cellulaire est déterminé en incubant les cellules THP-1 ($0,25 \times 10^6$ cellules par condition) en présence des différents anticorps anti-HS (Tableau 11) dans 250 μ L de DPBS contenant 0,5 % (w/v) de BSA (DPBS/BSA) pendant 1 h à 4°C. Après lavage, l'anticorps de souris anti-VSV est ajouté pendant 1 h à 4°C, puis les complexes sont révélés par un anticorps anti-IgG couplé à la fluorescéine.

La fixation cellulaire de RANTES/CCL5 est étudiée en incubant les cellules THP-1 dans du DPBS/BSA en présence de 50 nM d'un dérivé de RANTES biotinylé (B1-RANTES) pendant 1 h à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées et marquées par un conjugué streptavidine-phycoérythrine (1/35) (Sigma). Pour l'étude de la fixation de la CyPB à la surface des cellules THP-1, les cellules sont incubées en présence de 50 nM de CyPB couplée à la fluorescéine

pendant 1 h à 4°C (Denys *et al.*, 1997). La fixation non spécifique est déterminée en incubant les cellules en présence de 100 excès molaire de ligand non marqué.

L'expression membranaire du CD44v3, du syndécan-1 et du syndécan-2 est analysée en incubant les cellules THP-1 avec les différents anticorps correspondants (Tableau 11) dans du DPBS/BSA pendant 1 h à 4°C. Après lavage, les anticorps couplés à la fluorescéine sont ajoutés pendant 1 h à 4°C. La fixation non spécifique est déterminée en présence de sérum irrelevant.

Dans toutes les expériences, les cellules sont lavées deux fois et sont immédiatement analysées. L'acquisition a été réalisée grâce au cytofluorimètre en flux FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) et les données ont été analysées grâce au logiciel CellQuest.

Tableau 11 : Anticorps utilisés en cytofluorimétrie en flux.

Anticorps primaires			
Réactivité	Origine	Référence	Dilution
Epitopes HS	phage-display		1/100
Syndécan-1	polyclonal de chèvre	Santa Cruz Biotechnology	1/100
Syndécan-2	polyclonal de chèvre	Santa Cruz Biotechnology	1/100
CD44v3	polyclonal de lapin	Chemicon	1/500
Etiquette VSV (P5D4)	monoclonal de souris	Sigma	1/1000
Irrelevant	sérum de lapin		1/5000
Irrelevant	sérum de chèvre		1/5000
Anticorps couplés à la fluorescéine			
Réactivité	Origine	Référence	Dilution
IgG de chèvre		Sigma	1/400
IgG de lapin		Sigma	1/40
IgG de souris		Sigma	1/64

D.6. Etude du chimiotactisme

Les expériences de chimiotactisme sont réalisées en utilisant des chambres de micro-diffusion (Corning Costar, Cambridge, MA, USA) contenant deux compartiments séparés par une membrane de polycarbonate dont les pores sont de 3 µM. Les cellules THP-1 ($0,8 \times 10^6$) sont placées dans 100 µL de milieu RPMI 1640 complétementé par 0,5 % (w/v) de BSA dans le

compartiment supérieur, tandis que le facteur chimio-attractant (600 μ L) (5 nM de RANTES/CCL5 ou 15 nM de CyPB) est ajouté dans le compartiment inférieur. Après 1 h d'incubation à 37°C, les cellules non adhérentes sont éliminées par lavage au DPBS, tandis que les cellules ayant migrées sont fixées par 100 μ L de paraformaldéhyde 3 % (w/v), pH 7,8 à 4°C. Les cellules sont ensuite colorées par une solution de bleu de méthylène à 1 % (w/v) dans du tampon borate 100 mM, pH 8,2, puis lysées par 100 μ L de HCl 0,1 N. L'intensité de la coloration libérée par la lyse des cellules est mesurée à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (BioRad), puis reliée au nombre de cellules en se référant à une courbe étalon exprimant le nombre de cellules THP-1 en fonction de l'absorbance (Allain *et al.*, 2002).

D.7. Détection de l'expression des protéines par immunorévélation

Avant la manipulation, les cellules THP-1 (1×10^6 /point) sont sevrées pendant 4 h dans du milieu dépourvu de SVF. L'activation de la voie p44/p42 MAPK est réalisée par addition de 150 nM de CyPB, 15 nM de RANTES/CCL5 ou 200 nM de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acétate). Aux temps indiqués, les cellules sont lavées par du DPBS froid contenant des inhibiteurs de phosphatases (1 mM orthovanadate de sodium et 10 mM NaF), puis lysées pendant 4 h à 4°C par 60 μ L de tampon de lyse (20 mM phosphate, pH 7,4, 350 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, 20 % (v/v) glycérol) additionné d'un cocktail d'anti-protéases (Roche Applied Science, Meylan, France) et d'inhibiteurs de phosphatases. Les lysats sont clarifiés par centrifugation et déposés sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 10 %. Après électrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany), les membranes sont saturées pendant 16 h à 4°C dans un tampon 20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20 (TBS-T) complété par 3 % (w/v) de BSA. Les membranes sont alors incubées 2 h à 20°C en présence de l'anticorps primaire approprié dans un tampon TBS-T complété par 1 % (w/v) de BSA, lavées par le tampon TBS-T, puis incubées 1 h en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La détection des protéines est réalisée par chimiluminescence (ECL, Western Blotting System, GE Healthcare).

D.8. Analyse statistique

Pour chaque expérience, les résultats ont été obtenus à partir d'au moins trois manipulations différentes effectuées en triple exemplaires. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le *t*-test Student et les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

Conclusion Générale

Les HSPGs participent à une grande variété de processus physiologiques, où ils interviennent notamment dans la fixation et la modulation de l'activité de nombreux médiateurs protéiques (Turnbull *et al.*, 2001; Lindahl & Li, 2009). A ce jour, même si une centaine de HBPs a été identifiée, il existe peu d'informations sur la nature précise de leurs motifs de fixation héparaniques. Toutefois, il est clairement établi que la diversité structurale de ces motifs est liée à la régulation fine des voies de biosynthèse des chaînes HS. Au cours de ce processus complexe, le précurseur non sulfaté [GlcUA β 1,4 GlcNAc]_n subit différentes modifications régies par des enzymes de maturation, *N*-déacétylase/*N*-sulfotransférases, *O*-sulfotransférases et C₅-épipimérase. Ces enzymes, dont l'expression est dépendante du type cellulaire, possèdent des activités et des spécificités de substrat différentes, ce qui confère une grande hétérogénéité structurale aux HS et offre ainsi un large éventail de motifs de fixation pour les protéines (Esko & Lindahl, 2001; Capila & Linhardt, 2002; Esko & Selleck, 2002). Dans ce contexte, l'étude des variations d'expression et d'activité des sulfotransférases est complémentaire à l'analyse structurale des motifs HS, afin de relier leur hétérogénéité à la fixation spécifique des médiateurs protéiques sur leurs cellules cibles.

Comme la majorité des chimiokines, la CyPB est une protéine inflammatoire qui induit la migration et l'adhérence des monocytes/macrophages et de certaines sous-populations lymphocytaires. Il a été démontré que ses activités sont dépendantes de sa fixation sur deux types de sites de haute affinité, un récepteur protéique identifié au CD147 et des chaînes HS portées par le syndécan-1. En effet, le traitement des cellules par l'héparinase, l'invalidation du syndécan-1 par ARN interférence ou l'utilisation d'anticorps anti-syndécan-1 ou anti-CD147 bloquants inhibent les réponses induites par la CyPB (Yurchenko *et al.*, 2001; Allain *et al.*, 2002; Pakula *et al.*, 2007). Ces données indiquent que la fixation de la CyPB sur les chaînes HS du syndécan-1 est nécessaire à sa présentation au CD147, ce qui conduit à l'activation des voies de signalisation intracellulaires et à l'induction des réponses observées chez les cellules cibles de la CyPB. Toutefois, même si le CD147 et le syndécan-1 sont présents à la surface d'un grand nombre de cellules, la majorité d'entre elles ne fixe pas la CyPB, ce qui suggère que la seule présence du CD147 et du syndécan-1 n'explique pas la spécificité d'action de la CyPB. En revanche, il a été démontré que la variabilité structurale des chaînes HS est dépendante du type cellulaire. Il est donc envisageable que la reconnaissance de la CyPB soit uniquement liée à la présence d'un motif héparanique particulier porté par les chaînes HS du syndécan-1 présent sur les cellules cibles de la CyPB.

Nos travaux sont largement en faveur de cette hypothèse. L'utilisation d'une méthode physique basée sur l'utilisation de biocapteur optique de type IAsys et d'une méthode de retard sur gel en condition non dénaturante a démontré l'implication de certains groupements sulfates dans les interactions entre la CyPB et l'héparine. De façon surprenante, nous avons mis en évidence la présence d'un résidu de glucosamine *N*-non substitué 3-*O*-sulfaté dans le motif HS reconnu par la CyPB. De plus, l'utilisation de dérivés hépariniques *N*-, 2-*O*- et 6-*O*-désulfatés a permis de confirmer l'importance des charges apportées par ces groupements sulfates dans les interactions de type HBP/héparine.

L'implication de glucosamines *N*-non substituées dans les interactions entre les motifs hépariniques et leurs ligands est un événement rare. En effet, le pourcentage de fonction amine libre varie de 0,7 à 4 % selon la provenance des chaînes d'héparine/HS, et on a longtemps pensé qu'il s'agissait d'artéfacts expérimentaux reflétant la perte de groupements *N*-sulfatés lors de la préparation des HS (Hook *et al.*, 1982; Westling & Lindahl, 2002). Toutefois, la présence de ces résidus dans les tissus natifs a désormais clairement été démontrée (Norgard-Sumnicht & Varki, 1995; van den Born *et al.*, 1995; Toida *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 2001; Westling & Lindahl, 2002). Le mécanisme de formation des GlcNH₂ durant la biosynthèse des HS reste encore à découvrir mais l'intervention d'une déacétylase ou d'une endo-sulfamidase peut être envisagée. Aucune des deux enzymes n'a été identifiée. En revanche, la NDST3 semble être un bon candidat. En effet, il est probable que la NDST3 joue un rôle dans la génération de ces résidus particuliers de glucosamine en raison de sa haute activité *N*-déacétylase (Westling & Lindahl, 2002). En recherchant les enzymes impliquées dans la synthèse du motif HS de fixation de la CyPB, nous avons mis en évidence que, contrairement aux autres cellules, les cellules inflammatoires expriment la NDST3. Nos premières expériences d'inactivation par siRNA dans les cellules Jurkat ont montré que cette enzyme est nécessaire à la fixation et aux activités biologiques de la CyPB. Ainsi, ces résultats suggèrent que la NDST3 est sans doute l'enzyme la plus à même de générer la GlcNH₂ responsable de la fixation de la CyPB sur ses cellules cibles. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. En particulier, la surexpression de cette isoenzyme dans des cellules de type Hela et l'analyse structurale des HS isolés à partir de ces cellules devraient permettre de démontrer le rôle de cette NDST dans la génération des glucosamines *N*-non substituées.

A ce jour, seule la glycoprotéine gD de l'enveloppe du virus HSV-1 a été décrite dans la littérature comme interagissant avec un motif héparinique qui possède entre autres un résidu de glucosamine *N*-non substitué 3-*O*-sulfaté (Shukla *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002).

L'infection par le HSV-1 est un processus multi-étape dépendant des HS. En effet, il a été démontré que le contact initial entre le virus et la cellule cible s'effectue *via* l'interaction des glycoprotéines de l'enveloppe gB et gC avec un motif HS portant des résidus de IdoUA2S et GlcNS6S. Suite à cet ancrage cellulaire, l'interaction avec la glycoprotéine gD engendre la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire, permettant ainsi l'entrée du virus. Plusieurs récepteurs cellulaires de la protéine gD ont été décrits. Ils incluent HVEM (*Herpesvirus Entry Mediator*), un membre de la famille des récepteurs du TNF, et deux protéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines, les nectine-1 et nectine-2 (Shukla & Spear, 2001; Spear & Longnecker, 2003). En plus de ces récepteurs, les HS 3-O-sulfatés fournissent également des sites de fixation cellulaire pour la protéine gD et assistent ainsi l'entrée virale dans certaines cellules cibles (Shukla *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002; Tiwari *et al.*, 2004). De façon intéressante, il a été démontré que les 3-OST-3 fournissent l'unique site de fixation de la glycoprotéine gD *via* la synthèse du disaccharide [IdoUA2S-GlcNH₂3S[±]6S] (Liu *et al.*, 1999a; 1999b; 2002; Tiwari *et al.*, 2006). Nous avons mis en évidence que la fixation et les activités de la CyPB sont également dépendantes de la présence d'un résidu de GlcNH₂3S généré par les 3-OST-3, ce qui suggère que les motifs HS reconnus par la CyPB et la glycoprotéine gD possèderaient des caractéristiques communes. Nos travaux préliminaires réalisés par cytofluorimétrie en flux à l'aide de protéines recombinantes ont montré que la CyPB inhibe la fixation de la protéine gD à la surface des cellules Jurkat. Sur la base de ces premiers résultats, il serait donc intéressant de poursuivre ces travaux afin de déterminer si le motif initialement décrit comme étant la signature de la protéine gD correspond au motif HS de fixation de la CyPB.

La présence des HSPGs à la surface cellulaire des lymphocytes T CD4⁺ et des monocytes a longtemps été débattue. Bien qu'il ait été établi que des lignées cellulaires telles que la lignée lymphoblastique T Jurkat et la lignée monocyttaire THP-1 expriment des HS membranaires, l'absence de ces derniers à la surface des cellules T CD4⁺ et des monocytes a été suggérée par de nombreuses études (Clasper *et al.*, 1999; Ibrahim *et al.*, 1999; Makatsori *et al.*, 2001; Manakil *et al.*, 2001). Cette controverse s'est compliquée lorsqu'il a été mis en évidence que les lymphocytes T CD4⁺ et les monocytes expriment les transcrits codant pour les glucosaminyl sulfotransférases et les « cores » protéiques des protéoglycanes. De plus, il a été montré que le traitement de ces cellules par les héparinases réduit drastiquement la fixation des HBPs à leur surface, confortant l'idée que les HS membranaires sont bel et bien exprimés par les lymphocytes T et les monocytes primaires (Denys *et al.*, 1998; Jones *et al.*,

2005; Wegrowski *et al.*, 2006; Pakula *et al.*, 2007; den Dekker *et al.*, 2008; Garner *et al.*, 2008). Cette divergence s'explique probablement par la très faible expression des HSPGs membranaires, à laquelle s'ajoutent les difficultés de détection de ces molécules par des approches biochimiques classiques. Des études récentes utilisant la cytofluorimétrie en flux ont pourtant mis en évidence l'expression de HS à la surface des lymphocytes T et des monocytes primaires au cours de leur activation et/ou de leur différenciation (Jones *et al.*, 2005; den Dekker *et al.*, 2008; Garner *et al.*, 2008). En utilisant des anticorps qui reconnaissent spécifiquement certains épitopes des HS, nous avons confirmé ces résultats en démontrant que le degré d'activation ou de maturation des cellules inflammatoires module la structure et la densité de sulfatation des chaînes HS présentes à la surface de ces dernières.

Les données actuelles suggèrent que l'action concertée des enzymes de maturation serait responsable de l'extrême diversité des motifs HS qui mène à la fixation spécifique des HBPs sur leurs cellules cibles. Par une approche fonctionnelle, nous avons confirmé cette théorie. Après avoir mis en évidence que la caractéristique majeure des cellules répondant à la CyPB est une forte expression de la NDST2 et de la 3-OST-3B, l'invalidation de ces enzymes par ARN interférence dans les cellules Jurkat nous a permis de démontrer leur implication dans la biosynthèse du motif HS engagé dans l'interaction avec la CyPB. Par ailleurs, nous avons également montré que l'invalidation de l'expression de la NDST1 inhibe la fixation et les réponses induites par la CyPB. Alors que l'absence de la NDST2 ne réduit que partiellement le nombre de glucosamines *N*-sulfatées, l'invalidation de la NDST1 conduit à une inhibition quasi-totale de la *N*-sulfatation. Ces résultats sont en accord avec les publications récentes et confortent l'hypothèse selon laquelle la NDST1 serait impliquée dans l'initiation de la maturation des HS (Pikas *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005; Ledin *et al.*, 2006). Dans les cellules où son expression est élevée, la NDST2 pourrait alors agir en coopération avec la NDST1 afin d'augmenter la densité en groupements sulfates et d'étendre les régions *N*-sulfatées des HS initialement modifiées par la NDST1.

Nous avons ensuite montré que l'augmentation du taux de 3-*O*-sulfatation des HS constitue la modification majeure observée après stimulation des lymphocytes T et des monocytes. Le niveau élevé de 3-*O*-sulfatation semble être spécifique des cellules de l'inflammation, puisque les 3-OSTs ne sont que peu exprimées par les autres types cellulaires. Ces données suggèrent que les HS 3-*O*-sulfatés seraient cruciaux pour la régulation des réponses inflammatoires. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences d'invalidation d'expression des 3-OST-3 par ARN interférence. Nous avons montré que les réponses cellulaires induites par la CyPB et par RANTES/CCL5, le prototype des chimiokines

inflammatoires, sont dépendantes de l'expression et de l'activité des 3-OST-3. Toutefois, contrairement à la CyPB, l'expression des 3-OST-3 n'est pas requise pour la fixation cellulaire de RANTES/CCL5, ce qui suggère que les 3-OST-3 régulent les activités biologiques des deux facteurs inflammatoires *via* des mécanismes distincts. Afin de mieux comprendre le rôle différentiel des 3-OST-3 dans la réponse inflammatoire, il serait important d'approfondir cette étude en identifiant la nature de ces mécanismes.

Les protéines inflammatoires sont impliquées dans un grand nombre de dérives pathologiques telles que les maladies inflammatoires chroniques (asthme, psoriasis, polyarthrite rhumatoïde, athérosclérose), le cancer, les troubles neurodégénératifs ou encore les infections virales (HIV, HSV). Dans ce contexte, l'identification des motifs HS nécessaires aux activités biologiques des protéines inflammatoires représente un nouvel enjeu attractif dans l'optique de développer des mimétiques HS à potentiel thérapeutique (Spillmann, 2001; Lindahl & Li, 2009). Les travaux réalisés au Laboratoire ont montré que des oligosaccharides 3-*O*-sulfatés sont plus efficaces que leurs précurseurs non modifiés pour inhiber la migration des cellules THP-1 induite par RANTES/CCL5 et la CyPB. Ces résultats préliminaires sont prometteurs car ils démontrent, pour la première fois, que des oligosaccharides 3-*O*-sulfatés inhibent efficacement l'activité de facteurs inflammatoires. Néanmoins, le contrôle des caractéristiques structurales des substrats utilisés dans les réactions de 3-*O*-sulfatation est essentiel. En effet, les produits formés à partir des oligosaccharides dérivés d'héparine ou de HS pourraient inhiber des facteurs inflammatoires non ciblés ou posséder des propriétés anticoagulantes. Afin d'éviter ces inconvénients, il est donc nécessaire d'utiliser des substrats de structure homogène, pour lesquels les caractéristiques structurales auront préalablement été définies par synthèse chimique contrôlée. Ces travaux sont déjà en cours de réalisation dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire du Pr. D. Bonnaffé (Université d'Orsay) et devraient conduire au développement de molécules à activité anti-inflammatoire ayant des applications dans le traitement de pathologies où les HS ont été identifiés comme cibles potentielles.

Annexe

En parallèle de mes travaux de recherche, j'ai également participé à une étude visant à démontrer la participation du CD98 et du CD147 dans l'activité pro-adhésive de la CyPB. Les résultats ont fait l'objet d'une publication dans *Experimental Cell Research*.

Publication 3 :

Melchior, A., Denys, A., Deligny, A., Mazurier, J. & Allain, F. 2008, Cyclophilin B induces integrin-mediated cell adhesion by a mechanism involving CD98-dependent activation of protein kinase C-delta and p44/42 mitogen-activated protein kinases, *Exp Cell Res*, **314**, 616-628.

PUBLICATION 3

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

Cyclophilin B induces integrin-mediated cell adhesion by a mechanism involving CD98-dependent activation of protein kinase C- δ and p44/42 mitogen-activated protein kinases

Aurélie Melchior, Agnès Denys, Audrey Deligny, Joël Mazurier, Fabrice Allain*

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche No. 8576 du CNRS, Institut de Recherche Fédératif No. 147, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 3 July 2007

Revised version received

8 November 2007

Accepted 8 November 2007

Available online 17 November 2007

Keywords:

Cyclophilin B

CD147

CD98

 β 1 integrinProtein kinase C- δ

MAPK

ABSTRACT

Initially identified as a cyclosporin-A binding protein, cyclophilin B (CyPB) is an inflammatory mediator that induces adhesion of T lymphocytes to fibronectin, by a mechanism dependent on CD147 and α 4 β 1 integrins. Recent findings have suggested that another cell membrane protein, CD98, may cooperate with CD147 to regulate β 1 integrin functions. Based on these functional relationships, we examined the contribution of CD98 in the pro-adhesive activity of CyPB, by utilizing the responsive promonocyte cell line THP-1. We demonstrated that cross-linking CD98 with CD98-AHN-18 antibody mimicked the responses induced by CyPB, i.e. homotypic aggregation, integrin-mediated adhesion to fibronectin and activation of p44/42 MAPK. Consistent with previous data, immunoprecipitation confirmed the existence of a heterocomplex wherein CD147, CD98 and β 1 integrins were associated. We then demonstrated that CyPB-induced cell adhesion and p44/42 MAPK activation were dependent on the participation of phosphoinositide 3-kinase and subsequent activation of protein kinase C- δ . Finally, silencing the expression of CD98 by RNA interference potently reduced CyPB-induced cell responses, thus confirming the role of CD98 in the pro-adhesive activity of CyPB. Altogether, our results support a model whereby CyPB induces integrin-mediated adhesion via interaction with a multimolecular unit formed by the association between CD147, CD98 and β 1 integrins.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

First identified as the main binding proteins for cyclosporin A (CsA), cyclophilins are ubiquitously distributed peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (PPIase), for which most of the studies concerning their biology have focused on their intracellular functions [1,2]. However, accumulating data have indicated a key role for secreted cyclophilins A (CyPA) and B (CyPB) as regulators of inflammation. The expression of these proteins is increased as a response to inflammatory stimuli and oxidative

stress [3–7]. Both CyPA and CyPB trigger chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and T lymphocytes, supporting the hypothesis that they may contribute to the guidance of leukocyte populations to inflammatory sites [3,6–10]. We and others have demonstrated that the activities of secreted CyPA and CyPB are related to interactions with CD147 [9–11]. By using site-directed mutants of CD147, Yurchenko *et al.* [12] demonstrated that a proline residue located in an exposed loop of CD147 was crucial for CyPA to induce cell chemotaxis. Consistent with these findings, we also demonstrated that the central

* Corresponding author. Fax: +33 3 20 43 65 55.

E-mail address: fabrice.allain@univ-lille1.fr (F. Allain).

core of CyPB, which contains CsA binding domain and catalytic site, is required for efficient binding to T lymphocytes. Moreover, a PPIase defective mutant was found unable to trigger p44/42 mitogen-activated protein kinases (MAPK) activation and subsequent integrin-mediated adhesion of T cells to fibronectin [13,14]. These data suggest that CyPA and CyPB trigger common biological responses by a mechanism that involves prolyl isomerization of CD147, making this protein as an essential component of the membrane receptor of extracellular cyclophilins.

CD147 is a 50–60 kDa-type I transmembrane protein also known as extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) or basigin. CD147 is broadly expressed on human peripheral blood cells, endothelial cells and cultured cells, and is involved in reproduction, neural function, inflammation, tumour invasion and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection, functioning either as a signal transmitting molecule or directly as a regulator of adhesion. CD147 was proven to be responsible for the induction of expression of several matrix metalloproteinases [15,16], and to enable insertion of monocarboxylate transporters (MCT)-1 and -4 in the membrane, which facilitates import and/or export of lactate and pyruvate [17]. In addition to these functions, accumulating data have suggested that CD147 may interact with integrins. Antibodies to CD147 were reported to modulate homotypic cell aggregation [18,19] and CD147 was found to co-immunoprecipitate with $\beta 1$ integrins and to colocalize with these integrins in the areas of cell-cell contacts [20].

Although it is not clear yet as how these molecules share their roles in cell adhesion, recent findings suggest that another cell surface protein, CD98, may functionally cooperate with CD147 to regulate $\beta 1$ integrin functions [19]. Consistent with these findings, combination of covalent cross-linking, mass spectrometric protein identification and co-immunoprecipitation experiments revealed the existence of a cell surface multimeric complex, where CD147 and CD98 association plays a central organizing role [17]. CD98, also known as 4F2, is an 85 kDa-type II integral membrane protein initially characterized as a T cell activation marker [21]. It has been subsequently found covalently linked to one of at least six alternative 40 kDa-light chains, four of which have been identified as members of heterodimeric amino acid transporter family (HAT). The function of amino acid transporters is determined by the light chain, while the heavy chain is required for the functional cell surface expression and localization of the HAT complex [22,23]. As CD147, a striking feature of CD98 is the large diversity of functions in which it has been implicated, e.g. haematopoietic cell differentiation and functions, cell growth and fusion, and virus infection. As examples, CD98 has been reported to regulate osteoclast differentiation and T-lymphocyte stimulation [24,25]. The ability of antigen-presenting cells to deliver co-stimulatory signals to T lymphocytes could be blocked by antibodies to CD98 [26]. Antibodies against CD98 also inhibit the formation of cell syncytia by HIV and other viruses [27,28]. RNA interference-induced reduction in CD98 expression suppresses cell fusion of human placental cells [29]. In addition to these activities, CD98 appears to play a key role in the regulation of integrin functions. The first data came from studies showing that CD98 enhanced integrin-dependent cell aggregation and fusion [19,30]. Physical interaction between CD98 and $\beta 1$ integrins have been then demonstrated [31,32] and CD98 was reported to co-immunoprecipitate with $\beta 1$ integrins in a number of different cell lines [33–35] and peripheral blood

T lymphocytes [36]. Furthermore, evidence from a number of studies supports a model where CD98 regulates $\beta 1$ integrin affinity, because cross-linking of CD98 with antibody leads directly to the activation of $\beta 1$ integrins [25,35–37].

Based on the functional relationships between CD147, CD98 and $\beta 1$ integrins, we thought the idea that CD98 might coordinate the responses triggered by CyPB and regulate integrin-mediated adhesion of responsive cells. In this study, we have thus examined the contribution of CD98 in CyPB-induced cell adhesion to fibronectin. To this end, we have used the responsive THP-1 promonocytic cell line [14]. Consistent with the previously published data, we first confirmed that CD147, CD98 and $\beta 1$ integrins are associated within a functional multimolecular unit. Then, we demonstrated that the pro-adhesive activity of CyPB is dependent on the activation of protein kinase C- δ (PKC δ), a mechanism in which CD98 plays a pivotal role.

Materials and methods

Antibodies and reagents

Recombinant human CyPB was produced and purified as described [38]. CyPB was detoxified on Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel (Pierce Chemicals, Rockford, IL, U.S.A). The endotoxin content of the preparation was less than 0.09 E.U./ μ g, as determined by the chromogenic *Limulus* lysate assay (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA). Human fibronectin was a gift from Dr. P. Delannoy (University of Lille, France). Mouse monoclonal antibodies to CD147 (clone HIM6), to $\beta 1$ integrin (clone 18) and to PKC δ (clone 14) were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). Mouse monoclonal antibodies to CD147 (clone MEM-M6/1), to CD98 (clone 4F2), to the phosphorylated forms of ERK1/2 (p44/42 MAPK) (E-4) and goat polyclonal antibodies to CD98 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Mouse monoclonal antibody to human CD14 (My4) and rabbit polyclonal anti-phospho-PKC δ (Ser643) were from Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) and Cell Signaling (Beverly, MA, USA), respectively. Mouse monoclonal antibodies to CD98 (clone AHN-18) and to $\beta 1$ integrins (clone MAB2253) were from Chemicon International (Temecula, CA, USA). These antibodies were recommended as inducer of cell homotypic aggregation and efficient agent of immunoprecipitation, respectively. The blocking monoclonal mouse antibodies to integrin subunits (anti- $\alpha 2$, - $\alpha 4$, - $\alpha 5$, - $\beta 1$, - $\beta 2$) were from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Rabbit polyclonal anti-ERK1/2, mouse monoclonal anti-CD44 (clone A3D8), fluorescein-conjugated antibodies to mouse and goat IgG, horseradish peroxidase-conjugated anti-goat IgG, and isotype-matched control antibodies were from Sigma Chemicals Co (St Louis, MO, USA). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG antibodies were from Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont Buckinghamshire, UK). PD98059, rottlerin and 1,25-dihydroxy-vitamine D3 were from Calbiochem (La Jolla, CA, USA), and wortmannin from Alexis Corp. (San Diego, CA, USA). The thiol cleavable cross-linker 3, 3'-dithiobis[sulfosuccinimidylpropionate] (DTSSP) was from Pierce. Cell culture products were from Cambrex (Walkersville, MA, USA). Oligonucleotide PCR primers and siRNA duplexes were synthesized and purified

by Eurogentec (Seraing, Belgium). All other chemicals, except where otherwise mentioned, were purchased from Sigma.

Cell culture

Human promonocytic leukemia THP-1 cells (88081201; ECACC, Porton Down, Salisbury, UK) were routinely cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 20 μ M β -mercaptoethanol and 10 mM gentamycin in 5% CO₂ enriched atmosphere at 37 °C. To induce responsiveness to CyPB, THP-1 cells were differentiated for 72 h with 50 nM 1,25-dihydroxy-vitamine D3 [14]. Analyzing CD14 expression by flow cytofluorimetry checked efficacy of the treatment. This protocol resulted in over 90% differentiation and a viability >95% in all studies.

Flow cytofluorimetry analysis

Analysis was performed by incubating THP-1 cells (5×10^5 cells per sample) in Dulbecco's phosphate buffered saline containing 0.5% bovine serum albumin (DPBS/BSA), supplemented with the appropriate monoclonal antibodies or the respective isotype-matched control IgG for 1 h at 4 °C. After washing, secondary fluorescein-conjugated antibodies (1/64) was added for another 1 h. Cells were washed twice and immediately used for analysis. Data were monitored on a Becton Dickinson flow cytofluorimeter (FACScalibur) (Mountain View, CA, USA) and analyzed with CellQuest software. Results are expressed as variations of fluorescence mean values (Δ FMV%).

Western blot analysis

Cells (10^6 per sample) were washed in cold PBS and lysed in 70 μ L of 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 350 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 (v/v), 20% glycerol (v/v), 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche, Meylan, France) for 3 h at 4 °C. The lysates were clarified by centrifugation at 10,000 g for 30 min at 4 °C and thereafter used for immunoblotting analysis. Proteins were separated on 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher & Schull, Dassel, Germany). The blots were blocked for 1 h at room temperature in 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Tween-20 (v/v), pH 7.6 (TBS-Tween), supplemented with 3% BSA. Membranes were then incubated for 2 h at room temperature with the appropriate primary antibodies in TBS-Tween supplemented with 1% BSA. After extensive washing with TBS-Tween, the immunoblotted proteins were visualized with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1 h-incubation, 1/5000) by using a chemiluminescence detection kit (ECL) (Amersham).

Immunoprecipitation

THP-1 cells (10×10^6) were lysed in 1 mL buffer consisting of 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1% CHAPS (w/v) and protease inhibitor cocktail, for 3 h at 4 °C. After centrifugation at 10,000 g for 30 min, the supernatants were clarified by incubation with protein G-Plus Sepharose (Santa Cruz) and thereafter used for co-immuno-

precipitation. To this end, lysates were incubated in the presence of 4 μ g of appropriate antibodies (β 1 integrin-MAB2253, CD147-MEM-M6/1, CD98-4F2, CD44-A3D8) overnight at 4 °C. Protein G-Plus Sepharose was then added and the mixture was incubated for 3 h at 4 °C. Beads were extensively washed with lysis buffer, and bound proteins were eluted by boiling the beads in 100 μ L of SDS-PAGE sample buffer under reducing conditions. Proteins were then separated on a SDS gel and processed as indicated above.

Gel filtration of cell lysates

To investigate clustering of CD147 and associated proteins, 2×10^7 THP-1 cells were stimulated or not with CyPB for 30 min at 37 °C. After three washes with DPBS, cross-linker DTSSP was added to a final concentration of 2 mM in DPBS and cells were incubated for 2 h at 4 °C, before termination with 25 mM glycine, pH 7.5. THP-1 cells were then solubilized in ice-cold 20 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 7.4, containing 1% Triton X-100 (w/v) and protease inhibitor cocktail, for 3 h at 4 °C. Insoluble materials were removed by centrifugation at 3,000 g for 5 min and the supernatant was fractionated by gel filtration on a 2.5 mL-column of Sepharose 4B (Amersham Pharmacia). Fractions of 150 μ L were analyzed by SDS-PAGE under reducing condition followed by immunostaining as indicated above. The column was calibrated by size standards; the void volume corresponded to fractions 5-7, IgM ($\sim 10^3$ kDa) and IgG (150 kDa) were mainly recovered in fractions 10 and 13, respectively.

Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from 3×10^6 cells using a NucleoSpin RNA II kit, according to the instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel, Hœrdt, France). Reverse transcription was performed from 2 μ g of total RNA with an oligo-dT primer and M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). PCR amplification was performed in a final volume of 25 μ L containing 2 μ L of first-strand cDNA, 0.625 U of GoTAQ Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 5 μ L of GoTAQ buffer (5 X), 0.5 μ L of deoxy-NTP (10 mM) and 0.125 μ L of primers (150 μ M). The housekeeping gene GAPDH was amplified in each sample to normalize for total mRNA input and confirm efficiency of complementary DNA synthesis. The amplification products were separated by electrophoresis in 2% agarose gel containing ethidium bromide and analyzed. Images were acquired with the Gel Doc 2000 Image analysis apparatus and analyzed with the supplied software Quantity-One (Bio-Rad). The sequence of amplified product was confirmed by sequencing (Genoscreen, Lille, France).

RNA interference

Synthetic siRNA duplexes with symmetric 3'-deoxythymidine overhangs were used to carry out RNA interference. A synthetic siRNA duplex (si-CD98), corresponding to the CD98 mRNA sequence 5'-UCU GAA GGA UGC AUC CUC A(TT)- 3' (nucleotides 1222-1240 of human CD98 sequence, NM_002394), was used to inhibit CD98 mRNA expression [29]. The oligonucleotide sequence was subjected to a BLAST search analysis and no significant identity to others sequences could be

detected. To check the specificity of the RNA interference, a siRNA duplex (siGFP) corresponding to GFP (Green fluorescent protein) was used as a negative control: 5'-GAA CGG CAU CAA GGU GAA C(TT)- 3'. THP-1 cells were transfected with 2 µg of siRNA duplexes in serum-free medium using a Nucleofector device and corresponding kits (Amaxa Inc., Cologne, Germany), according to the manufacturer's instructions. To monitor the transfection efficacy, a fluorescein-tagged siRNA duplex was used in parallel, and the transfection rate was evaluated by FACS and found >85%. The cell responsiveness to CyPB was analyzed 72 h post-transfection.

Homotypic cell aggregation assay

Quantitative cell aggregation assay was performed essentially as described previously by Cho et al. [19]. Briefly, 100 µL of RPMI 1640 medium containing THP-1 cells (10^6 cells/mL) were placed in flat-bottom wells of a 96-microwell plate. An equal volume of medium with or without different concentrations of CyPB or antibody CD98-AHN-18 (2 µg/mL) was added, and the cells were incubated at 37 °C for 6 h or 18 h. Cells were then resuspended gently so as not to break the clusters, and the numbers of non-aggregated cells were counted in a haemocytometer. **Percentage** of cells in aggregates was determined by the following equation: % of cells in aggregates = [(total cells – free cells)/total cells] × 100. Relative levels of aggregation were determined visually in making images of cells in culture by means of an inverted phase contrast microscope attached to a camera Pentax Z-70 (magnification × 200).

Cell adhesion assay

Adhesion assay was performed in 96-well microtiter plates coated with fibronectin (1 µg per well), as described [10]. Plates were washed extensively with DPBS, and non-specific binding sites were blocked by the addition of 0.5% BSA (w/v) in DPBS for 30 min at 37 °C. THP-1 cells (7.5×10^6 per mL) were pre-incubated in DPBS/BSA with CyPB or CD98-AHN-18 antibody for 10 min at 37 °C and the mixture was then distributed into the wells (100 µL) for additional 20 min incubation at 37 °C. Thereafter, the plates were extensively washed with DPBS to remove non-adherent cells, and the remaining firmly attached cells were fixed with 3% formaldehyde, stained with 1% methylene blue and lysed with HCl 0.1 N. The absorbance was measured at 590 nm with a microplate BioRad reader Model 550 (Hercules, CA, USA). Cell adhesion was estimated by using standard curves where absorbances were related to cell numbers, and results were expressed as a percentage of the initially added cells remaining fixed to the substrate. In some experiments, cells were either pre-treated for 1 h at 37 °C with metabolic inhibitors or pre-incubated for 1 h at 20 °C in the presence of antibodies to CD147 (10 µg/mL), and thereafter used for adhesion assays as described above. Neutralizing antibodies were checked for their inability to induce cell responses in the absence of any stimulatory agents.

Statistical Analysis

Results of cell aggregation and cell adhesion assays are expressed as mean values ±SD, and were obtained from 3 to 6

replicates culture. Statistical significance for unpaired observation between control and experimental samples was evaluated by Student's *t*-test, with a threshold of $P < 0.05$. In all cases, each individual experiment was repeated at least 3 times.

Results

CyPB and CD98-AHN-18 induce THP-1 cell homotypic aggregation

The antibody CD98-AHN-18 was previously demonstrated to be a potent inducer of homotypic aggregation of promonocytic U937 cells [19]. We then tested the ability of this antibody to induce a similar response in THP-1 cells. As expected, CD98-AHN-18 induced formation of large clusters, which could be observed from 6 h of incubation and was maximal at 18 h (Fig. 1A). As already reported by others, the effect of CD98-AHN-18 was optimal at 2 µg/mL, and increase in the concentration of antibody above this value resulted in a lesser level of aggregation. Moreover, the effect was not due simply to the binding of antibody to the cell surface, since antibody to CD44, another adhesion molecule present on the surface of THP-1 cells, did not induce aggregation (data not shown). CyPB was then tested for its ability to induce similar aggregation. Incubation of THP-1 cells in the presence of 50 nM of CyPB resulted in homotypic aggregation, thus mimicking the effect of CD98-AHN-18. Clustering could be observed from 6 h, although the aggregates were larger and more compact following 18 h of incubation (Fig. 1A). We then analyzed the dose-dependent responses of CyPB by using a quantitative cell aggregation assay. Although large aggregates could not be visualized by means of microscope analysis, a 40% cell aggregation could be measured in the absence of CyPB. Formation of small aggregates might be due to spontaneous adhesion and/or clustering of THP-1 cells in culture. We then reproduced the experiments in the presence of increasing concentrations of CyPB for 6 h or 18 h of incubation. In both cases, stimulation with CyPB similarly resulted in an increase in cell aggregation. The effect was significant from 10 nM and reached a plateau thereafter, which corresponded to a 2-fold increase in cell aggregation by comparison with unstimulated THP-1 (Fig. 1B). Altogether, these results demonstrate that CyPB functions as CD98-AHN-18 antibody in the induction of homotypic aggregation, suggesting a convergence between CyPB and CD98.

CyPB and CD98-AHN-18 induce THP-1 cell adhesion to fibronectin

In precedent experiments, we reported that CyPB induces adhesion of peripheral blood T lymphocytes by a mechanism dependent on the activation of $\alpha 4\beta 1$ integrins [10]. We thus checked here whether CyPB induces a similar response in THP-1 cells. In the absence of CyPB, the adhesion of THP-1 cells to fibronectin was estimated at around 20% of initially added cells, which corroborated with the ability of these cells to spontaneously form aggregates. When the experiments were reproduced in the presence of increasing concentrations of CyPB, a significant increase in cell adhesion could be observed. The optimal concentration of CyPB was estimated at around 30 nM, reflecting an almost 3-fold increase in cell adhesion

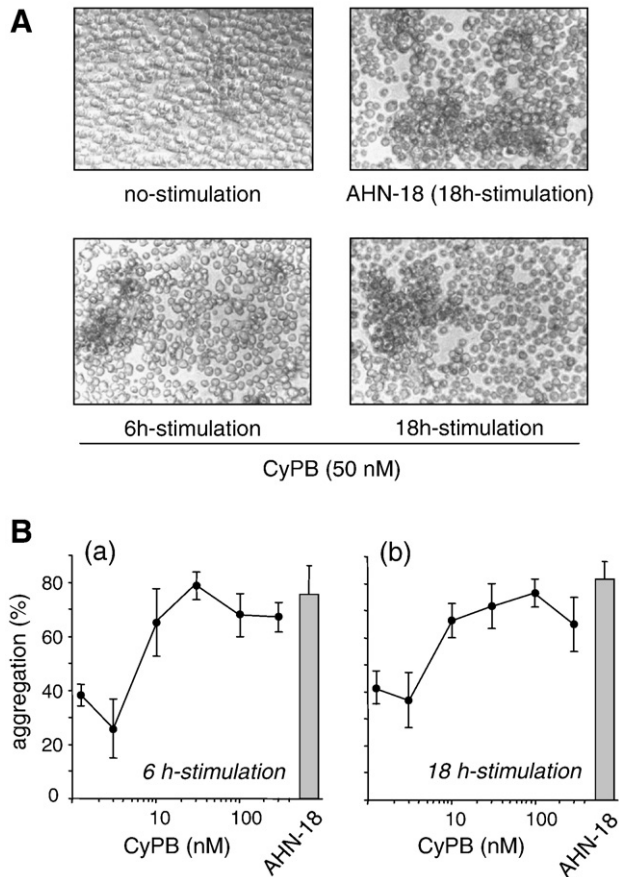


Fig. 1 – Effect of CyPB and CD98-AHN-18 antibody on homotypic aggregation of THP-1 cells. (A) Differentiated THP-1 cells were incubated in the presence of CD98-AHN-18 antibody (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or CyPB at the concentration of 50 nM for the indicated times. Images of cells in culture at these time points were obtained by means of an inverted phase contrast microscope (original magnification, $\times 200$). Results show aggregation from triplicate culture and are representative from at least three separate experiments. (B) Dose dependency of aggregation was analyzed by incubating THP-1 cells in the presence of increasing concentrations of CyPB for 6 h (a) and 18 h (b). In both cases, cell aggregation induced by CD98-AHN-18 at 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was also shown. Aggregation was measured as described in “Materials & Methods”. Points are means \pm SD of triplicate determination and are representative of three separate experiments.

compared with control (Fig. 2A). We then reproduced the experiments in the presence of blocking antibodies to integrin subunits. Cell adhesion could be only inhibited in the presence of anti- $\alpha 4$ and anti- $\beta 1$ subunit antibodies, confirming the involvement of $\alpha 4\beta 1$ integrins in the pro-adhesive activity of CyPB (Fig. 2B). Moreover, the full inhibition obtained with either anti- $\alpha 4$ or anti- $\beta 1$ antibodies indicate that adhesion molecules other than $\alpha 4\beta 1$ integrins were not involved in the adhesive process induced by CyPB. Interestingly, Miyamoto *et al.* [36] demonstrated that the same integrin heterodimer was involved in the responses induced by CD98 cross-linking. Consistent with these observations, we demonstrated here

that integrin activation by CD98-AHN-18 antibody led to an increase in THP-1 cell adhesion to fibronectin, which was quite similar to the response triggered by CyPB (Fig. 2C).

Activation of p44/42 MAPK is associated with CyPB- and CD98-AHN-18-induced cell adhesion

CyPB and CD98-AHN-18 antibody were both reported to activate p44/42 MAPK signalling pathway in various cell types [9,14,39]. We then analyzed the phosphorylation status of

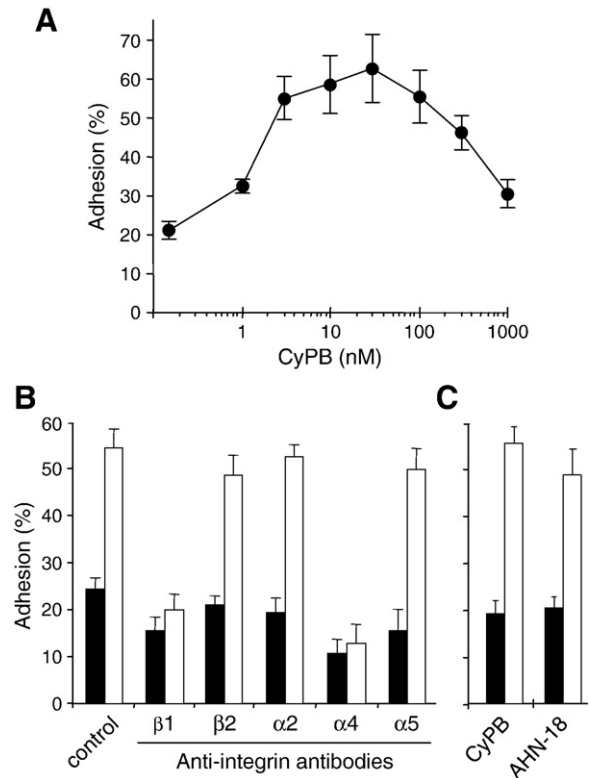


Fig. 2 – Effect of CyPB and CD98-AHN-18 antibody on the adhesion of THP-1 cells to fibronectin. (A) Differentiated THP-1 cells were pre-incubated in the absence or presence of increasing concentrations of CyPB for 20 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, and thereafter allowed to adhere into fibronectin-coated wells. Points are means \pm SD of triplicate determination for an individual experiment. Results are expressed as percentages of initially added cells (0.75×10^6 per well) remaining associated to the coated well, and are representative of three separate experiments. (B) Following pre-treatment or not in the presence of antibody to integrin subunits, THP-1 cells were either untreated (filled bar) or treated with 50 nM CyPB (open bar) and used for adhesion assay. (C) THP-1 were stimulated (open bar) or not (filled bar) in the presence of either CyPB (50 nM) or CD98-AHN-18 antibody (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and thereafter used for analysis of cell adhesion to fibronectin. Each bar of histograms represents the mean \pm SD of triplicate determination of an individual experiment. Data are representative of at least three separate experiments conducted with distinct preparations of differentiated THP-1 cells.

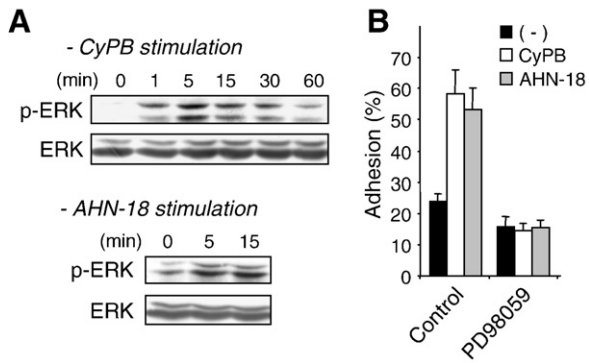


Fig. 3 – Involvement of p44/42 MAPK in CyPB- and CD98-AHN-18 antibody-induced adhesion of THP-1 cells. (A) Differentiated THP-1 cells were stimulated or not in the presence of either CyPB (50 nM) or CD98-AHN-18 antibody (2 μ g/mL), and the activation of p44/42 MAPK was analyzed by using antibodies to phosphorylated ERK1/2 (p-ERK). Parallel immunoblotting with anti-total ERKs confirmed equal loading of samples. **(B)** Following pre-treatment or not in the presence of PD98059 (50 μ M), THP-1 cells were incubated in the absence (filled bar) or the presence of CyPB (50 nM) (open bar) or CD98-AHN-18 antibody (2 μ g/mL) (grey bar), and then allowed to adhere into fibronectin-coated wells. Results of adhesion assays are expressed as percentages of initially added cells (0.75×10^6 per well) remaining associated to the coated well. Each bar of histograms represents the mean \pm SD of triplicate determination of an individual experiment. Data are representative of at least three separate experiments.

ERK1/2 in THP-1 cells stimulated in the presence of either 50 nM CyPB or 2 μ g/mL CD98-AHN-18. As expected, a significant increase in the level of phosphorylated ERKs was observed after stimulation of THP-1 cells. The amount of total ERKs was not changed, confirming that CyPB or anti-CD98 antibody only induced the phosphorylation and activation of the pre-existing proteins (Fig. 3A). Time course analysis demonstrated that ERK phosphorylation reached a maximum at 5 min after stimulation. We previously determined that fully enhanced adhesion was obtained at 20 min of incubation, indicating that ERK phosphorylation occurred before integrin activation. Therefore, time-dependent responses for activating ERK phosphorylation paralleled those observed for inducing cell adhesion. To check whether both events are related, THP-1 cells were pre-treated with PD98059, a specific inhibitor of p44/42 MAPK pathway activation, and thereafter used for adhesion assays. As expected, the pro-adhesive activity of CyPB and of CD98-AHN-18 antibody was potently inhibited, confirming the involvement of ERK activation in this process (Fig. 3B).

CD147 is required to promote cell responses induced by CyPB and CD98-AHN-18

CD147 was previously demonstrated to act as a signalling receptor for CyPB [9,10]. We then analyzed whether it is similarly involved in the responses induced by CyPB and CD98-AHN-18 in THP-1 cells. As expected, pre-treatment of cells with anti-CD147

antibody (CD147-HIM6), but not isotype-matched control antibodies, dramatically reduced both CyPB-induced phosphorylation of ERK1/2 and subsequent adhesion of THP-1 cells to fibronectin. To a similar extent, the responses induced by CD98-AHN-18 were potently inhibited following pre-treatment with anti-CD147 antibody (Fig. 4). These data suggest that CyPB binding or CD98 cross-linking resulted in the activation of the same signalling intermediates by a mechanism involving functional participation of CD147. Although CD98 has not been reported as a binding protein for CyPB, a possibility remains that CyPB may interact with a sequence that overlaps the epitope recognized by CD98-AHN-18, thus explaining the common responses induced by CyPB and anti-CD98 antibody. However, direct interaction between CyPB and CD98 is unlikely, since saturation of CyPB binding sites with high concentration of the protein did not reduce the binding of CD98-AHN-18 to THP-1 cells, and in the reverse experiments, pre-treatment of cells with

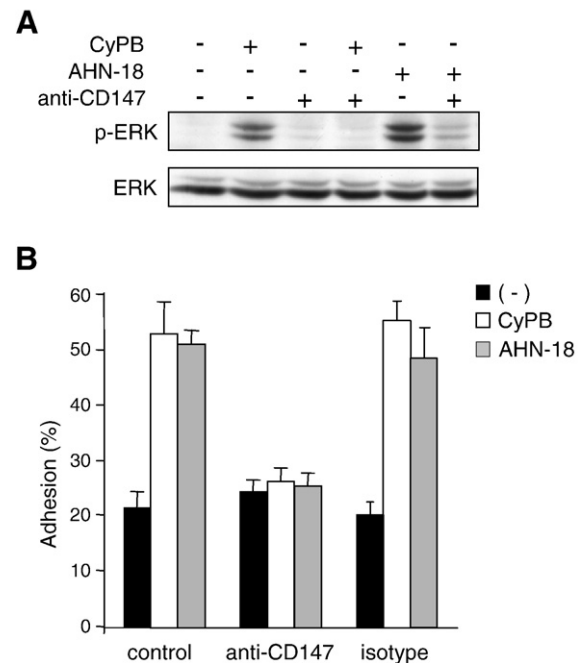


Fig. 4 – Implication of CD147 in the responses induced by CyPB and CD98-AHN-18 antibody. (A) Differentiated THP-1 cells were pre-incubated in the presence or absence of antibody to CD147, and the phosphorylation status of ERK1/2 was analyzed after a 5-min stimulation with CyPB at 50 nM or CD98-AHN-18 antibody at 2 μ g/mL. Parallel immunoblotting with anti-total ERKs confirmed equal loading of samples. **(B)** Following pre-incubation in the presence of anti-CD147 or isotype-matched control antibodies, THP-1 cells were either non stimulated (filled bar), or stimulated with 50 nM CyPB (open bar) or 2 μ g/mL CD98-AHN-18 antibody (grey bar), and then allowed to adhere into fibronectin-coated wells. Results of adhesion assay are expressed as percentages of initially added cells (0.75×10^6 per well) remaining associated to the coated well. Each bar of histograms represents the mean \pm SD of triplicate determination of an individual experiment. Data are representative of at least three separate experiments.

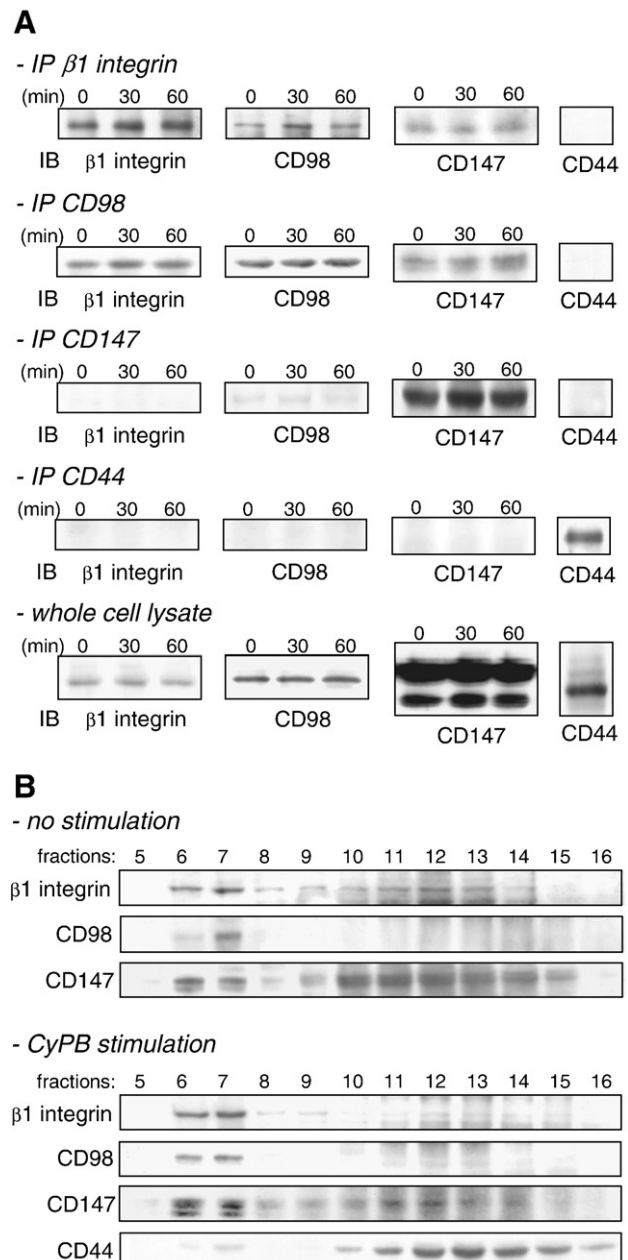
anti-CD98 antibody did not inhibit the surface binding of CyPB (data not shown).

CD147 is physically associated with CD98 and β 1 integrins

We tested the possibility that CyPB may induce a physical association between CD147, CD98 and β 1 integrins. To this end, THP-1 cells were lysed with mild detergent, in order to avoid dissociation of heterocomplexes, and the cell lysates were used for co-immunoprecipitation experiments (Fig. 5A). As expected, anti- β 1 integrin antibody precipitated β 1 integrins from non-stimulated and CyPB-stimulated cells. Moreover, a physical association with CD98 and CD147 could be detected, as demonstrated by immunostaining with anti-CD147 and anti-CD98 antibodies from the same immunoprecipitated complexes. However, both the proteins could be co-precipitated with β 1 integrins in the absence of CyPB, suggesting the existence of a pre-formed heterocomplex. To a similar extent, anti-CD98 antibody was efficient to co-immunoprecipitate β 1 integrins and CD147 in non-stimulated and CyPB-stimulated cells. Although small increase in the intensities of immunostaining could be observed in the presence of CyPB, it was not significant enough to conclude that CyPB stimulation has induced clustering between β 1 integrins, CD98 and CD147. We have previously showed that CD147-HIM6 antibody inhibited the responses induced by CyPB, indicating that it probably destabilizes the heterocomplex. As expected, this antibody precipitated CD147 from mild-detergent lysates of THP-1 cells, but neither CD98 nor β 1 integrins could be immunostained with corresponding antibodies (data not shown). We then reproduced the same experiments with CD147-MEM-M6/1 antibody, which has been reported to be devoid of inhibitory activity [40]. Although this antibody was highly efficient to

precipitate CD147, the immune complex did contain only small fraction of CD98, as shown by the weak staining with corresponding antibody, and β 1 integrins could not be detected. Moreover, immunostaining of directly precipitated CD147 did not correlate with the amount of the same protein that was co-immunoprecipitated with CD98 or β 1 integrin antibodies, suggesting that only a small fraction of CD147 was recovered in the immune complexes. To confirm this hypothesis, we analyzed the relative levels of expression of CD147, CD98 and β 1 integrins in whole cell lysates. By comparison with CD98 and β 1 integrins, we found that CD147 was abundantly expressed on the cell membrane of THP-1 cells. As expected, the expression of CD98 and β 1 integrins appeared related to the amounts of the same proteins that have been reciprocally co-precipitated. In contrast, the expression of CD147 did not correlate with the amount of the protein that was recovered following co-immunoprecipitation with CD98 or β 1 integrins.

Fig. 5 – Association of CD147 with CD98 and β 1 integrins. (A) Differentiated THP-1 cells were stimulated in presence of 50 nM CyPB for the indicated times. Following treatment with mild-detergent lysis buffer, equal amount of cell lysates (equivalent to 10×10^6 cells) were immunoprecipitated with anti- β 1 integrin (clone MAB2253), anti-CD98 (clone 4F2), anti-CD147 (clone MEM-M6/1) or anti-CD44 (clone A3D8) antibodies. The immunoprecipitates were separated by 10% SDS-PAGE and transblotted onto nitrocellulose. Membranes were subsequently immunostained with antibodies to β 1 integrins, CD98, CD147 or CD44. In parallel experiments, equal amount of proteins from whole cell lysates (equivalent to 10^6 cells per sample) were separated by SDS-PAGE, transblotted onto nitrocellulose, and β 1 integrins, CD98 and CD147 were immunostained with appropriate antibodies. (B) Non stimulated and CyPB-stimulated THP-1 cells were treated with the cross-linker DTSSP and thereafter lysed in the presence of 1% Triton X-100. Lysates were fractionated by Sepharose 4B gel filtration, and the fractions were analyzed by SDS-PAGE under reducing condition and Western blotting. Elution maxima of large complexes, IgM and IgG are recovered in fraction 6, 10 and 13, respectively. In both the co-immunoprecipitation and gel filtration experiments, only the relevant parts of the blots are shown. Results are representative of three individual experiments.



Taken together, these data indicate that only minor fraction of CD147 is closely associated to CD98 and $\beta 1$ integrins, and that CyPB probably induced activation and/or stabilization of this pre-existing heterocomplex. In parallel experiments, we used CD44 as a control to check the specificity of the antibodies used in our precipitation and staining experiments. As expected, CD44 could not be detected in the immune complexes following precipitation with antibodies to CD147, CD98 or $\beta 1$ integrins, and in reverse experiments, these proteins were not immunostained following precipitation with anti-CD44 antibodies.

To firmly establish the existence of a pre-existing complex between CD147, CD98 and $\beta 1$ integrins, we used covalent cross-linking of cell surface proteins with DTSSP and gel filtration of cell lysates. Indeed, fractionation of multimolecular complexes by gel filtration was already used to visualize activation-dependent clustering of CD147 in T lymphocytes [40]. Following electrophoresis under reducing condition and staining with appropriate antibodies, we obtained an elution profile of immunoreactive proteins, for which elution maxima could be directly related to the expression of these proteins under uncomplexed forms and/or small oligomers (fractions 12–14), or to their association in intermediate or large multimolecular complexes (the last corresponding to fractions 6–7). In the absence of DTSSP, multimolecular complexes were almost completely disrupted, confirming the requirement of cross-linker in these experiments (data not shown). As shown in Fig. 5B, $\beta 1$ integrins were mainly detected in fractions 6–7 and 11–13 in non-stimulated THP-1 cells. In agreement with the known association of $\beta 1$ chains with α subunits, we assumed that the last fractions were likely to contain the heterodimeric forms of these integrins. In contrast, fractions 6–7 contained large multimolecular complexes, suggesting that a significant amount of $\beta 1$ integrins were clustered at the surface of non-stimulated THP-1 cells. Surprisingly, CD98 was only recovered in fractions 6–7, indicating that this protein was constitutively associated within large complexes. Although a significant amount of CD147 was found to colocalize with CD98, most of the protein was however detected in fractions 10–14. The last fractions contained proteins and protein complexes for which molecular weights varying from 150 to 10^3 kDa. Consistent with previously published data [16,40], our findings indicate that CD147 form oligomers of various sizes in non-stimulated THP-1 cells. Moreover, a plausible reason for the lack of detection of CD98 and $\beta 1$ integrins following precipitation with anti-CD147 antibody was that most of CD147 was not part of the CD98- and $\beta 1$ -integrin containing complexes. The same experiment was then reproduced with CyPB-stimulated THP-1 cells. Interestingly, we found that $\beta 1$ integrins were mainly recovered in fractions 6–7, indicating that CyPB has probably enhanced clustering of these molecules within large multimolecular complexes. As expected, CD98 was also detected in the same fractions. However, the findings that non-stimulated and CyPB-stimulated cells showed similar association of CD98 within large complexes may explain why we did not observe any significant increase in $\beta 1$ integrin or CD98 staining following co-immunoprecipitation experiments. Interestingly, we found that CyPB increased the association of CD147 within complexes similar in size to that containing CD98 and $\beta 1$ integrins. Nevertheless, a significant amount of CD147 remained in

fractions 11–14, indicating that CyPB did not mobilize all CD147-containing molecular species. Finally, we analyzed the elution profile of CD44. As expected, elution maximum was found in fraction 12–14, confirming that the presence of large multimolecular complexes was not due cell treatment with cross-linker. Altogether, these data support our previous findings of a pre-existing $\beta 1$ integrin-CD98-CD147 complex, for which CD98 may play a pivotal role in the assembly, and further indicate that CyPB probably acts by increasing the size and/or the stability of this multimolecular complex.

PKC δ activation is implicated in CyPB-induced cell responses

Cross-linking CD98 has been reported to activate PKC δ , which in turn activates p44/42 MAPK and induces cell aggregation [39]. We thus investigated the involvement of PKC δ in the

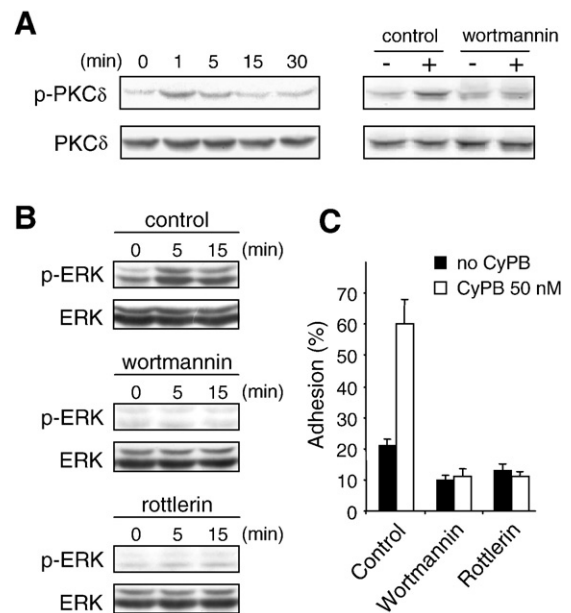


Fig. 6 – Activation of PKC δ in CyPB-stimulated THP-1 cells. (A) Left panel: differentiated THP-1 cells were stimulated or not in the presence of CyPB at 50 nM, and the rate of activation of PKC δ was analyzed by using antibodies to the phosphorylated form of PKC δ on Ser643. Parallel immunoblotting with anti-total PKC δ confirmed equal loading of samples. Right panel: following pre-treatment or not in the presence of wortmannin (50 μ M), THP-1 cells were incubated in the absence (-) or presence (+) of CyPB (50 nM), and the phosphorylation status of PKC δ was analyzed. (B) THP-1 cells were pre-treated or not with wortmannin (50 μ M) or rottlerin (10 μ M), and CyPB-induced activation of p44/42 MAPK was analyzed at the indicated times. (C) Following pre-treatment or not in the presence of wortmannin (50 μ M) or rottlerin (10 μ M), THP-1 cells were incubated in the absence (filled bar) or the presence of CyPB at 50 nM (open bar), and then allowed to adhere into fibronectin-coated wells. Each bar of histograms represents the mean \pm SD of triplicate determination of an individual experiment. Data are representative of at least three separate experiments.

responses induced by CyPB, using phosphorylation of Ser643 as an indicator of PKC activation [41]. The relative level of phosphorylated versus total PKC is shown in Fig. 6A. A small proportion of PKC δ was found phosphorylated even in the absence of CyPB, perhaps resulting from the involvement of this PKC isoform in other metabolic processes associated to the transformed phenotype of THP-1 cells. However, the addition of CyPB induced a transient increase in the phosphorylation of PKC δ , which was maximal in the first few minutes of stimulation and decreased slowly thereafter. Interestingly, PKC δ activation was reported to be a downstream signalling event following phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) activation [42], and CD98 cross-linking was demonstrated to activate PI3-K [35]. We thus analyzed the effect of wortmannin, which is a potent inhibitor of PI3-K, on CyPB-induced activation of PKC δ . As expected, pre-incubation of THP-1 cells with wortmannin

efficiently abolished the increase in PKC δ phosphorylation by comparison with control conducted with untreated cells (Fig. 6A).

We demonstrated above that CyPB- and CD98-AHN-18-induced adhesion of THP-1 cells is dependent on a mechanism whereby p44/42 MAPK activation is an essential signalling event. CyPB-induced ERK phosphorylation reached a maximum after 5 min of stimulation, while PKC δ phosphorylation occurred in the first minutes of activation. Therefore, PKC δ activation may be an early signalling event, which in turn mediates p44/42 MAPK activation. The relationships between PKC δ and p44/42 MAPK activation was thus investigated by analyzing the phosphorylation status of ERK1/2 in THP-1 cells treated in the presence of either wortmannin or rottlerin, the latter is a selective inhibitor of PKC δ activity. As shown in Fig. 6B, CyPB-initiated ERK phosphorylation was potentially reduced in the cells

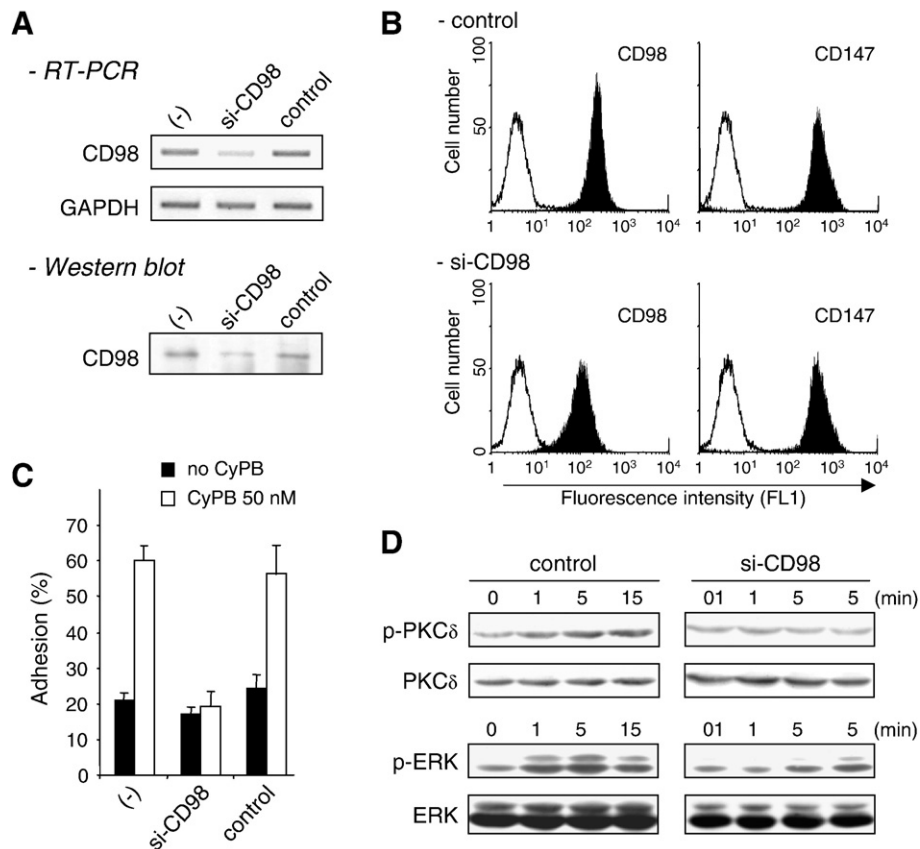


Fig. 7 – Inhibitory effect of RNA interference-induced reduction in CD98 expression on CyPB-induced cell responses. Differentiated THP-1 cells were either non-transfected (-) or transfected with siRNA that specifically target mRNA encoding either CD98 (si-CD98) or GFP (control). (A) The expression of mRNA encoding CD98 was analyzed by semi-quantitative RT-PCR 48 h post-transfection. GAPDH mRNA was also determined to normalize for input of total RNA. Following separation of the proteins of THP-1 cell lysates by SDS-PAGE, the expression of CD98 in non-transfected cells versus siRNA-transfected cells was analysed by Western blot 72 h post-transfection. (B) The expression of cell surface CD98 and CD147 was analyzed in THP-1 cells transfected with siRNA that target mRNA encoding either CD98 (si-CD98) or GFP (control) by flow cytometry. Cells were stained with specific monoclonal antibodies (filled histogram) or isotype-matched control antibody (open histogram). The results shown are representative of at least three separate experiments. (C) Adhesion of non transfected and siRNA-transfected THP-1 cells to fibronectin was analyzed 72 h post-transfection in the absence (filled bars) or presence of 50 nM CyPB (open bar). Each bar of histograms represents mean \pm SD of triplicate. (D) Transfected THP-1 cells (72 h post-transfection) were stimulated or not in the presence of 50 nM CyPB for various times and the activation of PKC δ and p44/42 MAPK was analyzed by using antibodies to phosphorylated forms of the kinases. Parallel immunoblotting with anti-total PKC δ and ERKs confirmed equal loading of samples. Representative results from 3 independent experiments are shown.

treated with both the inhibitors, indicating that CyPB induces p44/42 MAPK activation by a mechanism dependent on the upstream activation of PKC δ . We therefore investigated the relationships between PKC δ activation and cell adhesion of THP-1 cells. As expected, pre-treatment with either rottlerin or wortmannin potently reduced the capability of CyPB to trigger cell adhesion to fibronectin. Altogether, these data indicate that early signalling events initiated by CyPB binding to cell surface mimicked the responses induced by cross-linking CD98, further supporting the hypothesis that CD98 plays a pivotal role in CyPB-induced p44/42 MAPK activation and subsequent cell adhesion.

Silencing of CD98 expression inhibits the responses induced by CyPB

Finally, we used a RNA interference approach to further explore the involvement of CD98 in the responses triggered by CyPB. Transfection of THP-1 cells with siRNA that specifically targets CD98 (si-CD98) critically reduced the expression of the corresponding mRNA. By comparison with control cells transfected with siRNA that targets GFP, the down-expression of the mRNA encoding CD98 reached 60% 48 h post-transfection. Immunostaining of CD98 was similarly reduced in cell lysates from si-CD98-transfected cells, confirming the efficacy of RNA interference to reduce CD98 expression (Fig. 7A and B). Indeed, transfection of cells with CD98 siRNA reduced the cell surface immunostaining with anti-CD98 antibodies by around 50%, by comparison with cells transfected with irrelevant siRNA (Δ FMV = $1200 \pm 130\%$ versus $660 \pm 50\%$, respectively). Cell immunostaining of CD147 (Fig. 7B) was not significantly modified in transfected cells (Δ FMV = $2710 \pm 280\%$ versus $2940 \pm 240\%$, respectively), indicating that silencing of CD98 had no inhibitory effect on the expression of this protein at the cell membrane. As expected, such a reduction in the expression of CD98 resulted in a strong inhibition of CyPB-induced cell adhesion to fibronectin (Fig. 7C). When analyzing the intracellular events initiated by CyPB, we found that silencing of CD98 potently reduced phosphorylation of PKC δ and ERK1/2 (Fig. 7D), which correlated with the inability of CyPB to induce cell adhesion. Altogether, these data further demonstrated that CD98 is a key element in the transduction signals that control the pro-adhesive activity of CyPB.

Discussion

CD98 cross-linking on the cell surface was reported to induce cell aggregation by a mechanism dependent on the participation of CD147 and β 1 integrins [19]. Moreover, CD147 was identified as a member of the CD98 functional unit, suggesting the existence of a cell surface multimeric heterocomplex, where CD147, CD98 and β 1 integrins may be associated [17]. In previous works, we demonstrated that CyPB induces adhesion of peripheral blood T lymphocytes, by a mechanism dependent on the interaction with CD147 and the activation of α 4 β 1 integrins [10]. Interestingly, CD98 was found to co-immunoprecipitate with α 4 β 1 integrins in peripheral blood T lymphocytes [36]. However, the role of CD98 in the responses triggered by CyPB had not yet been investigated, perhaps because of CD98 diversity and

ubiquity. In the current issue, we showed that CyPB-induced adhesion of THP-1 cells is also dependent on the interaction with CD147 and activation of α 4 β 1 integrins. We then demonstrated that cross-linking CD98 with CD98-AHN-18 mimicked the responses induced by CyPB, while reducing the expression of CD98 by RNA interference rendered the cells non-responsive to the pro-adhesive factor. Altogether, these data suggest that CD98 may play a pivotal role in the responses induced by CyPB.

One central question in the biology of CD98 was to understand the nature of its interactions with integrins at the cell surface. The physical interaction between CD98 and β 1 integrins was first evaluated by analyzing either the binding of endogenous CD98 to genetically engineered regions of β 1 integrins in affinity chromatography, or by utilizing a model of CHO cells expressing various genetic constructs of β 1 integrins and CD98 domains. These experiments demonstrated that the transmembrane and cytoplasmic domains of CD98 were implicated in mediating the interaction with β 1 cytoplasmic tail, while the extracellular domain of CD98 is important for amino acid transport function [31,32]. However, accumulating data were consistent with a model whereby CD98 might be implicated in the regulation of β 1 integrin affinity, suggesting that the association between CD98 and β 1 integrins may not rely on proximity alone but involve conformational changes and/or signalling events [19,25,36,37]. These observations were first confirmed by examination of CD98-induced signalling. CD98 cross-linking by CD98-AHN-18 induced membrane translocation of PKC δ , but not other PKC isoforms, and phosphorylation of p44/42 MAPK. Activation of these signalling molecules could be the mechanism by which CD98 functionally interacts with β 1 integrins, because CD98-induced cell aggregation was inhibited in the presence of PD98059 and rottlerin [39]. Utilization of chimeric or truncation mutants of CD98 further demonstrated that both the transmembrane and the proximal part of the cytoplasmic domain of CD98 were required to enhance integrin affinity. PI3-K activation was then suggested to be the early mechanism by which CD98 interacts with β 1 integrin tail, resulting in enhancement in integrin functions [43]. Consistent with the abundant literature implicating CD98 in integrin functions, our results confirm and support the idea that CD98 does not only physically interact with β 1 integrins, but also participates in the activation of signalling molecules, which in turn enhances integrin functions. First, we showed that PD98059 strongly inhibited integrin-mediated adhesion of THP-1 cells, confirming the role of p44/42 MAPK activation in the pro-adhesive activity of CyPB. We then demonstrated that CyPB-induced ERK phosphorylation and subsequent adhesion of THP-1 cells could be inhibited by rottlerin and wortmannin, indicating that p44/42 MAPK activation is a downstream event following PKC δ and PI3-K activation. Finally, we found that reduction in CD98 expression by siRNA suppressed CyPB-induced activation of PKC δ and p44/42 MAPK, while cross-linking CD98 by CD98-AHN-18 mimicked the signalling events triggered by CyPB.

The signalling pathway involved in the activation of ERK has been intensively studied, and the mechanism of activation by Ras has been analyzed in detail. However, accumulating data have suggested the involvement of PKC in the signalling pathway leading to p44/42 MAPK activation. Interestingly, PKC δ requirement appears to be agonist- and cell type-specific.

As example, fibroblast growth factor (FGF) activates p44/42 MAPK in neuronal cells by a mechanism dependent on PKC δ . Conversely, FGF-induced ERK phosphorylation was found independent on PKC δ in fibroblasts [44]. In other experiments, the use of knockout mutants and mutants with constitutive kinase activity demonstrated that the activation of PKC δ was sufficient to activate p44/42 MAPK by a mechanism independent of Ras [45]. Consistent with these data, our results suggest that PKC δ may be a pivotal element in the activation of p44/42 MAPK by CyPB. Activation and regulation of PKC δ can involve binding of diacylglycerol, serine/threonine and/or tyrosine phosphorylation, and interaction with scaffolding molecules that promote enzyme/substrate interaction [46]. However, CD98-dependent activation of PKC δ has been reported to be independent of diacylglycerol, and tyrosine phosphorylation would be involved in inhibition rather than activation of PKC δ [39]. Ser643 has been previously reported to be a site of autophosphorylation, which may play an important role in controlling enzymatic activity and biological function of PKC δ [41]. In the present paper, we demonstrated that CyPB induced phosphorylation of PKC δ on Ser643 and that such a phosphorylation could be inhibited by wortmannin. These findings indicate that PKC δ activation requires participation of an upstream signalling molecule implicating PI3-K activation. Therefore, autophosphorylation of PKC δ on Ser643 might be consequent upon a direct interaction with PI3-K. Another possible signalling intermediate may be 3-phosphoinositide dependent kinase 1 (PDK1). PDK1 indeed acts downstream of PI3-K and has been reported to interact with and activate members of the PKC family [42]. Additional studies into the signalling pathways from CD147/CD98 complex are required to further determine the mechanism of activation of PKC δ and the possible role of PDK1 as a signalling intermediate in CyPB-induced cell responses.

We demonstrated that CyPB did not directly interact with CD98, and did not induce any significant increase in the intensity of the complex formed by the association of CD147, CD98 and β 1 integrins. Anti-CD147 antibodies were reported to inhibit cell homotypic aggregation induced by CD98 cross-linking [19]. In our hands, CD147-HIM6 antibody also inhibited ERK phosphorylation and cell adhesion induced by either stimulation with CyPB or CD98-AHN-18, suggesting that inhibition was due to dissociation of CD147 from CD98-containing complexes. In support to this hypothesis, we found that immunoprecipitation with the same anti-CD147 antibody did not allow to co-precipitate CD98. Nevertheless, we also demonstrated that CD147-MEM-M6/1 antibody, which was reported to be devoid of inhibitory activity, was poorly efficient to co-precipitate CD98. An explanation for this discrepancy might be that only part of CD147 was required for integrin activation. Indeed, we found that a small fraction of CD147 was immunoprecipitated with anti- β 1 integrin and anti-CD98 antibodies. Moreover, covalent cross-linking of surface molecules and gel filtration of cell lysates demonstrated that most of CD147 molecules were not associated within complexes similar in size to that containing CD98 and β 1 integrins.

Reducing the expression of CD98 by RNA interference rendered the cells non-responsive to CyPB, without significant modifications in the level of expression of CD147. These results indicate that the expression of CD147 is unlikely to be

dependent on CD98 in THP-1 cells. Surprisingly, Xu & Hemler [17] reported that reduction of the expression of either CD147 or CD98 by siRNA reciprocally resulted in a loss of each other at the cell surface of polarized cells. However, only part of CD147 molecules might be associated to CD98 in non-polarized cells, explaining why silencing of CD98 did not significantly reduced CD147 expression. Another plausible explanation might be that down-regulation of CD98 expression was not sufficient to visualize an effect on CD147 expression. Indeed, silencing by RNA interference did not reduce the expression of CD98 by more than 50% in THP-1 cells. Although this down-regulation was efficient enough to inhibit cell responsiveness to CyPB, it was probably not sufficient to significantly reduce the density of CD147 molecules at the cell surface. Actually, CD147-CD98 complex have been reported to play a critical role in energy metabolism [17]. These data suggest that part of CD98-containing complexes might be involved in the regulation of cellular metabolism, independently of their role in the activation of β 1 integrins. Therefore, stronger inhibition of CD98 expression could alter cell viability, which may explain why we did not achieve to down-regulate CD98 by more than 50%.

Altogether, these results suggest that the responses induced by CyPB are dependent on the activation and/or stabilization of a pre-existing complex rather than assembly of a new heterocomplex. Actually, the close association between CD147 and CD98 may provide a mechanism whereby CD98 initiates signalling events as a consequence on the functional interaction with CyPB-activated CD147. We and others previously demonstrated that prolyl-isomerization of CD147 might be the mechanism by which cyclophilins induces cell responses. Defective PPIase cyclophilin mutants failed to activate p44/42 MAPK and to induce cell adhesion [13,14], and Pro¹⁸⁰ and Gly¹⁸¹ residues in the extracellular loop of CD147 were found to be critical for inducing signalling events [12]. Although no direct mechanistic evidence could be provided, we hypothesized for a model whereby CyPB-mediated prolyl-isomerization of CD147 may induce conformational changes within the polypeptidic chain of CD98, which in turn lead to the association with and subsequent activation of signalling molecules that enhance integrin-mediated functions.

Growing evidence has suggested a role for secreted CyPA and CyPB in inflammation and viral infection [3–11]. The up-regulation of CD147 expression in the synovial membrane was found to correlate with MMP overexpression, which plays an essential role in cartilage lesion development in rheumatoid arthritis [47]. High levels of CyPA within synovial fluids were found to directly correlate with the severity of rheumatoid arthritis [48], and anti-CD147 antibodies or CD147 antagonistic peptides were reported to efficiently block the migration of monocytes/macrophages to synovial fluids of the patients [49]. Moreover, blocking cyclophilin/CD147 interactions with anti-CD147 antibodies or non-immunosuppressive cyclosporin analogues was demonstrated to reduce inflammatory responses in mouse models of acute lung inflammation [6] and asthma [7]. On another hand, cyclophilin interaction with CD147 has been demonstrated to play a role in HIV-1 infection and to contribute to AIDS pathogenesis [11]. CD98 has been also implicated in the physiopathology of HIV-1 [50]. Actually, syncytium formation and subsequent cell fusion are potentially important mechanisms of virus-induced cytotoxic effects. Interestingly, CD98 was

reported to regulate virus-mediated cell fusion in a manner dependent on its association with CD147 [51]. Therefore, initial interaction with CD147 might promote attachment of the virus to target cells and contribute to the functional interaction with CD98, which in turn leads to cell activation and syncytium formation. With regards to the possible role of cyclophilins in the development and/or progression of inflammatory pathologies and viral infection, detailed analysis of the interaction of cyclophilins with CD147 and elucidation of the signalling pathways dependent on its close association with CD98 would then provide opportunity to develop therapeutic molecules capable of blocking pathogenic conditions that depend on CD147/CD98 association.

Acknowledgments

This investigation was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, by the Université des Sciences et Technologies de Lille, France, and by a grant from the Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) du Nord/Pas-de Calais.

REFERENCES

- [1] R.E. Handschumacher, M.W. Harding, J. Rice, R.J. Drugge, D.W. Speicher, Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A, *Science* 226 (1984) 544–547.
- [2] A. Galat, Peptidylprolyl *cis/trans* isomerases (immunophilins): biological diversity-targets-functions, *Curr. Top. Med. Chem.* 3 (2003) 1315–1347.
- [3] B. Sherry, N. Yarlett, A. Strupp, A. Cerami, Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992) 3511–3515.
- [4] I. Tegeder, A. Schumacher, S. John, H. Geiger, G. Geisslinger, H. Bang, K. Brune, Elevated serum cyclophilins levels in patients with severe sepsis, *J. Clin. Immunol.* 17 (1997) 380–386.
- [5] Z.G. Jin, M.G. Melaragno, D.F. Liao, C. Yan, J. Haendeler, Y.A. Suh, J.D. Lambeth, B.C. Berk, Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress, *Circ. Res.* 87 (2000) 789–796.
- [6] K. Arora, W.M. Gwinn, M.A. Bower, A. Watson, I. Okwumabua, H.R. MacDonald, M.I. Bukrinsky, S.I. Constant, Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses, *J. Immunol.* 175 (2005) 517–522.
- [7] W.M. Gwinn, J.M. Damsker, R. Falahati, I. Okwumabua, A. Kelly-Welch, A.D. Keegan, C. Vanpouille, J.J. Lee, L.A. Dent, D. Leitenberg, M.I. Bukrinsky, S.L. Constant, Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention, *J. Immunol.* 177 (2006) 4870–4879.
- [8] Q. Xu, M.C. Leiva, S.A. Fischkoff, R.E. Handschumacher, C.R. Lyttle, Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 11968–11971.
- [9] V. Yurchenko, M. O'Connor, W.W. Dai, H. Guo, B. Toole, B. Sherry, M. Bukrinsky, CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288 (2001) 786–788.
- [10] F. Allain, C. Vanpouille, M. Carpentier, M.C. Slomianny, S. Durieux, G. Spik, Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 2714–2719.
- [11] T. Pushkarsky, G. Zybarth, L. Dubrovsky, V. Yurchenko, H. Tang, H. Guo, B. Toole, B. Sherry, M. Bukrinsky, CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 6360–6365.
- [12] V. Yurchenko, G. Zybarth, M. O'Connor, W.W. Dai, G. Franchin, T. Hao, H. Guo, H.C. Hung, B. Toole, P. Gallay, B. Sherry, M. Bukrinsky, Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 22959–22965.
- [13] M. Carpentier, F. Allain, M.C. Slomianny, S. Durieux, C. Vanpouille, B. Haendler, G. Spik, Receptor type I and type II binding regions and the peptidyl-prolyl isomerase site of cyclophilin B are required for enhancement of T-lymphocyte adhesion to fibronectin, *Biochemistry* 41 (2002) 5222–5229.
- [14] R. Pakula, A. Melchior, A. Denys, C. Vanpouille, J. Mazurier, F. Allain, Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis, *Glycobiology* (2007) 492–503.
- [15] C. Biswas, Y. Zhang, R. DeCastro, H. Guo, T. Nakamura, H. Kataoka, K. Nabeshima, The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily, *Cancer Res.* 55 (1995) 434–439.
- [16] B.P. Toole, Emmprin (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function, *Curr. Top. Dev. Biol.* 54 (2003) 371–389.
- [17] D. Xu, M. Hemler, Metabolic activation-related CD147-CD98 complex, *Mol. Cell. Proteomics* 4 (2005) 1061–1071.
- [18] W. Kasinrerker, N. Tokrasinwit, P. Phunpae, CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway, *Immunology* 96 (1999) 184–192.
- [19] J.Y. Cho, D.A. Fox, V. Horejsi, K. Sagawa, K.M. Skubitz, D.R. Katz, B. Chain, The functional interactions between CD98, b1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation, *Blood* 98 (2001) 374–382.
- [20] F. Berditchevski, S. Chang, J. Bodorova, M.E. Hemler, Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 29174–29180.
- [21] B.F. Haynes, M.E. Hemler, D.L. Mann, G.S. Eisenbarth, J. Shelhamer, H.S. Mostowski, C.A. Thomas, J.L. Stroninger, A.S. Fauci, Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes, *J. Immunol.* 126 (1981) 1409–1414.
- [22] E. Nakamura, M. Sato, H. Yang, F. Miyagawa, M. Harasaki, K. Tomita, S. Matsuoka, A. Noma, K. Iwai, N. Minato, 4F2 CD98 heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 3009–3016.
- [23] F. Verrey, D.L. Jack, I.T. Paulsen, M.H. Saier Jr, R. Pfeiffer, New glycoprotein-associated protein amino acid transporters, *J. Membr. Biol.* 172 (1999) 181–192.
- [24] Y. Higuchi, M. Ito, M. Tajima, S. Higuchi, N. Miyamoto, M. Nishio, M. Kawano, S. Kusagawa, M. Tsurudome, A. Sudo, K. Katou, A. Uchida, Y. Ito, Gene expression during osteoclast-like cell formation induced by antifusion regulatory protein-1/CD98/4F2 monoclonal antibodies (Mabs): c-src is selectively induced by anti-FRP-1 Mab, *Bone* 25 (1999) 17–24.
- [25] A.P. Warren, K. Patel, Y. Miyamoto, J.N. Wygant, D.G. Woodside, B.W. McIntyre, Convergence between CD98 and integrin-mediated T-lymphocyte co-stimulation, *Immunology* 99 (2000) 62–68.

- [26] V.E. Woodhead, T.J. Stonehouse, M.H. Binks, K. Speidel, D.A. Fox, A. Gaya, D. Hardie, A.J. Henniker, V. Horejsi, K. Sagawa, K.M. Skubitz, H. Taskov, R.F. Todd, A. van Aghhoven, D.R. Katz, B.M. Chain, Novel molecular mechanisms of dendritic cell-induced T cell activation, *Int. Immunol.* 12 (2000) 1051–1061.
- [27] S. Ohgimoto, N. Tabata, S. Suga, M. Tsurudome, M. Kawano, M. Nishio, K. Okamoto, H. Komada, N. Watanabe, Y. Ito, Regulation of human immunodeficiency virus gp160-mediated cell fusion by antibodies against fusion regulatory protein 1, *J. Gen. Virol.* 77 (1996) 2747–2756.
- [28] K. Okamoto, M. Tsurudome, S. Ohgimoto, M. Kawano, M. Nishio, H. Komada, M. Ito, Y. Sakakura, Y. Ito, An anti-fusion regulatory protein-1 monoclonal antibody suppresses human parainfluenza virus type 2-induced cell fusion, *J. Gen. Virol.* 78 (1997) 83–89.
- [29] Y. Kudo, C.A.R. Boyd, RNA interference-induced reduction in CD98 expression suppresses cell fusion during syncytialization of human placental BeWo cells, *FEBS Lett.* 577 (2004) 473–477.
- [30] N. Tabata, M. Ito, K. Shimokata, S. Suga, S. Ohgimoto, M. Tsurudome, M. Kawano, H. Matsumura, H. Komada, M. Nishio, Y. Ito, Expression of fusion regulatory proteins (FRPs) on human peripheral blood monocytes. Induction of homotypic cell aggregation and formation of multinucleated giant cells by anti-FRP-1 monoclonal antibodies, *J. Immunol.* 153 (1994) 3256–3266.
- [31] R. Zent, C.A. Fenczik, D.A. Calderwood, S. Liu, M. Dellos, M.H. Ginsberg, Class- and splice variant-specific association of CD98 with integrin β cytoplasmic domains, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 5059–5064.
- [32] C.A. Fenczik, R. Zent, M. Dellos, D.A. Calderwood, J. Satriano, C. Kelly, M.H. Ginsberg, Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 8746–8752.
- [33] T.V. Kolesnikova, B.A. Mannion, F. Berdichevski, M.E. Hemler, Beta1 integrins show specific association with CD98 protein in low density membranes, *BMC Biochem.* 2 (2001) 10.
- [34] D. Merlin, S. Sitaraman, X. Liu, K. Eastburn, J. Sun, T. Kucharzik, B. Lewis, J.L. Madara, CD98-mediated links between amino acid transport and b1 integrin distribution in polarized columnar epithelia, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 39282–39289.
- [35] R.C. Rintoul, R.C. Buttery, A.C. Mackinnon, W.S. Wong, D. Mosher, C. Haslett, T. Sethi, Cross-linking CD98 promotes integrin-like signaling and anchorage-independent growth, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 2841–2852.
- [36] Y. Miyamoto, J.S. Mitchell, B.W. McIntyre, Physical association and functional interaction between β 1 integrin and CD98 on human T lymphocytes, *Mol. Immunol.* 39 (2003) 739–751.
- [37] C.A. Fenczik, T. Sethi, J.W. Ramos, P.E. Hughes, M.H. Ginsberg, Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation, *Nature* 390 (1997) 81–85.
- [38] Spik, B. Haendler, O. Delmas, C. Mariller, M. Chamoux, P. Maes, A. Tartar, J. Montreuil, K. Stedman, H.P. Kocher, R. Keller, P.C. Hiestand, N.R. Movva, A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP), *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 10735–10738.
- [39] J.Y. Cho, K.M. Skubitz, D.R. Katz, B.M. Chain, CD98-dependent homotypic aggregation is associated with translocation of protein kinase C δ and activation of mitogen-activated protein kinases, *Exp. Cell Res.* 286 (2003) 1–11.
- [40] C. Koch, G. Staffler, R. Huttinger, I. Hilgert, E. Prager, J. Cerny, P. Steinlein, O. Majdic, V. Horejsi, H. Stockinger, T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density, *Int. Immunol.* 11 (1999) 777–786.
- [41] W. Li, J. Zhang, D.P. Bottaro, J.H. Pierce, Identification of serine 643 of protein kinase C- δ as an important autophosphorylation site for its enzymatic activity, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 24550–24555.
- [42] J.A. Le Good, W.H. Ziegler, D.B. Parekh, D.R. Alessi, P. Cohen, P.J. Parker, Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1, *Science* 281 (1998) 2042–2045.
- [43] S. Cai, N. Bulus, P.M. Fonseca-Siesser, D. Chen, S.K. Hanks, A. Pozzi, R. Zent, CD98 modulates integrin β 1 function in polarized epithelial cells, *J. Cell Sci* 118 (2005) 889–899.
- [44] Corbit, D.A. Foster, M.R. Rosner, Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells, *Mol. Cell Biol.* 19 (1999) 4209–4218.
- [45] Y. Ueda, S.I. Hirai, S.I. Osada, A. Suzuki, K. Mizuno, S. Ohno, Protein kinase C δ activates the MEK-ERK pathways in a manner independent of Ras and dependent of Raf, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 23512–23519.
- [46] M. Gschwendt, Protein kinase C delta, *Eur. J. Biochem.* 259 (1999) 555–564.
- [47] T. Tomita, T. Nakase, M. Kaneko, K. Shi, K. Takahi, T. Ochi, H. Yoshikawa, Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 373–378.
- [48] Billich, G. Winkler, H. Aschauer, A. Rot, P. Peichl, Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis, *J. Exp. Med.* 185 (1997) 975–980.
- [49] P. Zhu, J. Ding, J. Zhou, W.J. Dong, C.M. Fan, Z.N. Chen, Expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis: its potential role in monocyte accumulation and matrix metalloproteinase production, *Arthritis Res. Ther.* 7 (2005) 1023–1033.
- [50] M. Tsurudome, Y. Ito, Function of fusion regulatory proteins (FRPs) in immune cells and virus-infected cells, *Crit. Rev. Immunol.* 20 (2000) 167–196.
- [51] K. Mori, M. Nishimura, M. Tsurudome, M. Ito, M. Nishio, M. Kawano, Y. Kozuka, Y. Yamashita, H. Komada, A. Uchida, Y. Ito, The functional interaction between CD98 and CD147 in regulation of virus-induced cell fusion and osteoclast formation. *Med. Microbiol. Immunol.* 193 (2004) 155–162.

Bibliographie

- Adhikari, N., Rusch, M., Mariash, A., Li, Q., Selleck, S. B. & Hall, J. L. 2008, Alterations in Heparan Sulfate in the Vessel in Response to Vascular Injury in the Mouse, *J Cardiovasc Transl Res*, **1**, 236-240.
- Ahrens, T., Sleeman, J. P., Schempp, C. M., Howells, N., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P. & Simon, J. C. 2001, Soluble CD44 inhibits melanoma tumor growth by blocking cell surface CD44 binding to hyaluronic acid, *Oncogene*, **20**, 3399-3408.
- Ai, X., Do, A. T., Lozynska, O., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U. & Emerson, C. P., Jr. 2003, QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling, *J Cell Biol*, **162**, 341-351.
- Ai, X., Do, A. T., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U., Lu, K. & Emerson, C. P., Jr. 2006, Substrate specificity and domain functions of extracellular heparan sulfate 6-O-endosulfatases, QSulf1 and QSulf2, *J Biol Chem*, **281**, 4969-4976.
- Ai, X., Kitazawa, T., Do, A. T., Kusche-Gullberg, M., Labosky, P. A. & Emerson, C. P., Jr. 2007, SULF1 and SULF2 regulate heparan sulfate-mediated GDNF signaling for esophageal innervation, *Development*, **134**, 3327-3338.
- Aikawa, J. & Esko, J. D. 1999, Molecular cloning and expression of a third member of the heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/ N-sulfotransferase family, *J Biol Chem*, **274**, 2690-2695.
- Aikawa, J., Grobe, K., Tsujimoto, M. & Esko, J. D. 2001, Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/GlcN N-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, NDST4, *J Biol Chem*, **276**, 5876-5882.
- Aitkenhead, M., Wang, S. J., Nakatsu, M. N., Mestas, J., Heard, C. & Hughes, C. C. 2002, Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM, *Microvasc Res*, **63**, 159-171.
- Alexopoulou, A. N., Multhaupt, H. A. & Couchman, J. R. 2007, Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology, *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 505-528.
- Ali, S., Robertson, H., Wain, J. H., Isaacs, J. D., Malik, G. & Kirby, J. A. 2005, A non-glycosaminoglycan-binding variant of CC chemokine ligand 7 (monocyte chemoattractant protein-3) antagonizes chemokine-mediated inflammation, *J Immunol*, **175**, 1257-1266.
- Allain, F., Boutillon, C., Mariller, C. & Spik, G. 1995, Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies, *J Immunol Methods*, **178**, 113-120.
- Allain, F., Vanpouille, C., Carpentier, M., Slomianny, M. C., Durieux, S. & Spik, G. 2002, Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2714-2719.
- Almeida, R., Levery, S. B., Mandel, U., Kresse, H., Schwientek, T., Bennett, E. P. & Clausen, H. 1999, Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose:beta-xylose beta1,4-galactosyltransferase I. A seventh member of the human beta4-galactosyltransferase gene family, *J Biol Chem*, **274**, 26165-26171.
- Andersson, L. O., Engman, L. & Henningsson, E. 1977, Crossed immunoelectrophoresis as applied to studies on complex formation. The binding of heparin to antithrombin III and the antithrombin III--thrombin complex, *J Immunol Methods*, **14**, 271-281.
- Andres, J. L., Stanley, K., Cheifetz, S. & Massague, J. 1989, Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta, *J Cell Biol*, **109**, 3137-3145.

- Aronson, N. N., Jr. & Davidson, E. A. 1968, Catabolism of mucopolysaccharides by rat liver lysosomes in vivo, *J Biol Chem*, **243**, 4494-4499.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B. & Seed, B. 1990, CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate, *Cell*, **61**, 1303-1313.
- Ascencio, F., Fransson, L. A. & Wadstrom, T. 1993, Affinity of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* for the N-sulphated glycosaminoglycan heparan sulphate, *J Med Microbiol*, **38**, 240-244.
- Asundi, V. K. & Carey, D. J. 1995, Self-association of N-syndecan (syndecan-3) core protein is mediated by a novel structural motif in the transmembrane domain and ectodomain flanking region, *J Biol Chem*, **270**, 26404-26410.
- Atha, D. H., Stephens, A. W. & Rosenberg, R. D. 1984, Evaluation of critical groups required for the binding of heparin to antithrombin, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 1030-1034.
- Ausseil, J., Loredano-Osti, J. C., Verner, A., Darmond-Zwaig, C., Maire, I., Poorthuis, B., van Diggelen, O. P., Hudson, T. J., Fujiwara, T. M., Morgan, K. & Pshezhetsky, A. V. 2004, Localisation of a gene for mucopolysaccharidosis IIIC to the pericentromeric region of chromosome 8, *J Med Genet*, **41**, 941-945.
- Baciu, P. C., Saoncella, S., Lee, S. H., Denhez, F., Leuthardt, D. & Goetinck, P. F. 2000, Syndesmos, a protein that interacts with the cytoplasmic domain of syndecan-4, mediates cell spreading and actin cytoskeletal organization, *J Cell Sci*, **113 Pt 2**, 315-324.
- Backen, A. C., Cole, C. L., Lau, S. C., Clamp, A. R., McVey, R., Gallagher, J. T. & Jayson, G. C. 2007, Heparan sulphate synthetic and editing enzymes in ovarian cancer, *Br J Cancer*, **96**, 1544-1548.
- Bai, X. & Esko, J. D. 1996, An animal cell mutant defective in heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfation, *J Biol Chem*, **271**, 17711-17717.
- Bai, X., Zhou, D., Brown, J. R., Crawford, B. E., Hennet, T. & Esko, J. D. 2001, Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans: cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the beta 1,3-galactosyltransferase family (beta 3GalT6), *J Biol Chem*, **276**, 48189-48195.
- Bajorath, J. 2000, Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions, *Proteins*, **39**, 103-111.
- Bame, K. J. & Esko, J. D. 1989, Undersulfated heparan sulfate in a Chinese hamster ovary cell mutant defective in heparan sulfate N-sulfotransferase, *J Biol Chem*, **264**, 8059-8065.
- Bame, K. J., Reddy, R. V. & Esko, J. D. 1991, Coupling of N-deacetylation and N-sulfation in a Chinese hamster ovary cell mutant defective in heparan sulfate N-sulfotransferase, *J Biol Chem*, **266**, 12461-12468.
- Bame, K. J., Zhang, L., David, G. & Esko, J. D. 1994, Sulphated and undersulphated heparan sulphate proteoglycans in a Chinese hamster ovary cell mutant defective in N-sulphotransferase, *Biochem J*, **303 (Pt 1)**, 81-87.
- Bame, K. J., Danda, J., Hassall, A. & Tumova, S. 1997, Abeta(1-40) prevents heparanase-catalyzed degradation of heparan sulfate glycosaminoglycans and proteoglycans in vitro. A role for heparan sulfate proteoglycan turnover in Alzheimer's disease, *J Biol Chem*, **272**, 17005-17011.
- Bame, K. J. 2001, Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans, *Glycobiology*, **11**, 91R-98R.

- Bandtlow, C. E. & Zimmermann, D. R. 2000, Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins, *Physiol Rev*, **80**, 1267-1290.
- Bass, M. D. & Humphries, M. J. 2002, Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling, *Biochem J*, **368**, 1-15.
- Battaglia, C., Aumailley, M., Mann, K., Mayer, U. & Timpl, R. 1993, Structural basis of beta 1 integrin-mediated cell adhesion to a large heparan sulfate proteoglycan from basement membranes, *Eur J Cell Biol*, **61**, 92-99.
- Beattie, J., Phillips, K., Shand, J. H., Szymanowska, M., Flint, D. J. & Allan, G. J. 2005, Molecular recognition characteristics in the insulin-like growth factor (IGF)-insulin-like growth factor binding protein -3/5 (IGFBP-3/5) heparin axis, *J Mol Endocrinol*, **34**, 163-175.
- Bechard, D., Meignin, V., Scherpereel, A., Oudin, S., Kervoaze, G., Bertheau, P., Janin, A., Tonnel, A. & Lassalle, P. 2000, Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies, *J Vasc Res*, **37**, 417-425.
- Bechard, D., Gentina, T., Delehedde, M., Scherpereel, A., Lyon, M., Aumercier, M., Vazeux, R., Richet, C., Degand, P., Jude, B., Janin, A., Fernig, D. G., Tonnel, A. B. & Lassalle, P. 2001, Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity, *J Biol Chem*, **276**, 48341-48349.
- Beesley, C. E., Meaney, C. A., Greenland, G., Adams, V., Vellodi, A., Young, E. P. & Winchester, B. G. 2001, Mutational analysis of 85 mucopolysaccharidosis type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations, *Hum Genet*, **109**, 503-511.
- Beesley, C. E., Burke, D., Jackson, M., Vellodi, A., Winchester, B. G. & Young, E. P. 2003, Sanfilippo syndrome type D: identification of the first mutation in the N-acetylglucosamine-6-sulphatase gene, *J Med Genet*, **40**, 192-194.
- Bengtsson, J., Eriksson, I. & Kjellen, L. 2003, Distinct effects on heparan sulfate structure by different active site mutations in NDST-1, *Biochemistry*, **42**, 2110-2115.
- Bennett, K. L., Jackson, D. G., Simon, J. C., Tanczos, E., Peach, R., Modrell, B., Stamenkovic, I., Plowman, G. & Aruffo, A. 1995, CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor, *J Cell Biol*, **128**, 687-698.
- Bensadoun, E. S., Burke, A. K., Hogg, J. C. & Roberts, C. R. 1997, Proteoglycans in granulomatous lung diseases, *Eur Respir J*, **10**, 2731-2737.
- Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M. T., Spring, J., Gallo, R. L. & Lose, E. J. 1992, Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans, *Annu Rev Cell Biol*, **8**, 365-393.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. & Zako, M. 1999, Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans, *Annu Rev Biochem*, **68**, 729-777.
- Berninsone, P. & Hirschberg, C. B. 1998, Heparan sulfate/heparin N-deacetylase/N-sulfotransferase. The N-sulfotransferase activity domain is at the carboxyl half of the holoenzyme, *J Biol Chem*, **273**, 25556-25559.
- Bethea, H. N., Xu, D., Liu, J. & Pedersen, L. C. 2008, Redirecting the substrate specificity of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase by structurally guided mutagenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 18724-18729.

- Bezakova, G. & Ruegg, M. A. 2003, New insights into the roles of agrin, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 295-308.
- Bink, R. J., Habuchi, H., Lele, Z., Dolk, E., Joore, J., Rauch, G. J., Geisler, R., Wilson, S. W., den Hertog, J., Kimata, K. & Zivkovic, D. 2003, Heparan sulfate 6-o-sulfotransferase is essential for muscle development in zebrafish, *J Biol Chem*, **278**, 31118-31127.
- Bishop, J. R., Schuksz, M. & Esko, J. D. 2007, Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology, *Nature*, **446**, 1030-1037.
- Bishop, J. R., Stanford, K. I. & Esko, J. D. 2008, Heparan sulfate proteoglycans and triglyceride-rich lipoprotein metabolism, *Curr Opin Lipidol*, **19**, 307-313.
- Bix, G., Fu, J., Gonzalez, E. M., Macro, L., Barker, A., Campbell, S., Zutter, M. M., Santoro, S. A., Kim, J. K., Hook, M., Reed, C. C. & Iozzo, R. V. 2004, Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through alpha2beta1 integrin, *J Cell Biol*, **166**, 97-109.
- Bix, G., Castello, R., Burrows, M., Zoeller, J. J., Weech, M., Iozzo, R. A., Cardi, C., Thakur, M. L., Barker, C. A., Camphausen, K. & Iozzo, R. V. 2006, Endorepellin in vivo: targeting the tumor vasculature and retarding cancer growth and metabolism, *J Natl Cancer Inst*, **98**, 1634-1646.
- Blanch, L., Weber, B., Guo, X. H., Scott, H. S. & Hopwood, J. J. 1997, Molecular defects in Sanfilippo syndrome type A, *Hum Mol Genet*, **6**, 787-791.
- Blobe, G. C., Liu, X., Fang, S. J., How, T. & Lodish, H. F. 2001, A novel mechanism for regulating transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC, *J Biol Chem*, **276**, 39608-39617.
- Bobardt, M. D., Saphire, A. C., Hung, H. C., Yu, X., Van der Schueren, B., Zhang, Z., David, G. & Gally, P. A. 2003, Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes, *Immunity*, **18**, 27-39.
- Borland, G., Ross, J. A. & Guy, K. 1998, Forms and functions of CD44, *Immunology*, **93**, 139-148.
- Bourdon, M. A., Oldberg, A., Pierschbacher, M. & Ruoslahti, E. 1985, Molecular cloning and sequence analysis of a chondroitin sulfate proteoglycan cDNA, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 1321-1325.
- Bourin, M. C. & Lindahl, U. 1993, Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation, *Biochem J*, **289** (Pt 2), 313-330.
- Brandan, E. & Hirschberg, C. B. 1988, Purification of rat liver N-heparan-sulfate sulfotransferase, *J Biol Chem*, **263**, 2417-2422.
- Bret, C., Hose, D., Reme, T., Sprynski, A. C., Mahtouk, K., Schved, J. F., Quittet, P., Rossi, J. F., Goldschmidt, H. & Klein, B. 2009, Expression of genes encoding for proteins involved in heparan sulphate and chondroitin sulphate chain synthesis and modification in normal and malignant plasma cells, *Br J Haematol*, **145**, 350-368.
- Brickman, Y. G., Ford, M. D., Gallagher, J. T., Nurcombe, V., Bartlett, P. F. & Turnbull, J. E. 1998a, Structural modification of fibroblast growth factor-binding heparan sulfate at a determinative stage of neural development, *J Biol Chem*, **273**, 4350-4359.
- Brickman, Y. G., Nurcombe, V., Ford, M. D., Gallagher, J. T., Bartlett, P. F. & Turnbull, J. E. 1998b, Structural comparison of fibroblast growth factor-specific heparan sulfates derived from a growing or differentiating neuroepithelial cell line, *Glycobiology*, **8**, 463-471.

- Brown, G. M., Huckerby, T. N., Abram, B. L. & Nieduszynski, I. A. 1996, Characterization of a non-reducing terminal fragment from bovine articular cartilage keratan sulphates containing alpha(2-3)-linked sialic acid and alpha(1-3)-linked fucose. A sulphated variant of the VIM-2 epitope, *Biochem J*, **319** (Pt 1), 137-141.
- Brown, L. F., Guidi, A. J., Schnitt, S. J., Van De Water, L., Iruela-Arispe, M. L., Yeo, T. K., Tognazzi, K. & Dvorak, H. F. 1999, Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast, *Clin Cancer Res*, **5**, 1041-1056.
- Brunner, G., Metz, C. N., Nguyen, H., Gabrilove, J., Patel, S. R., Davitz, M. A., Rifkin, D. B. & Wilson, E. L. 1994, An endogenous glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D releases basic fibroblast growth factor-heparan sulfate proteoglycan complexes from human bone marrow cultures, *Blood*, **83**, 2115-2125.
- Bukrinsky, M. I. 2002, Cyclophilins: unexpected messengers in intercellular communications, *Trends Immunol*, **23**, 323-325.
- Bullock, S. L., Fletcher, J. M., Beddington, R. S. & Wilson, V. A. 1998, Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase, *Genes Dev*, **12**, 1894-1906.
- Burgess, R. W., Skarnes, W. C. & Sanes, J. R. 2000, Agrin isoforms with distinct amino termini: differential expression, localization, and function, *J Cell Biol*, **151**, 41-52.
- Busse, M. & Kusche-Gullberg, M. 2003, In vitro polymerization of heparan sulfate backbone by the EXT proteins, *J Biol Chem*, **278**, 41333-41337.
- Busse, M., Feta, A., Presto, J., Wilen, M., Gronning, M., Kjellen, L. & Kusche-Gullberg, M. 2007, Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation, *J Biol Chem*, **282**, 32802-32810.
- Cadene, M., Boudier, C., de Marcillac, G. D. & Bieth, J. G. 1995, Influence of low molecular mass heparin on the kinetics of neutrophil elastase inhibition by mucus proteinase inhibitor, *J Biol Chem*, **270**, 13204-13209.
- Cadwallader, A. B. & Yost, H. J. 2006a, Combinatorial expression patterns of heparan sulfate sulfotransferases in zebrafish: I. The 3-O-sulfotransferase family, *Dev Dyn*, **235**, 3423-3431.
- Cadwallader, A. B. & Yost, H. J. 2006b, Combinatorial expression patterns of heparan sulfate sulfotransferases in zebrafish: II. The 6-O-sulfotransferase family, *Dev Dyn*, **235**, 3432-3437.
- Cadwallader, A. B. & Yost, H. J. 2007, Combinatorial expression patterns of heparan sulfate sulfotransferases in zebrafish: III. 2-O-sulfotransferase and C5-epimerases, *Dev Dyn*, **236**, 581-586.
- Caldwell, E. E., Nadkarni, V. D., Fromm, J. R., Linhardt, R. J. & Weiler, J. M. 1996, Importance of specific amino acids in protein binding sites for heparin and heparan sulfate, *Int J Biochem Cell Biol*, **28**, 203-216.
- Campbell, P., Hannesson, H. H., Sandback, D., Roden, L., Lindahl, U. & Li, J. P. 1994, Biosynthesis of heparin/heparan sulfate. Purification of the D-glucuronyl C-5 epimerase from bovine liver, *J Biol Chem*, **269**, 26953-26958.
- Capila, I., Hernaiz, M. J., Mo, Y. D., Mealy, T. R., Campos, B., Dedman, J. R., Linhardt, R. J. & Seaton, B. A. 2001, Annexin V--heparin oligosaccharide complex suggests heparan sulfate--mediated assembly on cell surfaces, *Structure*, **9**, 57-64.

- Capila, I. & Linhardt, R. J. 2002, Heparin-protein interactions, *Angew Chem Int Ed Engl*, **41**, 391-412.
- Cardin, A. D. & Weintraub, H. J. 1989, Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions, *Arteriosclerosis*, **9**, 21-32.
- Carey, D. J., Evans, D. M., Stahl, R. C., Asundi, V. K., Conner, K. J., Garbes, P. & Cizmeci-Smith, G. 1992, Molecular cloning and characterization of N-syndecan, a novel transmembrane heparan sulfate proteoglycan, *J Cell Biol*, **117**, 191-201.
- Carlsson, P., Presto, J., Spillmann, D., Lindahl, U. & Kjellen, L. 2008, Heparin/heparan sulfate biosynthesis: processive formation of N-sulfated domains, *J Biol Chem*, **283**, 20008-20014.
- Carpentier, M., Allain, F., Haendler, B., Denys, A., Mariller, C., Benaissa, M. & Spik, G. 1999, Two distinct regions of cyclophilin B are involved in the recognition of a functional receptor and of glycosaminoglycans on T lymphocytes, *J Biol Chem*, **274**, 10990-10998.
- Carpentier, M., Allain, F., Slomianny, M. C., Durieux, S., Vanpouille, C., Haendler, B. & Spik, G. 2002, Receptor type I and type II binding regions and the peptidyl-prolyl isomerase site of cyclophilin B are required for enhancement of T-lymphocyte adhesion to fibronectin, *Biochemistry*, **41**, 5222-5229.
- Carter, N. M., Ali, S. & Kirby, J. A. 2003, Endothelial inflammation: the role of differential expression of N-deacetylase/N-sulphotransferase enzymes in alteration of the immunological properties of heparan sulphate, *J Cell Sci*, **116**, 3591-3600.
- Casu, B., Oreste, P., Torri, G., Zoppetti, G., Choay, J., Lormeau, J. C., Petitou, M. & Sinay, P. 1981, The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. Chemical and ¹³C nuclear-magnetic-resonance studies, *Biochem J*, **197**, 599-609.
- Casu, B. & Lindahl, U. 2001, Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate, *Adv Carbohydr Chem Biochem*, **57**, 159-206.
- Caterson, B., Flannery, C. R., Hughes, C. E. & Little, C. B. 2000, Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism, *Matrix Biol*, **19**, 333-344.
- Cazzola, M. & Skoda, R. C. 2000, Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease, *Blood*, **95**, 3280-3288.
- Chakravarti, S., Magnuson, T., Lass, J. H., Jepsen, K. J., LaMantia, C. & Carroll, H. 1998, Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican, *J Cell Biol*, **141**, 1277-1286.
- Chang, M. Y., Olin, K. L., Tsoi, C., Wight, T. N. & Chait, A. 1998, Human monocyte-derived macrophages secrete two forms of proteoglycan-macrophage colony-stimulating factor that differ in their ability to bind low density lipoproteins, *J Biol Chem*, **273**, 15985-15992.
- Charnaux, N., Brule, S., Chaigneau, T., Saffar, L., Sutton, A., Hamon, M., Prost, C., Lievre, N., Vita, C. & Gattegno, L. 2005, RANTES (CCL5) induces a CCR5-dependent accelerated shedding of syndecan-1 (CD138) and syndecan-4 from HeLa cells and forms complexes with the shed ectodomains of these proteoglycans as well as with those of CD44, *Glycobiology*, **15**, 119-130.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J. & Marks, R. M. 1997, Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate, *Nat Med*, **3**, 866-871.

- Chen, C., Ma, J., Lazic, A., Backovic, M. & Colley, K. J. 2000, Formation of insoluble oligomers correlates with ST6Gal I stable localization in the golgi, *J Biol Chem*, **275**, 13819-13826.
- Chen, R. L. & Lander, A. D. 2001, Mechanisms underlying preferential assembly of heparan sulfate on glypican-1, *J Biol Chem*, **276**, 7507-7517.
- Chen, J., Duncan, M. B., Carrick, K., Pope, R. M. & Liu, J. 2003, Biosynthesis of 3-O-sulfated heparan sulfate: unique substrate specificity of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5, *Glycobiology*, **13**, 785-794.
- Chen, J. & Liu, J. 2005, Characterization of the structure of antithrombin-binding heparan sulfate generated by heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 5, *Biochim Biophys Acta*, **1725**, 190-200.
- Chen, E., Stringer, S. E., Rusch, M. A., Selleck, S. B. & Ekker, S. C. 2005, A unique role for 6-O sulfation modification in zebrafish vascular development, *Dev Biol*, **284**, 364-376.
- Chen, C. P., Liu, S. H., Lee, M. Y. & Chen, Y. Y. 2008, Heparan sulfate proteoglycans in the basement membranes of the human placenta and decidua, *Placenta*, **29**, 309-316.
- Cheng, F., Mani, K., van den Born, J., Ding, K., Belting, M. & Fransson, L. A. 2002, Nitric oxide-dependent processing of heparan sulfate in recycling S-nitrosylated glypican-1 takes place in caveolin-1-containing endosomes, *J Biol Chem*, **277**, 44431-44439.
- Cheung, W. F., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M., Lindhal, U. & Kjellen, L. 1996, Expression of the mouse mastocytoma glucosaminyl N-deacetylase/ N-sulfotransferase in human kidney 293 cells results in increased N-sulfation of heparan sulfate, *Biochemistry*, **35**, 5250-5256.
- Cheung, P. K., McCormick, C., Crawford, B. E., Esko, J. D., Tufaro, F. & Duncan, G. 2001, Etiological point mutations in the hereditary multiple exostoses gene EXT1: a functional analysis of heparan sulfate polymerase activity, *Am J Hum Genet*, **69**, 55-66.
- Chitu, V. & Stanley, E. R. 2006, Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation, *Curr Opin Immunol*, **18**, 39-48.
- Choi, S., Lee, E., Kwon, S., Park, H., Yi, J. Y., Kim, S., Han, I. O., Yun, Y. & Oh, E. S. 2005, Transmembrane domain-induced oligomerization is crucial for the functions of syndecan-2 and syndecan-4, *J Biol Chem*, **280**, 42573-42579.
- Clarke, D., Katoh, O., Gibbs, R. V., Griffiths, S. D. & Gordon, M. Y. 1995, Interaction of interleukin 7 (IL-7) with glycosaminoglycans and its biological relevance, *Cytokine*, **7**, 325-330.
- Clasper, S., Vekemans, S., Fiore, M., Plebanski, M., Wordsworth, P., David, G. & Jackson, D. G. 1999, Inducible expression of the cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 (fibroglycan) on human activated macrophages can regulate fibroblast growth factor action, *J Biol Chem*, **274**, 24113-24123.
- Colin, S., Jeanny, J. C., Mascarelli, F., Vienet, R., Al-Mahmood, S., Courtois, Y. & Labarre, J. 1999, In vivo involvement of heparan sulfate proteoglycan in the bioavailability, internalization, and catabolism of exogenous basic fibroblast growth factor, *Mol Pharmacol*, **55**, 74-82.
- Colley, K. J. 1997, Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers, *Glycobiology*, **7**, 1-13.
- Colliec-Jouault, S., Shworak, N. W., Liu, J., de Agostini, A. I. & Rosenberg, R. D. 1994, Characterization of a cell mutant specifically defective in the synthesis of anticoagulant active heparan sulfate, *J Biol Chem*, **269**, 24953-24958.

- Compton, T., Nowlin, D. M. & Cooper, N. R. 1993, Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate, *Virology*, **193**, 834-841.
- Coombe, D. R. & Kett, W. C. 2005, Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights, *Cell Mol Life Sci*, **62**, 410-424.
- Coombe, D. R., Stevenson, S. M., Kinnear, B. F., Gandhi, N. S., Mancera, R. L., Osmond, R. I. & Kett, W. C. 2008, Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) and its interactions with glycosaminoglycans: 2. Biochemical analyses, *Biochemistry*, **47**, 4863-4875.
- Costell, M., Gustafsson, E., Aszodi, A., Morgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R. & Fassler, R. 1999, Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes, *J Cell Biol*, **147**, 1109-1122.
- Couchman, J. R. 2003, Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains?, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 926-937.
- Crawford, B. E., Olson, S. K., Esko, J. D. & Pinhal, M. A. 2001, Cloning, Golgi localization, and enzyme activity of the full-length heparin/heparan sulfate-glucuronic acid C5-epimerase, *J Biol Chem*, **276**, 21538-21543.
- Danielson, K. G., Baribault, H., Holmes, D. F., Graham, H., Kadler, K. E. & Iozzo, R. V. 1997, Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility, *J Cell Biol*, **136**, 729-743.
- Danishefsky, I., Ahrens, M. & Klein, S. 1977, Effect of heparin modification on its activity in enhancing the inhibition of thrombin by antithrombin III, *Biochim Biophys Acta*, **498**, 215-222.
- David, G., Lories, V., Decock, B., Marynen, P., Cassiman, J. J. & Van den Berghe, H. 1990, Molecular cloning of a phosphatidylinositol-anchored membrane heparan sulfate proteoglycan from human lung fibroblasts, *J Cell Biol*, **111**, 3165-3176.
- David, G., van der Schueren, B., Marynen, P., Cassiman, J. J. & van den Berghe, H. 1992, Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblastic cells, *J Cell Biol*, **118**, 961-969.
- De Cat, B. & David, G. 2001, Developmental roles of the glypicans, *Semin Cell Dev Biol*, **12**, 117-125.
- De Ceuninck, F., Allain, F., Caliez, A., Spik, G. & Vanhoutte, P. M. 2003, High binding capacity of cyclophilin B to chondrocyte heparan sulfate proteoglycans and its release from the cell surface by matrix metalloproteinases: possible role as a proinflammatory mediator in arthritis, *Arthritis Rheum*, **48**, 2197-2206.
- DeBaun, M. R., Ess, J. & Saunders, S. 2001, Simpson Golabi Behmel syndrome: progress toward understanding the molecular basis for overgrowth, malformation, and cancer predisposition, *Mol Genet Metab*, **72**, 279-286.
- Delehedde, M., Seve, M., Sergeant, N., Wartelle, I., Lyon, M., Rudland, P. S. & Fernig, D. G. 2000, Fibroblast growth factor-2 stimulation of p42/44MAPK phosphorylation and I κ B degradation is regulated by heparan sulfate/heparin in rat mammary fibroblasts, *J Biol Chem*, **275**, 33905-33910.
- Delehedde, M., Lyon, M., Sergeant, N., Rahmoune, H. & Fernig, D. G. 2001, Proteoglycans: pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **6**, 253-273.

- Delehedde, M., Lyon, M., Gallagher, J. T., Rudland, P. S. & Fernig, D. G. 2002a, Fibroblast growth factor-2 binds to small heparin-derived oligosaccharides and stimulates a sustained phosphorylation of p42/44 mitogen-activated protein kinase and proliferation of rat mammary fibroblasts, *Biochem J*, **366**, 235-244.
- Delehedde, M., Lyon, M., Vidyasagar, R., McDonnell, T. J. & Fernig, D. G. 2002b, Hepatocyte growth factor/scatter factor binds to small heparin-derived oligosaccharides and stimulates the proliferation of human HaCaT keratinocytes, *J Biol Chem*, **277**, 12456-12462.
- Dempsey, L. A., Brunn, G. J. & Platt, J. L. 2000, Heparanase, a potential regulator of cell-matrix interactions, *Trends Biochem Sci*, **25**, 349-351.
- den Dekker, E., Grefte, S., Huijs, T., ten Dam, G. B., Versteeg, E. M., van den Berk, L. C., Bladergroen, B. A., van Kuppevelt, T. H., Figdor, C. G. & Torensma, R. 2008, Monocyte cell surface glycosaminoglycans positively modulate IL-4-induced differentiation toward dendritic cells, *J Immunol*, **180**, 3680-3688.
- Denhez, F., Wilcox-Adelman, S. A., Baciou, P. C., Saoncella, S., Lee, S., French, B., Neveu, W. & Goetinck, P. F. 2002, Syndesmos, a syndecan-4 cytoplasmic domain interactor, binds to the focal adhesion adaptor proteins paxillin and Hic-5, *J Biol Chem*, **277**, 12270-12274.
- Dennissen, M. A., Jenniskens, G. J., Pieffers, M., Versteeg, E. M., Petitou, M., Veerkamp, J. H. & van Kuppevelt, T. H. 2002, Large, tissue-regulated domain diversity of heparan sulfates demonstrated by phage display antibodies, *J Biol Chem*, **277**, 10982-10986.
- Denys, A., Allain, F., Foxwell, B. & Spik, G. 1997, Distribution of cyclophilin B-binding sites in the subsets of human peripheral blood lymphocytes, *Immunology*, **91**, 609-617.
- Denys, A., Allain, F., Carpentier, M. & Spik, G. 1998, Involvement of two classes of binding sites in the interactions of cyclophilin B with peripheral blood T-lymphocytes, *Biochem J*, **336** (Pt 3), 689-697.
- Denzer, A. J., Gesemann, M., Schumacher, B. & Ruegg, M. A. 1995, An amino-terminal extension is required for the secretion of chick agrin and its binding to extracellular matrix, *J Cell Biol*, **131**, 1547-1560.
- Denzer, A. J., Brandenberger, R., Gesemann, M., Chiquet, M. & Ruegg, M. A. 1997, Agrin binds to the nerve-muscle basal lamina via laminin, *J Cell Biol*, **137**, 671-683.
- Derynck, R. & Feng, X. H. 1997, TGF-beta receptor signaling, *Biochim Biophys Acta*, **1333**, F105-150.
- Dhoot, G. K., Gustafsson, M. K., Ai, X., Sun, W., Standiford, D. M. & Emerson, C. P., Jr. 2001, Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase, *Science*, **293**, 1663-1666.
- DiGabriele, A. D., Lax, I., Chen, D. I., Svahn, C. M., Jaye, M., Schlessinger, J. & Hendrickson, W. A. 1998, Structure of a heparin-linked biologically active dimer of fibroblast growth factor, *Nature*, **393**, 812-817.
- Ding, K., Jonsson, M., Mani, K., Sandgren, S., Belting, M. & Fransson, L. A. 2001, N-unsubstituted glucosamine in heparan sulfate of recycling glypican-1 from suramin-treated and nitrite-deprived endothelial cells. mapping of nitric oxide/nitrite-susceptible glucosamine residues to clustered sites near the core protein, *J Biol Chem*, **276**, 3885-3894.
- Ding, K., Mani, K., Cheng, F., Belting, M. & Fransson, L. A. 2002, Copper-dependent autocleavage of glypican-1 heparan sulfate by nitric oxide derived from intrinsic nitrosothiols, *J Biol Chem*, **277**, 33353-33360.

- Do, A. T., Smeds, E., Spillmann, D. & Kusche-Gullberg, M. 2006, Overexpression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferases in human embryonic kidney 293 cells results in increased N-acetylglucosaminyl 6-O-sulfation, *J Biol Chem*, **281**, 5348-5356.
- Dolan, M., Horchar, T., Rigatti, B. & Hassell, J. R. 1997, Identification of sites in domain I of perlecan that regulate heparan sulfate synthesis, *J Biol Chem*, **272**, 4316-4322.
- Dong, S., Cole, G. J. & Halfter, W. 2003, Expression of collagen XVIII and localization of its glycosaminoglycan attachment sites, *J Biol Chem*, **278**, 1700-1707.
- Dours-Zimmermann, M. T. & Zimmermann, D. R. 1994, A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican, *J Biol Chem*, **269**, 32992-32998.
- Dowd, C. J., Cooney, C. L. & Nugent, M. A. 1999, Heparan sulfate mediates bFGF transport through basement membrane by diffusion with rapid reversible binding, *J Biol Chem*, **274**, 5236-5244.
- Duncan, G., McCormick, C. & Tufaro, F. 2001, The link between heparan sulfate and hereditary bone disease: finding a function for the EXT family of putative tumor suppressor proteins, *J Clin Invest*, **108**, 511-516.
- Duncan, M. B., Chen, J., Krise, J. P. & Liu, J. 2004, The biosynthesis of anticoagulant heparan sulfate by the heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5, *Biochim Biophys Acta*, **1671**, 34-43.
- Duncan, M. B., Liu, M., Fox, C. & Liu, J. 2006, Characterization of the N-deacetylase domain from the heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 2, *Biochem Biophys Res Commun*, **339**, 1232-1237.
- Echtermeyer, F., Baciuc, P. C., Saoncella, S., Ge, Y. & Goetinck, P. F. 1999, Syndecan-4 core protein is sufficient for the assembly of focal adhesions and actin stress fibers, *J Cell Sci*, **112 (Pt 20)**, 3433-3441.
- Edavettal, S. C., Carrick, K., Shah, R. R., Pedersen, L. C., Tropsha, A., Pope, R. M. & Liu, J. 2004a, A conformational change in heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-1 is induced by binding to heparan sulfate, *Biochemistry*, **43**, 4680-4688.
- Edavettal, S. C., Lee, K. A., Negishi, M., Linhardt, R. J., Liu, J. & Pedersen, L. C. 2004b, Crystal structure and mutational analysis of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 1, *J Biol Chem*, **279**, 25789-25797.
- Ehara, T., Carone, F. A., McCarthy, K. J. & Couchman, J. R. 1994, Basement membrane chondroitin sulfate proteoglycan alterations in a rat model of polycystic kidney disease, *Am J Pathol*, **144**, 612-621.
- Eickelberg, O., Centrella, M., Reiss, M., Kashgarian, M. & Wells, R. G. 2002, Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function, *J Biol Chem*, **277**, 823-829.
- Elenius, K., Maatta, A., Salmivirta, M. & Jalkanen, M. 1992, Growth factors induce 3T3 cells to express bFGF-binding syndecan, *J Biol Chem*, **267**, 6435-6441.
- Endo, K., Takino, T., Miyamori, H., Kinsen, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M. & Sato, H. 2003, Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration, *J Biol Chem*, **278**, 40764-40770.
- Eriksson, I., Sandback, D., Ek, B., Lindahl, U. & Kjellen, L. 1994, cDNA cloning and sequencing of mouse mastocytoma glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase, an enzyme involved in the biosynthesis of heparin, *J Biol Chem*, **269**, 10438-10443.

- Esko, J. D. & Zhang, L. 1996, Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly, *Curr Opin Struct Biol*, **6**, 663-670.
- Esko, J. D. & Lindahl, U. 2001, Molecular diversity of heparan sulfate, *J Clin Invest*, **108**, 169-173.
- Esko, J. D. & Selleck, S. B. 2002, Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate, *Annu Rev Biochem*, **71**, 435-471.
- Eswarakumar, V. P., Lax, I. & Schlessinger, J. 2005, Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors, *Cytokine Growth Factor Rev*, **16**, 139-149.
- Ethell, I. M., Hagihara, K., Miura, Y., Irie, F. & Yamaguchi, Y. 2000, Synbindin, A novel syndecan-2-binding protein in neuronal dendritic spines, *J Cell Biol*, **151**, 53-68.
- Ezura, Y., Chakravarti, S., Oldberg, A., Chervoneva, I. & Birk, D. E. 2000, Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons, *J Cell Biol*, **151**, 779-788.
- Faham, S., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Linhardt, R. J. & Rees, D. C. 1996, Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor, *Science*, **271**, 1116-1120.
- Fairbanks, M. B., Mildner, A. M., Leone, J. W., Cavey, G. S., Mathews, W. R., Drong, R. F., Slightom, J. L., Bienkowski, M. J., Smith, C. W., Bannow, C. A. & Henrikson, R. L. 1999, Processing of the human heparanase precursor and evidence that the active enzyme is a heterodimer, *J Biol Chem*, **274**, 29587-29590.
- Fan, G., Xiao, L., Cheng, L., Wang, X., Sun, B. & Hu, G. 2000, Targeted disruption of NDST-1 gene leads to pulmonary hypoplasia and neonatal respiratory distress in mice, *FEBS Lett*, **467**, 7-11.
- Fernig, D. G. & Gallagher, J. T. 1994, Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair, *Prog Growth Factor Res*, **5**, 353-377.
- Ferreras, M., Felbor, U., Lenhard, T., Olsen, B. R. & Delaisse, J. 2000, Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases, *FEBS Lett*, **486**, 247-251.
- Feyerabend, T. B., Li, J. P., Lindahl, U. & Rodewald, H. R. 2006, Heparan sulfate C5-epimerase is essential for heparin biosynthesis in mast cells, *Nat Chem Biol*, **2**, 195-196.
- Feyzi, E., Saldeen, T., Larsson, E., Lindahl, U. & Salmivirta, M. 1998, Age-dependent modulation of heparan sulfate structure and function, *J Biol Chem*, **273**, 13395-13398.
- Fiedler, L. R. & Eble, J. A. 2009, Decorin regulates endothelial cell-matrix interactions during angiogenesis, *Cell Adh Migr*, **3**,
- Filmus, J., Church, J. G. & Buick, R. N. 1988, Isolation of a cDNA corresponding to a developmentally regulated transcript in rat intestine, *Mol Cell Biol*, **8**, 4243-4249.
- Filmus, J. & Selleck, S. B. 2001, Glypicans: proteoglycans with a surprise, *J Clin Invest*, **108**, 497-501.
- Filmus, J., Capurro, M. & Rast, J. 2008, Glypicans, *Genome Biol*, **9**, 224.
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. & Schmid, F. X. 1989, Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins, *Nature*, **337**, 476-478.

- Forsberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L. & Kjellen, L. 1999, Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme, *Nature*, **400**, 773-776.
- Fransson, L. A., Silverberg, I. & Carlstedt, I. 1985, Structure of the heparan sulfate-protein linkage region. Demonstration of the sequence galactosyl-galactosyl-xylose-2-phosphate, *J Biol Chem*, **260**, 14722-14726.
- Fransson, L. A., Belting, M., Jonsson, M., Mani, K., Moses, J. & Oldberg, A. 2000, Biosynthesis of decorin and glypican, *Matrix Biol*, **19**, 367-376.
- Fransson, L. A., Belting, M., Cheng, F., Jonsson, M., Mani, K. & Sandgren, S. 2004, Novel aspects of glypican glycobiochemistry, *Cell Mol Life Sci*, **61**, 1016-1024.
- Fraser, J. R., Laurent, T. C. & Laurent, U. B. 1997, Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover, *J Intern Med*, **242**, 27-33.
- Frevert, U., Sinnis, P., Cerami, C., Shreffler, W., Takacs, B. & Nussenzweig, V. 1993, Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes, *J Exp Med*, **177**, 1287-1298.
- Friedrich, M. V., Gohring, W., Morgelin, M., Brancaccio, A., David, G. & Timpl, R. 1999, Structural basis of glycosaminoglycan modification and of heterotypic interactions of perlecan domain V, *J Mol Biol*, **294**, 259-270.
- Fries, E. & Blom, A. M. 2000, Bikunin--not just a plasma proteinase inhibitor, *Int J Biochem Cell Biol*, **32**, 125-137.
- Fritz, T. A., Gabb, M. M., Wei, G. & Esko, J. D. 1994, Two N-acetylglucosaminyltransferases catalyze the biosynthesis of heparan sulfate, *J Biol Chem*, **269**, 28809-28814.
- Froissart, R., Da Silva, I. M. & Maire, I. 2007, Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum, *Acta Paediatr Suppl*, **96**, 71-77.
- Fromm, J. R., Hileman, R. E., Caldwell, E. E., Weiler, J. M. & Linhardt, R. J. 1995, Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor, *Arch Biochem Biophys*, **323**, 279-287.
- Fukai, N., Eklund, L., Marneros, A. G., Oh, S. P., Keene, D. R., Tamarkin, L., Niemela, M., Ilves, M., Li, E., Pihlajaniemi, T. & Olsen, B. R. 2002, Lack of collagen XVIII/endostatin results in eye abnormalities, *EMBO J*, **21**, 1535-1544.
- Fuki, I. V., Kuhn, K. M., Lomazov, I. R., Rothman, V. L., Tuszynski, G. P., Iozzo, R. V., Swenson, T. L., Fisher, E. A. & Williams, K. J. 1997, The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro, *J Clin Invest*, **100**, 1611-1622.
- Fukuda, K., Kawata, S., Inui, Y., Higashiyama, S., Matsuda, Y., Igura, T., Tamura, S., Taniguchi, N. & Matsuzawa, Y. 1997, High concentration of glucose increases mitogenic responsiveness to heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in rat vascular smooth muscle cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 1962-1968.
- Funderburgh, J. L., Mitschler, R. R., Funderburgh, M. L., Roth, M. R., Chapes, S. K. & Conrad, G. W. 1997, Macrophage receptors for lumican. A corneal keratan sulfate proteoglycan, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **38**, 1159-1167.
- Funderburgh, J. L. 2000, Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function, *Glycobiology*, **10**, 951-958.

- Galat, A. 1999, Variations of sequences and amino acid compositions of proteins that sustain their biological functions: An analysis of the cyclophilin family of proteins, *Arch Biochem Biophys*, **371**, 149-162.
- Gallagher, J. T. 2001, Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu, *J Clin Invest*, **108**, 357-361.
- Gandhi, N. S., Coombe, D. R. & Mancera, R. L. 2008, Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) and its interactions with glycosaminoglycans: 1. Molecular modeling studies, *Biochemistry*, **47**, 4851-4862.
- Gandhi, N. S. & Mancera, R. L. 2008, The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins, *Chem Biol Drug Des*, **72**, 455-482.
- Gao, Y., Li, M., Chen, W. & Simons, M. 2000, Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration, *J Cell Physiol*, **184**, 373-379.
- Garner, O. B., Yamaguchi, Y., Esko, J. D. & Videm, V. 2008, Small changes in lymphocyte development and activation in mice through tissue-specific alteration of heparan sulphate, *Immunology*, **125**, 420-429.
- Gebhard, W., Hochstrasser, K., Fritz, H., Enghild, J. J., Pizzo, S. V. & Salvesen, G. 1990, Structure of inter-alpha-inhibitor (inter-alpha-trypsin inhibitor) and pre-alpha-inhibitor: current state and proposition of a new terminology, *Biol Chem Hoppe Seyler*, **371 Suppl**, 13-22.
- Geuijen, C. A., Willems, R. J. & Mooi, F. R. 1996, The major fimbrial subunit of Bordetella pertussis binds to sulfated sugars, *Infect Immun*, **64**, 2657-2665.
- Ghiselli, G. & Iozzo, R. V. 2000, Overexpression of bamacan/SMC3 causes transformation, *J Biol Chem*, **275**, 20235-20238.
- Ghiselli, G. & Agrawal, A. 2005, The human D-glucuronyl C5-epimerase gene is transcriptionally activated through the beta-catenin-TCF4 pathway, *Biochem J*, **390**, 493-499.
- Ghiselli, G. & Farber, S. A. 2005, D-glucuronyl C5-epimerase acts in dorso-ventral axis formation in zebrafish, *BMC Dev Biol*, **5**, 19.
- Gilat, D., Hershkoviz, R., Mekori, Y. A., Vlodaysky, I. & Lider, O. 1994, Regulation of adhesion of CD4+ T lymphocytes to intact or heparinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta, *J Immunol*, **153**, 4899-4906.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. E. & Sapp, M. 2001, Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate, *J Virol*, **75**, 1565-1570.
- Gladwin, A. J., Dixon, J., Loftus, S. K., Wasmuth, J. J. & Dixon, M. J. 1996, Genomic organization of the human heparan sulfate-N-deacetylase/N-sulfotransferase gene: exclusion from a causative role in the pathogenesis of Treacher Collins syndrome, *Genomics*, **32**, 471-473.
- Gold, L. I. 1999, The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer, *Crit Rev Oncog*, **10**, 303-360.
- Gong, F., Jemth, P., Escobar Galvis, M. L., Vlodaysky, I., Horner, A., Lindahl, U. & Li, J. P. 2003, Processing of macromolecular heparin by heparanase, *J Biol Chem*, **278**, 35152-35158.
- Gonzalez-Cuadrado, S., Bustos, C., Ruiz-Ortega, M., Ortiz, A., Guijarro, C., Plaza, J. J. & Egido, J. 1996, Expression of leucocyte chemoattractants by interstitial renal fibroblasts: up-regulation by drugs associated with interstitial fibrosis, *Clin Exp Immunol*, **106**, 518-522.

- Goodger, S. J., Robinson, C. J., Murphy, K. J., Gasiunas, N., Harmer, N. J., Blundell, T. L., Pye, D. A. & Gallagher, J. T. 2008, Evidence that heparin saccharides promote FGF2 mitogenesis through two distinct mechanisms, *J Biol Chem*, **283**, 13001-13008.
- Goodison, S., Urquidi, V. & Tarin, D. 1999, CD44 cell adhesion molecules, *Mol Pathol*, **52**, 189-196.
- Gorsi, B. & Stringer, S. E. 2007, Tinkering with heparan sulfate sulfation to steer development, *Trends Cell Biol*, **17**, 173-177.
- Gospodarowicz, D. & Cheng, J. 1986, Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation, *J Cell Physiol*, **128**, 475-484.
- Gotte, M. 2003, Syndecans in inflammation, *FASEB J*, **17**, 575-591.
- Gotting, C., Kuhn, J., Zahn, R., Brinkmann, T. & Kleesiek, K. 2000, Molecular cloning and expression of human UDP-d-Xylose:proteoglycan core protein beta-d-xylosyltransferase and its first isoform XT-II, *J Mol Biol*, **304**, 517-528.
- Granes, F., Urena, J. M., Rocamora, N. & Vilaro, S. 2000, Ezrin links syndecan-2 to the cytoskeleton, *J Cell Sci*, **113 (Pt 7)**, 1267-1276.
- Granes, F., Berndt, C., Roy, C., Mangeat, P., Reina, M. & Vilaro, S. 2003, Identification of a novel Ezrin-binding site in syndecan-2 cytoplasmic domain, *FEBS Lett*, **547**, 212-216.
- Gray, N. K. & Wickens, M. 1998, Control of translation initiation in animals, *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 399-458.
- Greenfield, B., Wang, W. C., Marquardt, H., Piepkorn, M., Wolff, E. A., Aruffo, A. & Bennett, K. L. 1999, Characterization of the heparan sulfate and chondroitin sulfate assembly sites in CD44, *J Biol Chem*, **274**, 2511-2517.
- Greiling, H. 1994, Structure and biological functions of keratan sulfate proteoglycans, *EXS*, **70**, 101-122.
- Grigorieva, E., Eshchenko, T., Rykova, V. I., Chernakov, A., Zabarovsky, E. & Sidorov, S. V. 2008, Decreased expression of human D-glucuronyl C5-epimerase in breast cancer, *Int J Cancer*, **122**, 1172-1176.
- Grigoriu, B. D., Depontieu, F., Scherpereel, A., Gourcerol, D., Devos, P., Ouatas, T., Lafitte, J. J., Copin, M. C., Tonnel, A. B. & Lassalle, P. 2006, Endocan expression and relationship with survival in human non-small cell lung cancer, *Clin Cancer Res*, **12**, 4575-4582.
- Grobe, K. & Esko, J. D. 2002, Regulated translation of heparan sulfate N-acetylglucosamine N-deacetylase/n-sulfotransferase isozymes by structured 5'-untranslated regions and internal ribosome entry sites, *J Biol Chem*, **277**, 30699-30706.
- Grobe, K., Ledin, J., Ringvall, M., Holmborn, K., Forsberg, E., Esko, J. D. & Kjellen, L. 2002, Heparan sulfate and development: differential roles of the N-acetylglucosamine N-deacetylase/N-sulfotransferase isozymes, *Biochim Biophys Acta*, **1573**, 209-215.
- Grobe, K., Inatani, M., Pallerla, S. R., Castagnola, J., Yamaguchi, Y. & Esko, J. D. 2005, Cerebral hypoplasia and craniofacial defects in mice lacking heparan sulfate Ndst1 gene function, *Development*, **132**, 3777-3786.
- Guimond, S., Maccarana, M., Olwin, B. B., Lindahl, U. & Rapraeger, A. C. 1993, Activating and inhibitory heparin sequences for FGF-2 (basic FGF). Distinct requirements for FGF-1, FGF-2, and FGF-4, *J Biol Chem*, **268**, 23906-23914.
- Guimond, S. E. & Turnbull, J. E. 1999, Fibroblast growth factor receptor signalling is dictated by specific heparan sulphate saccharides, *Curr Biol*, **9**, 1343-1346.

- Gulberti, S., Lattard, V., Fondeur, M., Jacquinet, J. C., Mulliert, G., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M. & Fournel-Gigleux, S. 2005, Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human beta1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I) and beta1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans, *J Biol Chem*, **280**, 1417-1425.
- Habuchi, H., Habuchi, O. & Kimata, K. 1995, Purification and characterization of heparan sulfate 6-sulfotransferase from the culture medium of Chinese hamster ovary cells, *J Biol Chem*, **270**, 4172-4179.
- Habuchi, H., Kobayashi, M. & Kimata, K. 1998, Molecular characterization and expression of heparan-sulfate 6-sulfotransferase. Complete cDNA cloning in human and partial cloning in Chinese hamster ovary cells, *J Biol Chem*, **273**, 9208-9213.
- Habuchi, O. 2000, Diversity and functions of glycosaminoglycan sulfotransferases, *Biochim Biophys Acta*, **1474**, 115-127.
- Habuchi, H., Tanaka, M., Habuchi, O., Yoshida, K., Suzuki, H., Ban, K. & Kimata, K. 2000, The occurrence of three isoforms of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase having different specificities for hexuronic acid adjacent to the targeted N-sulfoglucosamine, *J Biol Chem*, **275**, 2859-2868.
- Habuchi, H., Miyake, G., Nogami, K., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Kusche-Gullberg, M., Habuchi, O., Tanaka, M. & Kimata, K. 2003, Biosynthesis of heparan sulphate with diverse structures and functions: two alternatively spliced forms of human heparan sulphate 6-O-sulphotransferase-2 having different expression patterns and properties, *Biochem J*, **371**, 131-142.
- Habuchi, H., Nagai, N., Sugaya, N., Atsumi, F., Stevens, R. L. & Kimata, K. 2007, Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 exhibit defective heparan sulfate biosynthesis, abnormal placentation, and late embryonic lethality, *J Biol Chem*, **282**, 15578-15588.
- Hagner-McWhirter, A., Hannesson, H. H., Campbell, P., Westley, J., Roden, L., Lindahl, U. & Li, J. P. 2000a, Biosynthesis of heparin/heparan sulfate: kinetic studies of the glucuronyl C5-epimerase with N-sulfated derivatives of the Escherichia coli K5 capsular polysaccharide as substrates, *Glycobiology*, **10**, 159-171.
- Hagner-McWhirter, A., Lindahl, U. & Li, J. P. 2000b, Biosynthesis of heparin/heparan sulphate: mechanism of epimerization of glucuronyl C-5, *Biochem J*, **347 Pt 1**, 69-75.
- Hagner-McWhirter, A., Li, J. P., Oscarson, S. & Lindahl, U. 2004, Irreversible glucuronyl C5-epimerization in the biosynthesis of heparan sulfate, *J Biol Chem*, **279**, 14631-14638.
- HajMohammadi, S., Enjyoji, K., Princivale, M., Christi, P., Lech, M., Beeler, D., Rayburn, H., Schwartz, J. J., Barzegar, S., de Agostini, A. I., Post, M. J., Rosenberg, R. D. & Shworak, N. W. 2003, Normal levels of anticoagulant heparan sulfate are not essential for normal hemostasis, *J Clin Invest*, **111**, 989-999.
- Halfter, W., Dong, S., Schurer, B. & Cole, G. J. 1998, Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, *J Biol Chem*, **273**, 25404-25412.
- Hamel, D. J., Sielaff, I., Proudfoot, A. E. & Handel, T. M. 2009, Chapter 4. Interactions of chemokines with glycosaminoglycans, *Methods Enzymol*, **461**, 71-102.
- Handel, T. M., Johnson, Z., Crown, S. E., Lau, E. K. & Proudfoot, A. E. 2005, Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines, *Annu Rev Biochem*, **74**, 385-410.

- Handley, C. J., Samiric, T. & Ilic, M. Z. 2006, Structure, metabolism, and tissue roles of chondroitin sulfate proteoglycans, *Adv Pharmacol*, **53**, 219-232.
- Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J. & Speicher, D. W. 1984, Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A, *Science*, **226**, 544-547.
- Harmer, N. J., Ilag, L. L., Mulloy, B., Pellegrini, L., Robinson, C. V. & Blundell, T. L. 2004, Towards a resolution of the stoichiometry of the fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor-heparin complex, *J Mol Biol*, **339**, 821-834.
- Hashimoto, Y., Orellana, A., Gil, G. & Hirschberg, C. B. 1992, Molecular cloning and expression of rat liver N-heparan sulfate sulfotransferase, *J Biol Chem*, **267**, 15744-15750.
- Hassell, J., Yamada, Y. & Arikawa-Hirasawa, E. 2002, Role of perlecan in skeletal development and diseases, *Glycoconj J*, **19**, 263-267.
- Hayashi, K., Madri, J. A. & Yurchenco, P. D. 1992, Endothelial cells interact with the core protein of basement membrane perlecan through beta 1 and beta 3 integrins: an adhesion modulated by glycosaminoglycan, *J Cell Biol*, **119**, 945-959.
- Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Hess, A. R. & Seftor, R. E. 2003, Molecular plasticity of human melanoma cells, *Oncogene*, **22**, 3070-3075.
- Henis, Y. I., Moustakas, A., Lin, H. Y. & Lodish, H. F. 1994, The types II and III transforming growth factor-beta receptors form homo-oligomers, *J Cell Biol*, **126**, 139-154.
- Henningsson, F., Ledin, J., Lunderius, C., Wilen, M., Hellman, L. & Pejler, G. 2002, Altered storage of proteases in mast cells from mice lacking heparin: a possible role for heparin in carboxypeptidase A processing, *Biol Chem*, **383**, 793-801.
- Herold, B. C., WuDunn, D., Soltys, N. & Spear, P. G. 1991, Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity, *J Virol*, **65**, 1090-1098.
- Hildebrand, A., Romaris, M., Rasmussen, L. M., Heinegard, D., Twardzik, D. R., Border, W. A. & Ruoslahti, E. 1994, Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta, *Biochem J*, **302 (Pt 2)**, 527-534.
- Hileman, R. E., Jennings, R. N. & Linhardt, R. J. 1998, Thermodynamic analysis of the heparin interaction with a basic cyclic peptide using isothermal titration calorimetry, *Biochemistry*, **37**, 15231-15237.
- Hocking, A. M., Shinomura, T. & McQuillan, D. J. 1998, Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix, *Matrix Biol*, **17**, 1-19.
- Holmborn, K., Ledin, J., Smeds, E., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M. & Kjellen, L. 2004, Heparan sulfate synthesized by mouse embryonic stem cells deficient in NDST1 and NDST2 is 6-O-sulfated but contains no N-sulfate groups, *J Biol Chem*, **279**, 42355-42358.
- Holmer, E., Soderstrom, G. & Andersson, L. O. 1979, Studies on the mechanism of the rate-enhancing effect of heparin on the thrombin-antithrombin III reaction, *Eur J Biochem*, **93**, 1-5.
- Hoogewerf, A. J., Leone, J. W., Reardon, I. M., Howe, W. J., Asa, D., Heinrikson, R. L. & Ledbetter, S. R. 1995, CXC chemokines connective tissue activating peptide-III and neutrophil activating peptide-2 are heparin/heparan sulfate-degrading enzymes, *J Biol Chem*, **270**, 3268-3277.
- Hoogewerf, A. J., Kuschert, G. S., Proudfoot, A. E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C. A. & Wells, T. N. 1997, Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines, *Biochemistry*, **36**, 13570-13578.

- Hook, M., Lindahl, U., Hallen, A. & Backstrom, G. 1975, Biosynthesis of heparin. Studies on the microsomal sulfation process, *J Biol Chem*, **250**, 6065-6071.
- Hook, M., Bjork, I., Hopwood, J. & Lindahl, U. 1976, Anticoagulant activity of heparin: separation of high-activity and low-activity heparin species by affinity chromatography on immobilized antithrombin, *FEBS Lett*, **66**, 90-93.
- Hook, M., Riesenfeld, J. & Lindahl, U. 1982, N-[3H]Acetyl-labeling, a convenient method for radiolabeling of glycosaminoglycans, *Anal Biochem*, **119**, 236-245.
- Horowitz, A., Murakami, M., Gao, Y. & Simons, M. 1999, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate mediates the interaction of syndecan-4 with protein kinase C, *Biochemistry*, **38**, 15871-15877.
- Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J. & Ferrara, N. 1992, Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms, *J Biol Chem*, **267**, 26031-26037.
- Hsueh, Y. P., Yang, F. C., Kharazia, V., Naisbitt, S., Cohen, A. R., Weinberg, R. J. & Sheng, M. 1998, Direct interaction of CASK/LIN-2 and syndecan heparan sulfate proteoglycan and their overlapping distribution in neuronal synapses, *J Cell Biol*, **142**, 139-151.
- Hulett, M. D., Freeman, C., Hamdorf, B. J., Baker, R. T., Harris, M. J. & Parish, C. R. 1999, Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis, *Nat Med*, **5**, 803-809.
- Humphries, D. E., Sullivan, B. M., Aleixo, M. D. & Stow, J. L. 1997, Localization of human heparan glucosaminyl N-deacetylase/N-sulphotransferase to the trans-Golgi network, *Biochem J*, **325 (Pt 2)**, 351-357.
- Humphries, D. E., Lanciotti, J. & Karlinsky, J. B. 1998, cDNA cloning, genomic organization and chromosomal localization of human heparan glucosaminyl N-deacetylase/N-sulphotransferase-2, *Biochem J*, **332 (Pt 2)**, 303-307.
- Humphries, D. E., Wong, G. W., Friend, D. S., Gurish, M. F., Qiu, W. T., Huang, C., Sharpe, A. H. & Stevens, R. L. 1999, Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells, *Nature*, **400**, 769-772.
- Ibrahim, J., Griffin, P., Coombe, D. R., Rider, C. C. & James, W. 1999, Cell-surface heparan sulfate facilitates human immunodeficiency virus Type 1 entry into some cell lines but not primary lymphocytes, *Virus Res*, **60**, 159-169.
- Ihrcke, N. S., Parker, W., Reissner, K. J. & Platt, J. L. 1998, Regulation of platelet heparanase during inflammation: role of pH and proteinases, *J Cell Physiol*, **175**, 255-267.
- Ilangumaran, S., He, H. T. & Hoessli, D. C. 2000, Microdomains in lymphocyte signalling: beyond GPI-anchored proteins, *Immunol Today*, **21**, 2-7.
- Imberty, A., Lortat-Jacob, H. & Perez, S. 2007, Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions, *Carbohydr Res*, **342**, 430-439.
- Iozzo, R. V. & Murdoch, A. D. 1996, Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function, *FASEB J*, **10**, 598-614.
- Iozzo, R. V. 1998, Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function, *Annu Rev Biochem*, **67**, 609-652.
- Iozzo, R. V. 2005, Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 646-656.

- Isacke, C. M. & Yarwood, H. 2002, The hyaluronan receptor, CD44, *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 718-721.
- Ishai-Michaeli, R., Eldor, A. & Vlodavsky, I. 1990, Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix, *Cell Regul*, **1**, 833-842.
- Ishihara, M., Kiefer, M. C., Barr, P. J., Guo, Y. & Swiedler, S. J. 1992, Selection of COS cell mutants defective in the biosynthesis of heparan sulfate proteoglycan, *Anal Biochem*, **206**, 400-407.
- Ishitsuka, R., Sato, S. B. & Kobayashi, T. 2005, Imaging lipid rafts, *J Biochem*, **137**, 249-254.
- Izvolosky, K. I., Lu, J., Martin, G., Albrecht, K. H. & Cardoso, W. V. 2008, Systemic inactivation of Hs6st1 in mice is associated with late postnatal mortality without major defects in organogenesis, *Genesis*, **46**, 8-18.
- Jackson, D. G., Bell, J. I., Dickinson, R., Timans, J., Shields, J. & Whittle, N. 1995, Proteoglycan forms of the lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the v3 exon, *J Cell Biol*, **128**, 673-685.
- Jackson, D. G. 1997, Human leucocyte heparan sulphate proteoglycans and their roles in inflammation, *Biochem Soc Trans*, **25**, 220-224.
- Jacobsson, I., Hook, M., Pettersson, I., Lindahl, U., Larm, O., Wiren, E. & von Figura, K. 1979, Identification of N-sulphated disaccharide units in heparin-like polysaccharides, *Biochem J*, **179**, 77-87.
- Jacobsson, I., Lindahl, U., Jensen, J. W., Roden, L., Prihar, H. & Feingold, D. S. 1984, Biosynthesis of heparin. Substrate specificity of heparosan N-sulfate D-glucuronosyl 5-epimerase, *J Biol Chem*, **259**, 1056-1063.
- Jemth, P., Smeds, E., Do, A. T., Habuchi, H., Kimata, K., Lindahl, U. & Kusche-Gullberg, M. 2003, Oligosaccharide library-based assessment of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase substrate specificity, *J Biol Chem*, **278**, 24371-24376.
- Jin, Z. G., Melaragno, M. G., Liao, D. F., Yan, C., Haendeler, J., Suh, Y. A., Lambeth, J. D. & Berk, B. C. 2000, Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress, *Circ Res*, **87**, 789-796.
- Johnson, P. R. 2001, Role of human airway smooth muscle in altered extracellular matrix production in asthma, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **28**, 233-236.
- Jones, M., Tussey, L., Athanasou, N. & Jackson, D. G. 2000, Heparan sulfate proteoglycan isoforms of the CD44 hyaluronan receptor induced in human inflammatory macrophages can function as paracrine regulators of fibroblast growth factor action, *J Biol Chem*, **275**, 7964-7974.
- Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D. C., Huang, Y. & Ruscetti, F. W. 2005, Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells, *J Virol*, **79**, 12692-12702.
- Kakuta, Y., Pedersen, L. G., Carter, C. W., Negishi, M. & Pedersen, L. C. 1997, Crystal structure of estrogen sulphotransferase, *Nat Struct Biol*, **4**, 904-908.
- Kakuta, Y., Pedersen, L. G., Pedersen, L. C. & Negishi, M. 1998, Conserved structural motifs in the sulfotransferase family, *Trends Biochem Sci*, **23**, 129-130.
- Kakuta, Y., Sueyoshi, T., Negishi, M. & Pedersen, L. C. 1999, Crystal structure of the sulfotransferase domain of human heparan sulfate N-deacetylase/ N-sulfotransferase 1, *J Biol Chem*, **274**, 10673-10676.

- Kakuta, Y., Li, L., Pedersen, L. C., Pedersen, L. G. & Negishi, M. 2003, Heparan sulphate N-sulphotransferase activity: reaction mechanism and substrate recognition, *Biochem Soc Trans*, **31**, 331-334.
- Karamanos, N. K., Vanky, P., Syrokou, A. & Hjerpe, A. 1995, Identity of dermatan and chondroitin sequences in dermatan sulfate chains determined by using fragmentation with chondroitinases and ion-pair high-performance liquid chromatography, *Anal Biochem*, **225**, 220-230.
- Kato, M., Wang, H., Kainulainen, V., Fitzgerald, M. L., Ledbetter, S., Ornitz, D. M. & Bernfield, M. 1998, Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2, *Nat Med*, **4**, 691-697.
- Kilpelainen, I., Kaksonen, M., Kinnunen, T., Avikainen, H., Fath, M., Linhardt, R. J., Rauho, E. & Rauvala, H. 2000, Heparin-binding growth-associated molecule contains two heparin-binding beta -sheet domains that are homologous to the thrombospondin type I repeat, *J Biol Chem*, **275**, 13564-13570.
- Kim, C. W., Goldberger, O. A., Gallo, R. L. & Bernfield, M. 1994, Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns, *Mol Biol Cell*, **5**, 797-805.
- Kim, B. T., Kitagawa, H., Tamura, J., Saito, T., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U. & Sugahara, K. 2001, Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/heparin biosynthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7176-7181.
- Kim, B. T., Kitagawa, H., Tanaka, J., Tamura, J. & Sugahara, K. 2003, In vitro heparan sulfate polymerization: crucial roles of core protein moieties of primer substrates in addition to the EXT1-EXT2 interaction, *J Biol Chem*, **278**, 41618-41623.
- Kinnunen, T., Kaksonen, M., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Peng, H. B. & Rauvala, H. 1998, Cortactin-Src kinase signaling pathway is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth, *J Biol Chem*, **273**, 10702-10708.
- Kinsella, L., Chen, H. L., Smith, J. A., Rudland, P. S. & Fernig, D. G. 1998, Interactions of putative heparin-binding domains of basic fibroblast growth factor and its receptor, FGFR-1, with heparin using synthetic peptides, *Glycoconj J*, **15**, 419-422.
- Kirkpatrick, C. A. & Selleck, S. B. 2007, Heparan sulfate proteoglycans at a glance, *J Cell Sci*, **120**, 1829-1832.
- Kitagawa, H., Tone, Y., Tamura, J., Neumann, K. W., Ogawa, T., Oka, S., Kawasaki, T. & Sugahara, K. 1998, Molecular cloning and expression of glucuronyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans, *J Biol Chem*, **273**, 6615-6618.
- Kitagawa, H., Shimakawa, H. & Sugahara, K. 1999, The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate, *J Biol Chem*, **274**, 13933-13937.
- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T. C. & Hashimoto, Y. 2001, Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13554-13559.

- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Kotani, N., Ogawa, K., Suzuki, M., Dohmae, N., Takio, K., Saido, T. C. & Hashimoto, Y. 2003, Characterization of alpha 2,6-sialyltransferase cleavage by Alzheimer's beta -secretase (BACE1), *J Biol Chem*, **278**, 14865-14871.
- Kjellen, L., Bielefeld, D. & Hook, M. 1983, Reduced sulfation of liver heparan sulfate in experimentally diabetic rats, *Diabetes*, **32**, 337-342.
- Kjellen, L. 2003, Glucosaminyl N-deacetylase/N-sulphotransferases in heparan sulphate biosynthesis and biology, *Biochem Soc Trans*, **31**, 340-342.
- Kobayashi, M., Habuchi, H., Habuchi, O., Saito, M. & Kimata, K. 1996, Purification and characterization of heparan sulfate 2-sulfotransferase from cultured Chinese hamster ovary cells, *J Biol Chem*, **271**, 7645-7653.
- Kobayashi, M., Habuchi, H., Yoneda, M., Habuchi, O. & Kimata, K. 1997, Molecular cloning and expression of Chinese hamster ovary cell heparan-sulfate 2-sulfotransferase, *J Biol Chem*, **272**, 13980-13985.
- Kobayashi, M., Sugumaran, G., Liu, J., Shworak, N. W., Silbert, J. E. & Rosenberg, R. D. 1999, Molecular cloning and characterization of a human uronyl 2-sulfotransferase that sulfates iduronyl and glucuronyl residues in dermatan/chondroitin sulfate, *J Biol Chem*, **274**, 10474-10480.
- Koike, T., Izumikawa, T., Tamura, J. & Kitagawa, H. 2009, FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region, *Biochem J*, **421**, 157-162.
- Kolset, S. O. & Gallagher, J. T. 1990, Proteoglycans in haemopoietic cells, *Biochim Biophys Acta*, **1032**, 191-211.
- Kolset, S. O., Prydz, K. & Pejler, G. 2004, Intracellular proteoglycans, *Biochem J*, **379**, 217-227.
- Kolset, S. O. & Tveit, H. 2008, Serglycin--structure and biology, *Cell Mol Life Sci*, **65**, 1073-1085.
- Koopmann, W. & Krangel, M. S. 1997, Identification of a glycosaminoglycan-binding site in chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha, *J Biol Chem*, **272**, 10103-10109.
- Koyama, T., Parkinson, J. F., Sie, P., Bang, N. U., Muller-Berghaus, G. & Preissner, K. T. 1991, Different glycoforms of human thrombomodulin. Their glycosaminoglycan-dependent modulatory effects on thrombin inactivation by heparin cofactor II and antithrombin III, *Eur J Biochem*, **198**, 563-570.
- Kozak, M. 1999, Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes, *Gene*, **234**, 187-208.
- Kramer, K. L. & Yost, H. J. 2003, Heparan sulfate core proteins in cell-cell signaling, *Annu Rev Genet*, **37**, 461-484.
- Krenn, E. C., Wille, I., Gesslbauer, B., Poteser, M., van Kuppevelt, T. H. & Kungl, A. J. 2008, Glycanogenomics: a qPCR-approach to investigate biological glycan function, *Biochem Biophys Res Commun*, **375**, 297-302.
- Kresse, H. & Schonherr, E. 2001, Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control, *J Cell Physiol*, **189**, 266-274.
- Kreuger, J., Spillmann, D., Li, J. P. & Lindahl, U. 2006, Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity, *J Cell Biol*, **174**, 323-327.
- Krusius, T., Finne, J., Margolis, R. K. & Margolis, R. U. 1986, Identification of an O-glycosidic mannose-linked sialylated tetrasaccharide and keratan sulfate oligosaccharides in the chondroitin sulfate proteoglycan of brain, *J Biol Chem*, **261**, 8237-8242.

- Kuhn, J., Gotting, C., Schnolzer, M., Kempf, T., Brinkmann, T. & Kleesiek, K. 2001, First isolation of human UDP-D-xylose: proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase secreted from cultured JAR choriocarcinoma cells, *J Biol Chem*, **276**, 4940-4947.
- Kurup, S., Wijnhoven, T. J., Jenniskens, G. J., Kimata, K., Habuchi, H., Li, J. P., Lindahl, U., van Kuppevelt, T. H. & Spillmann, D. 2007, Characterization of anti-heparan sulfate phage display antibodies AO4B08 and HS4E4, *J Biol Chem*, **282**, 21032-21042.
- Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Pikas, D. S. & Kjellen, L. 1998, Identification and expression in mouse of two heparan sulfate glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase genes, *J Biol Chem*, **273**, 11902-11907.
- Kusche-Gullberg, M. & Kjellen, L. 2003, Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis, *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 605-611.
- Kuschert, G. S., Coulin, F., Power, C. A., Proudfoot, A. E., Hubbard, R. E., Hoogewerf, A. J. & Wells, T. N. 1999, Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses, *Biochemistry*, **38**, 12959-12968.
- Lai, J., Chien, J., Staub, J., Avula, R., Greene, E. L., Matthews, T. A., Smith, D. I., Kaufmann, S. H., Roberts, L. R. & Shridhar, V. 2003, Loss of HSulf-1 up-regulates heparin-binding growth factor signaling in cancer, *J Biol Chem*, **278**, 23107-23117.
- Lai, J. P., Chien, J. R., Moser, D. R., Staub, J. K., Aderca, I., Montoya, D. P., Matthews, T. A., Nagorney, D. M., Cunningham, J. M., Smith, D. I., Greene, E. L., Shridhar, V. & Roberts, L. R. 2004, hSulf1 Sulfatase promotes apoptosis of hepatocellular cancer cells by decreasing heparin-binding growth factor signaling, *Gastroenterology*, **126**, 231-248.
- Lamanna, W. C., Kalus, I., Padva, M., Baldwin, R. J., Merry, C. L. & Dierks, T. 2007, The heparanome--the enigma of encoding and decoding heparan sulfate sulfation, *J Biotechnol*, **129**, 290-307.
- Lamant, M., Smih, F., Harmancey, R., Philip-Couderc, P., Pathak, A., Roncalli, J., Galinier, M., Collet, X., Massabuau, P., Senard, J. M. & Rouet, P. 2006, ApoO, a novel apolipoprotein, is an original glycoprotein up-regulated by diabetes in human heart, *J Biol Chem*, **281**, 36289-36302.
- Lamari, F. N. & Karamanos, N. K. 2006, Structure of chondroitin sulfate, *Adv Pharmacol*, **53**, 33-48.
- Langsdorf, A., Do, A. T., Kusche-Gullberg, M., Emerson, C. P., Jr. & Ai, X. 2007, Sulfs are regulators of growth factor signaling for satellite cell differentiation and muscle regeneration, *Dev Biol*, **311**, 464-477.
- Lassalle, P., Molet, S., Janin, A., Heyden, J. V., Tavernier, J., Fiers, W., Devos, R. & Tonnel, A. B. 1996, ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines, *J Biol Chem*, **271**, 20458-20464.
- Lauder, R. M. 2009, Chondroitin sulphate: a complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems, *Complement Ther Med*, **17**, 56-62.
- Lawrence, R., Yabe, T., Hajmohammadi, S., Rhodes, J., McNeely, M., Liu, J., Lamperti, E. D., Toselli, P. A., Lech, M., Spear, P. G., Rosenberg, R. D. & Shworak, N. W. 2007, The principal neuronal gD-type 3-O-sulfotransferases and their products in central and peripheral nervous system tissues, *Matrix Biol*, **26**, 442-455.
- LeBaron, R. G., Hook, A., Esko, J. D., Gay, S. & Hook, M. 1989, Binding of heparan sulfate to type V collagen. A mechanism of cell-substrate adhesion, *J Biol Chem*, **264**, 7950-7956.
- LeBaron, R. G., Zimmermann, D. R. & Ruoslahti, E. 1992, Hyaluronate binding properties of versican, *J Biol Chem*, **267**, 10003-10010.

- Ledin, J., Staatz, W., Li, J. P., Gotte, M., Selleck, S., Kjellen, L. & Spillmann, D. 2004, Heparan sulfate structure in mice with genetically modified heparan sulfate production, *J Biol Chem*, **279**, 42732-42741.
- Ledin, J., Ringvall, M., Thuveson, M., Eriksson, I., Wilen, M., Kusche-Gullberg, M., Forsberg, E. & Kjellen, L. 2006, Enzymatically active N-deacetylase/N-sulfotransferase-2 is present in liver but does not contribute to heparan sulfate N-sulfation, *J Biol Chem*, **281**, 35727-35734.
- Lesley, J. & Hyman, R. 1998, CD44 structure and function, *Front Biosci*, **3**, d616-630.
- Lewis, K. A., Gray, P. C., Blount, A. L., MacConell, L. A., Wiater, E., Bilezikjian, L. M. & Vale, W. 2000, Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling, *Nature*, **404**, 411-414.
- Li, J., Hagner-McWhirter, A., Kjellen, L., Palgi, J., Jalkanen, M. & Lindahl, U. 1997, Biosynthesis of heparin/heparan sulfate. cDNA cloning and expression of D-glucuronyl C5-epimerase from bovine lung, *J Biol Chem*, **272**, 28158-28163.
- Li, J. P., Gong, F., El Darwish, K., Jalkanen, M. & Lindahl, U. 2001, Characterization of the D-glucuronyl C5-epimerase involved in the biosynthesis of heparin and heparan sulfate, *J Biol Chem*, **276**, 20069-20077.
- Li, J. P., Gong, F., Hagner-McWhirter, A., Forsberg, E., Abrink, M., Kisilevsky, R., Zhang, X. & Lindahl, U. 2003, Targeted disruption of a murine glucuronyl C5-epimerase gene results in heparan sulfate lacking L-iduronic acid and in neonatal lethality, *J Biol Chem*, **278**, 28363-28366.
- Li, W., Johnson, D. J., Esmon, C. T. & Huntington, J. A. 2004, Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin, *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 857-862.
- Li, J., Kleeff, J., Abiatari, I., Kayed, H., Giese, N. A., Felix, K., Giese, T., Buchler, M. W. & Friess, H. 2005, Enhanced levels of Hsulf-1 interfere with heparin-binding growth factor signaling in pancreatic cancer, *Mol Cancer*, **4**, 14.
- Liang, O. D., Ascencio, F., Fransson, L. A. & Wadstrom, T. 1992, Binding of heparan sulfate to *Staphylococcus aureus*, *Infect Immun*, **60**, 899-906.
- Liang, Y., Haring, M., Roughley, P. J., Margolis, R. K. & Margolis, R. U. 1997, Glypican and biglycan in the nuclei of neurons and glioma cells: presence of functional nuclear localization signals and dynamic changes in glypican during the cell cycle, *J Cell Biol*, **139**, 851-864.
- Liao, D. F., Jin, Z. G., Baas, A. S., Daum, G., Gygi, S. P., Aebersold, R. & Berk, B. C. 2000, Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem*, **275**, 189-196.
- Lidholt, K., Kjellen, L. & Lindahl, U. 1989, Biosynthesis of heparin. Relationship between the polymerization and sulphation processes, *Biochem J*, **261**, 999-1007.
- Lidholt, K. & Lindahl, U. 1992, Biosynthesis of heparin. The D-glucuronosyl- and N-acetyl-D-glucosaminyltransferase reactions and their relation to polymer modification, *Biochem J*, **287** (Pt 1), 21-29.
- Lindahl, U., Jacobsson, I., Hook, M., Backstrom, G. & Feingold, D. S. 1976, Biosynthesis of heparin. Loss of C-5 hydrogen during conversion of D-glucuronic to L-iduronic acid residues, *Biochem Biophys Res Commun*, **70**, 492-499.

- Lindahl, U., Backstrom, G., Hook, M., Thunberg, L., Fransson, L. A. & Linker, A. 1979, Structure of the antithrombin-binding site in heparin, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 3198-3202.
- Lindahl, U., Backstrom, G., Thunberg, L. & Leder, I. G. 1980, Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 6551-6555.
- Lindahl, B. & Lindahl, U. 1997, Amyloid-specific heparan sulfate from human liver and spleen, *J Biol Chem*, **272**, 26091-26094.
- Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M. & Kjellen, L. 1998, Regulated diversity of heparan sulfate, *J Biol Chem*, **273**, 24979-24982.
- Lindahl, U. 2007, Heparan sulfate-protein interactions--a concept for drug design?, *Thromb Haemost*, **98**, 109-115.
- Lindahl, U. & Li, J. P. 2009, Interactions between heparan sulfate and proteins-design and functional implications, *Int Rev Cell Mol Biol*, **276**, 105-159.
- Linker, A., Hoffman, P., Sampson, P. & Meyer, K. 1958, Heparitin sulfate, *Biochim Biophys Acta*, **29**, 443-444.
- Lipscombe, R. J., Nakhoul, A. M., Sanderson, C. J. & Coombe, D. R. 1998, Interleukin-5 binds to heparin/heparan sulfate. A model for an interaction with extracellular matrix, *J Leukoc Biol*, **63**, 342-350.
- Liu, J., Shworak, N. W., Fritze, L. M., Edelberg, J. M. & Rosenberg, R. D. 1996, Purification of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase, *J Biol Chem*, **271**, 27072-27082.
- Liu, J., Shriver, Z., Blaiklock, P., Yoshida, K., Sasisekharan, R. & Rosenberg, R. D. 1999a, Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3A sulfates N-unsubstituted glucosamine residues, *J Biol Chem*, **274**, 38155-38162.
- Liu, J., Shworak, N. W., Sinay, P., Schwartz, J. J., Zhang, L., Fritze, L. M. & Rosenberg, R. D. 1999b, Expression of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase isoforms reveals novel substrate specificities, *J Biol Chem*, **274**, 5185-5192.
- Liu, J., Shriver, Z., Pope, R. M., Thorp, S. C., Duncan, M. B., Copeland, R. J., Raska, C. S., Yoshida, K., Eisenberg, R. J., Cohen, G., Linhardt, R. J. & Sasisekharan, R. 2002, Characterization of a heparan sulfate octasaccharide that binds to herpes simplex virus type 1 glycoprotein D, *J Biol Chem*, **277**, 33456-33467.
- Liu, J. & Thorp, S. C. 2002, Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections, *Med Res Rev*, **22**, 1-25.
- Lopes, C. C., Dietrich, C. P. & Nader, H. B. 2006a, Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling, *Braz J Med Biol Res*, **39**, 157-167.
- Lopes, C. C., Toma, L., Pinhal, M. A., Porcionatto, M. A., Sogayar, M. C., Dietrich, C. P. & Nader, H. B. 2006b, EJ-ras oncogene transfection of endothelial cells upregulates the expression of syndecan-4 and downregulates heparan sulfate sulfotransferases and epimerase, *Biochimie*, **88**, 1493-1504.
- Lopez-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J. L., Lane, W. S. & Massague, J. 1991, Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system, *Cell*, **67**, 785-795.
- Lopez-Casillas, F., Payne, H. M., Andres, J. L. & Massague, J. 1994, Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites, *J Cell Biol*, **124**, 557-568.

- Lortat-Jacob, H. & Grimaud, J. A. 1991, Interferon-gamma C-terminal function: new working hypothesis. Heparan sulfate and heparin, new targets for IFN-gamma, protect, relax the cytokine and regulate its activity, *Cell Mol Biol*, **37**, 253-260.
- Lortat-Jacob, H., Turnbull, J. E. & Grimaud, J. A. 1995, Molecular organization of the interferon gamma-binding domain in heparan sulphate, *Biochem J*, **310 (Pt 2)**, 497-505.
- Lortat-Jacob, H., Baltzer, F. & Grimaud, J. A. 1996, Heparin decreases the blood clearance of interferon-gamma and increases its activity by limiting the processing of its carboxyl-terminal sequence, *J Biol Chem*, **271**, 16139-16143.
- Lortat-Jacob, H., Grosdidier, A. & Imberty, A. 2002, Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1229-1234.
- Lyon, M., Deakin, J. A., Mizuno, K., Nakamura, T. & Gallagher, J. T. 1994, Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate. Elucidation of the major heparan sulfate structural determinants, *J Biol Chem*, **269**, 11216-11223.
- Lyon, M., Rushton, G. & Gallagher, J. T. 1997, The interaction of the transforming growth factor-betas with heparin/heparan sulfate is isoform-specific, *J Biol Chem*, **272**, 18000-18006.
- MacArthur, J. M., Bishop, J. R., Stanford, K. I., Wang, L., Bensadoun, A., Witztum, J. L. & Esko, J. D. 2007, Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members, *J Clin Invest*, **117**, 153-164.
- Maccarana, M., Sakura, Y., Tawada, A., Yoshida, K. & Lindahl, U. 1996, Domain structure of heparan sulfates from bovine organs, *J Biol Chem*, **271**, 17804-17810.
- Machamer, C. E. 1993, Targeting and retention of Golgi membrane proteins, *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 606-612.
- Mahley, R. W. & Ji, Z. S. 1999, Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E, *J Lipid Res*, **40**, 1-16.
- Makatsori, E., Karamanos, N. K., Papadogiannakis, N., Hjerpe, A., Anastassiou, E. D. & Tseggenidis, T. 2001, Synthesis and distribution of glycosaminoglycans in human leukemic B- and T-cells and monocytes studied using specific enzymic treatments and high-performance liquid chromatography, *Biomed Chromatogr*, **15**, 413-417.
- Malmstrom, A., Roden, L., Feingold, D. S., Jacobsson, I., Backstrom, G. & Lindahl, U. 1980, Biosynthesis of heparin. Partial purification of the uronosyl C-5 epimerase, *J Biol Chem*, **255**, 3878-3883.
- Malmstrom, A. & Aberg, L. 1982, Biosynthesis of dermatan sulphate. Assay and properties of the uronosyl C-5 epimerase, *Biochem J*, **201**, 489-493.
- Manakil, J. F., Sugerman, P. B., Li, H., Seymour, G. J. & Bartold, P. M. 2001, Cell-surface proteoglycan expression by lymphocytes from peripheral blood and gingiva in health and periodontal disease, *J Dent Res*, **80**, 1704-1710.
- Mandon, E., Kempner, E. S., Ishihara, M. & Hirschberg, C. B. 1994, A monomeric protein in the Golgi membrane catalyzes both N-deacetylation and N-sulfation of heparan sulfate, *J Biol Chem*, **269**, 11729-11733.
- Mann, D. M., Yamaguchi, Y., Bourdon, M. A. & Ruoslahti, E. 1990, Analysis of glycosaminoglycan substitution in decorin by site-directed mutagenesis, *J Biol Chem*, **265**, 5317-5323.
- Margolis, R. U. & Margolis, R. K. 1997, Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding, *Cell Tissue Res*, **290**, 343-348.

- Marneros, A. G. & Olsen, B. R. 2005, Physiological role of collagen XVIII and endostatin, *FASEB J*, **19**, 716-728.
- Marshall, L. J., Ramdin, L. S., Brooks, T., PC, D. P. & Shute, J. K. 2003, 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*, **171**, 2057-2065.
- Martin, T. A., Harrison, G., Mansel, R. E. & Jiang, W. G. 2003, The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis, *Crit Rev Oncol Hematol*, **46**, 165-186.
- Mascotti, D. P. & Lohman, T. M. 1995, Thermodynamics of charged oligopeptide-heparin interactions, *Biochemistry*, **34**, 2908-2915.
- Matsuura, H., Momota, Y., Murata, K., Matsushima, H., Suzuki, N., Nomizu, M., Shinkai, H. & Utani, A. 2004, Localization of the laminin alpha4 chain in the skin and identification of a heparin-dependent cell adhesion site within the laminin alpha4 chain C-terminal LG4 module, *J Invest Dermatol*, **122**, 614-620.
- Matsuzaki, H., Kobayashi, H., Yagyu, T., Wakahara, K., Kondo, T., Kurita, N., Sekino, H., Inagaki, K., Suzuki, M., Kanayama, N. & Terao, T. 2004, Bikunin inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha induction in macrophages, *Clin Diagn Lab Immunol*, **11**, 1140-1147.
- Mbemba, E., Slimani, H., Atemezem, A., Saffar, L. & Gattegno, L. 2001, Glycans are involved in RANTES binding to CCR5 positive as well as to CCR5 negative cells, *Biochim Biophys Acta*, **1510**, 354-366.
- McCaffrey, T. A., Falcone, D. J., Brayton, C. F., Agarwal, L. A., Welt, F. G. & Weksler, B. B. 1989, Transforming growth factor-beta activity is potentiated by heparin via dissociation of the transforming growth factor-beta/alpha 2-macroglobulin inactive complex, *J Cell Biol*, **109**, 441-448.
- McCaffrey, T. A., Falcone, D. J., Borth, W. & Weksler, B. B. 1994a, Alpha 2-macroglobulin/transforming growth factor-beta 1 interactions. Modulation by heparin-like molecules and effects on vascular smooth muscle cells, *Ann N Y Acad Sci*, **737**, 368-382.
- McCaffrey, T. A., Falcone, D. J., Vicente, D., Du, B., Consigli, S. & Borth, W. 1994b, Protection of transforming growth factor-beta 1 activity by heparin and fucoidan, *J Cell Physiol*, **159**, 51-59.
- McCormick, C., Duncan, G., Goutsos, K. T. & Tufaro, F. 2000, The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 668-673.
- McKenzie, E., Tyson, K., Stamps, A., Smith, P., Turner, P., Barry, R., Hircock, M., Patel, S., Barry, E., Stubberfield, C., Terrett, J. & Page, M. 2000, Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member, *Biochem Biophys Res Commun*, **276**, 1170-1177.
- McKenzie, E. A. 2007, Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation, *Br J Pharmacol*, **151**, 1-14.
- Meissen, J. K., Sweeney, M. D., Girardi, M., Lawrence, R., Esko, J. D. & Leary, J. A. 2009, Differentiation of 3-O-sulfated heparin disaccharide isomers: identification of structural aspects of the heparin CCL2 binding motif, *J Am Soc Mass Spectrom*, **20**, 652-657.
- Melchior, A., Denys, A., Deligny, A., Mazurier, J. & Allain, F. 2008, Cyclophilin B induces integrin-mediated cell adhesion by a mechanism involving CD98-dependent activation of

- protein kinase C-delta and p44/42 mitogen-activated protein kinases, *Exp Cell Res*, **314**, 616-628.
- Melrose, J., Smith, S. & Whitelock, J. 2004, Perlecan immunolocalizes to perichondrial vessels and canals in human fetal cartilaginous primordia in early vascular and matrix remodeling events associated with diarthrodial joint development, *J Histochem Cytochem*, **52**, 1405-1413.
- Merry, C. L., Lyon, M., Deakin, J. A., Hopwood, J. J. & Gallagher, J. T. 1999, Highly sensitive sequencing of the sulfated domains of heparan sulfate, *J Biol Chem*, **274**, 18455-18462.
- Merry, C. L., Bullock, S. L., Swan, D. C., Backen, A. C., Lyon, M., Beddington, R. S., Wilson, V. A. & Gallagher, J. T. 2001, The molecular phenotype of heparan sulfate in the Hs2st^{-/-} mutant mouse, *J Biol Chem*, **276**, 35429-35434.
- Merry, C. L. & Wilson, V. A. 2002, Role of heparan sulfate-2-O-sulfotransferase in the mouse, *Biochim Biophys Acta*, **1573**, 319-327.
- Mertens, G., Van der Schueren, B., van den Berghe, H. & David, G. 1996, Heparan sulfate expression in polarized epithelial cells: the apical sorting of glypican (GPI-anchored proteoglycan) is inversely related to its heparan sulfate content, *J Cell Biol*, **132**, 487-497.
- Meyer, K., Smyth, E. M. & Dawson, M. H. 1938, The Nature of the Muco-Polysaccharide of Synovial Fluid, *Science*, **88**, 129.
- Meyer, K., Linker, A., Davidson, E. A. & Weissmann, B. 1953, The mucopolysaccharides of bovine cornea, *J Biol Chem*, **205**, 611-616.
- Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E. & Rot, A. 1997, Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells, *Cell*, **91**, 385-395.
- Miyamoto, K., Asada, K., Fukutomi, T., Okochi, E., Yagi, Y., Hasegawa, T., Asahara, T., Sugimura, T. & Ushijima, T. 2003, Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers, *Oncogene*, **22**, 274-280.
- Mochizuki, H., Yoshida, K., Gotoh, M., Sugioka, S., Kikuchi, N., Kwon, Y. D., Tawada, A., Maeyama, K., Inaba, N., Hiruma, T., Kimata, K. & Narimatsu, H. 2003, Characterization of a heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-5, an enzyme synthesizing a tetrasulfated disaccharide, *J Biol Chem*, **278**, 26780-26787.
- Mochizuki, H., Yoshida, K., Shibata, Y. & Kimata, K. 2008, Tetrasulfated disaccharide unit in heparan sulfate: enzymatic formation and tissue distribution, *J Biol Chem*, **283**, 31237-31245.
- Mohammadi, M., Olsen, S. K. & Goetz, R. 2005, A protein canyon in the FGF-FGF receptor dimer selects from an a la carte menu of heparan sulfate motifs, *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 506-516.
- Mondor, I., Ugolini, S. & Sattentau, Q. J. 1998, Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans, *J Virol*, **72**, 3623-3634.
- Mongiati, M., Sweeney, S. M., San Antonio, J. D., Fu, J. & Iozzo, R. V. 2003, Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan, *J Biol Chem*, **278**, 4238-4249.
- Moon, A. F., Edavettal, S. C., Krahn, J. M., Munoz, E. M., Negishi, M., Linhardt, R. J., Liu, J. & Pedersen, L. C. 2004, Structural analysis of the sulfotransferase (3-o-sulfotransferase

- isoform 3) involved in the biosynthesis of an entry receptor for herpes simplex virus 1, *J Biol Chem*, **279**, 45185-45193.
- Morii, E., Ogihara, H., Oboki, K., Sawa, C., Sakuma, T., Nomura, S., Esko, J. D., Handa, H. & Kitamura, Y. 2001, Inhibitory effect of the mi transcription factor encoded by the mutant mi allele on GA binding protein-mediated transcript expression in mouse mast cells, *Blood*, **97**, 3032-3039.
- Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Werb, Z., Hemmerich, S. & Rosen, S. D. 2002, Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans, *J Biol Chem*, **277**, 49175-49185.
- Moses, J., Oldberg, A., Cheng, F. & Fransson, L. A. 1997, Biosynthesis of the proteoglycan decorin--transient 2-phosphorylation of xylose during formation of the trisaccharide linkage region, *Eur J Biochem*, **248**, 521-526.
- Mulloy, B., Forster, M. J., Jones, C. & Davies, D. B. 1993, N.m.r. and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin, *Biochem J*, **293 (Pt 3)**, 849-858.
- Mulloy, B. & Forster, M. J. 2000, Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate, *Glycobiology*, **10**, 1147-1156.
- Mulloy, B. & Rider, C. C. 2006, Cytokines and proteoglycans: an introductory overview, *Biochem Soc Trans*, **34**, 409-413.
- Munoz, E., Xu, D., Kemp, M., Zhang, F., Liu, J. & Linhardt, R. J. 2006, Affinity, kinetic, and structural study of the interaction of 3-O-sulfotransferase isoform 1 with heparan sulfate, *Biochemistry*, **45**, 5122-5128.
- Murdoch, A. D., Liu, B., Schwarting, R., Tuan, R. S. & Iozzo, R. V. 1994, Widespread expression of perlecan proteoglycan in basement membranes and extracellular matrices of human tissues as detected by a novel monoclonal antibody against domain III and by in situ hybridization, *J Histochem Cytochem*, **42**, 239-249.
- Murphy, K. J., McLay, N. & Pye, D. A. 2008, Structural studies of heparan sulfate hexasaccharides: new insights into iduronate conformational behavior, *J Am Chem Soc*, **130**, 12435-12444.
- Nagai, N., Habuchi, H., Esko, J. D. & Kimata, K. 2004, Stem domains of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase are required for Golgi localization, oligomer formation and enzyme activity, *J Cell Sci*, **117**, 3331-3341.
- Nagai, N., Habuchi, H., Kitazume, S., Toyoda, H., Hashimoto, Y. & Kimata, K. 2007, Regulation of heparan sulfate 6-O-sulfation by beta-secretase activity, *J Biol Chem*, **282**, 14942-14951.
- Nagano, O. & Saya, H. 2004, Mechanism and biological significance of CD44 cleavage, *Cancer Sci*, **95**, 930-935.
- Najjam, S., Gibbs, R. V., Gordon, M. Y. & Rider, C. C. 1997, The binding of interleukin 2 to heparin revealed by a novel ELISA method, *Biochem Soc Trans*, **25**, 3S.
- Nara, Y., Kato, Y., Torii, Y., Tsuji, Y., Nakagaki, S., Goto, S., Isobe, H., Nakashima, N. & Takeuchi, J. 1997, Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human breast tumours with special reference to PG-M/versican, *Histochem J*, **29**, 21-30.
- Nasser, N. J. 2008, Heparanase involvement in physiology and disease, *Cell Mol Life Sci*, **65**, 1706-1715.

- Nawa, K., Sakano, K., Fujiwara, H., Sato, Y., Sugiyama, N., Teruuchi, T., Iwamoto, M. & Marumoto, Y. 1990, Presence and function of chondroitin-4-sulfate on recombinant human soluble thrombomodulin, *Biochem Biophys Res Commun*, **171**, 729-737.
- Nelimarkka, L., Kainulainen, V., Schonherr, E., Moisander, S., Jortikka, M., Lammi, M., Elenius, K., Jalkanen, M. & Jarvelainen, H. 1997, Expression of small extracellular chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans is differentially regulated in human endothelial cells, *J Biol Chem*, **272**, 12730-12737.
- Nelimarkka, L., Salminen, H., Kuopio, T., Nikkari, S., Ekfors, T., Laine, J., Pelliniemi, L. & Jarvelainen, H. 2001, Decorin is produced by capillary endothelial cells in inflammation-associated angiogenesis, *Am J Pathol*, **158**, 345-353.
- Neumann, F. R., Bittcher, G., Annies, M., Schumacher, B., Kroger, S. & Ruegg, M. A. 2001, An alternative amino-terminus expressed in the central nervous system converts agrin to a type II transmembrane protein, *Mol Cell Neurosci*, **17**, 208-225.
- Nilsson, T. & Warren, G. 1994, Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus, *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 517-521.
- Noel, G. J., Love, D. C. & Mosser, D. M. 1994, High-molecular-weight proteins of nontypeable Haemophilus influenzae mediate bacterial adhesion to cellular proteoglycans, *Infect Immun*, **62**, 4028-4033.
- Nogami, K., Suzuki, H., Habuchi, H., Ishiguro, N., Iwata, H. & Kimata, K. 2004, Distinctive expression patterns of heparan sulfate O-sulfotransferases and regional differences in heparan sulfate structure in chick limb buds, *J Biol Chem*, **279**, 8219-8229.
- Norgard-Sumnicht, K. E., Varki, N. M. & Varki, A. 1993, Calcium-dependent heparin-like ligands for L-selectin in nonlymphoid endothelial cells, *Science*, **261**, 480-483.
- Norgard-Sumnicht, K. & Varki, A. 1995, Endothelial heparan sulfate proteoglycans that bind to L-selectin have glucosamine residues with unsubstituted amino groups, *J Biol Chem*, **270**, 12012-12024.
- Nugent, M. A. & Edelman, E. R. 1992, Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: a mechanism for cooperativity, *Biochemistry*, **31**, 8876-8883.
- O'Donnell, C. D., Tiwari, V., Oh, M. J. & Shukla, D. 2006, A role for heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 2 in herpes simplex virus type 1 entry and spread, *Virology*, **346**, 452-459.
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. & Folkman, J. 1997, Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, *Cell*, **88**, 277-285.
- Oh, S. P., Warman, M. L., Seldin, M. F., Cheng, S. D., Knoll, J. H., Timmons, S. & Olsen, B. R. 1994, Cloning of cDNA and genomic DNA encoding human type XVIII collagen and localization of the alpha 1(XVIII) collagen gene to mouse chromosome 10 and human chromosome 21, *Genomics*, **19**, 494-499.
- Oh, E. S., Woods, A. & Couchman, J. R. 1997, Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C, *J Biol Chem*, **272**, 11805-11811.
- Oh, E. S., Woods, A., Lim, S. T., Theibert, A. W. & Couchman, J. R. 1998, Syndecan-4 proteoglycan cytoplasmic domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate coordinately regulate protein kinase C activity, *J Biol Chem*, **273**, 10624-10629.

- Ohshiro, Y., Murakami, T., Matsuda, K., Nishioka, K., Yoshida, K. & Yamamoto, N. 1996, Role of cell surface glycosaminoglycans of human T cells in human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection, *Microbiol Immunol*, **40**, 827-835.
- Ohto, T., Uchida, H., Yamazaki, H., Keino-Masu, K., Matsui, A. & Masu, M. 2002, Identification of a novel nonlysosomal sulphatase expressed in the floor plate, choroid plexus and cartilage, *Genes Cells*, **7**, 173-185.
- Okamoto, I., Kawano, Y., Tsuiki, H., Sasaki, J., Nakao, M., Matsumoto, M., Suga, M., Ando, M., Nakajima, M. & Saya, H. 1999, CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration, *Oncogene*, **18**, 1435-1446.
- Opat, A. S., Houghton, F. & Gleeson, P. A. 2000, Medial Golgi but not late Golgi glycosyltransferases exist as high molecular weight complexes. Role of luminal domain in complex formation and localization, *J Biol Chem*, **275**, 11836-11845.
- Orellana, A., Hirschberg, C. B., Wei, Z., Swiedler, S. J. & Ishihara, M. 1994, Molecular cloning and expression of a glycosaminoglycan N-acetylglucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase from a heparin-producing cell line, *J Biol Chem*, **269**, 2270-2276.
- Ori, A., Wilkinson, M. C. & Fernig, D. G. 2008, The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges, *Front Biosci*, **13**, 4309-4338.
- Ornitz, D. M. & Itoh, N. 2001, Fibroblast growth factors, *Genome Biol*, **2**, REVIEWS3005.
- Pakula, R., Melchior, A., Denys, A., Vanpouille, C., Mazurier, J. & Allain, F. 2007, Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis, *Glycobiology*, **17**, 492-503.
- Pallerla, S. R., Lawrence, R., Lewejohann, L., Pan, Y., Fischer, T., Schlomann, U., Zhang, X., Esko, J. D. & Grobe, K. 2008, Altered heparan sulfate structure in mice with deleted NDST3 gene function, *J Biol Chem*, **283**, 16885-16894.
- Pantoliano, M. W., Horlick, R. A., Springer, B. A., Van Dyk, D. E., Tobery, T., Wetmore, D. R., Lear, J. D., Nahapetian, A. T., Bradley, J. D. & Sisk, W. P. 1994, Multivalent ligand-receptor binding interactions in the fibroblast growth factor system produce a cooperative growth factor and heparin mechanism for receptor dimerization, *Biochemistry*, **33**, 10229-10248.
- Parish, C. R., Freeman, C. & Hulett, M. D. 2001, Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion, *Biochim Biophys Acta*, **1471**, M99-108.
- Parish, C. R. 2006, The role of heparan sulphate in inflammation, *Nat Rev Immunol*, **6**, 633-643.
- Partenheimer, A., Schwarz, K., Wrocklage, C., Kolsch, E. & Kresse, H. 1995, Proteoglycan form of colony-stimulating factor-1 (proteoglycan-100). Stimulation of activity by glycosaminoglycan removal and proteolytic processing, *J Immunol*, **155**, 5557-5565.
- Parthasarathy, N., Gotow, L. F., Bottoms, J. D., Obunike, J. C., Naggi, A., Casu, B., Goldberg, I. J. & Wagner, W. D. 2000, Influence of glucose on production and N-sulfation of heparan sulfate in cultured adipocyte cells, *Mol Cell Biochem*, **213**, 1-9.
- Patel, M., Yanagishita, M., Roderiquez, G., Bou-Habib, D. C., Oravec, T., Hascall, V. C. & Norcross, M. A. 1993, Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines, *AIDS Res Hum Retroviruses*, **9**, 167-174.
- Paulson, J. C. & Colley, K. J. 1989, Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation, *J Biol Chem*, **264**, 17615-17618.

- Pellegrini, L., Burke, D. F., von Delft, F., Mulloy, B. & Blundell, T. L. 2000, Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin, *Nature*, **407**, 1029-1034.
- Pepin, M. C., Beauchemin, M., Plamondon, J. & O'Connor-McCourt, M. D. 1994, Mapping of the ligand binding domain of the transforming growth factor beta receptor type III by deletion mutagenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6997-7001.
- Pepin, M. C., Beauchemin, M., Collins, C., Plamondon, J. & O'Connor-McCourt, M. D. 1995, Mutagenesis analysis of the membrane-proximal ligand binding site of the TGF-beta receptor type III extracellular domain, *FEBS Lett*, **377**, 368-372.
- Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pilipenko, E. V., Shatsky, I. N., Agol, V. I. & Hellen, C. U. 2001, Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7029-7036.
- Peterson, F. C., Elgin, E. S., Nelson, T. J., Zhang, F., Hoeger, T. J., Linhardt, R. J. & Volkman, B. F. 2004, Identification and characterization of a glycosaminoglycan recognition element of the C chemokine lymphotactin, *J Biol Chem*, **279**, 12598-12604.
- Petitou, M., Casu, B. & Lindahl, U. 2003, 1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site, *Biochimie*, **85**, 83-89.
- Pettersson, I., Kusche, M., Unger, E., Wlad, H., Nylund, L., Lindahl, U. & Kjellen, L. 1991, Biosynthesis of heparin. Purification of a 110-kDa mouse mastocytoma protein required for both glucosaminyl N-deacetylation and N-sulfation, *J Biol Chem*, **266**, 8044-8049.
- Pfaffl, M. W. 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- Philip, A., Hannah, R. & O'Connor-McCourt, M. 1999, Ectodomain cleavage and shedding of the type III transforming growth factor-beta receptor in lung membranes effect of temperature, ligand binding and membrane solubilization, *Eur J Biochem*, **261**, 618-628.
- Pierce, A., Lyon, M., Hampson, I. N., Cowling, G. J. & Gallagher, J. T. 1992, Molecular cloning of the major cell surface heparan sulfate proteoglycan from rat liver, *J Biol Chem*, **267**, 3894-3900.
- Pikas, D. S., Eriksson, I. & Kjellen, L. 2000, Overexpression of different isoforms of glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase results in distinct heparan sulfate N-sulfation patterns, *Biochemistry*, **39**, 4552-4558.
- Pillarisetti, S., Paka, L., Sasaki, A., Vanni-Reyes, T., Yin, B., Parthasarathy, N., Wagner, W. D. & Goldberg, I. J. 1997, Endothelial cell heparanase modulation of lipoprotein lipase activity. Evidence that heparan sulfate oligosaccharide is an extracellular chaperone, *J Biol Chem*, **272**, 15753-15759.
- Pinhal, M. A., Smith, B., Olson, S., Aikawa, J., Kimata, K. & Esko, J. D. 2001, Enzyme interactions in heparan sulfate biosynthesis: uronosyl 5-epimerase and 2-O-sulfotransferase interact in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12984-12989.
- Plotnikov, A. N., Schlessinger, J., Hubbard, S. R. & Mohammadi, M. 1999, Structural basis for FGF receptor dimerization and activation, *Cell*, **98**, 641-650.
- Plotnikov, A. N., Hubbard, S. R., Schlessinger, J. & Mohammadi, M. 2000, Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity, *Cell*, **101**, 413-424.
- Polakis, P. 2000, Wnt signaling and cancer, *Genes Dev*, **14**, 1837-1851.

- Ponighaus, C., Ambrosius, M., Casanova, J. C., Prante, C., Kuhn, J., Esko, J. D., Kleesiek, K. & Gotting, C. 2007, Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans, *J Biol Chem*, **282**, 5201-5206.
- Presto, J., Thuveson, M., Carlsson, P., Busse, M., Wilen, M., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M. & Kjellen, L. 2008, Heparan sulfate biosynthesis enzymes EXT1 and EXT2 affect NDST1 expression and heparan sulfate sulfation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 4751-4756.
- Prestrelski, S. J., Fox, G. M. & Arakawa, T. 1992, Binding of heparin to basic fibroblast growth factor induces a conformational change, *Arch Biochem Biophys*, **293**, 314-319.
- Prihar, H. S., Campbell, P., Feingold, D. S., Jacobsson, I., Jensen, J. W., Lindahl, U. & Roden, L. 1980, Biosynthesis of heparin. Hydrogen exchange at carbon 5 of the glucuronosyl residues, *Biochemistry*, **19**, 495-500.
- Properzi, F., Lin, R., Kwok, J., Naidu, M., van Kuppevelt, T. H., Ten Dam, G. B., Camargo, L. M., Raha-Chowdhury, R., Furukawa, Y., Mikami, T., Sugahara, K. & Fawcett, J. W. 2008, Heparan sulphate proteoglycans in glia and in the normal and injured CNS: expression of sulphotransferases and changes in sulphation, *Eur J Neurosci*, **27**, 593-604.
- Proudfoot, A. E., Peitsch, M. C., Power, C. A., Allet, B., Mermod, J. J., Bacon, K. & Wells, T. N. 1997, Structure and bioactivity of recombinant human CTAP-III and NAP-2, *J Protein Chem*, **16**, 37-49.
- Proudfoot, A. E., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J. P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P. R. & Wells, T. N. 2001, The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity, *J Biol Chem*, **276**, 10620-10626.
- Proudfoot, A. E. 2002, Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets, *Nat Rev Immunol*, **2**, 106-115.
- Proudfoot, A. E., Handel, T. M., Johnson, Z., Lau, E. K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T. N. & Kosco-Vilbois, M. H. 2003, Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1885-1890.
- Pure, E. & Cuff, C. A. 2001, A crucial role for CD44 in inflammation, *Trends Mol Med*, **7**, 213-221.
- Pushkarsky, T., Zybarth, G., Dubrovsky, L., Yurchenko, V., Tang, H., Guo, H., Toole, B., Sherry, B. & Bukrinsky, M. 2001, CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6360-6365.
- Pye, D. A., Vives, R. R., Turnbull, J. E., Hyde, P. & Gallagher, J. T. 1998, Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity, *J Biol Chem*, **273**, 22936-22942.
- Quaranta, V. 2000, Cell migration through extracellular matrix: membrane-type metalloproteinases make the way, *J Cell Biol*, **149**, 1167-1170.
- Rabenstein, D. L. 2002, Heparin and heparan sulfate: structure and function, *Nat Prod Rep*, **19**, 312-331.
- Rahmoune, H., Chen, H. L., Gallagher, J. T., Rudland, P. S. & Fernig, D. G. 1998, Interaction of heparan sulfate from mammary cells with acidic fibroblast growth factor (FGF) and basic FGF. Regulation of the activity of basic FGF by high and low affinity binding sites in heparan sulfate, *J Biol Chem*, **273**, 7303-7310.

- Rapraeger, A. C., Krufka, A. & Olwin, B. B. 1991, Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation, *Science*, **252**, 1705-1708.
- Rapraeger, A. C. & Ott, V. L. 1998, Molecular interactions of the syndecan core proteins, *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 620-628.
- Rapraeger, A. C. 2001, Molecular interactions of syndecans during development, *Semin Cell Dev Biol*, **12**, 107-116.
- Rauch, U., Feng, K. & Zhou, X. H. 2001, Neurocan: a brain chondroitin sulfate proteoglycan, *Cell Mol Life Sci*, **58**, 1842-1856.
- Rehn, M., Hintikka, E. & Pihlajaniemi, T. 1994, Primary structure of the alpha 1 chain of mouse type XVIII collagen, partial structure of the corresponding gene, and comparison of the alpha 1(XVIII) chain with its homologue, the alpha 1(XV) collagen chain, *J Biol Chem*, **269**, 13929-13935.
- Rehn, M. & Pihlajaniemi, T. 1994, Alpha 1(XVIII), a collagen chain with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution, and homology with type XV collagen, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4234-4238.
- Reiss, M. 1997, Transforming growth factor-beta and cancer: a love-hate relationship?, *Oncol Res*, **9**, 447-457.
- Rescan, P. Y., Loreal, O., Hassell, J. R., Yamada, Y., Guillouzo, A. & Clement, B. 1993, Distribution and origin of the basement membrane component perlecan in rat liver and primary hepatocyte culture, *Am J Pathol*, **142**, 199-208.
- Ricard-Blum, S., Feraud, O., Lortat-Jacob, H., Rencurosi, A., Fukai, N., Dkhissi, F., Vittet, D., Imberty, A., Olsen, B. R. & van der Rest, M. 2004, Characterization of endostatin binding to heparin and heparan sulfate by surface plasmon resonance and molecular modeling: role of divalent cations, *J Biol Chem*, **279**, 2927-2936.
- Ringvall, M., Ledin, J., Holmborn, K., van Kuppevelt, T., Ellin, F., Eriksson, I., Olofsson, A. M., Kjellen, L. & Forsberg, E. 2000, Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking N-deacetylase/N-sulfotransferase-1, *J Biol Chem*, **275**, 25926-25930.
- Roderiquez, G., Oravec, T., Yanagishita, M., Bou-Habib, D. C., Mostowski, H. & Norcross, M. A. 1995, Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41, *J Virol*, **69**, 2233-2239.
- Rohrmann, K., Niemann, R. & Buddecke, E. 1985, Two N-acetylgalactosaminyltransferase are involved in the biosynthesis of chondroitin sulfate, *Eur J Biochem*, **148**, 463-469.
- Rong, J., Habuchi, H., Kimata, K., Lindahl, U. & Kusche-Gullberg, M. 2000, Expression of heparan sulphate L-iduronyl 2-O-sulphotransferase in human kidney 293 cells results in increased D-glucuronyl 2-O-sulphation, *Biochem J*, **346 Pt 2**, 463-468.
- Rong, J., Habuchi, H., Kimata, K., Lindahl, U. & Kusche-Gullberg, M. 2001, Substrate specificity of the heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfotransferase, *Biochemistry*, **40**, 5548-5555.
- Roscic-Mrkic, B., Fischer, M., Leemann, C., Manrique, A., Gordon, C. J., Moore, J. P., Proudfoot, A. E. & Trkola, A. 2003, RANTES (CCL5) uses the proteoglycan CD44 as an auxiliary receptor to mediate cellular activation signals and HIV-1 enhancement, *Blood*, **102**, 1169-1177.
- Rosenberg, R. D. & Damus, P. S. 1973, The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor, *J Biol Chem*, **248**, 6490-6505.

- Rosenberg, R. D., Armand, G. & Lam, L. 1978, Structure-function relationships of heparin species, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 3065-3069.
- Rosenberg, R. D., Shworak, N. W., Liu, J., Schwartz, J. J. & Zhang, L. 1997, Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated?, *J Clin Invest*, **100**, S67-75.
- Ross, D. T., Scherf, U., Eisen, M. B., Perou, C. M., Rees, C., Spellman, P., Iyer, V., Jeffrey, S. S., Van de Rijn, M., Waltham, M., Pergamenschikov, A., Lee, J. C., Lashkari, D., Shalon, D., Myers, T. G., Weinstein, J. N., Botstein, D. & Brown, P. O. 2000, Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines, *Nat Genet*, **24**, 227-235.
- Rossi, D. & Zlotnik, A. 2000, The biology of chemokines and their receptors, *Annu Rev Immunol*, **18**, 217-242.
- Rot, A. 1992, Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration, *Immunol Today*, **13**, 291-294.
- Roughley, P. J. 2006, The structure and function of cartilage proteoglycans, *Eur Cell Mater*, **12**, 92-101.
- Ruhland, C., Schonherr, E., Robenek, H., Hansen, U., Iozzo, R. V., Bruckner, P. & Seidler, D. G. 2007, The glycosaminoglycan chain of decorin plays an important role in collagen fibril formation at the early stages of fibrillogenesis, *FEBS J*, **274**, 4246-4255.
- Russo, R. N., Shaper, N. L., Taatjes, D. J. & Shaper, J. H. 1992, Beta 1,4-galactosyltransferase: a short NH₂-terminal fragment that includes the cytoplasmic and transmembrane domain is sufficient for Golgi retention, *J Biol Chem*, **267**, 9241-9247.
- Ryffel, B., Woerly, G., Murray, M., Eugster, H. P. & Car, B. 1993, Binding of active cyclosporins to cyclophilin A and B, complex formation with calcineurin A, *Biochem Biophys Res Commun*, **194**, 1074-1083.
- Sadir, R., Imberty, A., Baleux, F. & Lortat-Jacob, H. 2004, Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV, *J Biol Chem*, **279**, 43854-43860.
- Safaiyan, F., Lindahl, U. & Salmivirta, M. 2000, Structural diversity of N-sulfated heparan sulfate domains: distinct modes of glucuronyl C5 epimerization, iduronic acid 2-O-sulfation, and glucosamine 6-O-sulfation, *Biochemistry*, **39**, 10823-10830.
- Saksela, O., Moscatelli, D., Sommer, A. & Rifkin, D. B. 1988, Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation, *J Cell Biol*, **107**, 743-751.
- Salmivirta, M., Lidholt, K. & Lindahl, U. 1996, Heparan sulfate: a piece of information, *FASEB J*, **10**, 1270-1279.
- Santra, M., Reed, C. C. & Iozzo, R. V. 2002, 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*, **277**, 35671-35681.
- Saphire, A. C., Bobardt, M. D., Zhang, Z., David, G. & Gallay, P. A. 2001, Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages, *J Virol*, **75**, 9187-9200.
- Sarrazin, S., Bonnaffe, D., Lubineau, A. & Lortat-Jacob, H. 2005, Heparan sulfate mimicry: a synthetic glycoconjugate that recognizes the heparin binding domain of interferon-gamma inhibits the cytokine activity, *J Biol Chem*, **280**, 37558-37564.

- Sarrazin, S., Adam, E., Lyon, M., Depontieu, F., Motte, V., Landolfi, C., Lortat-Jacob, H., Bechard, D., Lassalle, P. & Delehedde, M. 2006, Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy, *Biochim Biophys Acta*, **1765**, 25-37.
- Sasisekharan, R. & Venkataraman, G. 2000, Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function, *Curr Opin Chem Biol*, **4**, 626-631.
- Sasisekharan, R., Raman, R. & Prabhakar, V. 2006, Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans, *Annu Rev Biomed Eng*, **8**, 181-231.
- Saunders, S., Jalkanen, M., O'Farrell, S. & Bernfield, M. 1989, Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan, *J Cell Biol*, **108**, 1547-1556.
- Saunders, S., Paine-Saunders, S. & Lander, A. D. 1997, Expression of the cell surface proteoglycan glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain, *Dev Biol*, **190**, 78-93.
- Scherpereel, A., Gentina, T., Grigoriu, B., Senechal, S., Janin, A., Tsicopoulos, A., Plenat, F., Bechard, D., Tonnel, A. B. & Lassalle, P. 2003, Overexpression of endocan induces tumor formation, *Cancer Res*, **63**, 6084-6089.
- Scherpereel, A., Depontieu, F., Grigoriu, B., Cavestri, B., Tsicopoulos, A., Gentina, T., Jourdain, M., Pugin, J., Tonnel, A. B. & Lassalle, P. 2006, Endocan, a new endothelial marker in human sepsis, *Crit Care Med*, **34**, 532-537.
- Schick, B. P., Gradowski, J. F. & San Antonio, J. D. 2001, Synthesis, secretion, and subcellular localization of serglycin proteoglycan in human endothelial cells, *Blood*, **97**, 449-458.
- Schlessinger, J., Plotnikov, A. N., Ibrahimi, O. A., Eliseenkova, A. V., Yeh, B. K., Yayon, A., Linhardt, R. J. & Mohammadi, M. 2000, Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization, *Mol Cell*, **6**, 743-750.
- Schmidt, K. H., Ascencio, F., Fransson, L. A., Kohler, W. & Wadstrom, T. 1993, Studies on binding of glycosaminoglycans to *Streptococcus pyogenes* by using ¹²⁵I-heparan sulphate as a probe, *Zentralbl Bakteriol*, **279**, 472-483.
- Schonherr, E., Sunderkotter, C., Iozzo, R. V. & Schaefer, L. 2005, Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system, *J Biol Chem*, **280**, 15767-15772.
- Schreiber, S. L. 1991, Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands, *Science*, **251**, 283-287.
- Schwarz, K., Breuer, B. & Kresse, H. 1990, Biosynthesis and properties of a further member of the small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan family, *J Biol Chem*, **265**, 22023-22028.
- Scott, H. S., Litjens, T., Hopwood, J. J. & Morris, C. P. 1992, A common mutation for mucopolysaccharidosis type I associated with a severe Hurler syndrome phenotype, *Hum Mutat*, **1**, 103-108.
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U. & Bell, J. I. 1992, Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 12160-12164.
- Sedita, J., Izvolsky, K. & Cardoso, W. V. 2004, Differential expression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase isoforms in the mouse embryo suggests distinctive roles during organogenesis, *Dev Dyn*, **231**, 782-794.

- Seidenbecher, C. I., Richter, K., Rauch, U., Fassler, R., Garner, C. C. & Gundelfinger, E. D. 1995, Brevican, a chondroitin sulfate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms, *J Biol Chem*, **270**, 27206-27212.
- Senay, C., Lind, T., Muguruma, K., Tone, Y., Kitagawa, H., Sugahara, K., Lidholt, K., Lindahl, U. & Kusche-Gullberg, M. 2000, The EXT1/EXT2 tumor suppressors: catalytic activities and role in heparan sulfate biosynthesis, *EMBO Rep*, **1**, 282-286.
- Seo, N. S., Hocking, A. M., Hook, M. & McQuillan, D. J. 2005, Decorin core protein secretion is regulated by N-linked oligosaccharide and glycosaminoglycan additions, *J Biol Chem*, **280**, 42774-42784.
- Shao, C., Zhang, F., Kemp, M. M., Linhardt, R. J., Waisman, D. M., Head, J. F. & Seaton, B. A. 2006, Crystallographic analysis of calcium-dependent heparin binding to annexin A2, *J Biol Chem*, **281**, 31689-31695.
- Shaw, A. S. & Allen, P. M. 2001, Kissing cousins: immunological and neurological synapses, *Nat Immunol*, **2**, 575-576.
- Sherry, B., Yarlett, N., Strupp, A. & Cerami, A. 1992, Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3511-3515.
- Shi, W. & Filmus, J. 2009, A patient with the Simpson-Golabi-Behmel syndrome displays a loss-of-function point mutation in GPC3 that inhibits the attachment of this proteoglycan to the cell surface, *Am J Med Genet A*, **149A**, 552-554.
- Shibata, S., Midura, R. J. & Hascall, V. C. 1992, Structural analysis of the linkage region oligosaccharides and unsaturated disaccharides from chondroitin sulfate using CarboPac PA1, *J Biol Chem*, **267**, 6548-6555.
- Shieh, M. T., WuDunn, D., Montgomery, R. I., Esko, J. D. & Spear, P. G. 1992, Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans, *J Cell Biol*, **116**, 1273-1281.
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D. & Spear, P. G. 1999, A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry, *Cell*, **99**, 13-22.
- Shukla, D. & Spear, P. G. 2001, Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry, *J Clin Invest*, **108**, 503-510.
- Shworak, N. W., Shirakawa, M., Collic-Jouault, S., Liu, J., Mulligan, R. C., Birinyi, L. K. & Rosenberg, R. D. 1994, Pathway-specific regulation of the synthesis of anticoagulant active heparan sulfate, *J Biol Chem*, **269**, 24941-24952.
- Shworak, N. W., Liu, J., Fritze, L. M., Schwartz, J. J., Zhang, L., Logeart, D. & Rosenberg, R. D. 1997, Molecular cloning and expression of mouse and human cDNAs encoding heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase, *J Biol Chem*, **272**, 28008-28019.
- Shworak, N. W., Liu, J., Petros, L. M., Zhang, L., Kobayashi, M., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Rosenberg, R. D. 1999, Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. Isolation, characterization, and expression of human cdnas and identification of distinct genomic loci, *J Biol Chem*, **274**, 5170-5184.
- Shworak, N. W., HajMohammadi, S., de Agostini, A. I. & Rosenberg, R. D. 2002, Mice deficient in heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-1: normal hemostasis with unexpected perinatal phenotypes, *Glycoconj J*, **19**, 355-361.

- Siebertz, B., Stocker, G., Drzeniek, Z., Handt, S., Just, U. & Haubeck, H. D. 1999, Expression of glypican-4 in haematopoietic-progenitor and bone-marrow-stromal cells, *Biochem J*, **344 Pt 3**, 937-943.
- Simons, K. & Ikonen, E. 1997, Functional rafts in cell membranes, *Nature*, **387**, 569-572.
- Slimani, H., Charnaux, N., Mbemba, E., Saffar, L., Vassy, R., Vita, C. & Gattegno, L. 2003a, Interaction of RANTES with syndecan-1 and syndecan-4 expressed by human primary macrophages, *Biochim Biophys Acta*, **1617**, 80-88.
- Slimani, H., Charnaux, N., Mbemba, E., Saffar, L., Vassy, R., Vita, C. & Gattegno, L. 2003b, Binding of the CC-chemokine RANTES to syndecan-1 and syndecan-4 expressed on HeLa cells, *Glycobiology*, **13**, 623-634.
- Smeds, E., Habuchi, H., Do, A. T., Hjertson, E., Grundberg, H., Kimata, K., Lindahl, U. & Kusche-Gullberg, M. 2003, Substrate specificities of mouse heparan sulphate glucosaminyl 6-O-sulphotransferases, *Biochem J*, **372**, 371-380.
- Snow, A. D., Sekiguchi, R. T., Nochlin, D., Kalaria, R. N. & Kimata, K. 1994, Heparan sulfate proteoglycan in diffuse plaques of hippocampus but not of cerebellum in Alzheimer's disease brain, *Am J Pathol*, **144**, 337-347.
- Song, H. H. & Filmus, J. 2002, The role of glypicans in mammalian development, *Biochim Biophys Acta*, **1573**, 241-246.
- Spear, P. G. & Longnecker, R. 2003, Herpesvirus entry: an update, *J Virol*, **77**, 10179-10185.
- Sperinde, G. V. & Nugent, M. A. 1998, Heparan sulfate proteoglycans control intracellular processing of bFGF in vascular smooth muscle cells, *Biochemistry*, **37**, 13153-13164.
- Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Stedman, K., Kocher, H. P. & et al. 1991, A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP), *J Biol Chem*, **266**, 10735-10738.
- Spillmann, D., Witt, D. & Lindahl, U. 1998, Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate, *J Biol Chem*, **273**, 15487-15493.
- Spillmann, D. 2001, Heparan sulfate: anchor for viral intruders?, *Biochimie*, **83**, 811-817.
- Stevens, R. L., Otsu, K., Weis, J. H., Tantravahi, R. V., Austen, K. F., Henkart, P. A., Galli, M. C. & Reynolds, C. W. 1987, Co-sedimentation of chondroitin sulfate A glycosaminoglycans and proteoglycans with the cytolytic secretory granules of rat large granular lymphocyte (LGL) tumor cells, and identification of a mRNA in normal and transformed LGL that encodes proteoglycans, *J Immunol*, **139**, 863-868.
- Stevens, R. L. & Austen, K. F. 1989, Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells, *Immunol Today*, **10**, 381-386.
- Stipp, C. S., Litwack, E. D. & Lander, A. D. 1994, Cerebroglycan: an integral membrane heparan sulfate proteoglycan that is unique to the developing nervous system and expressed specifically during neuronal differentiation, *J Cell Biol*, **124**, 149-160.
- Stringer, S. E. & Gallagher, J. T. 1997, Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparan sulfate, *J Biol Chem*, **272**, 20508-20514.
- Stringer, S. E., Forster, M. J., Mulloy, B., Bishop, C. R., Graham, G. J. & Gallagher, J. T. 2002, Characterization of the binding site on heparan sulfate for macrophage inflammatory protein 1alpha, *Blood*, **100**, 1543-1550.
- Subramanian, S. V., Fitzgerald, M. L. & Bernfield, M. 1997, Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation, *J Biol Chem*, **272**, 14713-14720.

- Sueyoshi, T., Kakuta, Y., Pedersen, L. C., Wall, F. E., Pedersen, L. G. & Negishi, M. 1998, A role of Lys614 in the sulfotransferase activity of human heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase, *FEBS Lett*, **433**, 211-214.
- Sugahara, K., Mizuno, N., Okumura, Y. & Kawasaki, T. 1992a, The phosphorylated and/or sulfated structure of the carbohydrate-protein-linkage region isolated from chondroitin sulfate in the hybrid proteoglycans of Engelbreth-Holm-Swarm mouse tumor, *Eur J Biochem*, **204**, 401-406.
- Sugahara, K., Ohi, Y., Harada, T., de Waard, P. & Vliegthart, J. F. 1992b, Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. I. Six compounds containing 0 or 1 sulfate and/or phosphate residues, *J Biol Chem*, **267**, 6027-6035.
- Sugahara, K. & Kitagawa, H. 2000, Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans, *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 518-527.
- Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K. & Kitagawa, H. 2003, Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate, *Curr Opin Struct Biol*, **13**, 612-620.
- SundarRaj, N., Fite, D., Ledbetter, S., Chakravarti, S. & Hassell, J. R. 1995, Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment, *J Cell Sci*, **108 (Pt 7)**, 2663-2672.
- Svensson, L., Aszodi, A., Reinholt, F. P., Fassler, R., Heinegard, D. & Oldberg, A. 1999, Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon, *J Biol Chem*, **274**, 9636-9647.
- Tai, G. H., Huckerby, T. N. & Nieduszynski, I. A. 1996, Multiple non-reducing chain termini isolated from bovine corneal keratan sulfates, *J Biol Chem*, **271**, 23535-23546.
- Takagaki, K., Nakamura, T. & Endo, M. 1988, Demonstration of an endo-beta-galactosidase and an endo-beta-xylosidase that degrade the proteoglycan linkage region, *Biochim Biophys Acta*, **966**, 94-98.
- Takahashi, N., Hayano, T. & Suzuki, M. 1989, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin, *Nature*, **337**, 473-475.
- Tanaka, Y., Adams, D. H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U. & Shaw, S. 1993a, T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta, *Nature*, **361**, 79-82.
- Tanaka, Y., Adams, D. H. & Shaw, S. 1993b, Regulation of leukocyte recruitment by proadhesive cytokines immobilized on endothelial proteoglycan, *Curr Top Microbiol Immunol*, **184**, 99-106.
- Tanaka, Y., Adams, D. H. & Shaw, S. 1993c, Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes, *Immunol Today*, **14**, 111-115.
- Tanaka, Y., Fujii, K., Hubscher, S., Aso, M., Takazawa, A., Saito, K., Ota, T. & Eto, S. 1998a, Heparan sulfate proteoglycan on endothelium efficiently induces integrin-mediated T cell adhesion by immobilizing chemokines in patients with rheumatoid synovitis, *Arthritis Rheum*, **41**, 1365-1377.
- Tanaka, Y., Kimata, K., Adams, D. H. & Eto, S. 1998b, Modulation of cytokine function by heparan sulfate proteoglycans: sophisticated models for the regulation of cellular responses to cytokines, *Proc Assoc Am Physicians*, **110**, 118-125.
- Taylor, K. R. & Gallo, R. L. 2006, Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation, *FASEB J*, **20**, 9-22.

- Tchougounova, E. & Pejler, G. 2001, Regulation of extravascular coagulation and fibrinolysis by heparin-dependent mast cell chymase, *FASEB J*, **15**, 2763-2765.
- Teasdale, R. D., D'Agostaro, G. & Gleeson, P. A. 1992, The signal for Golgi retention of bovine beta 1,4-galactosyltransferase is in the transmembrane domain, *J Biol Chem*, **267**, 13113.
- Ten Dam, G. B., Kurup, S., van de Westerlo, E. M., Versteeg, E. M., Lindahl, U., Spillmann, D. & van Kuppevelt, T. H. 2006, 3-O-sulfated oligosaccharide structures are recognized by anti-heparan sulfate antibody HS4C3, *J Biol Chem*, **281**, 4654-4662.
- Thompson, L. D., Pantoliano, M. W. & Springer, B. A. 1994, Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain, *Biochemistry*, **33**, 3831-3840.
- Tieu, P. T., Bach, G., Matynia, A., Hwang, M. & Neufeld, E. F. 1995, Four novel mutations underlying mild or intermediate forms of alpha-L-iduronidase deficiency (MPS IS and MPS IH/S), *Hum Mutat*, **6**, 55-59.
- Tiwari, V., Clement, C., Duncan, M. B., Chen, J., Liu, J. & Shukla, D. 2004, A role for 3-O-sulfated heparan sulfate in cell fusion induced by herpes simplex virus type 1, *J Gen Virol*, **85**, 805-809.
- Tiwari, V., O'Donnell, C. D., Oh, M. J., Valyi-Nagy, T. & Shukla, D. 2005, A role for 3-O-sulfotransferase isoform-4 in assisting HSV-1 entry and spread, *Biochem Biophys Res Commun*, **338**, 930-937.
- Tiwari, V., Clement, C., Xu, D., Valyi-Nagy, T., Yue, B. Y., Liu, J. & Shukla, D. 2006, Role for 3-O-sulfated heparan sulfate as the receptor for herpes simplex virus type 1 entry into primary human corneal fibroblasts, *J Virol*, **80**, 8970-8980.
- Tiwari, V., ten Dam, G. B., Yue, B. Y., van Kuppevelt, T. H. & Shukla, D. 2007, Role of 3-O-sulfated heparan sulfate in virus-induced polykaryocyte formation, *FEBS Lett*, **581**, 4468-4472.
- Tkachenko, E., Rhodes, J. M. & Simons, M. 2005, Syndecans: new kids on the signaling block, *Circ Res*, **96**, 488-500.
- Toida, T., Yoshida, H., Toyoda, H., Koshiishi, I., Imanari, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R. & Linhardt, R. J. 1997, Structural differences and the presence of unsubstituted amino groups in heparan sulphates from different tissues and species, *Biochem J*, **322 (Pt 2)**, 499-506.
- Toma, L., Berninsone, P. & Hirschberg, C. B. 1998, The putative heparin-specific N-acetylglucosaminyl N-Deacetylase/N-sulfotransferase also occurs in non-heparin-producing cells, *J Biol Chem*, **273**, 22458-22465.
- Tomatsu, S., Fukuda, S., Sukegawa, K., Ikedo, Y., Yamada, S., Yamada, Y., Sasaki, T., Okamoto, H., Kuwahara, T., Yamaguchi, S. & et al. 1991, Mucopolysaccharidosis type VII: characterization of mutations and molecular heterogeneity, *Am J Hum Genet*, **48**, 89-96.
- Tone, Y., Pedersen, L. C., Yamamoto, T., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Nishihara, J., Tamura, J., Negishi, M. & Sugahara, K. 2008, 2-o-phosphorylation of xylose and 6-o-sulfation of galactose in the protein linkage region of glycosaminoglycans influence the glucuronyltransferase-I activity involved in the linkage region synthesis, *J Biol Chem*, **283**, 16801-16807.
- Traister, A., Shi, W. & Filmus, J. 2007, Mammalian Notum induces the release of glypicans and other GPI-anchored proteins from the cell surface, *Biochem J*,
- Trowbridge, J. M. & Gallo, R. L. 2002, Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan, *Glycobiology*, **12**, 117R-125R.

- Tsai, J. C., Zhang, J., Minami, T., Volland, C., Zhao, S., Yi, X., Lassalle, P., Oettgen, P. & Aird, W. C. 2002, Cloning and characterization of the human lung endothelial-cell-specific molecule-1 promoter, *J Vasc Res*, **39**, 148-159.
- Tsen, G., Halfter, W., Kroger, S. & Cole, G. J. 1995, Agrin is a heparan sulfate proteoglycan, *J Biol Chem*, **270**, 3392-3399.
- Tsutsumi, S., Yanagawa, T., Shimura, T., Fukumori, T., Hogan, V., Kuwano, H. & Raz, A. 2003, Regulation of cell proliferation by autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase signaling, *J Biol Chem*, **278**, 32165-32172.
- Tumova, S. & Bame, K. J. 1997, The interaction between basic fibroblast growth factor and heparan sulfate can prevent the in vitro degradation of the glycosaminoglycan by Chinese hamster ovary cell heparanases, *J Biol Chem*, **272**, 9078-9085.
- Tumova, S., Hatch, B. A., Law, D. J. & Bame, K. J. 1999, Basic fibroblast growth factor does not prevent heparan sulphate proteoglycan catabolism in intact cells, but it alters the distribution of the glycosaminoglycan degradation products, *Biochem J*, **337 (Pt 3)**, 471-481.
- Turnbull, J. E., Fernig, D. G., Ke, Y., Wilkinson, M. C. & Gallagher, J. T. 1992, Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate, *J Biol Chem*, **267**, 10337-10341.
- Turnbull, J., Powell, A. & Guimond, S. 2001, Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator, *Trends Cell Biol*, **11**, 75-82.
- Uchimura, K., Morimoto-Tomita, M., Bistrup, A., Li, J., Lyon, M., Gallagher, J., Werb, Z. & Rosen, S. D. 2006, HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1, *BMC Biochem*, **7**, 2.
- Ueno, M., Yamada, S., Zako, M., Bernfield, M. & Sugahara, K. 2001, Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence, *J Biol Chem*, **276**, 29134-29140.
- Utani, A., Nomizu, M., Matsuura, H., Kato, K., Kobayashi, T., Takeda, U., Aota, S., Nielsen, P. K. & Shinkai, H. 2001, A unique sequence of the laminin alpha 3 G domain binds to heparin and promotes cell adhesion through syndecan-2 and -4, *J Biol Chem*, **276**, 28779-28788.
- Valla, S., Li, J., Ertesvag, H., Barbeyron, T. & Lindahl, U. 2001, Hexuronyl C5-epimerases in alginate and glycosaminoglycan biosynthesis, *Biochimie*, **83**, 819-830.
- van den Born, J., Gunnarsson, K., Bakker, M. A., Kjellen, L., Kusche-Gullberg, M., Maccarana, M., Berden, J. H. & Lindahl, U. 1995, Presence of N-unsubstituted glucosamine units in native heparan sulfate revealed by a monoclonal antibody, *J Biol Chem*, **270**, 31303-31309.
- van den Born, J., Pikas, D. S., Pisa, B. J., Eriksson, I., Kjellen, L. & Berden, J. H. 2003, Antibody-based assay for N-deacetylase activity of heparan sulfate/heparin N-deacetylase/N-sulfotransferase (NDST): novel characteristics of NDST-1 and -2, *Glycobiology*, **13**, 1-10.
- van den Born, J., Salmivirta, K., Henttinen, T., Ostman, N., Ishimaru, T., Miyaura, S., Yoshida, K. & Salmivirta, M. 2005, Novel heparan sulfate structures revealed by monoclonal antibodies, *J Biol Chem*, **280**, 20516-20523.

- van der Velden, A. W. & Thomas, A. A. 1999, The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development, *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 87-106.
- van Kuppevelt, T. H., Dennissen, M. A., van Venrooij, W. J., Hoet, R. M. & Veerkamp, J. H. 1998, Generation and application of type-specific anti-heparan sulfate antibodies using phage display technology. Further evidence for heparan sulfate heterogeneity in the kidney, *J Biol Chem*, **273**, 12960-12966.
- Vanpouille, C., Denys, A., Carpentier, M., Pakula, R., Mazurier, J. & Allain, F. 2004, Octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of cyclophilin B to heparin and cell surface heparan sulphate, *Biochem J*, **382**, 733-740.
- Veldkamp, C. T., Peterson, F. C., Pelzek, A. J. & Volkman, B. F. 2005, The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin, *Protein Sci*, **14**, 1071-1081.
- Venkatesan, N., Ebihara, T., Roughley, P. J. & Ludwig, M. S. 2000, Alterations in large and small proteoglycans in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats, *Am J Respir Crit Care Med*, **161**, 2066-2073.
- Veugelaers, M., De Cat, B., Ceulemans, H., Bruystens, A. M., Coomans, C., Durr, J., Vermeesch, J., Marynen, P. & David, G. 1999, Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans, *J Biol Chem*, **274**, 26968-26977.
- Villaneuva, G. B. & Danishefsky, I. 1977, Evidence for a heparin-induced conformational change on antithrombin III, *Biochem Biophys Res Commun*, **74**, 803-809.
- Viola, M., Bartolini, B., Sonaggere, M., Giudici, C., Tenni, R. & Tira, M. E. 2007, Fibromodulin interactions with type I and II collagens, *Connect Tissue Res*, **48**, 141-148.
- Vives, R. R., Sadir, R., Imberty, A., Rencurosi, A. & Lortat-Jacob, H. 2002, A kinetics and modeling study of RANTES(9-68) binding to heparin reveals a mechanism of cooperative oligomerization, *Biochemistry*, **41**, 14779-14789.
- Viviano, B. L., Paine-Saunders, S., Gasiunas, N., Gallagher, J. & Saunders, S. 2004, Domain-specific modification of heparan sulfate by Qsulf1 modulates the binding of the bone morphogenetic protein antagonist Noggin, *J Biol Chem*, **279**, 5604-5611.
- Vlodavsky, I., Eldor, A., Haimovitz-Friedman, A., Matzner, Y., Ishai-Michaeli, R., Lider, O., Naparstek, Y., Cohen, I. R. & Fuks, Z. 1992, Expression of heparanase by platelets and circulating cells of the immune system: possible involvement in diapedesis and extravasation, *Invasion Metastasis*, **12**, 112-127.
- Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Bitan, M., Pappo, O., Peretz, T., Michal, I., Spector, L. & Pecker, I. 1999, Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis, *Nat Med*, **5**, 793-802.
- Vlodavsky, I. & Friedmann, Y. 2001, Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis, *J Clin Invest*, **108**, 341-347.
- Vlodavsky, I. & Goldshmidt, O. 2001, Properties and function of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis, *Haemostasis*, **31 Suppl 1**, 60-63.
- Vlodavsky, I., Goldshmidt, O., Zcharia, E., Atzmon, R., Rangini-Guatta, Z., Elkin, M., Peretz, T. & Friedmann, Y. 2002, Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development, *Semin Cancer Biol*, **12**, 121-129.
- Vogel, K. G., Paulsson, M. & Heinegard, D. 1984, Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon, *Biochem J*, **223**, 587-597.

- Voglmeir, J., Voglauer, R. & Wilson, I. B. 2007, XT-II, the second isoform of human peptide-O-xylosyltransferase, displays enzymatic activity, *J Biol Chem*, **282**, 5984-5990.
- Vreys, V. & David, G. 2007, Mammalian heparanase: what is the message?, *J Cell Mol Med*, **11**, 427-452.
- Wagner, L., Yang, O. O., Garcia-Zepeda, E. A., Ge, Y., Kalams, S. A., Walker, B. D., Pasternack, M. S. & Luster, A. D. 1998, Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans, *Nature*, **391**, 908-911.
- Wang, X. F., Lin, H. Y., Ng-Eaton, E., Downward, J., Lodish, H. F. & Weinberg, R. A. 1991, Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor, *Cell*, **67**, 797-805.
- Wang, S., Ai, X., Freeman, S. D., Pownall, M. E., Lu, Q., Kessler, D. S. & Emerson, C. P., Jr. 2004, QSulf1, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4833-4838.
- Wang, L., Fuster, M., Sriramarao, P. & Esko, J. D. 2005, Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses, *Nat Immunol*, **6**, 902-910.
- Watanabe, K., Yamada, H. & Yamaguchi, Y. 1995, K-glypican: a novel GPI-anchored heparan sulfate proteoglycan that is highly expressed in developing brain and kidney, *J Cell Biol*, **130**, 1207-1218.
- Webb, L. M., Ehrenguber, M. U., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. & Rot, A. 1993, Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7158-7162.
- Weber, B., Guo, X. H., Kleijer, W. J., van de Kamp, J. J., Poorthuis, B. J. & Hopwood, J. J. 1999, Sanfilippo type B syndrome (mucopolysaccharidosis III B): allelic heterogeneity corresponds to the wide spectrum of clinical phenotypes, *Eur J Hum Genet*, **7**, 34-44.
- Wegrowski, Y., Milard, A. L., Kotlarz, G., Toulmonde, E., Maquart, F. X. & Bernard, J. 2006, Cell surface proteoglycan expression during maturation of human monocytes-derived dendritic cells and macrophages, *Clin Exp Immunol*, **144**, 485-493.
- Wei, Z., Swiedler, S. J., Ishihara, M., Orellana, A. & Hirschberg, C. B. 1993, A single protein catalyzes both N-deacetylation and N-sulfation during the biosynthesis of heparan sulfate, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3885-3888.
- Wei, G., Bai, X., Gabb, M. M., Bame, K. J., Koshy, T. I., Spear, P. G. & Esko, J. D. 2000, Location of the glucuronosyltransferase domain in the heparan sulfate copolymerase EXT1 by analysis of Chinese hamster ovary cell mutants, *J Biol Chem*, **275**, 27733-27740.
- Wei, Z., Lyon, M. & Gallagher, J. T. 2005, Distinct substrate specificities of bacterial heparinases against N-unsubstituted glucosamine residues in heparan sulfate, *J Biol Chem*, **280**, 15742-15748.
- Weitz, J. I. 2003, Heparan sulfate: antithrombotic or not?, *J Clin Invest*, **111**, 952-954.
- Wellner, M., Herse, F., Janke, J., Gorzelnjak, K., Engeli, S., Bechart, D., Lasalle, P., Luft, F. C. & Sharma, A. M. 2003, Endothelial cell specific molecule-1--a newly identified protein in adipocytes, *Horm Metab Res*, **35**, 217-221.
- Westling, C. & Lindahl, U. 2002, Location of N-unsubstituted glucosamine residues in heparan sulfate, *J Biol Chem*, **277**, 49247-49255.

- Wettreich, A., Sebollela, A., Carvalho, M. A., Azevedo, S. P., Borojevic, R., Ferreira, S. T. & Coelho-Sampaio, T. 1999, Acidic pH modulates the interaction between human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and glycosaminoglycans, *J Biol Chem*, **274**, 31468-31475.
- Whitelock, J. M. & Iozzo, R. V. 2005, Heparan sulfate: a complex polymer charged with biological activity, *Chem Rev*, **105**, 2745-2764.
- Whitelock, J. M., Melrose, J. & Iozzo, R. V. 2008, Diverse cell signaling events modulated by perlecan, *Biochemistry*, **47**, 11174-11183.
- Wille, I., Rek, A., Krenn, E. & Kungl, A. J. 2007, Biophysical investigation of human heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3A: a mutual effect of enzyme oligomerisation and glycosaminoglycan ligand binding, *Biochim Biophys Acta*, **1774**, 1470-1476.
- Williams, K. J., Liu, M. L., Zhu, Y., Xu, X., Davidson, W. R., McCue, P. & Sharma, K. 2005, Loss of heparan N-sulfotransferase in diabetic liver: role of angiotensin II, *Diabetes*, **54**, 1116-1122.
- Willis, A. E. 1999, Translational control of growth factor and proto-oncogene expression, *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 73-86.
- Wilson, V. A., Gallagher, J. T. & Merry, C. L. 2002, Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase (Hs2st) and mouse development, *Glycoconj J*, **19**, 347-354.
- Winchester, B. G. 1996, Lysosomal metabolism of glycoconjugates, *Subcell Biochem*, **27**, 191-238.
- Winchester, B. 2005, Lysosomal metabolism of glycoproteins, *Glycobiology*, **15**, 1R-15R.
- Witt, D. P. & Lander, A. D. 1994, Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations, *Curr Biol*, **4**, 394-400.
- Wong, S. H., Low, S. H. & Hong, W. 1992, The 17-residue transmembrane domain of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase is sufficient for Golgi retention, *J Cell Biol*, **117**, 245-258.
- Wraith, J. E. 1995, The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management, *Arch Dis Child*, **72**, 263-267.
- Wu, Y. J., La Pierre, D. P., Wu, J., Yee, A. J. & Yang, B. B. 2005, The interaction of versican with its binding partners, *Cell Res*, **15**, 483-494.
- WuDunn, D. & Spear, P. G. 1989, Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate, *J Virol*, **63**, 52-58.
- Xia, G., Chen, J., Tiwari, V., Ju, W., Li, J. P., Malmstrom, A., Shukla, D. & Liu, J. 2002, Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1, *J Biol Chem*, **277**, 37912-37919.
- Xu, Q., Leiva, M. C., Fischkoff, S. A., Handschumacher, R. E. & Lyttle, C. R. 1992, Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin, *J Biol Chem*, **267**, 11968-11971.
- Xu, T., Bianco, P., Fisher, L. W., Longenecker, G., Smith, E., Goldstein, S., Bonadio, J., Boskey, A., Heegaard, A. M., Sommer, B., Satomura, K., Dominguez, P., Zhao, C., Kulkarni, A. B., Robey, P. G. & Young, M. F. 1998, Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice, *Nat Genet*, **20**, 78-82.
- Xu, D., Tiwari, V., Xia, G., Clement, C., Shukla, D. & Liu, J. 2005, Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1, *Biochem J*, **385**, 451-459.

- Xu, D., Song, D., Pedersen, L. C. & Liu, J. 2007, Mutational study of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase and chondroitin sulfate 2-O-sulfotransferase, *J Biol Chem*, **282**, 8356-8367.
- Xu, D., Moon, A. F., Song, D., Pedersen, L. C. & Liu, J. 2008, Engineering sulfotransferases to modify heparan sulfate, *Nat Chem Biol*, **4**, 200-202.
- Yabe, T., Shukla, D., Spear, P. G., Rosenberg, R. D., Seeberger, P. H. & Shworak, N. W. 2001, Portable sulphotransferase domain determines sequence specificity of heparan sulphate 3-O-sulphotransferases, *Biochem J*, **359**, 235-241.
- Yabe, T., Hata, T., He, J. & Maeda, N. 2005, Developmental and regional expression of heparan sulfate sulfotransferase genes in the mouse brain, *Glycobiology*, **15**, 982-993.
- Yamada, H., Watanabe, K., Shimonaka, M. & Yamaguchi, Y. 1994, Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family, *J Biol Chem*, **269**, 10119-10126.
- Yamada, H., Watanabe, K., Shimonaka, M., Yamasaki, M. & Yamaguchi, Y. 1995a, cDNA cloning and the identification of an aggrecanase-like cleavage site in rat brevican, *Biochem Biophys Res Commun*, **216**, 957-963.
- Yamada, S., Murakami, T., Tsuda, H., Yoshida, K. & Sugahara, K. 1995b, Isolation of the porcine heparin tetrasaccharides with glucuronate 2-O-sulfate. Heparinase cleaves glucuronate 2-O-sulfate-containing disaccharides in highly sulfated blocks in heparin, *J Biol Chem*, **270**, 8696-8705.
- Yamaguchi, Y., Mann, D. M. & Ruoslahti, E. 1990, Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin, *Nature*, **346**, 281-284.
- Yanagishita, M. & Hascall, V. C. 1992, Cell surface heparan sulfate proteoglycans, *J Biol Chem*, **267**, 9451-9454.
- Yard, B., Feng, Y., Keller, H., Mall, C. & van Der Woude, F. 2002, Influence of high glucose concentrations on the expression of glycosaminoglycans and N-deacetylase/N-sulphotransferase mRNA in cultured skin fibroblasts from diabetic patients with or without nephropathy, *Nephrol Dial Transplant*, **17**, 386-391.
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D., Leder, P. & Ornitz, D. M. 1991, Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor, *Cell*, **64**, 841-848.
- Ylikarppa, R., Eklund, L., Sormunen, R., Kontiola, A. I., Utriainen, A., Maatta, M., Fukai, N., Olsen, B. R. & Pihlajaniemi, T. 2003, Lack of type XVIII collagen results in anterior ocular defects, *FASEB J*, **17**, 2257-2259.
- Young, M. F., Bi, Y., Ameye, L. & Chen, X. D. 2002, Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases, *Glycoconj J*, **19**, 257-262.
- Yurchenko, V., O'Connor, M., Dai, W. W., Guo, H., Toole, B., Sherry, B. & Bukrinsky, M. 2001, CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B, *Biochem Biophys Res Commun*, **288**, 786-788.
- Yurchenko, V., Zybarth, G., O'Connor, M., Dai, W. W., Franchin, G., Hao, T., Guo, H., Hung, H. C., Toole, B., Gallay, P., Sherry, B. & Bukrinsky, M. 2002, Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147, *J Biol Chem*, **277**, 22959-22965.
- Yurt, R. W., Leid, R. W., Jr. & Austen, K. F. 1977, Native heparin from rat peritoneal mast cells, *J Biol Chem*, **252**, 518-521.

- Zak, B. M., Crawford, B. E. & Esko, J. D. 2002, Hereditary multiple exostoses and heparan sulfate polymerization, *Biochim Biophys Acta*, **1573**, 346-355.
- Zcharia, E., Zilka, R., Yaar, A., Yacoby-Zeevi, O., Zetser, A., Metzger, S., Sarid, R., Naggi, A., Casu, B., Ilan, N., Vlodaysky, I. & Abramovitch, R. 2005, Heparanase accelerates wound angiogenesis and wound healing in mouse and rat models, *FASEB J*, **19**, 211-221.
- Zeng, B. J., Mortimer, B. C., Martins, I. J., Seydel, U. & Redgrave, T. G. 1998, Chylomicron remnant uptake is regulated by the expression and function of heparan sulfate proteoglycan in hepatocytes, *J Lipid Res*, **39**, 845-860.
- Zhang, L. & Esko, J. D. 1994, Amino acid determinants that drive heparan sulfate assembly in a proteoglycan, *J Biol Chem*, **269**, 19295-19299.
- Zhang, L., David, G. & Esko, J. D. 1995, Repetitive Ser-Gly sequences enhance heparan sulfate assembly in proteoglycans, *J Biol Chem*, **270**, 27127-27135.
- Zhang, L., Schwartz, J. J., Miller, J., Liu, J., Fritze, L. M., Shworak, N. W. & Rosenberg, R. D. 1998, The retinoic acid and cAMP-dependent up-regulation of 3-O-sulfotransferase-1 leads to a dramatic augmentation of anticoagulant active heparan sulfate biosynthesis in F9 embryonal carcinoma cells, *J Biol Chem*, **273**, 27998-28003.
- Zhang, L., Yoshida, K., Liu, J. & Rosenberg, R. D. 1999, Anticoagulant heparan sulfate precursor structures in F9 embryonal carcinoma cells, *J Biol Chem*, **274**, 5681-5691.
- Zhang, L., Beeler, D. L., Lawrence, R., Lech, M., Liu, J., Davis, J. C., Shriver, Z., Sasisekharan, R. & Rosenberg, R. D. 2001, 6-O-sulfotransferase-1 represents a critical enzyme in the anticoagulant heparan sulfate biosynthetic pathway, *J Biol Chem*, **276**, 42311-42321.
- Zhuo, L., Salustri, A. & Kimata, K. 2002, A physiological function of serum proteoglycan bikunin: the chondroitin sulfate moiety plays a central role, *Glycoconj J*, **19**, 241-247.
- Zimmermann, P., Tomatis, D., Rosas, M., Grootjans, J., Leenaerts, I., Degeest, G., Reekmans, G., Coomans, C. & David, G. 2001, Characterization of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a component of cell adhesion sites and microfilaments, *Mol Biol Cell*, **12**, 339-350.
- Zlotnik, A. & Yoshie, O. 2000, Chemokines: a new classification system and their role in immunity, *Immunity*, **12**, 121-127.