

N° d'ordre : 40714

Université des Sciences et Technologies de Lille

## **Thèse de doctorat**

Présentée par

**Adeline MARCANT**

En vue de l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de Lille**

Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé

# Rôle de la cyclophiline B dans la régulation de l'activité des macrophages

**Soutenue le 14 décembre 2011 devant la commission d'examen :**

**Président :** Pr. Annick PIERCE (Université de Lille1)

**Rapporteurs :** Dr. Toby LAWRENCE (Directeur de recherche INSERM, Marseille)  
Pr. Nathalie CHARNAUX (Université Paris 13)

**Examineurs :** Pr. Fabrice ALLAIN (Université de Lille1)  
Dr. Joël MAZURIER (Directeur de recherche CNRS, Lille)  
Dr. Christophe VANPOUILLE (NIH, Bethesda, Md, USA)

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.

# Remerciements

*Je tiens à adresser mes remerciements à :*

***Monsieur le Docteur Toby Lawrence***

*qui a accepté de juger cette thèse en qualité de rapporteur. Je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à ce travail. Je suis particulièrement honorée de votre présence dans ce jury de soutenance de thèse et je vous exprime ici ma plus haute considération.*

***Madame le Professeur Nathalie Charnaux***

*pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Je vous remercie pour l'intérêt et la considération que vous apportez à ces travaux. Je vous adresse mes sincères remerciements ainsi que ma profonde gratitude.*

***Monsieur le Docteur Christophe Vanpouille***

*pour avoir accepté de juger mon travail. En tant qu'ancien membre de l'équipe, j'espère que vous prendrez plaisir à vous replonger dans le monde des cyclophilines.*

***Monsieur le Docteur Joël Mazurier***

*alias Tonton Joël qui m'a en parti "sponsorisé" durant ma thèse. C'est pour moi un immense plaisir que tu ais accepté de participer à mon jury de soutenance. Merci d'avoir veillé sur moi durant ces quelques années. Sois assuré de mon entière reconnaissance.*

***Madame le Professeur Annick Pierce***

*que je remercie chaleureusement pour avoir accepté de présider le jury de cette soutenance de thèse. Après tout le temps que tu m'as consacré et les discussions animés durant les pauses déjeuner, c'est pour moi un réel plaisir que de te compter parmi les membres du jury.*

***Monsieur le Professeur Fabrice Allain***

*à qui j'exprime ma plus profonde gratitude. En m'acceptant dans ton Laboratoire, tu m'as fait découvrir l'univers mystérieux des cyclophilines et m'a entraîné dans les méandres de l'inflammation. Merci pour la confiance que tu m'as accordé et pour toutes ces discussions ô combien passionnées et enrichissantes que nous avons eu. Ces années passées au sein de ton équipe ont été un réel plaisir tant sur le plan professionnel que humain. Merci pour tout.*

# Résumé

Les cyclophilines forment une famille de protéines caractérisées par leur activité peptidyl-prolyl cis/trans isomérase et par leur capacité à fixer une drogue immunosuppressive, la cyclosporine A. Les travaux antérieurs réalisés au Laboratoire ont montré que la cyclophiline B (CyPB) est sécrétée en réponse à des stimuli inflammatoires et que sa fixation sur un récepteur constitué du CD147 et du syndécan-1 induit le chimiotactisme de sous-populations lymphocytaires et leur adhérence à la matrice extracellulaire. Ces données confèrent à la CyPB un rôle de médiateur dans la réponse inflammatoire. La CyPA est également sécrétée en cas d'inflammation et présente des activités similaires à la CyPB. De nombreuses études ont également suggéré que la CyPA induit l'expression de facteurs pro-inflammatoires, tel que le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), par les macrophages. Sur la base de ces constatations, nous avons entrepris d'étudier les réponses induites par la CyPB dans les macrophages humains obtenus à partir de monocytes isolés du sang et dans les cellules de la lignée humaine promonocytaire THP-1 différenciées en macrophages.

Nous avons d'abord confirmé que la CyPB induit la migration des macrophages, par un mécanisme dépendant de sa fixation sur des héparanes 3-*O*-sulfatés et de l'activation de la voie p44/p42 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*). Mais contrairement aux données concernant la CyPA, nos résultats montrent que la CyPB n'induit pas l'expression de TNF- $\alpha$ , d'Interleukine (IL)-1 $\beta$  ou de CXCL8/IL-8. Par contre, un prétraitement des macrophages durant 16 h en présence de CyPB réduit considérablement la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages stimulés par le lipopolysaccharide (LPS). Etant donné que la synthèse de cette cytokine est finement contrôlée à différents niveaux de son expression, nous avons étudié les mécanismes moléculaires mis en jeu par la CyPB pour inhiber la production de TNF- $\alpha$ . Les analyses par PCR en temps réel et l'utilisation de gènes rapporteurs sous le contrôle du promoteur du gène du TNF- $\alpha$  ont montré que l'inhibition de la sécrétion de la cytokine est corrélée à une diminution de l'expression de son transcrite. Nous avons ensuite démontré que cette diminution est liée à un mécanisme d'inhibition transcriptionnel. En effet, l'étude de la voie d'activation dépendante du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor of  $\kappa$ B*) a mis en évidence la prédominance d'une complexe NF- $\kappa$ B p50 inhibiteur dans les cellules prétraitées par la CyPB. Par ailleurs, nous avons montré que la CyPB induit l'expression de Bcl-3 (B cell leukemia-3), une protéine favorisant la fixation de ce complexe répresseur sur le

promoteur du gène du TNF- $\alpha$ . Par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine et d'ARN interférence, nous avons confirmé le rôle de Bcl-3 dans l'activité inhibitrice de la CyPB.

Parallèlement à la mise en place de ce mécanisme de régulation transcriptionnelle, nous avons démontré que la CyPB induit l'expression de MKP-1 (*Mitogen activated protein Kinase Phosphatase-1*), une phosphatase capable de déphosphoryler et donc d'inactiver les MAPK. MKP-1 est également impliquée dans l'activation de protéines responsables de la déstabilisation de l'ARNm du TNF- $\alpha$ . Nos résultats ont montré que l'expression de MKP-1 est corrélée à une diminution de la phosphorylation de p38 MAPK et à une diminution du temps de vie des ARNm du TNF- $\alpha$ . Cependant, l'inactivation de l'expression de MKP-1 par ARN interférence n'a qu'un faible impact sur l'activité inhibitrice de la CyPB, suggérant un rôle mineur de cette voie post-transcriptionnelle dans les mécanismes d'inhibition mis en place par la CyPB.

Dans leur ensemble, nos résultats sont en faveur d'un rôle important de la CyPB dans les mécanismes de régulation des réponses du macrophage. La poursuite de ces travaux devrait permettre de préciser le rôle des cyclophilines sécrétées dans la régulation de l'activité de ces cellules et de mieux comprendre leur implication dans les maladies inflammatoires et immunes.

# Abstract

Cyclophilins are members of a family of proteins characterised by their peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity and their ability to interact the immunosuppressive drug cyclosporine A. Previous works from our Laboratory have demonstrated that cyclophilin B (CyPB) is secreted in response to inflammatory stimuli and may interact with a receptor formed by the association of CD147 and syndecan-1. These interactions trigger chemotaxis of T lymphocytes subsets and their adherence to extracellular matrix, thus supporting the hypothesis that CyPB functions as an inflammatory mediator. CyPA is also secreted in response to inflammatory stimuli and exhibits similar activities than CyPB. Moreover, CyPA was reported to induce the expression of pro-inflammatory factors, such as TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) by macrophages. Based on these data, we have studied the responses induced by CyPB in human macrophages obtained from peripheral blood-derived monocytes and in human promonocytic THP-1 cells differentiated in macrophage-like cells.

First, we confirmed that CyPB induces the migration of macrophages, by a mechanism dependent on the interaction with 3-*O*-sulfated heparans and the activation of p44/p42 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) pathway. Unlike CyPA, CyPB failed to induce the expression of TNF- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  and CXCL8/IL-8. In contrast, a 16 h pre-treatment of macrophages with CyPB reduced TNF- $\alpha$  production in response to LPS (lipopolysaccharide). As the TNF- $\alpha$  synthesis is highly controlled at diverse levels of its expression, we have studied the molecular mechanisms induced by CyPB responsible for the inhibition TNF- $\alpha$  production. Quantitative real time PCR analysis and luciferase experiments with a reporter gene under the control of the TNF- $\alpha$  gene promoter showed that inhibition of cytokine secretion was related to a decrease in mRNA expression, thus highlighting a transcriptional mechanism of inhibition. Analysis of LPS-activated signalling pathways revealed that CyPB did not modify the activation of NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor of  $\kappa$ B) signalling pathway revealed CyPB. Otherwise, we found that CyPB induced the expression of Bcl-3 (B-cell leukemia-3), a protein that triggers the binding of the repressor homodimer p50/p50 on TNF- $\alpha$  gene promoter. Chromatin immunoprecipitation and RNA interference experiments confirmed the implication of Bcl-3 in the inhibitory activity of CyPB.

In parallel to the mechanisms of transcriptional regulation, we found that CyPB also induced the expression of MKP-1 (MAPK Phosphatase-1), a phosphatase involved in the dephosphorylation and consequent inactivation of MAPKs. MKP-1 has also been implicated

in the activation of proteins responsible for destabilization of TNF- $\alpha$  mRNA. Our results demonstrated that the expression of MKP-1 is correlated with a decrease in p38 MAPK phosphorylation and half-life time of TNF- $\alpha$  mRNA. However, inhibition of MKP-1 expression by RNA interference had no marked effect on the responses induced by CyPB, suggesting a minor role of this post-transcriptional pathway in the inhibitory mechanism established by CyPB.

Overall, our results suggest an important role of CyPB in the regulation of macrophage responses. Further investigations will allow clarifying the role of secreted cyclophilins in the regulation of the activity of macrophages and providing a better comprehension of the implications of these proteins in immune and inflammatory disorders.

# Abbréviations

<b>3-OST</b> : 3-O-sulfotransférase	<b>ECL</b> : électrochimiluminescence
<b>3'UTR</b> : 3' untranslated region	<b>EDTA</b> : acide éthylène diamine tétracétique
<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>ELISA</b> : enzyme-linked immunosorbent assay
<b>ADNc</b> : ADN complémentaire	<b>ERK1/2</b> : extracellular signal regulated protein kinase
<b>ARE</b> : Adenosine/uridine-rich element	<b>GSK3</b> : glycogen synthase 3 kinase
<b>ARN</b> : acide ribonucléique	<b>HGF</b> : hepatocyte growth factor
<b>ARNdb</b> : ARN double brin	<b>HIV</b> : human immunodeficiency virus
<b>ARNm</b> : ARN messenger	<b>HS</b> : héparanes sulfates
<b>ARNsb</b> : ARN simple brin	<b>Hsp</b> : heat shock protein
<b>ASK1</b> : apoptosis signal-regulating kinase 1	<b>HSPG</b> : protéoglycane à chaînes héparanes sulfates
<b>ATF3</b> : activating transcription factor-3	<b>HSV</b> : human simplex virus
<b>AUF1</b> : ARE/poly-(U) binding degradation factor 1	<b>IC50</b> : half maximal inhibitory concentration
<b>BCL-3</b> : B-cell leukemia	<b>IFN</b> : interféron
<b>BSA</b> : bovine serum albumin	<b>IκB</b> : inhibitor of κB
<b>CAML</b> : calcium-signal modulating cyclophilin ligand	<b>IKK</b> : IκB kinase
<b>CD</b> : cluster of differentiation	<b>IL</b> : interleukine
<b>CMLV</b> : cellule musculaire lisse vasculaire	<b>IL-1R</b> : récepteur de l'IL-1β
<b>CsA</b> : cyclosporine A	<b>IRAK</b> : IL-1R associated kinase
<b>CyPA, CyPB</b> : cyclophiline A, B	<b>IRF</b> : interferon regulatory factor
<b>CYLD</b> : cylindromatosis	<b>JAK</b> : janus kinase
<b>DD</b> : death domain	<b>JNK</b> : c-Jun amino-terminal kinase
<b>DPBS</b> : Dulbecco's phosphate buffer saline	<b>Kd</b> : constante de dissociation
<b>DUB</b> : Deubiquitylating enzyme	<b>kDa</b> : kilodalton



**LBP** : LPS binding protein  
**LPS** : lipopolysaccharide  
**LRR** : leucine rich repeat  
**LZ** : leucine zipper  
**MAL** : MyD88 adapter-like protein  
**MAPK** : mitogen activated protein kinase  
**MAPKK** : MAPK kinase  
**MAPKKK** : MAPK kinase kinase  
**MCP-1** : monocyte chemotactic protein-1  
**MD-2** : myeloïd differentiation factor-2  
**miRNA** : microRNA  
**MLV** : murine leukemia virus  
**MM** : masse moléculaire  
**MMP** : métalloprotéinase  
**MK-2** : MAPK activated protein kinase-2  
**MKP** : MAPK phosphatases  
**MyD88** : myeloïd differentiation factor-88  
**NBD** : NEMO binding domain  
**NDST** : N-déacétylase/N-sulfotransférase  
**NEMO** : NF- $\kappa$ B essential modulator  
**NES** : nuclear export sequence  
**NF-AT** : nuclear factor of activated T cells  
**NF- $\kappa$ B** : nuclear factor of  $\kappa$ B  
**NLS** : nuclear localization sequence  
**PAMP** : pathogen-associated molecular pattern  
**PDK1** : 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1  
**pHi** : point isoélectrique  
**PI3K** : phosphatidyl inositol 3 kinase  
**Pin-1** : peptidyl-prolyl isomerase 1  
**PIP2** : phosphatidylinositol (4,5) biphosphate  
**PIP3** : phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate  
**PKB** : protein kinase B  
**Poly I:C** : acide polyinosinique polycytidylque  
**PP1** : protéine phosphatase 1  
**PP2A** : protéine phosphatase 2A  
**PRL** : prolactine  
**PRR** : pattern recognition receptor  
**RANTES** : Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted  
**RBP** : RNA-binding protein  
**RHD** : Rel homology domain  
**RHIM** : RIP homotypic interacting motif  
**RIP1** : receptor interacting protein 1  
**RP105** : Radioprotective 105  
**ROS** : reactive oxyden species  
**SAM** : sterile  $\alpha$  motif  
**SARM** : sterile  $\alpha$ - and armadillo containing motif  
**SDS-PAGE** : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
**SH2** : Src homology 2  
**SIGIRR** : single immunoglobulin IL-1-related protein  
**SIKE** : supressor of IKK $\epsilon$   
**siRNA** : small interfering RNA  
**SIV** : simian immunodeficiency virus  
**SHP** : SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1

**SOCS** : suppressor of cytokine signalling

**ST2** : supressor of tumorigenicity

**STAT** : Signal transducer and activator of transcription

**SVF** : sérum de veau foetal

**T6BM** : TRAF6 binding motif

**TAB** : TAK1 binding protein

**TAD** : transcription activation domain

**TAK1** : TGF- $\beta$  activated kinase 1

**TAM** : Tumor-associated macrophages

**TANK** : TRAF-associated NF- $\kappa$ B activator

**TAX1BP1** : TAX1-binding protein 1

**TBK1** : TANK binding kinase 1

**TBS** : tris buffered saline

**TCR** : T-cell receptor

**TGF- $\beta$**  : transforming growth factor- $\beta$

**TIA-1** : T cell intracellular antigen -1

**TIAR** : TIA-1 related protein

**TIR** : Toll/IL-1 $\beta$  receptor

**TLR** : Toll-like receptor

**TNF- $\alpha$**  : tumor necrosis factor- $\alpha$

**TNFR** : récepteur du TNF- $\alpha$

**Tollip** : Toll interacting protein

**Tpl2** : tumor progression locus 2

**TRAF** : TNF-receptor associated kinase

**TRAM** : TIR-related adaptor molecule

**Triad3A** : Triad domain-containing protein 3

**TRIF** : TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$

**TRIM** : tripartite motif protein

**TRIS** : trishydroxyméthylaminométhane

**TTP** : tristretraproline

**UBD** : ubiquitin binding protein



<b>Avant propos</b> .....	<b>1</b>
---------------------------	----------

<b>Généralités</b> .....	<b>7</b>
--------------------------	----------

<b>I. Les Cyclophilines A et B</b> .....	<b>9</b>
--	----------

<b>A. Caractérisation des cyclophilines</b> .....	<b>9</b>
---	----------

<i>A. 1. La Cyclophiline A</i> .....	9
--------------------------------------	---

<i>A. 2. La cyclophiline B</i> .....	13
--------------------------------------	----

<i>A. 3. Les autres cyclophilines</i> .....	14
---	----

<b>B. Activités des CyPA et CyPB intracellulaires</b> .....	<b>16</b>
---	-----------

<i>B. 1. Activité peptidyl-prolyl cis/trans isomérase</i> .....	16
---	----

<i>B. 2. Rôle dans l'immunosuppression</i> .....	17
--	----

<i>B. 3. Régulation de l'activité des protéines de signalisation</i> .....	20
--	----

<i>B. 4. Régulation de la transcription</i> .....	21
---	----

<i>B. 5. Régulation de l'apoptose</i> .....	22
---	----

<i>B. 6. Régulation du transport des protéines</i> .....	24
--	----

<i>B. 7. Cyclophilines et virus</i> .....	25
---	----

<b>C. Propriétés des cyclophilines sécrétées</b> .....	<b>28</b>
--	-----------

<i>C. 1. Sécrétion des CyPA et CyPB lors de l'inflammation</i> .....	28
--	----

<i>C. 2. Les récepteurs de la CyPB</i> .....	29
--	----

<i>C. 2. a. Caractérisation des sites de fixation</i> .....	30
---	----

<i>C. 2. b. Fixation de la CyPB sur le CD147</i> .....	31
--	----

<i>C. 2. c. Fixation de la CyPB aux chaînes héparanes sulfates</i> .....	33
--	----

<i>C. 3. Réponses moléculaires induites par la CyPA et la CyPB</i> .....	35
--	----

<i>C. 4. Réponses cellulaires induites par la CyPA et la CyPB</i> .....	39
---	----

<i>C. 5. Implication de la CyPA et de la CyPB dans les pathologies inflammatoires</i> .....	41
---	----

<i>C. 5. a. Cyclophilines et polyarthrite rhumatoïde</i> .....	41
--	----

<i>C. 5. b. Cyclophilines et maladies cardiovasculaires</i> .....	42
---	----

<i>C. 5. c. Cyclophilines et autres pathologies inflammatoires</i> .....	44
--	----

<b>II. Rôle des TLRs dans l'immunité innée</b> .....	<b>45</b>
--	-----------

<b>A. La signalisation des TLRs</b> .....	<b>45</b>
---	-----------

<i>A. 1. Les TLRs</i> .....	46
-----------------------------	----

<i>A. 1. a. Structure des TLRs</i> .....	46
--	----

<i>A. 1. b. Expression et ligands des différents TLRs</i> .....	46
---	----

<i>A. 1. b. -i) Les TLRs de surface cellulaire</i> .....	48
--	----

<i>A. 1. b. -ii) Les TLRs intracellulaires</i> .....	49
--	----

<i>A. 2. Voies de signalisation associées aux TLRs</i> .....	49
--	----

<i>A. 2. a. Voie dépendante de MyD88</i> .....	50
--	----

<i>A. 2. b. La voie dépendante de TRIF</i> .....	54
--	----

<i>A. 2. c. La voie PI3K</i> .....	56
------------------------------------	----

<i>A. 3. Activation des facteurs de transcription</i> .....	57
---	----

<i>A. 3. a. La voie NF-<math>\kappa</math>B</i> .....	57
---	----

<i>A. 3. a. -i) Le complexe IKK</i> .....	57
---	----

A. 3. a. -ii) La famille NF- $\kappa$ B.....	58
A. 3. a. -iii) Les I $\kappa$ Bs : substrats du complexe IKK et inhibiteurs des complexes NF- $\kappa$ B.....	60
A. 3. b. Les voies MAPK.....	61
A. 3. b. -i) Les kinases ERK1/2.....	62
A. 3. b. -ii) Les kinases JNK.....	62
A. 3. b. -iii) Les kinases p38.....	62
A. 3. b. -iv) Les MAPKKs.....	63
A. 3. c. Les IRFs.....	64
A. 3. c. -i) Activation d'IRF3 et IRF7 par la voie dépendante de TRIF.....	64
A. 3. c. -ii) Activation d'IRF7 par la voie dépendante de MyD88.....	65
A. 3. c. -iii) Activation d'IRF5.....	65
<b>B. Désactivation des voies de signalisation des TLRs.....</b>	<b>66</b>
<u>B. 1. Régulation des voies de signalisation.....</u>	<u>66</u>
B. 1. a. Régulation par des compétiteurs.....	66
B. 1. b. Régulation par dégradation.....	70
B. 1. c. Régulation par débiquitination.....	72
B. 1. d. Régulation par déphosphorylation.....	73
B. 1. e. Régulation par des protéines transmembranaires.....	74
B. 1. f. Autres protéines inhibitrices.....	76
<u>B. 2. Inhibition transcriptionnelle et post-transcriptionnelle.....</u>	<u>77</u>
B. 2. a. Régulation de l'activité des facteurs de transcription.....	77
B. 2. b. Régulation post-transcriptionnelle.....	79
B. 2. b. -i) Déstabilisation et dégradation des ARNm.....	80
B. 2. b. -ii) Inhibition de la traduction.....	81
<u>B. 3. Régulation par les miRNAs.....</u>	<u>82</u>
B. 3. a. Régulation de l'expression des TLRs.....	82
B. 3. b. Régulation de l'expression des protéines de signalisation.....	83
B. 3. c. Régulation de l'expression des facteurs de transcription.....	84
B. 3. d. Régulation de l'expression des cytokines.....	84

## **Travaux personnels ..... 87**

### **Chapitre I : Etude de la fixation de la CyPB sur les macrophages..... 89**

<b>A. Introduction.....</b>	<b>91</b>
<b>B. Résultats.....</b>	<b>93</b>
<u>B. 1. Etude de la fixation de la CyPB sur les cellules THP-1.....</u>	<u>93</u>
<u>B. 2. Réponses induites par la CyPB sur les cellules THP-1.....</u>	<u>94</u>
B. 2. a. Activité chimiotactile.....	94
B. 2. b. Activation de la voie p44/p42 MAPK.....	96
<u>B. 3. Effet de l'invalidation des sites de fixation HS de la CyPB sur ses activités biologiques.....</u>	<u>96</u>
B. 3. a. Inhibition de la fixation de la CyPB sur les cellules THP-1.....	96
B. 3. b. Inhibition de l'activité de la CyPB.....	97
<b>C. Discussion.....</b>	<b>98</b>

**Chapitre II : Etude des mécanismes induits par la CyPB pour réguler l'expression du TNF- $\alpha$  induit par le LPS..... 101**

**Partie I : Etude du mécanisme de régulation transcriptionnelle.....103**

**Introduction .....103**

**Publication 1 : *Cyclophilin B attenuates the expression of TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated macrophages through the induction of Bcl-3* .....107**

**Discussion .....139**

**Partie II : Etude du mécanisme de régulation post-transcriptionnelle..... 145**

**A. Introduction .....145**

**B. Résultats.....146**

***B. 1. Mise en évidence d'une régulation post-transcriptionnelle..... 146***

***B. 2. Etude du mécanisme de régulation post-transcriptionnelle..... 148***

***B. 2. a. Effet de la CyPB sur la phosphorylation de p38 MAPK..... 148***

***B. 2. b. Effet de la CyPB sur l'expression de MKP-1..... 149***

***B. 2. c. Effet de la CyPB sur la stabilité de l'ARNm du TNF- $\alpha$  .....150***

***B. 3. Implication de MKP-1 dans l'activité inhibitrice de la CyPB..... 151***

**C. Discussion .....153**

**Discussion..... 155**

**Matériels et Méthodes..... 167**

**A. Matériels .....169**

**B. Culture cellulaire et isolement des monocytes du sang .....170**

**C. Dosage ELISA du TNF- $\alpha$ .....170**

**D. Détection de l'expression des protéines par immuno-révélation .....171**

**E. Analyse et quantification de l'expression des ARNm par RT-PCR.....171**

**F. Invalidation de gènes par ARN interférence .....172**

**G. Analyse par cytofluorimétrie en flux .....172**

**H. Etude du chimiotactisme .....173**

**I. Analyse de l'expression de gène rapporteur.....173**

**Annexe ..... 175**

**Publication 2 : *Synthesis of Heparan Sulfate with Cyclophilin B-binding properties is determined by cell type-specific expression of sulfotransferase*.....177**

**Bibliographie ..... 193**



*Avant propos*

---





Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe "Diversité des héparanes sulfates et régulation de la réponse inflammatoire" dirigée par le Pr. Fabrice ALLAIN.

Les cyclophilines se caractérisent par leur capacité à fixer un médicament à activité immunosuppressive, la cyclosporine A (CsA) et par leur activité peptidyl-prolyle *cis/trans* isomérase (PPIase). Les premières études se sont focalisées sur le rôle de la cyclophiline A (CyPA) dans l'activité de la CsA. La caractérisation de l'activité PPIase a ensuite suscité de nombreux travaux quant à l'implication des cyclophilines dans la mise en conformation des protéines. Depuis, de nombreuses fonctions biologiques ont été attribuées aux différentes isoformes.

La découverte de la CyPA dans les milieux biologiques, notamment lors de conditions inflammatoires, a conduit diverses équipes à caractériser son activité. La CyPA se fixe sur le CD147 et induit la migration de sous-populations leucocytaires selon un mécanisme dépendant de l'activation de la voie p44/p42 MAPK. La présence de CyPA dans le plasma de patients souffrant de septicémie, dans les voies respiratoires de modèles murins d'asthme allergique ou encore dans le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde a suggéré son implication dans les processus inflammatoires. Aussi, depuis quelques années, diverses équipes étudient le rôle de la CyPA dans la régulation de l'inflammation. Selon les données présentes dans la littérature, la fixation de la CyPA sur le CD147 induit l'expression par les macrophages de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor*) ou l'interleukine-8 par un mécanisme dépendant de l'activation des voies de signalisation MAPK (*Mitogen activated protein kinase*) et NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor of  $\kappa$ B*). Toutefois, ces propriétés de la CyPA sont à nuancer puisque diverses équipes n'ont pas été en mesure de reproduire ces résultats.

La CyPB présente des activités similaires à la CyPA. Elle est sécrétée de façon constitutive par différentes populations cellulaires et est retrouvée dans le lait et le plasma. Tout comme la CyPA, elle est détectée dans le plasma de patients atteints de septicémie ou dans des modèles murins d'inflammation du poumon. La CyPB se fixe également sur le CD147 et induit le chimiotactisme de différentes sous-populations leucocytaires. La CyPB présente en plus la capacité à se fixer aux chaînes héparanes sulfates portées par un protéoglycane membranaire, le syndécan-1, conférant à la CyPB des activités supplémentaires à celles de la CyPA. Ainsi, elle induit l'adhérence de lymphocytes T à la matrice extracellulaire. Par contre, en comparaison à la CyPA, la littérature recèle de peu de données concernant le rôle de la CyPB dans la modulation de la réponse inflammatoire. Les recherches

réalisées dans le cadre de ma thèse ont donc consisté en l'étude des réponses induites par la stimulation des macrophages par la CyPB.

Si la fixation de la CyPB aux lymphocytes a été largement caractérisée, peu de données concernant les réponses de la protéine sur les macrophages sont disponibles. Dans un premier temps, nous avons donc analysé les réponses induites par la stimulation par la CyPB de macrophages issus de monocytes isolés de sang humain et de cellules de la lignée promonocytaire THP-1 différenciées en macrophages. Nous avons montré que la CyPB induit l'activation de la voie p44/p42 MAPK et le chimiotactisme de ces cellules. Par ailleurs, l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre des enzymes impliquées dans la biosynthèse des chaînes héparanes sulfates a confirmé l'implication du syndécan-1 dans les activités de la CyPB.

Sur la base des travaux relatant l'activité pro-inflammatoire de la CyPA, nous avons stimulé nos cellules par la CyPB afin d'analyser l'activation des voies de signalisation MAPK et NF- $\kappa$ B ainsi que l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Contrairement à ce qui est rapporté pour la CyPA, la CyPB n'induit pas l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Par contre, la pré-incubation des macrophages en présence de la protéine inhibe leur expression induite par le LPS (lipopolysaccharide). La suite de mes travaux a donc consisté à identifier les mécanismes impliqués dans l'activité inhibitrice de la CyPB et fait l'objet de deux parties. La première concerne la régulation transcriptionnelle de l'expression du TNF- $\alpha$ . Cette régulation a été mise en évidence par utilisation de gène rapporteur placé sous le contrôle du promoteur du gène du TNF- $\alpha$ . L'analyse de l'expression de protéines suite à la stimulation des cellules par la CyPB a suggéré l'implication d'un régulateur transcriptionnel, Bcl-3 (*B cell-leukemia*). Nous avons alors utilisé les techniques d'immunoprécipitation de la chromatine et d'ARN interférence afin de confirmer le rôle de Bcl-3 dans l'activité inhibitrice de la CyPB.

En invalidant l'expression de Bcl-3, nous avons observé que la CyPB inhibe toujours l'expression du TNF- $\alpha$  induite par le LPS. Ces données suggérant un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle, nous avons également cherché à le caractériser. Les travaux présentés en seconde partie du chapitre portant sur l'activité immunorégulatrice de la CyPB montrent une possible implication de la phosphatase MKP-1 (*MAPK phosphatase-1*) dans la déstabilisation de l'ARNm du TNF- $\alpha$ .

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

communications suivantes :

## Publications

Deligny, A., Denys, A., **Marcant**, A., Melchior, A., Mazurier, J., van Kuppevelt, T. H. & Allain, F. (2010) Synthesis of heparan sulfate with cyclophilin B-binding properties is determined by cell type-specific expression of sulfotransferases. *J. Biol. Chem*, **285**, 1701-1715

**Marcant**, A., Denys, A., Melchior, A., Martinez, P., Deligny, A., Carpentier, A. & Allain, F. Cyclophilin B Attenuates the Expression of TNF- $\alpha$  in LPS-Stimulated Macrophages through the Induction of Bcl-3 (accepté dans *J. Immunol.*)

## Communications orales

**Adeline Marcant**, Agnès Denys, Mathieu Carpentier et Fabrice Allain. Régulation de l'expression du TNF- $\alpha$  par la cyclophiline B dans les macrophages : implication de Bcl-3. *10ème Journée André Verbert, 15 septembre 2010, Lille.*

## Communications par affiche

**Adeline Marcant**, Agnès Denys, Mathieu Carpentier and Fabrice Allain. Cyclophilin B inhibits TNF- $\alpha$  expression in LPS stimulated macrophages. *Annual meeting of the french society for immunology, 24-26 novembre 2010, Marseille.*

**Adeline Marcant**, Mathieu Carpentier, Agnès Denys and Fabrice Allain. Cyclophilin B inhibits TNF- $\alpha$  expression in LPS-stimulated macrophages : implication of Bcl-3. *10th world congress on inflammation, 25-29 juin 2011, Paris.*



# *Généralités*

---



# I. Les Cyclophilines A et B

Les cyclophilines forment une famille de protéines très conservées au cours de l'évolution dont les isoformes ont été retrouvées chez les animaux, les plantes et les champignons mais également chez les bactéries et les parasites. L'alignement de séquences nucléotidiques et peptidiques a jusqu'à présent permis d'identifier plus de 300 cyclophilines dont les profils d'expression et les fonctions biologiques n'ont pas été déterminés pour chacune d'entre elles (Galat *et al.*, 2004). Les cyclophilines sont caractérisées par leur capacité à fixer une drogue immunosuppressive, la cyclosporine A (CsA) et possèdent une activité enzymatique de type peptidyl-prolyle *cis/trans* isomérase (PPIase).

## A. Caractérisation des cyclophilines

### A. 1. La Cyclophiline A

La cyclophiline A (CyPA) fut la première cyclophiline à avoir été décrite, purifiée à partir de thymocytes de bœuf grâce à sa capacité à se fixer sur une colonne de CsA immobilisée (Handschumacher *et al.*, 1984). La CyPA humaine a ensuite été isolée à partir de splénocytes (Harding *et al.*, 1986), de différents tissus sains et néoplasiques (Koletsky *et al.*, 1986) ou encore à partir de la lignée lymphoblastique Jurkat (Haendler *et al.*, 1987). Chez de nombreuses espèces telles que le rat ou la souris, des orthologues de la CyPA ont été décrits et les séquences nucléotidiques codantes clonées, révélant ainsi plus de 90 % d'homologie entre les différentes cyclophilines (Danielson *et al.*, 1988 ; Hasel & Sutcliffe, 1990).

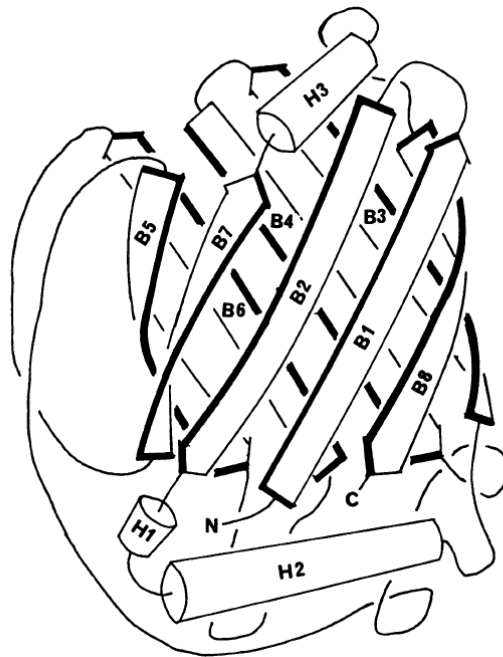
Chez l'Homme, le gène codant pour la CyPA (*Ppia*) a été localisé en un seul exemplaire sur le chromosome 7 et code pour une protéine de 165 acides aminés (MM = 18 kDa) (Haendler & Hofer, 1990 ; Willenbrink *et al.*, 1995 ; Braaten *et al.*, 1996) (Figure 1). La CyPA est représentée par deux isoformes : une mineure de pHi 6,8 et une majeure de pHi 8,6 (Handschumacher *et al.*, 1984 ; Harding *et al.*, 1986).

La conformation de la CyPA correspond à l'archétype des cyclophilines. Elle adopte une conformation en tonneau  $\beta$  formé de huit feuilletts  $\beta$  antiparallèles, délimitant un cylindre dont les ouvertures supérieures et inférieures sont verrouillées par deux hélices  $\alpha$ .





Une troisième hélice  $3_{10}$  se positionne latéralement par rapport au tonneau  $\beta$ . La conformation de la CyPA présente également des coudes  $\beta$  qui connectent les hélices et feuillets entre eux (Ke *et al.*, 1991). Schématiquement, la CyPA forme le noyau commun des cyclophilines sur lequel viennent se greffer les extensions N- et C-terminales spécifiques des autres membres de la famille et qui leur confère des localisations et des fonctions spécifiques (Figure 2).



**Figure 2 : Représentation schématique de la structure de la CyPA.** Les hélices sont numérotées de H1 à H3 et les feuillets de B1 à B8 (d'après Ke *et al.*, 1991).

La CyPA est une protéine abondante principalement localisée au niveau du cytosol et représentant 0,1 à 0,4 % des protéines cytosoliques totales (Harding *et al.*, 1986). Toutefois la CyPA a été retrouvée au niveau d'autres compartiments subcellulaires tels que la mitochondrie (Ryffel *et al.*, 1991), le réticulum endoplasmique (McDonald *et al.*, 1992), l'appareil de Golgi (Sarris *et al.*, 1992) ou encore le noyau (Ryffel *et al.*, 1991 ; Le Hir *et al.*, 1995). Au niveau tissulaire, la CyPA est ubiquitaire avec une abondance marquée dans le cortex cérébral, les reins, les parotides et les cellules du sang (Ryffel *et al.*, 1991 ; Marks *et al.*, 1991). Des auteurs ont montré que l'expression de la CyPA est plus élevée dans les cellules en prolifération. Ainsi, les tissus néoplasiques montrent une concentration plus importante en CyPA en comparaison aux tissus sains (Koletsky *et al.*, 1986). A l'inverse, la

différenciation respective des érythroblastes et myéloblastes spléniques murins en érythrocytes et granulocytes s'accompagne d'une diminution de l'expression de la CyPA (Sarris *et al.*, 1992). D'après les travaux de Campa *et al.* (2003), la CyPA est surexprimée dans les cellules pulmonaires de patients atteints de cancer. Des facteurs extérieurs peuvent également modifier le taux d'expression de la CyPA. En effet, des animaux traités à la CsA présentent une augmentation généralisée du taux de CyPA excepté au niveau du cerveau (McDonald *et al.*, 1992). Hovland *et al.* (1999) ont confirmé ces résultats sur des neuroblastomes murins tout en démontrant que la CsA ne modifie pas l'expression du gène de la CyPA. D'autres facteurs, comme la concanavaleine A entraînent une augmentation du taux de CyPA dans les lymphocytes T. Cette augmentation est inhibée en présence d'acide okadaïque, un inhibiteur des protéines phosphatases PP1 et PP2A, suggérant que l'expression de la CyPA est sous le contrôle de ces deux phosphatases (Richards *et al.*, 1992).

Bien que son ARNm ne code pas pour un peptide signal capable de diriger la CyPA vers l'espace extracellulaire, celle-ci est détectée dans différents liquides biologiques. En effet, il a été démontré que la CyPA est sécrétée dans certaines conditions inflammatoires ou de stress oxydatif. Ainsi, la CyPA a été identifiée comme produit de sécrétion de macrophages murins (Sherry *et al.*, 1992) ou de cellules endothéliales (Kim *et al.*, 2004) en réponse au lipopolysaccharide (LPS). La CyPA a également été mise en évidence dans le plasma de patients souffrant de septicémie (Tegeder *et al.*, 1997) ou dans les liquides synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Billich *et al.*, 1997), notamment au niveau des zones riches en macrophages (Kim *et al.*, 2005). D'ailleurs une corrélation a été établie entre le taux de CyPA et la gravité de la maladie. Dans des modèles murins d'inflammation aigue du poumon, Arora *et al.*, (2005) ont montré que la CyPA est présente à un taux plus élevé dans les fluides de lavages broncho-alvéolaires de souris traitées par le LPS. Il en est de même dans des modèles murins d'asthme allergique où la CyPA est surexprimée par les cellules des voies respiratoires de souris traitées à l'ovalbumine (Gwinn *et al.*, 2006). Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) sécrètent également la CyPA en réponse à un stress oxydatif (Jin *et al.*, 2000), impliquant la CyPA dans les pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose. Suzuki *et al.* (2006) ont mis en évidence un mode de transport vésiculaire hautement régulé de la CyPA par les CMLV, permettant ainsi la sécrétion de la CyPA.

## A. 2. La cyclophiline B

En 1991, une seconde forme de cyclophiline, la cyclophiline B (CyPB) fut découverte. Spik *et al.* (1991) et Caroni *et al.* (1991) ont respectivement purifié une forme sécrétée de cyclophiline à partir de lait de femme et de surnageants de culture de cellules embryonnaires de poulet tandis que Price *et al.* (1991), Hasel *et al.* (1991) et Bergsma *et al.* (1991) ont identifié une nouvelle cyclophiline par criblage de banques d'ADNc en utilisant une sonde oligonucléotidique basée sur la séquence conservée des cyclophilines. Cette nouvelle cyclophiline se distingue de la CyPA par la présence dans sa séquence protéique d'un peptide signal de 25 acides aminés non retrouvé dans la protéine mature, permettant ainsi son adressage au niveau du réticulum endoplasmique et sa sécrétion dans les milieux extracellulaires. Chez l'Homme, le gène de la CyPB (*Ppib*) est localisé sur le chromosome 15 (Peddada *et al.*, 1992) et code pour une protéine présentant 64 % d'homologies de séquence avec la CyPA mais se distinguant par la présence d'extrémités N- et C-terminales spécifiques (Price *et al.*, 1991 ; Hasel *et al.*, 1991 ; Bergsma *et al.*, 1991). La CyPB mature compte 184 acides aminés (MM = 21 kDa) et possède un pHi de 9,6 ; lui conférant ainsi une forte avidité pour les échangeurs à cations tels que l'ADN ou l'héparine (Galat & Bouet, 1994 ; Denys *et al.*, 1998a) (Figure 1).

La CyPB présente une large distribution tissulaire avec une abondance particulière dans le foie, le cerveau (Galat & Bouet, 1994) et les tissus embryonnaires (Caroni *et al.*, 1991). Son expression est cependant 5 à 10 fois inférieure à celle de la CyPA. La CyPB est principalement localisée dans les calciosomes, des vésicules du réticulum endoplasmique spécialisées dans le stockage du calcium où elle colocalise avec la calréticuline (Arber *et al.*, 1992). Dans les cellules du muscle strié, la CyPB est présente dans les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique avec la calséquestrine (Arber *et al.*, 1992). Au niveau du noyau, la présence de la CyPB est plus controversée (Hasel *et al.*, 1991 ; Le Hir *et al.*, 1995). Toutefois, dans les thymocytes activés par des anticorps CD3, Nagata *et al.* (2000) ont observé un passage de la CyPB depuis la fraction microsomale vers la fraction cytosolique/nucléaire, suggérant que la CyPB intervient dans l'apoptose des thymocytes immatures issus de la sélection négative en participant à la dégradation de l'ADN chromosomal. Selon Smith *et al.* (1995), la CyPB peut également emprunter les voies de sécrétion. D'ailleurs, elle est présente dans les surnageants de milieux de culture (Caroni *et al.*, 1991 ; Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996 ; De Ceuninck *et al.*, 2003 ; Faeron *et al.*, 2011) ou dans les milieux biologiques tels que

le lait de femme (Spik *et al.*, 1991) ou le plasma où la concentration de la CyPB a été dosée à  $150 \pm 80$  ng/ml ( $7 \pm 4$  nM) (Allain *et al.*, 1995).

Les mécanismes de rétention de la CyPB dans le réticulum endoplasmique n'ont pas encore été clairement élucidés. En effet, la CyPB ne possède ni la séquence KDEL caractéristique de la rétention de protéines dans le réticulum endoplasmique, ni de domaine transmembranaire. Par contre, elle possède une extrémité C-terminale VEKPF~~A~~I~~A~~KE qui semble être responsable de sa rétention dans le réticulum endoplasmique. Arber *et al.* (1992) ont montré que la substitution de l'extrémité C-terminale d'une protéine normalement sécrétée, la nexine, par celle de la CyPB conduisait à la colocalisation dans le réticulum endoplasmique des deux protéines. Mariller *et al.* (1996) ont confirmé ces travaux en montrant que la CyPB isolée du lait de femme correspond à la protéine tronquée, dépourvue des cinq acides aminés C-terminaux AIAKE. La CyPB peut être sécrétée de façon constitutive par certaines cellules comme les fibroblastes, les chondrocytes ou les kératinocytes en culture (Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996 ; De Ceuninck *et al.*, 2003 ; Faeron *et al.*, 2011) ou en réponse à un stimulus mais les mécanismes de sécrétion de la CyPB sont également mal connus. Il a toutefois été démontré que des cellules traitées à la CsA sécrètent un taux plus important de CyPB, qui se retrouve accumulée dans le milieu de culture (Price *et al.*, 1994 ; De Ceuninck *et al.*, 2003). Par ailleurs, des patients traités par la CsA montrent un taux de CyPB plasmatique plus élevé que des patients non traités (Denys *et al.*, 1998a). Fearon *et al.* (2011) ont également montré que la sécrétion de la CyPB par les kératinocytes est augmentée lorsque les cellules sont mises en présence de CsA. Ces résultats suggèrent que la CsA entrerait en compétition avec les ligands naturels de la CyPB au niveau du réticulum endoplasmique.

### A. 3. Les autres cyclophilines

La cyclophiline C (CyPC) fut clonée pour la première fois à partir d'une banque d'ADNc de cellules stromales de moelle osseuse de souris. C'est une protéine de 212 acides aminés (MM = 23 kDa) et de pHi égal à 7,4 (Friedman & Weissman, 1991) (Figure 1). En 1994, Schneider *et al.* utilisent une sonde nucléotidique correspondant à l'extrémité N-terminale de la CyPC murine pour cloner l'orthologue humain à partir d'une banque d'ADNc de cellules rénales. La CyPC humaine présente respectivement 48% et 70% d'homologie avec

les CyPA et CyPB et présente une large distribution tissulaire puisqu'elle est retrouvée dans le rein, le muscle squelettique, le pancréas, les poumons, le foie ou encore le cœur mais dans une proportion plus faible. Toutefois, de manière générale, la CyPC est 10 fois moins abondante que la CyPA.

En 1988, Tropschug *et al.* montrent l'existence d'une cyclophiline mitochondriale chez le champignon *Neurospora crassa*. Plus tard, une équipe a mis en évidence chez le rat la présence d'une PPIase, localisée au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, associée au pore mitochondrial et dont la séquence peptidique présente des similarités avec les CyPA et CyPB et la cyclophiline de *N. crassa* (Halestrap & Davidson, 1990 ; Connern & Halestrap, 1992). Il s'agit en fait de l'orthologue de la hCyp3, également appelée CyPD, une cyclophiline clonée à partir d'une banque d'ADNc de cellules Jurkat et d'hépatocytes humains à l'aide d'une sonde correspondant à la partie codante de la CyPA humaine (Bergsma *et al.*, 1991 ; Woodfield *et al.*, 1997). La CyPD présente respectivement 76 et 62 % d'homologie de séquence avec les CyPA et CyPB et son ARNm code pour une protéine de 201 acides aminés (Figure 1). Pourtant la masse moléculaire de la CyPD n'est pas de 22 kDa mais de 18 kDa. Cette différence s'explique par la présence d'un peptide signal clivable dirigeant la protéine vers la matrice mitochondriale (Connern & Halestrap, 1992). Tout comme la CyPA, la CyPD est exprimée dans tous les tissus mais à des taux 50 à 100 fois inférieurs (Bergsma *et al.*, 1991).

La cyclophiline 40 (CyP40) fut isolée pour la première fois par chromatographie d'affinité sur colonne immobilisée de CsA à partir d'une fraction soluble de cerveau de veau. Protéine de 370 acides aminés (MM =40 kDa) présente dans la plupart des tissus, elle existe sous deux isoformes qui ont la particularité d'avoir des pHi acides (5,3 et 5,5). Sa séquence nucléotidique a été clonée à partir d'une banque d'ADNc de cellules pancréatiques humaines et l'analyse de la séquence peptidique a révélé des homologies de 60 % avec la CyPA et de 51 % avec la CyPB (Kieffer *et al.*, 1992 ; Kieffer *et al.*, 1993). Le domaine N-terminal de la CyP40 présente 64 % d'homologie de séquence avec la CyPA et porte l'activité PPIase et le domaine de fixation à la CsA tandis que son domaine C-terminal possède 31 % d'identité de séquence avec la FKBP52 (*FK506 binding protein 52*) (Kieffer *et al.*, 1993). En effet, ces deux protéines partagent un domaine de trois unités répétées du motif TPR (*Tetratricopeptide*) qui leur permettent de se lier à la Hsp90 (*Heat shock protein 90*), une chaperone associée à la forme inactive des récepteurs stéroïdiens (Kieffer *et al.*, 1993 ; Ratajczak *et al.*, 1993 ; Ratajczak & Carello, 1996).

Parallèlement à ces précédentes isoformes, d'autres formes de cyclophilines, qualifiées de mineures, ont été décrites. La cyclophiline 33 (CyP33) fut découverte par criblage de banque d'ADNc de la lignée lymphoblastique Jurkat. Cette protéine nucléaire ubiquitaire de 301 acides aminés (33 kDa) possède en C-terminal le domaine PPIase correspondant aux cyclophilines et présente 70 % d'homologie de séquence avec la CyPA. En N-terminal, la CyP33 possède un domaine qui lui permet de se lier à des éléments nucléiques riche en Adénine et Uracile (Mi *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 2008). Ce domaine lui permet également d'interagir avec la protéine MLL (*Myeloid lymphoid leukemia*) qui régule entre autre l'expression des gènes HOX (*Homeobox*) impliqués dans l'hématopoïèse. Dans des cas de leucémies myéloïdes ou lymphoïdes aiguës, le gène MLL se retrouve fréquemment transloqué, provoquant ainsi la perte du domaine de liaison à la CyP33 et une dérégulation de l'expression des gènes HOX (Fair *et al.*, 2001 ; Park *et al.*, 2010).

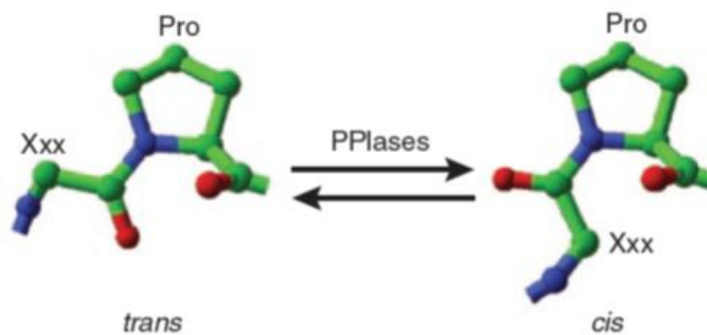
La cyclophiline 60 (CyP60) fut découverte par Wang *et al.* en 1996. Cette protéine de 520 acides aminés (MM = 60 kDa) présente une localisation nucléaire et une distribution tissulaire large. Récemment, la CyP60 a été impliquée dans le transport du CD147 depuis l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique (Yurchenko *et al.*, 2005 ; Pushkarsky *et al.*, 2005).

## **B. Activités des CyPA et CyPB intracellulaires**

### **B. 1. Activité peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase**

La liaison prolyle peut adopter deux conformations stables, *cis* ou *trans*, et l'isomérisation *cis/trans* de la liaison peptidique entre une proline et un autre résidu d'acide aminé est une étape qui nécessite un important apport énergétique à l'échelle biologique. Le passage à la conformation *trans* est un événement moléculaire lent mais déterminant dans le repliement des protéines, ce qui explique l'intervention d'enzymes spécialisées : les peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérases (PPIases) (Schmid, 1993) (Figure 3). En effet, *in vitro*, les PPIases accélèrent l'isomérisation de peptides de synthèse ainsi que les étapes lentes de repliement des protéines (Lang *et al.*, 1987 ; Fischer *et al.*, 1989). Par contre, le rôle de ces enzymes dans le repliement des protéines *in vivo* est beaucoup plus discuté. En effet, du fait de leur structure très conservée au cours de l'évolution et de leur large distribution tissulaire, il a été suggéré que les cyclophilines pouvaient jouer un rôle majeur dans la mise en conformation des

protéines néosynthétisées. Cependant, l'inactivation des gènes codant pour les CYP1 et CYP2 (homologues de la CyPA et CyPB) chez la levure n'affecte pas la viabilité des cellules (Koser *et al.*, 1991). Par ailleurs, l'inactivation du gène codant pour la CyPA chez la souris n'altère pas la durée de vie de ces animaux (Colgan *et al.*, 2000). Ces données suggèrent que les cyclophilines ne sont pas indispensables au métabolisme basal de la cellule. En revanche, le fait que ces protéines soient souvent retrouvées dans des complexes moléculaires suggère qu'elles participent à la régulation de diverses activités biologiques.



**Figure 3 : Isomérisation *cis/trans* de la liaison prolyle (d'après Lu *et al.*, 2007).**

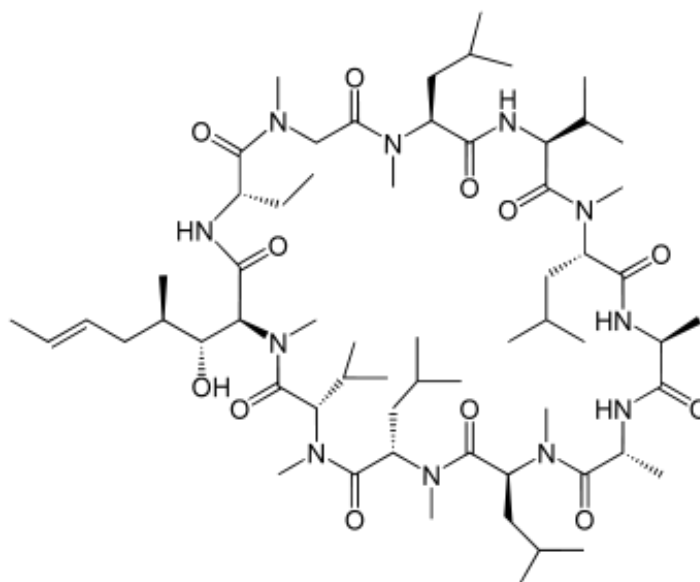
## B. 2. Rôle dans l'immunosuppression

La CsA a été isolée à partir d'une souche de champignon, *Tolytoclatum inflatum*, par le laboratoire Sandoz en 1969 (Borel *et al.*, 1986). C'est un undécapeptide cyclique hydrophobe de masse moléculaire de 1203 Da (Figure 4). Les premiers essais cliniques ont mis en évidence une puissante activité immunosuppressive et depuis, la CsA est utilisée pour prévenir des rejets de greffes après une transplantation de tissus ou d'organes mais également pour traiter certaines maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis ou encore le diabète insulino-dépendant. La CsA agit en bloquant la production et la libération de cytokines par les lymphocytes T auxiliaires et notamment l'expression de l'interleukine (IL)-2, une cytokine essentielle dans le mécanisme de l'expansion clonale (Borel *et al.*, 1989).

La formation du complexe cyclophiline/CsA inhibe l'activité PPIase (Harding *et al.*, 1988 ; Fischer *et al.*, 1989), indiquant que le site de fixation de l'immunosupresseur et le site



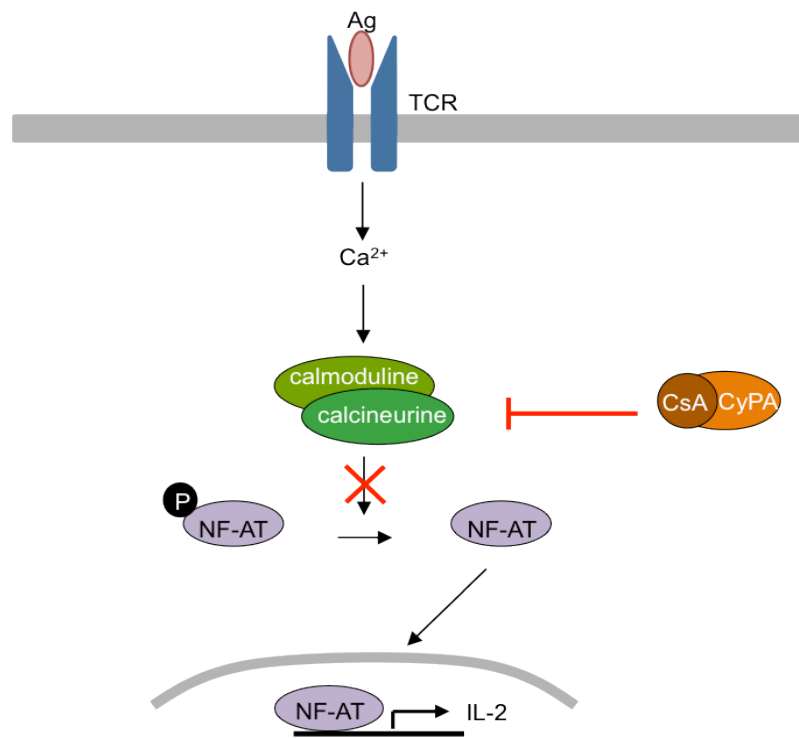
catalytique des cyclophilines sont confondus. Cette constatation a suggéré que l'activité immunosuppressive de la CsA dépend de l'inhibition de l'activité PPIase de la cyclophiline. Cependant les faibles doses effectrices de médicaments ne sont pas suffisantes pour inhiber les taux importants de PPIases présentes dans la cellule (Schreiber *et al.*, 1991 ; Sigal & Dumont, 1992). La découverte d'analogues de la CsA non immunosuppresseurs mais toujours capable d'inhiber l'activité enzymatique des cyclophilines a supposé l'implication d'autres molécules dans les mécanismes d'immunosuppression (Bierer *et al.*, 1991). D'ailleurs, la CsA présente deux domaines fonctionnels : un domaine de fixation aux cyclophilines et un domaine effecteur qui permet l'interaction avec un partenaire protéique (Ivery, 1999).



**Figure 4 : Structure de la CsA.**

Bien que toutes les cyclophilines se lient à la CsA *in vitro*, il a été démontré que seule la CyPA est directement impliquée dans l'activité immunosuppressive du médicament (Bram *et al.*, 1993). En effet, le complexe CyPA/CsA se lie à la calcineurine, une sérine/thréonine phosphatase  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline dépendante qui joue un rôle clé dans l'activation des lymphocytes T. D'ordinaire activée après reconnaissance d'un antigène par son TCR (*T-cell receptor*), cette phosphatase déphosphoryle la facteur de transcription NF-AT (*Nuclear Factor of activated T cells*), permettant ainsi sa translocation jusqu'au noyau et sa fixation sur les promoteurs de ses gènes cibles tels que le gène de l'IL-2 (Jain *et al.*, 1993). *In vivo*, les

complexes CyPA/CsA interagissent avec la calcineurine (Friedman & Weisman, 1991 ; Liu *et al.*, 1991 ; Kieffer *et al.*, 1992 ; Swanson *et al.*, 1992). La formation de ces complexes ternaires entraîne des défauts de déphosphorylation du NF-AT, induisant ainsi une inhibition de l'activation des lymphocytes T (Flanagan *et al.*, 1991 ; Fruman *et al.*, 1992) (Figure 5).



**Figure 5 : Mécanisme d'immunosuppression de la CsA.**

En raison de la localisation réticulaire de la CyPB, il a été proposé que le complexe CyPB/CsA jouerait un rôle dans l'inactivation de la calcineurine par une voie indirecte. En effet, Bram & Crabtree (1994) ont montré qu'au cours de l'activation lymphocytaire, la CyPB interagit avec la CAML (*Calcium-signal modulating cyclophilin ligand*), une protéine impliquée dans la régulation des flux calciques. Ainsi, en bloquant cette association, la CsA pourrait perturber la libération de Ca<sup>2+</sup> et bloquer l'activation de la calcineurine.

Une autre implication de la CyPB dans l'activité immunosuppressive de la CsA a également été décrite. Alors que la CsA diffuse passivement dans toutes les cellules du sang lorsqu'elle est sous forme libre, son incorporation est augmentée en présence de CyPB (Denys *et al.*, 1998a). La CyPB complexée à la CsA se fixe sur les lymphocytes, augmentant ainsi la

concentration de la CsA à proximité des membranes. En effet, en présence de CyPB, l'IC50 de la CsA diminue de  $175 \pm 40$  ng/mL à 12 ng/mL (Allain *et al.*, 1996). De plus, la sensibilité inter-individuelle à la CsA disparaît en présence de CyPB puisque tous les individus acquièrent un phénotype répondeur sensible au médicament (Denys *et al.*, 1998a). La CyPB contribue donc à l'efficacité du traitement immunosuppresseur.

### B. 3. Régulation de l'activité des protéines de signalisation

Il a été démontré que la CyPA peut catalyser l'interconversion *cis/trans* d'une liaison prolyle située dans le domaine SH2 (*Src homology 2*) de Itk (*Interleukine-2 tyrosine kinase*). Cette tyrosine kinase de la famille Tec, exprimée par les lymphocytes T, joue un rôle dans la maturation des thymocytes et participe à la signalisation du TCR. Lorsque la liaison prolyle impliquant la proline 287 est en position *trans*, le domaine SH2 de Itk interagit avec des phosphoprotéines impliquées dans la transduction du signal. Par contre, l'isomérisation par la CyPA de la liaison prolyle en forme *cis* entraîne un profond changement conformationnel du domaine SH2 qui induit l'homodimérisation de Itk et son inactivation. La présence de CsA inhibe l'inactivation de Itk, démontrant l'importance de l'activité PPIase de la CyPA (Brazin *et al.*, 2002). Des travaux réalisés sur des souris déficientes en CyPA ont montré que ces animaux présentent des allergies caractéristiques d'une surexpression de cytokines de type  $T_H2$  et notamment d'IL-4, dues à une suractivation de Itk chez ces souris (Colgan *et al.*, 2004).

En 2004, des expériences de double hybride et de co-immunoprécipitation ont mis en évidence une interaction fonctionnelle entre la partie cytoplasmique du CD99 et la CyPA. Le CD99 est protéine transmembranaire présentant un rôle essentiel dans l'inflammation et la réponse immunitaire puisqu'il est impliqué dans la migration des monocytes, l'adhésion entre leucocytes et cellules endothéliales ou encore la différenciation et l'apoptose des lymphocytes T et des thymocytes. L'activation du CD99 induit le recrutement de la CyPA, suggérant que cette dernière est une protéine de signalisation du CD99 (Kim *et al.*, 2004).

La CyPB interagit avec la CAML, qui réside dans le réticulum endoplasmique où elle colocalise avec le  $Ca^{2+}$ , l'ATPase II  $Ca^{2+}$ -dépendante et la calréticuline. La surexpression de la CAML entraîne l'ouverture des canaux calciques. Ainsi, en régulant la libération du  $Ca^{2+}$  intracellulaire, la CAML modulerait l'activation de la calcineurine, et par conséquent l'activation transcriptionnelle du gène de l'IL-2 (Bram & Crabtree, 1994 ; Holloway & Bram,

1998).

Par des expériences de co-immunoprécipitation, Syed *et al.* (2003) ont caractérisé une interaction fonctionnelle entre la CyPA et le récepteur de la prolactine (PRL). La PRL est une hormone peptidique à activité facteur de croissance ayant de multiples rôles physiologiques, notamment dans le développement du cancer du sein. La fixation de la PRL sur son récepteur entraîne l'activation de la voie JAK2/STAT5 (*Janus kinase 2 / Signal transducer and activator of transcription 5*) qui y est associée et la translocation du facteur de transcription STAT5 au noyau afin d'induire la synthèse de nombreux gènes impliqués dans la croissance, la prolifération et la migration cellulaire. La surexpression de la CyPA prolonge l'activation de JAK2 et entraîne une augmentation de l'expression de gènes en réponse à la PRL. Plus récemment, il a été démontré que c'est l'activité PPIase de la CyPA qui régule l'activation de la voie de signalisation. En effet, l'utilisation de CsA ou la surexpression de CyPA ayant perdu son activité enzymatique entraîne une absence de réponse suite à la fixation de la PRL sur son récepteur. De façon similaire, la surexpression du récepteur de la PRL dont la proline 344 a été mutée, inhibe la signalisation qui lui est associé. Par ailleurs, le traitement, par la CsA, de souris ayant subi des xénogreffes de tumeurs du sein entraîne une augmentation de la nécrose de ces tumeurs et une diminution des métastases (Zheng *et al.*, 2008).

De récents travaux ont montré que la CyPA et la CyPB jouent des rôles importants, mais à différents niveaux, dans l'activation de STAT3. En réponse à des cytokines telles que IL-6, ce facteur de transcription régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la différenciation, la prolifération ou encore la survie cellulaire. L'activation de STAT3 implique la phosphorylation d'un de ses résidus tyrosine et sa translocation du cytoplasme jusqu'au noyau. Bauer *et al.* (2009) ont montré par des expériences d'ARN interférence que la CyPA est essentielle à la phosphorylation de STAT3 induite par l'IL-6 dans des cellules de lignée myéloïde. Par ailleurs, ils ont montré que la CyPB interagit avec STAT3 afin de moduler la localisation nucléaire ainsi que la fixation du facteur de transcription sur ses gènes cibles.

## B. 4. Régulation de la transcription

Dans un modèle de lignée de cellules humaines de cancer du sein, l'inactivation de l'expression de la CyPB entraîne une diminution de l'expression des gènes en réponse à la

PRL. (Fang *et al.*, 2009 ; Fang *et al.*, 2010). De précédents travaux ont montré que la CyPB extracellulaire interagit avec la PRL et qu'elle facilite sa rétrotranslocation nucléaire. Dans le noyau, le complexe CyPB/PRL agit comme un inducteur transcriptionnel : il facilite l'interaction de STAT5 avec l'ADN en induisant la libération de STAT5 de son répresseur (Rycyzyn *et al.*, 2000, Rycyzyn & Clevenger, 2002). Par ailleurs, il a été observé que la CyPB est exprimée à des taux supérieurs dans les cellules de cancer du sein en comparaison aux cellules saines. Ensemble, ces données suggèrent que les actions moléculaires de la CyPB au sein de la voie de signalisation induite par la PRL auraient un impact important sur le cancer du sein (Fang *et al.*, 2009, 2010).

La CyPB interagit également avec l'IRF-3 (*Interferon regulatory factor-3*), un facteur de transcription impliqué dans l'induction de l'expression d'interféron- $\beta$  (IFN- $\beta$ ). Présent sous forme latente dans le cytoplasme, IRF-3 est phosphorylé lors d'une infection virale, ce qui entraîne sa dimérisation et sa translocation dans le noyau où il peut induire la synthèse d'IFN- $\beta$ . L'inactivation de l'expression de la CyPB induit un défaut de phosphorylation d'IRF-3, bloquant ainsi l'expression d'IFN- $\beta$  ce qui suggère que la CyPB joue un rôle important dans l'activation du facteur de transcription (Obata *et al.*, 2005).

## B. 5. Régulation de l'apoptose

Les travaux menés sur le rôle des CyPA et CyPB dans la régulation de l'activité des facteurs de transcription STAT3 et STAT5 ont permis de montrer qu'un défaut d'expression de ces deux cyclophilines est corrélé à une diminution de la survie de cellules issues de lignées cancéreuses (Bauer *et al.*, 2009 ; Fang *et al.*, 2009, 2010).

En 2002, Meunier *et al.* ont identifié la CyPB comme faisant parti d'un complexe multiprotéique localisé au niveau du réticulum endoplasmique et qui rassemble des protéines impliquées dans la réponse UPR (*Unfolded protein response*). Cette réponse UPR est activée lorsque le réticulum endoplasmique est soumis à un stress dû à une trop forte concentration de protéines présentant des défauts conformationnels et se traduit par une augmentation d'expression de chaperones endoplasmiques. Si ce stress est prolongé, la cellule produit des ROS (*Reactive oxygen species*) qui conduisent à la mort cellulaire. Plus récemment, il a été démontré que la CyPB a un rôle important à jouer dans cette réponse UPR. En effet, le promoteur du gène de la CyPB présente des éléments de réponse similaires à ceux retrouvés

sur les gènes codant les chaperones impliquées dans la réponse UPR, et son expression est augmentée en cas de stress du réticulum endoplasmique. Cette surexpression de CyPB réduit la génération de ROS et par conséquent l'apoptose des cellules induite par l'utilisation de drogues bloquant la mise en conformation des protéines. L'utilisation de mutants de la CyPB déficients pour son activité isomérase a également permis de démontrer que son activité PPIase est nécessaire afin d'inhiber les effets engendrés par un stress prolongé du réticulum endoplasmique (Kim *et al.*, 2008).

L'AIF (*Apoptosis-inducing factor*) est une protéine à activité NADH oxydase contenue dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Suite à un stimulus apoptotique, ce facteur est transloqué jusqu'au noyau où il induit la dégradation de l'ADN selon un mécanisme caspase indépendant. Candé *et al.* (2004) ont montré que pour induire la lyse de la chromatine, une interaction est nécessaire entre AIF et la CyPA et que cette activité ne requiert pas son domaine PPIase. Par ailleurs, dans des cellules n'exprimant pas la CyPA, AIF est incapable d'induire l'apoptose. Dans le cas d'hypoxie/ischémie cérébrale, les dommages causés au cerveau sont moins importants chez les souris déficientes pour la CyPA que pour les souris normales, du à une diminution de la translocation de AIF au noyau en absence de CyPA (Zhu *et al.*, 2007).

D'autres travaux ont montré que la CyPA a un rôle anti-apoptotique, notamment en séquestrant le cytochrome c (Cyt c). Cette protéine présente dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie est libérée lors d'événements apoptotiques. Une fois dans le cytoplasme, le Cyt c est impliqué dans la formation de l'apoptosome qui active la pro-caspase-9 et -3. *In vitro*, la CyPA inhibe l'activation de la pro-caspase-3 par le Cyt c. De plus, dans les tissus cérébraux qui expriment fortement la CyPA de façon constitutive, des dimères de CyPA/Cyt c ont été retrouvés. Dans des cellules cancéreuses, des complexes CyPA/Cyt c sont retrouvés suite à l'induction de l'apoptose, suggérant que la CyPA est capable d'inhiber l'apoptose en séquestrant le Cyt c dans les cellules tumorales (Bonfils *et al.*, 2010).

De nombreuses études ont révélé une augmentation de l'expression de la CyPA dans divers cancers tels que le cancer du poumon à petites cellules, le cancer du sein, le cancer de l'œsophage, l'adénocarcinome pancréatique ou encore l'hépatocarcinome (Lee & Kim, 2010). Les cellules surexprimant la CyPA montrent une forte activation de la voie p44/p42 MAPK responsable de la prolifération et de la migration cellulaire. D'ailleurs l'invalidation de l'expression de la CyPA entraîne une diminution de la croissance tumorale (Howard *et al.*,

2004 ; Obchoei *et al.*, 2011). Dans les tumeurs solides, des ROS sont continuellement générés au niveau de la région hypoxique de la tumeur. Pourtant, l'apoptose de ces cellules n'a pas lieu. Bien que le mécanisme ne soit pas encore établi, la CyPA aurait un effet antioxydant et par conséquent anti-apoptotique et l'inhibition de son activité PPIase par l'utilisation de CsA restaure l'apoptose induite par des drogues anticancéreuses (Choi *et al.*, 2007 ; Han *et al.*, 2010 ; Lee, 2010).

## B. 6. Régulation du transport des protéines

La CyPB et la chaperone Hsp47 sont associées au procollagène dans le réticulum endoplasmique et les vésicules pré-golgiennes de sécrétion. La dissociation est fonction de l'état de maturation du procollagène qui implique l'activité PPIase de la CyPB. En effet, le traitement des fibroblastes murins par la CsA diminue le taux de collagène mature et retarde sa sécrétion (Smith *et al.*, 1995).

La CyPA a été impliquée dans le transport à la membrane de l'échangeur sodium-calcium NCX1 (*Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger 1*). L'invalidation de l'expression de la CyPA conduit à une diminution de l'expression de l'échangeur à la surface des cellules sans modifier son taux d'expression cellulaire. Par ailleurs, il semblerait que l'activité PPIase de la CyPA ne soit pas nécessaire à l'expression fonctionnelle de NCX1 (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2002 ; Elbaz *et al.*, 2010).

Récemment, la CyPB a été décrite comme une protéine interagissant avec la pompe sodium/potassium (Na/K-ATPase) et nécessaire à son activité au sein d'une lignée de cellules rénales humaines. L'utilisation d'ARN interférents dirigés contre la CyPB et le relargage de la CyPB depuis le réticulum endoplasmique jusqu'au milieu extracellulaire grâce à la CsA ont permis de mettre en évidence un défaut de localisation de la pompe Na/K-ATPase au niveau de la membrane plasmique. Ces données ont permis de révéler un nouveau rôle de la CyPB dans la mise en conformation de la pompe Na/K-ATPase et son trafic depuis le compartiment réticulaire jusqu'à la membrane plasmique (Suñé *et al.*, 2010).

D'autres travaux ont impliqué la CyPB dans la maturation et le transport de protéines, notamment l'isoforme 1 du cotransporteur Na<sup>+</sup>-dicarboxylate (NaDC1) présent au niveau des cellules rénales. Des expériences d'invalidation de l'expression de la CyPB ont montré qu'en plus de participer à la mise en conformation et au trafic cytosolique de NDC1, la CyPB régule

également la synthèse du transporteur. De plus, son rôle de chaperone dans la maturation du transporteur n'implique pas son activité PPIase mais sa capacité à interagir avec NaDC1 au niveau du réticulum endoplasmique (Bergeron *et al.*, 2011).

## B. 7. Cyclophilines et virus

En 1993, des expériences de doubles hybrides visant à trouver des protéines interagissant avec les protéines de la capsid du HIV-1 ont permis de découvrir que les CyPA et CyPB forment des complexes stables avec la p55Gag et la gp120 du virus (Luban *et al.*, 1993 ; Franke *et al.*, 1994 ; Endrich & Gehring, 1998). Pourtant, seule la CyPA est retrouvée incorporée dans les virions durant l'assemblage du virus. Par ailleurs, l'interaction de la CyPA avec la protéine Gag du HIV-1 est spécifique puisque les protéines équivalentes chez d'autres retrovirus tels que le HIV-2, le SIV ou encore le Mo-MLV n'interagissent pas avec la CyPA (Luban *et al.*, 1993 ; Franke *et al.*, 1994 ; Thali *et al.*, 1994). Cette interaction est indispensable pour la réplication du virus au sein de la cellule hôte puisque la CyPA est requise dans les premières étapes du cycle infectieux du virus, étapes qui interviennent après la fixation du HIV-1 et la fusion membranaire, mais avant l'action de la transcriptase reverse et la réplication du génome viral (Braaten *et al.*, 1996). Par ailleurs, la CyPA ne jouerait aucun rôle dans l'assemblage, la maturation et la stabilité du HIV-1 (Wiegers *et al.*, 1999 ; Chiu *et al.*, 2002).

Suite à son incorporation, la CyPA peut être transloquée à la surface du virus et est alors capable d'interagir avec des récepteurs présents à la surface des cellules cibles. Les protéoglycanes à chaînes héparanes sulfates (HSPG) et plus particulièrement les syndécans ont été identifiés comme des co-récepteurs du virus HIV-1. L'interaction de la CyPA incorporée dans l'enveloppe virale avec les chaînes héparanes sulfates (HS) présentes à la surface des cellules hôtes constitueraient une étape initiale dans l'attachement du virus, permettant ainsi l'interaction entre la gp120 virale et les molécules CD4 des cellules cibles (Saphire *et al.*, 1999 ; Saphire *et al.*, 2000). Cependant, Zhang *et al.* (2002) ont exclu un rôle majeur des protéoglycanes dans l'attachement de la plupart des souches du HIV-1 aux cellules cibles. En recherchant de nouveaux co-récepteurs du virus HIV-1, Pushkarsky *et al.* (2001) ont mis en évidence une interaction entre la CyPA incorporée dans l'enveloppe virale et le CD147 présent à la surface des cellules cibles. Ce récepteur intervient dans la fixation et



l'entrée du virus dans ses cellules cibles, confirmant ainsi le rôle fonctionnel de la CyPA dans le cycle infectieux du HIV-1.

Si la CyPA semble nécessaire à l'infection du HIV-1 dans les cellules humaines, il en est tout autre pour les singes de la famille des cercopithèques. En 2004, Stremlau *et al.* ont découvert par criblage de banque d'ADNc de macaques rhésus une protéine intracellulaire antivirale, rhTRIM5 $\alpha$  (*tripartite motif protein 5*), impliquée dans la résistance au HIV-1. Les TRIMs forment une famille de protéines ubiquitaires présentant toutes une structure constituée de trois domaines impliqués dans des interactions protéine-protéine ou ayant une activité ubiquitine E3 ligase. La principale différence au sein de la famille TRIM réside dans l'extrémité C-terminale qui leur confère une importante diversité fonctionnelle (McNab *et al.*, 2011). Pour TRIM5, cette extrémité appelée B30.2 est constituée de la répétition des séquences PRY et SPRY et est impliquée dans la reconnaissance des protéines de la capsid du rétrovirus. De plus, l'ARNm codant pour TRIM5 présente des épissages alternatifs, générant ainsi des isoformes TRIM5 qui possèdent des domaines C-terminal de longueurs variables responsables de la spécificité antivirale. Ainsi, TRIM5 $\alpha$  est capable d'interagir avec la capsid du HIV-1 mais pas avec celle du HIV-2, du SIV ou encore du MLV (Stremlau *et al.*, 2005, Towers, 2007). Bien que l'on sache que TRIM5 $\alpha$  agit après l'entrée du virus dans la cellule hôte, le mécanisme antiviral n'a pas encore été élucidé. Toutefois, le rôle de la CyPA dans cette activité a bien été établi. En effet, chez les singes de l'ancien monde, la CyPA diminue l'infection par le HIV-1 mais uniquement en présence de TRIM5 $\alpha$ . D'ailleurs, l'utilisation de CsA ou l'inhibition de l'expression de la CyPA par ARN interférence réduit l'activité antivirale de TRIM5 $\alpha$ . Par contre, des virus présentant une mutation au niveau de la liaison prolyle <sup>89</sup>GP<sup>90</sup> des protéines de la capsid ne sont pas sensibles à l'activité de TRIM5 $\alpha$ . Ces données suggèrent que le rôle de la CyPA est de modifier la conformation de cette liaison peptidique afin de favoriser l'interaction de TRIM5 $\alpha$  avec la capsid virale (Berthoux *et al.*, 2005).

De façon surprenante, une protéine chimère TRIMCyp a été découverte chez les singes du genre *Aotus* (singe nocturne). Résultant de la duplication et de l'insertion de l'ADN codant pour la CyPA en lieu et place du domaine B30.2 de TRIM5, TRIMCyp présente la même propriété antivirale que TRIM5 $\alpha$ , à l'exception que l'interaction entre TRIMCyp et la capsid virale ne fait plus intervenir le domaine B30.2 mais le domaine CyPA (Sayah *et al.*, 2004). Une telle protéine chimère a également été retrouvée chez le macaque. Toutefois, celle-ci ne présente pas d'activité antivirale à l'encontre du HIV-1 mais envers le HIV-2 et le

FIV, du à une insertion différente de la séquence codant la CyPA sur le gène TRIM5 (Wilson *et al.*, 2008).

Une implication des CyPA et CyPB dans la réplication du HCV (*hepatite C virus*) a également été décrite. Toutefois, les auteurs ne semblent pas d'accord quant au rôle exact de ces protéines dans la réplication du virus. Watashi *et al.* (2005) ont montré que la CyPB interagit avec la protéine virale NS5B (*nonstructural protein 5B*), une ARN polymérase ARN-dépendante, essentielle à la réplication du génome viral. Cette interaction aurait pour conséquence de faciliter la fixation de NS5B à l'ARN, permettant ainsi une meilleure activité enzymatique de la polymérase. D'ailleurs, en 2009, Heck *et al.* ont confirmé eux aussi l'interaction de la CyPB avec la protéine virale et son implication dans la réplication du virus. Pourtant, de récents travaux ont contesté ces données. L'invalidation de l'expression des CyPA et CyPB ont suggéré que seule la CyPA est nécessaire à la réplication du HCV (Yang *et al.*, 2008 ; Chatterji *et al.*, 2009 ; Kaul *et al.*, 2009). Toutefois, le rôle précis de la CyPA n'a pas encore été clairement déterminé même s'il a été établi qu'elle interagit avec NS5B et la phosphoprotéine NS5A (Chatterji *et al.*, 2010).

Il a également été démontré que la CyPB participe à l'infection par le virus de l'encéphalite japonaise (JEV). En invalidant l'expression de la CyPB, le JEV est toujours capable d'infecter les cellules cibles mais présente un défaut de réplication de son génome, dû à une absence d'interaction entre la CyPB et la protéine virale NS4 (Kambara *et al.*, 2011).

Récemment, un rôle de la CyPB extracellulaire dans l'infection par certaines espèces de papillomavirus humains (HPV) a été identifié. Suite à l'attachement du virus à la surface de la cellule cible *via* les HSPG, les protéines de la capsid du HPV subissent un changement conformationnel qui génère l'exposition d'un épitope nécessaire à l'entrée du virus dans la cellule. L'utilisation de CsA bloque l'infection par le HPV16. De même, une inhibition de l'expression de la CyPB dans les cellules hôtes entraîne une baisse de l'internalisation de ce virus. La mutation d'un potentiel site de fixation de la CyPB sur HPV16 rend l'épitope impliqué dans l'internalisation du virus accessible. Toutefois, ces mutants ont toujours besoin de la CyPB pour une infection complète, suggérant que cette dernière intervient également après l'internalisation du HPV16 (Bienkowska-Haba *et al.*, 2009).

## C. Propriétés des cyclophilines sécrétées

### C. 1. Sécrétion des CyPA et CyPB lors de l'inflammation

La CyPB présente dans sa séquence codante un peptide signal qui lui permet d'être dirigée vers la voie de sécrétion. Elle est d'ailleurs retrouvée dans les milieux biologiques tels que le lait, le plasma (Spik *et al.*, 1991 ; Allain *et al.*, 1995). La CyPB est également constitutivement sécrétée dans les milieux de culture de fibroblastes, de kératinocytes ou de chondrocytes (Caroni *et al.*, 1991 ; Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996 ; De Ceuninck *et al.*, 2003 ; Fearon *et al.*, 2011). De plus, cette sécrétion peut être augmentée en réponse à des stimuli inflammatoires. Ainsi, Gonzalez-Cuadrado *et al.* (1996) ont montré que l'expression de l'ARNm de la CyPB est supérieure dans des fibroblastes rénaux interstitiels activés par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IP10 (*Interferon inducible protein 10*) et MCP-1 (*Monocyte chemotactic protein-1*). Dans des CMLV stimulées par un inducteur de ROS, la CyPB est retrouvée sécrétée dans le milieu de culture (Liao *et al.*, 2000). Chez des patients atteints de septicémie ou infecté par le HIV, le taux de CyPB mesuré dans leur sérum est supérieur à celui retrouvé chez des patients sains (Tegeder *et al.*, 1997 ; Endrich & Gehring, 1998). Dans un modèle murin d'asthme allergique, la CyPB est retrouvée dans les voies respiratoires (Gwinn *et al.*, 2006 ; Balsley *et al.*, 2010). De plus, des études ont montré que la sécrétion de la CyPB est fortement augmentée en réponse à la CsA, et ce de façon dose dépendante (Price *et al.*, 1994 ; Gonzalez-Cuadrado *et al.* 1996 ; Denys *et al.*, 1998a ; Fearon *et al.*, 2011). De Ceuninck *et al.* (2003) ont montré que la CyPB sécrétée par les chondrocytes traités par la CsA se retrouve fixée aux protéoglycanes de la matrice extracellulaire, permettant ainsi sa présentation aux leucocytes en cours de recrutement, comme c'est le cas pour les chimiokines, cytokines et facteurs de croissance. De plus, l'action de métalloprotéinases (MMPs)-1, 2, 3, 9 et 13 dégradant la matrice extracellulaire permet une libération de la CyPB intacte qui devient alors immédiatement disponible pour les cellules.

A l'inverse de la CyPB, la CyPA n'est pas sécrétée de façon constitutive et ne se retrouve pas dans le sérum de patients sains (Allain *et al.*, 1995). Par contre, elle est présente dans le sérum de patients atteints de septicémie ou infectés par le HIV (Tegeder *et al.*, 1997 ; Endrich & Gehring, 1998 ; Dear *et al.*, 2007), mais aussi dans les zones riches en macrophages dans les liquides synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Billich *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 2005) ou encore dans les lavages broncho-alvéolaires d'un

modèle murin d'asthme allergique (Gwinn *et al.*, 2006 ; Balsley *et al.*, 2010). Par ailleurs, la CyPA est fortement sécrétée par les macrophages et les cellules endothéliales en réponse au LPS (Sherry *et al.*, 1992 ; Kim *et al.*, 2004). Plus récemment, la CyPA a été impliquée dans les maladies cardiovasculaires. En effet, dans les CMLV, la CyPA est sécrétée en réponse à un stress oxydatif (Jin *et al.*, 2000 ; Suzuki *et al.*, 2006). Dans des modèles *in vivo* d'athérosclérose, la CyPA est fortement exprimée au niveau des athéromes (Jin *et al.*, 2004). Par ailleurs, des myocytes cardiaques de rat en culture soumis à une hypoxie/réoxygénation sécrètent la CyPA (Jin *et al.*, 2000 ; Séko *et al.*, 2004). Ces résultats ont d'ailleurs été confirmé *in vivo* dans un modèle de ligature vasculaire et d'ischémie/reperfusion (Séko *et al.*, 2004 ; Satoh *et al.*, 2008).

Les mécanismes impliqués dans la régulation de la sécrétion des CyPA et CyPB n'ont pas encore été clairement établis. Si la CyPB est retenue au réticulum endoplasmique grâce à son extrémité C-terminale VEKPF~~A~~I~~A~~KE, Mariller *et al.* (1996) ont montré que la CyPB retrouvée dans le lait de femme correspond à une forme tronquée de la CyPB, dépourvue des 5 derniers acides aminés AIAKE. Plus récemment, des études ont montré que la sécrétion de la CyPB en réponse à la CsA dans les kératinocytes se fait par la voie constitutive. De plus, la rétention de la CyPB dans le réticulum endoplasmique fait intervenir son domaine de fixation à la CsA, ce qui explique son importante sécrétion lors de l'utilisation de l'immunosuppresseur (Fearon *et al.*, 2011). La CyPA n'est quant à elle pas retrouvée dans les milieux extracellulaires en absence de stimuli inflammatoires, suggérant que sa sécrétion se fait par un transport vésiculaire hautement régulé. Dans les CMLV, Suzuki *et al.* (2006) ont montré que suite à la stimulation par un inducteur de ROS, la sécrétion de la CyPA implique le remodelage de l'actine et de la myosine II, deux événements dépendants de l'activité de la Rho kinase et des Rho-GTPases RhoA et Cdc42.

## C. 2. Les récepteurs de la CyPB

La découverte de cyclophilines dans les milieux biologiques et la description d'activités associées à ces formes sécrétées ont suggéré l'existence de sites de fixation à la surface des cellules ainsi que de voies de signalisation associées au récepteur.

## C. 2. a. Caractérisation des sites de fixation

En 1994, Allain *et al.* ont montré que la CyPB se fixe de façon spécifique à la surface des cellules de la lignée lymphoblastique Jurkat et des lymphocytes T purifiés du sang avec un  $K_d = 12 \pm 2$  nM et un nombre de sites de liaison estimé à  $35000 \pm 17000$  par cellule. Des expériences de cytofluorimétrie en flux réalisées au Laboratoire ont permis de montrer que seuls les lymphocytes T fixent la CyPB et que cette interaction a lieu préférentiellement avec les lymphocytes T CD4+. Les cellules activées *in vitro* par un anticorps anti-CD3 présentent un nombre moins important de récepteurs que les cellules naïves tandis que l'affinité reste constante, suggérant une régulation négative de l'expression des récepteurs. De plus, la fixation de la CyPB sur les lymphocytes circulants est hétérogène, indiquant un nombre variable de site de fixation à la surface des cellules. D'ailleurs, d'importantes variations inter-individuelles dans la fixation de la CyPB sont observées. L'ensemble des données montre que l'expression des sites de fixation de la CyPB est dépendante à la fois du type cellulaire et de l'état d'activation des cellules (Denys *et al.*, 1997).

La CyPA possède également des sites de fixation à la surface des lymphocytes T CD4+. D'ailleurs elle interagit avec un complexe de haut poids moléculaire impliqué dans le processus d'infection du HIV-1 (Sherry *et al.*, 1998). De plus, la découverte de réponses cellulaires induites par la CyPA et la CyPB a suggéré l'existence de récepteurs fonctionnels communs aux deux protéines (Sherry *et al.*, 1998 ; Allain *et al.*, 1999 ; Yurchenko *et al.*, 2001, 2002 ; Allain *et al.*, 2002). Par la suite, il a été démontré que les CyPA et CyPB sont capables de se fixer sur de nombreuses cellules telles que les neutrophiles, les plaquettes ou encore les cellules endothéliales de capillaires cérébraux et les astrocytes (Allain *et al.*, 1999 ; Carpentier *et al.*, 1999a ; Yurchenko *et al.*, 2001).

Les travaux menés au Laboratoire ont ensuite montré qu'il existe à la surface des lymphocytes T deux types de sites de fixation pour la CyPB présentant des affinités différentes. Un traitement des cellules par la trypsine ou par un tampon de pH acide inhibe toute interaction entre la CyPB et le site de fixation I, suggérant un récepteur de nature protéique. La CyPB présente une forte affinité pour l'héparine et cette interaction n'est rompue que par l'ajout d'une solution de NaCl à 0,6 M. Par ailleurs, un traitement des cellules à l'héparinase entraîne une diminution de moitié de la fixation de la CyPB avec le site de fixation II. Ces résultats ont donc montré que le second site correspond à des chaînes héparanes sulfates portées par les protéoglycanes membranaires (Denys *et al.*, 1998b).

Parallèlement à ces travaux, d'autres équipes ont cherché à caractériser les récepteurs potentiels des cyclophilines. En recherchant de nouveaux co-récepteurs du virus du HIV-1, Pushkarsky *et al.* (2001) ont mis en évidence une interaction entre la CyPA incorporée dans l'enveloppe virale et le CD147 présent à la surface des cellules cibles. Les travaux qui ont suivis ont confirmé que le CD147 est bien le récepteur protéique fonctionnel des CyPA et CyPB (Yurchenko *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2002).

### C. 2. b. Fixation de la CyPB sur le CD147

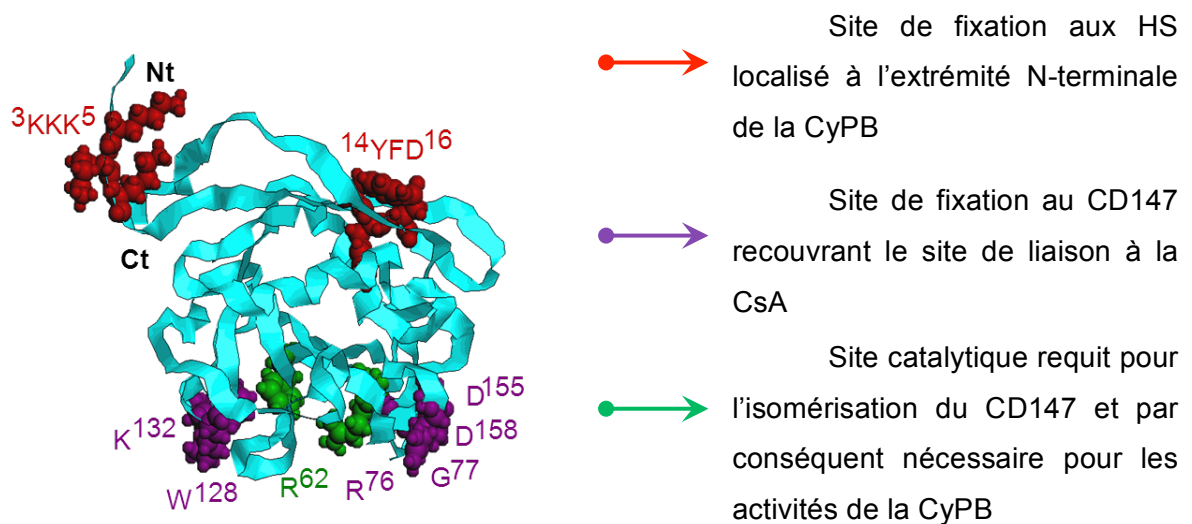
Le CD147 appartient à la superfamille des immunoglobulines. Il est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires comme les cellules hématopoïétiques, endothéliales, épithéliales ou leucocytaires. Il est constitué d'une partie N-terminale extracellulaire comportant deux domaines Ig, d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine cytoplasmique. L'ARNm du CD147 code pour une protéine de 28 kDa qui est ensuite N-glycosylée, lui donnant ainsi une masse comprise entre 44 et 46 kDa. De nombreuses activités ont été attribuées au CD147. Il est capable d'induire l'expression de MMPs, ce qui lui confère un rôle important dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques comme l'homéostasie tissulaire, le remodelage articulaire mais aussi dans les cancers et les maladies inflammatoires chroniques (Gabison *et al.*, 2005 ; Yurchenko *et al.*, 2010). Le CD147 est également impliqué dans des phénomènes d'adhérence cellulaire. En effet, il co-localise avec des molécules d'adhérence au niveau des zones de contact intercellulaire et interagit avec les intégrines  $\alpha 3\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 1$  (Berditchevski *et al.*, 1997). Le CD147 participe à l'activation des intégrines et son activation induit l'agrégation homotypique de cellules monocytaires *via* l'activation de la voie LFA-1 (*Leukocyte function-antigen-1*) / I-CAM-1 (*Inter-cellular adhesion molecule-1*) (Kasinrerker *et al.*, 1999). Le CD147 agit également comme une protéine régulatrice de l'activation des lymphocytes. Dans un système de co-culture entre lymphocytes et cellules stimulatrices, l'incubation d'un anticorps activateur du CD147 avec les cellules présentatrices d'antigène inhibe la prolifération des lymphocytes (Stonehouse *et al.*, 1999 ; Woodhead *et al.*, 2000).

La fixation de la CyPB sur le CD147 est caractérisée par un Kd de  $14 \pm 4$  nM avec un nombre de sites égal à  $25000 \pm 10000$  par lymphocyte T (Denys *et al.*, 1998b). Cette fixation entraîne une internalisation rapide du CD147, suggérant que celui ci est un récepteur fonctionnel. Après internalisation, la CyPB entre dans les vésicules acides où elle est

dégradée tandis que le CD147 est recyclé à la surface cellulaire (Allain *et al.*, 1994 ; Denys *et al.*, 1998b ; Allain *et al.*, 1996). La CyPA interagit également avec le CD147. Toutefois, l'affinité entre la CyPA et le récepteur est très faible avec un Kd qui serait équivalent à celui d'une enzyme pour son substrat (Allain *et al.*, 2002 ; Yurchenko *et al.*, 2002 ; Schlegel *et al.*, 2009).

Des expériences réalisées au Laboratoire ont montré que la CsA, comme la CyPC, inhibe la fixation de la CyPB au CD147 (Denys *et al.*, 1998b). Ces résultats ont suggéré que la région centrale conservée des cyclophilines est impliquée dans la fixation au récepteur protéique. Carpentier *et al.* (1999b, 2002) ont alors recherché, à l'aide de cyclophilines recombinantes mutées, les acides aminés nécessaires dans cette interaction. Les résidus Arg<sup>62</sup> et Phe<sup>67</sup> interviennent dans l'activité PPIase de la CyPB tandis que les résidus Phe<sup>67</sup> et Tyr<sup>128</sup> sont impliqués dans la fixation de la CsA. Ces résultats sont en accord avec ceux de Zydowsky *et al.* (1992) qui démontraient que le domaine de fixation de la CsA à la CyPA recouvre partiellement le site enzymatique de la protéine. Ainsi, contrairement à la mutation des résidus du site catalytique, la mutation de la Tyr<sup>128</sup> de la CyPB abolit sa fixation au CD147. Ce résidu étant conservé entre les cyclophilines, il pourrait justifier que la CyPA et la CyPC se fixent également au CD147. Toutefois, d'autres acides aminés, localisés à proximité de la poche de fixation de la CsA sont impliqués dans cette interaction. Ainsi les résidus Arg<sup>76</sup>, Gly<sup>77</sup>, Lys<sup>132</sup>, Asp<sup>155</sup> et Asp<sup>158</sup> interviennent également dans l'interaction entre la CyPB et le CD147 (Figure 5). La CyPA et la CyPC ne possédant pas intégralement ces cinq acides aminés présentent une moindre affinité que la CyPB pour le CD147.

Au Laboratoire, il a été démontré qu'une autre protéine est impliquée dans les réponses induites par la CyPB (Melchior *et al.*, 2008). Il s'agit du CD98, une glycoprotéine homodimérique largement exprimé à la surface cellulaire. Cho *et al.* (2001) ont montré que des anticorps dirigés contre le CD98 induisent une agrégation homotypique des monocytes selon un mécanisme dépendant de l'activation des intégrines  $\beta 1$  avec lesquelles il est associé. De plus des anticorps anti-CD147 inhibent cette agrégation induite par le CD98, démontrant la participation du CD147 dans ce processus cellulaire. Aucune interaction entre la CyPB et le CD98 n'a été démontrée. Pourtant des expériences de co-immunoprécipitation ont permis de mettre en évidence des interactions entre le CD98, le CD147 et les intégrines  $\beta 1$ , suggérant un rôle de co-récepteur du CD98 pour la CyPB (Melchior *et al.*, 2008).



**Figure 5 : Identification des régions de la CyPB impliquées dans l'activité enzymatique et dans la fixation aux chaînes HS et au récepteur protéique.**

### C. 2. c. Fixation de la CyPB aux chaînes héparanes sulfates

La fixation de la CyPB sur son récepteur de type II est caractérisée par un  $K_d$  de  $10,5 \pm 1,5$  nM avec un nombre de sites estimé à  $70000 \pm 25000$  par cellule. La forte affinité de la CyPB pour l'héparine a suggéré que le site de fixation est un protéoglycane membranaire à chaîne héparanes sulfates (HSPG). D'ailleurs, la fixation de la CyPB sur ses cellules cibles est inhibée lorsque ces cellules ont subi un traitement à l'héparinase ou lorsqu'elles sont mises en présence d'héparine libre (Denys *et al.*, 1998b). Mariller *et al.* (1996) ont montré que l'extrémité N-terminale de la CyPB inhibe fortement la fixation de la protéine aux cellules. L'utilisation de CyPB mutée a permis de montrer que les acides aminés  $^3\text{KKK}^5$  et  $^{14}\text{YFD}^{16}$  sont impliqués dans l'interaction de la CyPB avec les HS (Figure 5). Le tripeptide YFD a déjà été décrit comme un motif de liaison du collagène IV à l'héparine et pourrait renforcer les interactions ioniques des HS chargés négativement avec la séquence  $^3\text{KKK}^5$  de la CyPB (Carpentier *et al.*, 1999b). La CyPB mutée pour d'autres acides aminés ne présente pas de défaut de fixation au HS, confirmant que seul l'extrémité N-terminale est impliquée dans les interactions avec le site de type II. La CyPA, qui ne possède pas cette extrémité N-terminale, est cependant capable d'interagir avec les HS grâce à une région basique localisée en position C-terminale (Sapphire *et al.*, 1999). Toutefois, cette interaction entre la CyPA et les HS est faible puisque la CyPA est éluée à faible force ionique d'une colonne d'héparine immobilisée (0,15 M NaCl contre 0,6 M NaCl pour la CyPB). De plus, la CyPA n'entre pas en compétition

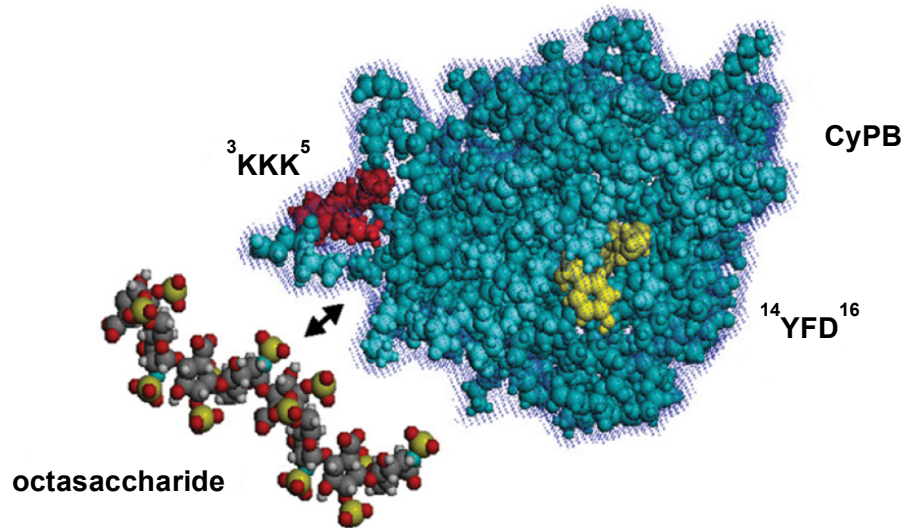


avec la CyPB pour les sites glycaniques des lymphocytes T (Mariller *et al.*, 1996 ; Denys *et al.*, 1998b).

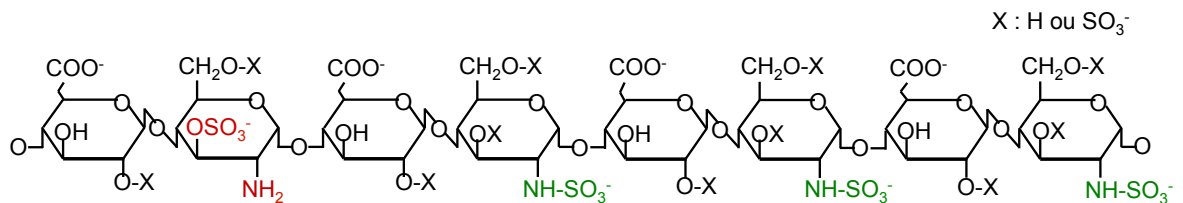
Au Laboratoire, des expériences ont été menées afin de déterminer l'HSPG impliqué dans la fixation de la CyPB. Pakula *et al.* (2007) ont démontré que le CD147 est associé avec le syndécan-1, un complexe qui semble être stabilisé et/ou augmenté lorsque les cellules sont stimulées par la CyPB. Les syndécans constituent une famille de 4 HSPG (syndécan-1 à -4), formés d'un domaine extracellulaire qui porte entre 3 et 5 chaînes glycosaminoglycane (GAGs) majoritairement de type HS, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique court. Si les domaines transmembranaires et cytoplasmiques sont conservés, ce n'est pas le cas du domaine extracellulaire qui varie d'un syndécan à l'autre, à l'exception des régions sensibles à la protéolyse et des sites d'attachement des GAGs (Esko & Lindahl, 2001).

De façon similaire au CD147, le syndécan-1 est principalement exprimé sur les cellules endothéliales et épithéliales, les lymphocytes et les monocytes/macrophages. Pourtant, toutes ces cellules ne répondent pas à la CyPB. Un élément variable du récepteur de la CyPB est la partie HS du syndécan-1. Cette variabilité structurale est dépendante des enzymes de biosynthèse et de maturation des HS exprimée ou non par les différents types cellulaires. En effet, l'interaction entre la CyPB et chaînes GAGs ne se résume pas à de simples interactions ioniques, mais font intervenir des motifs glycaniques spécifiques reconnus par la CyPB. Au Laboratoire, la caractérisation structurale du motif HS interagissant avec la CyPB a été réalisée. Dans un premier temps, la taille minimale du motif HS reconnu par la CyPB a été déterminée par une technique de retard sur gel en condition non dénaturante couplée à l'utilisation d'oligosaccharides fluorescents. Les résultats obtenus ont démontré que la taille minimale du motif héparinique reconnu par la CyPB correspond à un octasaccharide. De plus, l'analyse structurale de la CyPB a permis mettre en évidence l'arrangement des tripeptides  $^3\text{KKK}^5$  et  $^{14}\text{YFD}^{16}$  qui forment une gouttière dans laquelle un motif octasaccharidique peut de loger (Vanpouille *et al.*, 2004) (Figure 6). Des expériences de compétition de fixation de la CyPB par des dérivés hépariniques modifiés et l'analyse par électrophorèse du motif HS reconnu par la CyPB ont permis de mettre en évidence la présence en position 2 non réductrice de l'octasaccharide d'une glucosamine 3-O-sulfatée, une modification rare qui est importante pour la fixation de la CyPB (Vanpouille *et al.*, 2007) (Figure 7). D'ailleurs, l'invalidation par ARN interférence des 3-O-sulfotransférases 3 (3-OST-3) impliquées dans la génération de ce motif inhibe la fixation de la CyPB aux cellules

cibles (Vanpouille *et al.*, 2007) (Figure 8).



**Figure 6 : Représentation tridimensionnelle de l'interaction entre la CyPB et 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).



**Figure 7 : Caractéristiques structurales du motif héparinique reconnu par la CyPB.**

### C. 3. Réponses moléculaires induites par la CyPA et la CyPB

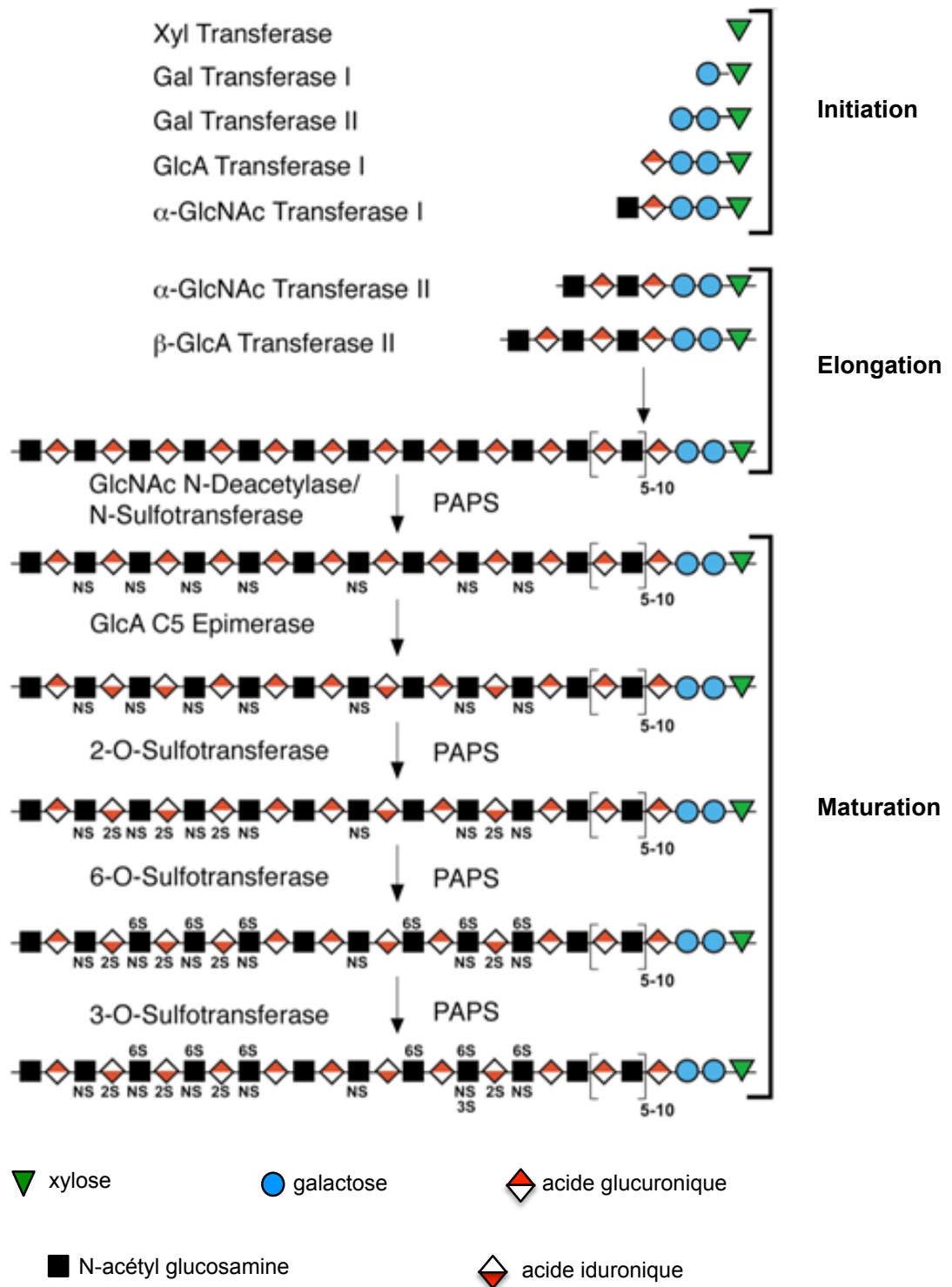
La présence de cyclophilines dans les milieux extracellulaires et l'identification de leurs récepteurs suggèrent l'existence de voies de signalisation activées par ces protéines.

Les travaux menés sur les CyPA et CyPB ont montré que leur fixation engendre un flux calcique intracellulaire (Allain *et al.*, 1999, 2002 ; Yurchenko *et al.*, 2001, 2002). Dans les lymphocytes T, la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  passe de  $95 \pm 15$  nM à  $550 \pm 240$  nM après

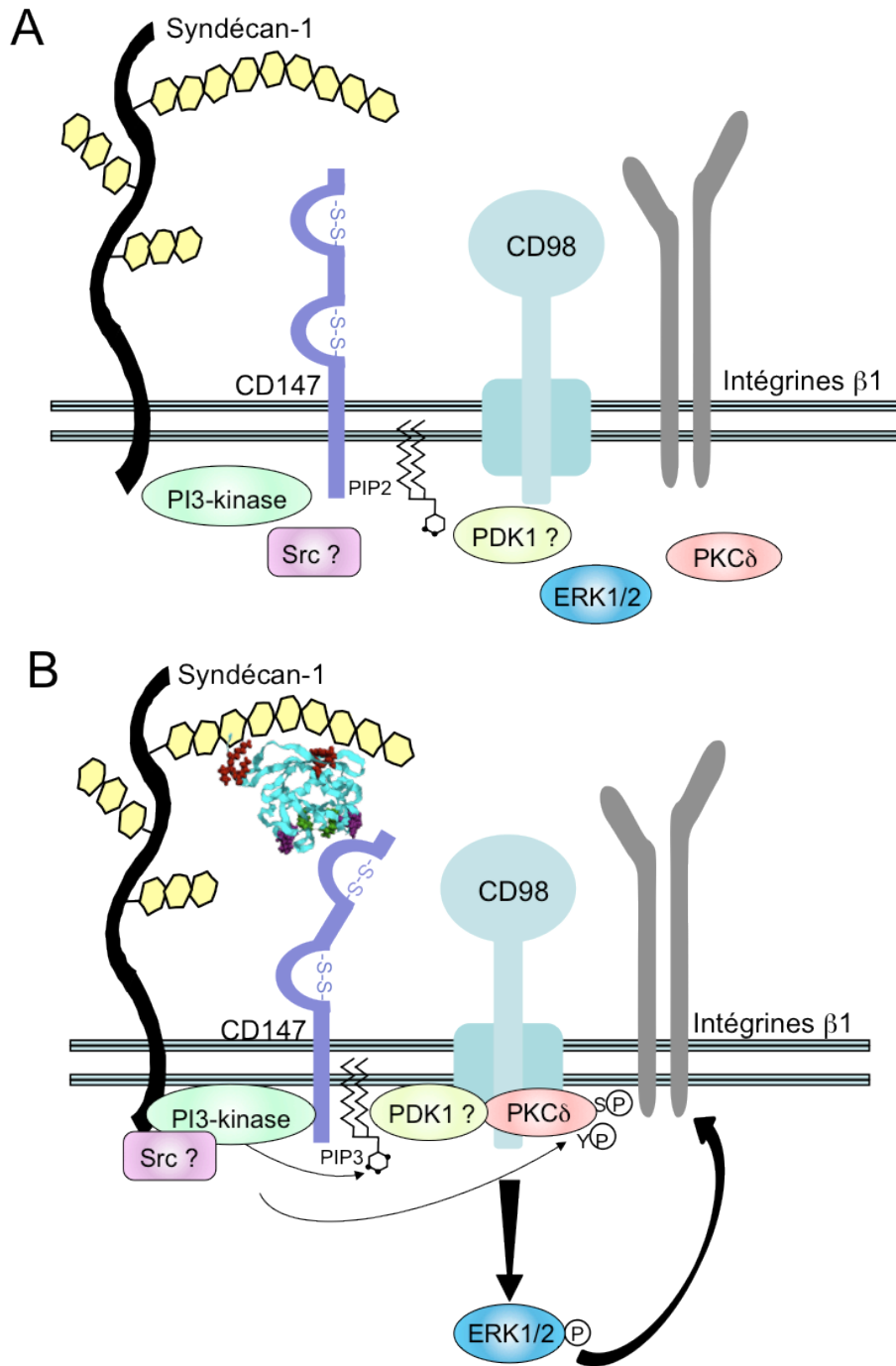
stimulation par la CyPB. Les cellules répondent également à la CyPA mais dans une moindre mesure ( $220 \pm 60$  nM) (Allain *et al.*, 2002). Les réponses induites par les CyPA et CyPB sont dépendantes du CD147. En effet, une augmentation du flux calcique est observée dans les cellules CHO à condition qu'elles soient transfectées avec le récepteur des cyclophilines (Yurchenko *et al.*, 2001). De plus, une pré-incubation de la CyPB avec la CsA entraîne une diminution du flux calcique (Allain *et al.*, 2002). La fixation de la CyPB aux chaînes HS potentialise également l'effet de la protéine puisque la CyPB mutée (CyPB<sub>KKK</sub>-) incapable de se fixer aux chaînes GAGs induit un flux calcique similaire à celui obtenu par la CyPA (Allain *et al.*, 2002).

La fixation des cyclophilines induit la phosphorylation des protéines ERK1/2 (*Extracellular signal regulated protein kinase*) dans les lymphocytes T, les monocytes/macrophages, les CMLV ou encore dans les cellules cancéreuses de poumon (Yurchenko *et al.*, 2001, 2002 ; Jin *et al.*, 2000 ; Yang *et al.*, 2007 ; Pakula *et al.*, 2007 ; Melchior *et al.*, 2008). De façon similaire au flux calcique, l'activation de ERK1/2 nécessite la présence du CD147 et fait intervenir l'activité PPIase des cyclophilines (Yurchenko *et al.*, 2001, 2002 ; Pakula *et al.*, 2007 ; Melchior *et al.*, 2008). Par ailleurs, le traitement des lymphocytes T à l'héparinase ou l'utilisation d'ARN interférence dirigé contre le syndécan-1 inhibe l'activation de ERK1/2 par la CyPB (Pakula *et al.*, 2007). Le CD98 est également important dans l'activation de la voie p44/p42 MAPK puisque des monocytes/macrophages n'exprimant plus le co-récepteur ne répondent plus à la CyPB. De plus, l'activation de la voie p44/p42 MAPK nécessite l'activation préalable de la PI3K (*Phosphatidyl inositol 3 kinase*) et de la PKC (*protein kinase C*)- $\delta$  (Melchior *et al.*, 2008) (Figure 9).

L'activation des deux autres voies MAPK par la CyPA a également été décrite. Toutefois ces données sont controversées. En effet, l'activation de p38 MAPK et JNK (*c-Jun amino-terminal kinase*) est observée dans les monocytes, les cellules endothéliales, les myocytes de rat ou encore dans les cellules pancréatiques cancéreuses (Jin *et al.*, 2004 ; Séko *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2006 ; Yuan *et al.*, 2010). Pourtant dans les cellules cancéreuses de poumon, dans les monocytes/macrophages et dans les cellules de la lignée CHO exprimant le CD147, aucune activation de p38 MAPK ou de JNK n'est observée suite à la stimulation par la CyPA (Yurchenko *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2008). D'ailleurs, Payeli *et al.* (2008) ont mis en évidence le rôle d'endotoxines contaminantes dans les réponses observées suite à la stimulation de cellules endothéliales et de monocytes/macrophages par la CyPA commerciale.



**Figure 8 : Biosynthèse des héparanes sulfates.** La biosynthèse des chaînes HS est un processus golgien qui débute par la formation d'un tétrasaccharide. L'élongation de la chaîne se poursuit par l'ajout successif de résidus de glucosamine N-acétylée et d'acide glucuronique. Le polymère est ensuite modifié par une série de réactions enzymatiques séquentielles où les produits d'une réaction deviennent les substrats de la suivante. Le PAPS (3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate) fournit les groupements phosphates nécessaires à la maturation des chaînes HS (d'après Esko & Lindahl, 2001).



**Figure 9 : Schéma représentant le complexe multimoléculaire impliqué dans l'activité pro-adhésive de la CyPB.** A) En absence de ligand, les molécules de signalisation potentiellement impliquées sont non activées. B) La fixation de la CyPB sur les chaînes HS du syndécan-1 induit l'isomérisation *cis/trans* d'une liaison prolyle du CD147, ce qui peut entraîner des changements de conformation au niveau du CD98. La PI3K peut alors phosphoryler le PIP2 pour recruter la PDK1, qui peut être impliquée dans la phosphorylation de résidus de sérine de la PKCδ. Simultanément, une Src kinase peut phosphoryler un résidu tyrosine de la PKCδ. La PKCδ activée est recrutée à la membrane et active les protéines ERK1/2. Cette cascade de signalisation aboutit à l'activation des intégrines β1 impliquées dans l'activité pro-adhésive de la CyPB.

La CyPA active également la voie NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor of  $\kappa$ B*) dans les cellules endothéliales et les monocytes/macrophages (Jin *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2005 ; Yuan *et al.*, 2010). Cette activation est dépendante du CD147 et de l'activation de la voie p44/p42 MAPK puisque l'utilisation d'anticorps bloquant le CD147 et d'inhibiteur de l'activation de ERK1/2 inhibe la phosphorylation et la dégradation de I $\kappa$ B- $\alpha$  (*Inhibitor of  $\kappa$ B*) ainsi que la phosphorylation de p65 induite par la CyPA.

## C. 4. Réponses cellulaires induites par la CyPA et la CyPB

De nombreuses activités biologiques ont été attribuées aux cyclophilines. En 1991, Caroni *et al.* ont montré que le milieu conditionné de cellules d'insectes exprimant la CyPB présente une activité mitogène pour les fibroblastes et les cellules cardiaques de poulet *in vitro*. De même, la CyPA sécrétée en réponse à un stress oxydatif par les CMLV augmente la croissance de ces cellules selon un mécanisme dépendant de l'activation des kinases ERK1/2, connues pour être impliquées dans les phénomènes de prolifération et de survie cellulaire (Jin *et al.*, 2000). D'ailleurs, des effets de la CyPA sur la prolifération cellulaire et l'apoptose ont également été décrits, notamment dans le cas de cancers. En effet, l'incubation en présence de CyPA recombinante de cellules de cancer du pancréas ou de cancer du poumon augmente la prolifération de ces cellules, un phénomène qui est dépendant de l'activité PPIase de la cyclophiline, de sa fixation au CD147 et de l'activation des kinases ERK1/2 (Li *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2007). Bauer *et al.* (2009) ont par ailleurs démontré que l'ajout de CyPB dans le milieu de culture de cellules myélomateuses diminue l'apoptose si celles-ci sont déficientes pour l'expression de la CyPB. De plus, dans le cas de stress oxydatif et d'ischémie *in vitro*, la CyPA protège les neurones (Boulos *et al.*, 2007).

Dès 1992, Sherry *et al.* et Xu *et al.* ont montré que la CyPA induit la migration des éosinophiles, des neutrophiles et des monocytes isolés du sang. D'autres travaux ont confirmé ces résultats et ont mis en évidence une activité chimioattractante identique pour la CyPB (Yurchenko *et al.*, 2001, 2002). Allain *et al.* (2002) ont montré que la CyPB présente également une activité chimioattractante pour les lymphocytes. Cette réponse est plus importante que celle induite par la CyPA et varie selon les sous-populations lymphocytaires. Les CD4<sup>+</sup> répondent plus efficacement que les CD8<sup>+</sup> et les lymphocytes mémoires CD45RO<sup>+</sup> sont plus sensibles que les lymphocytes naïfs CD45RA<sup>+</sup>. Récemment Damsker *et al.* (2007)

ont repris ces constatations et mis en évidence que les cellules CD4<sup>+</sup> activées répondent mieux à la CyPA. L'activité chimioattractante des CyPA et CyPB est dépendante de leur fixation au CD147 et de l'activation de la voie p44/p42 MAPK qui en découle (Yurchenko *et al.*, 2001, 2002 ; Damsker *et al.*, 2007). Par contre la fixation de la CyPB aux chaînes HS ne semble pas essentielle puisque la CyPB<sub>KKK</sub>- mutée présente une activité chimioattractante sensible à la CyPB non mutée, bien que diminuée (Allain *et al.*, 2002).

Des travaux menés au Laboratoire ont montré que la CyPB induit l'adhérence des lymphocytes T sur la fibronectine, par un mécanisme dépendant de l'activation des intégrines  $\alpha\beta 1$  et  $\alpha\beta 7$  (Allain *et al.*, 2002 ; Carpentier *et al.*, 2002). Cette activité est spécifique à la CyPB, supposant un rôle important des chaînes HS. En effet, la CyPB<sub>KKK</sub>- est incapable d'induire l'adhérence des lymphocytes T et des macrophages à la matrice extracellulaire. Par ailleurs, cette activité met en jeu le CD147, le CD98, l'activité PPIase de la CyPB et l'activité de la PI3K et de la PKC $\delta$  (Allain *et al.*, 2002 ; Pakula *et al.*, 2007 ; Melchior *et al.*, 2008). De même, les travaux réalisés avec différentes sous-populations lymphocytaires montrent que la CyPB agit préférentiellement sur les cellules CD4<sup>+</sup> que sur les cellules CD8<sup>+</sup> et notamment sur les lymphocytes mémoires CD45RO<sup>+</sup> (Allain *et al.*, 2002).

Si le CD147 est depuis longtemps connu pour induire l'expression de MMPs, ce n'est qu'en 2005 que les travaux de Kim *et al.* montrent que la fixation de la CyPA sur son récepteur induit une augmentation de la sécrétion de MMP-9. Depuis, il a clairement été établi que des monocytes/macrophages stimulés par la CyPA présentent des taux élevés de pro-MMP-9 et de MMP-9 dans les milieux extracellulaires. Il a d'ailleurs été démontré que l'expression de MMP-9 induite par la CyPA est dépendante du CD147 et de l'activation de la voie p44/p42 MAPK et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Yang *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2009 ; Seizer *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010 ; Yuan *et al.*, 2010). Des données plus contradictoires concernant la capacité de la CyPA à induire la sécrétion d'autres MMPs sont également présentes dans la littérature. En effet, Wang *et al.* (2010) ont montré la sécrétion de MMP-2 dans les cellules de la lignée THP-1 après stimulation par la CyPA. Par contre, selon les travaux de Yang *et al.* (2008), la CyPA n'induit pas la sécrétion de MMP-2 dans ces mêmes cellules.

Selon certains auteurs, la CyPA possède également la capacité d'induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Mais encore une fois, ces données se contredisent et la qualité de la CyPA utilisée lors des expériences est à mettre en cause. Dans les cellules THP-

1, la CyPA à une concentration de 1  $\mu$ M est capable d'induire l'expression de TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor- $\alpha$* ), d'IL-1 $\beta$ , d'IL-8 ou encore de MCP-1 (Kim *et al.*, 2005). Dans les cellules pancréatiques cancéreuses, une augmentation de l'expression de l'IL-5 et de l'IL-17 est également mesurée après stimulation par la CyPA (Li *et al.*, 2006). Toutefois, Wang *et al.* (2010) ne détecte pas de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , ou encore d'IL-6 dans les surnageants des cellules THP-1. Il en est de même pour Payeli *et al.* (2008) qui ne détectent ni TNF- $\alpha$  ni IL-6 dans les milieux de culture de cellules endothéliales stimulées par la CyPA.

## C. 5. Implication de la CyPA et de la CyPB dans les pathologies inflammatoires

Les données décrites ces dernières années placent les cyclophilines sécrétées parmi les médiateurs de l'inflammation. La présence des CyPA et CyPB à taux élevés dans les milieux extracellulaires en cas d'inflammation, leur activité chimioattractante et leur capacité à induire des facteurs pro-inflammatoires tels que les MMPs supposent un rôle de ces protéines dans la promotion des certaines pathologies dont la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose ou encore l'asthme allergique.

### C. 5. a. Cyclophilines et polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie autoimmune qui se traduit par une réaction inflammatoire exagérée, en particulier de la membrane synoviale, due à une réponse immunitaire innée et acquise incontrôlée et qui conduit à la destruction progressive des articulations. C'est la maladie rhumatismale chronique la plus fréquente chez l'adulte dont le déclenchement reste méconnu. La membrane synoviale qui tapisse les articulations sécrète la synovie qui est une structure pauvre en cellule. Lors de la pathologie, les fibroblastes et macrophages contenus dans la synovie sont activés. Ils produisent alors des cytokines inflammatoires qui permettent le recrutement d'autres macrophages mais aussi de lymphocytes T et B. Cette zone devient alors un lieu de développement chronique de la maladie, conduisant à la destruction des articulations (Pap *et al.*, 2005 ; Drexler *et al.*, 2008 ; Bartok & Firestein, 2010).



Les macrophages ont un rôle important dans cette pathologie car ils possèdent de fortes capacités pro-inflammatoires, conduisant au remodelage et à la destruction des articulations. En effet, ces cellules constituent avec les fibroblastes la principale source de facteurs pro-inflammatoires ou régulateurs comme les cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-10...) ou les chimioattractants (IL-8, MCP-1...). Les macrophages induisent également l'expression et la sécrétion de MMPs qui participent à la destruction de la matrice extracellulaire et à la dégradation des articulations (Drexler *et al.*, 2008).

Les cyclophilines entretiennent ce contexte inflammatoire. En effet, la CyPA est fortement sécrétée dans le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Billich *et al.*, 1997). Elle peut donc par son activité chimioattractante induire le recrutement de cellules inflammatoires qui pourront entretenir sa propre sécrétion. De plus, le taux de CD147 présent à la surface des neutrophiles retrouvés dans le liquide synovial a été corrélé à la sévérité de la maladie. La surexpression du CD147 au niveau des cellules infiltrantes entraîne une augmentation de la production de MMPs qui ont un rôle prépondérant dans la destruction des articulations (Konttinen *et al.*, 2000). De plus, ces enzymes, en dégradant la matrice extracellulaire permettent la libération de cyclophilines intactes piégées par les protéoglycanes (De Ceuninck *et al.*, 2003). Celles ci sont alors capables de se fixer sur leur cellules cibles, d'y exercer leur activité chimioattractante et d'induire l'expression de nouvelles MMPs, amplifiant finalement la destruction du cartilage. D'ailleurs, Wang *et al.* (2010) ont montré que l'injection de CyPA recombinante chez un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde entraîne une plus forte invasion des fibroblastes dans le cartilage en comparaison à des souris non traitées par la CyPA. A l'inverse dans un modèle murin d'arthrite induite par le collagène, l'utilisation d'anticorps bloquant l'interaction entre le CD147 et la CyPA réduit le recrutement de neutrophiles, macrophages et lymphocytes sur le site inflammatoire et diminue la production de pro-MMP9 et de TNF- $\alpha$  (Damsker *et al.*, 2009).

### C. 5. b. Cyclophilines et maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont l'une des premières causes de mortalité au niveau mondial. Les CMLV ont un rôle important à jouer dans ces maladies puisqu'elles forment le tissu contractile des vaisseaux sanguins et participent au maintien de l'intégrité des vaisseaux. L'angiotensine II (AngII) est un puissant vasoconstricteur dont l'expression est induite suite à

une baisse de la pression artérielle. Toutefois, il participe au dysfonctionnement des cellules constituant les vaisseaux sanguins en contribuant à la migration et à la prolifération des CMLV tout en augmentant le stress oxydant au niveau de ces cellules. Il a été démontré que ces effets délétères sont dus notamment à la génération de ROS par les CMLV lorsqu'elles sont stimulées par l'AngII. De plus, la production excessive de ROS a été impliquée dans le développement de nombreuses pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, l'hypertension ou encore les anévrismes aortiques abdominaux (Touyz *et al.*, 2003).

Il a été démontré que la génération d'un stress oxydatif entraîne la sécrétion de CyPA par les CMLV et que cette CyPA induit l'activation de la voie p44/p42 MAPK au sein des cellules (Jin *et al.*, 2000 ; Suzuki *et al.*, 2006). Des expériences ont montré que la ligation de la carotide entraîne une surexpression de la CyPA qui est accompagnée d'une hyperplasie intimale. Ce phénomène est dû à la prolifération et à la migration des CMLV suite à l'activation de la voie p44/p42 MAPK induite par la CyPA. D'ailleurs, la ligation de la carotide chez des souris *Ppia*<sup>-/-</sup> n'induit pas un épaississement de l'intima artérielle par rapport aux souris témoins (Sato *et al.*, 2008).

L'athérosclérose est une maladie chronique multifactorielle qui touche les artères. Elle est caractérisée par une diminution de la fonction des cellules endothéliales qui deviennent perméables aux constituants sanguins (cellules mononuclées et produits lipidiques) et par la perte du phénotype contractile des CMLV. Il en résulte la formation d'une plaque d'athérome constituée de lipides, débris cellulaires et de cellules immunitaires (Hansson & Libby, 2006). Une étude a été menée sur un modèle de cellules spumeuses obtenues *in vitro* en stimulant des cellules THP-1 en présence de LDL (*Low density lipoprotein*) oxydés. L'analyse des protéines contenues dans le milieu de culture de ces cellules en comparaison avec des cellules THP-1 stimulées par des LDL non oxydés a permis d'identifier des marqueurs pour l'athérosclérose dont l'expression est augmentée suite au traitement par les LDL oxydés. Parmi ces protéines se trouvent la CyPA et la CyPB dont l'expression est augmentée de 44 % et de 39 % respectivement (Fach *et al.*, 2004). Nigro *et al.* (2011) ont montré que l'inactivation de l'expression de la CyPA chez des souris *ApoE*<sup>-/-</sup> réduit la formation de plaques d'athérome induite par diète lipidique. Ces effets sont dus à une diminution de l'expression de VCAM-1 (*Vascular adhesion molecule -1*), à une diminution du recrutement des macrophages au niveau de la plaque ainsi qu'à une régulation des récepteurs impliqués dans la captation des LDL.

L'anévrisme aortique abdominal (AAA) est une maladie inflammatoire où les leucocytes infiltrants participent au développement de la maladie en sécrétant des MMPs et des cytokines inflammatoires et en induisant la mort des CMLV qui sont responsables de la production de la matrice extracellulaire aortique. L'augmentation de la dégradation de la matrice extracellulaire et le faible renouvellement de celle-ci par les CMLV conduit à la détérioration localisée de la paroi aortique contribuant à la dilatation progressive de l'aorte. De plus, la surexpression de ROS par les cellules inflammatoires et les CMLV participent également à l'évolution de la maladie (McCormick *et al.*, 2007). Des études ont montré qu'un traitement à l'AngII n'induit pas la formation d'AAA chez les souris *ApoE*<sup>-/-</sup> lorsqu'elles sont déficientes pour le gène de la CyPA. De plus, les souris *ApoE*<sup>-/-</sup> *Ppia*<sup>-/-</sup> ne présentent pas de dégradation de l'élastine et par conséquent ne meurent pas de rupture aortique en comparaison aux souris exprimant la CyPA. En effet, les travaux réalisés sur ces souris ont montré que la CyPA participe à la migration des cellules inflammatoires et à l'activation des MMPs au niveau des lésions aortiques, ainsi qu'à la génération de ROS induite par l'AngII (Satoh *et al.*, 2009).

### C. 5. c. Cyclophilines et autres pathologies inflammatoires

L'utilisation de modèles murins d'inflammation aigüe du poumon et d'asthme allergique a permis de mettre en évidence l'importance de la CyPA dans d'autres pathologies inflammatoires. Arora *et al.* (2005) ont montré que l'administration de LPS par voie intranasale chez des modèles murins d'inflammation du poumon induit une forte sécrétion de CyPA qui est retrouvée dans les lavages broncho-alvéolaires. Cette forte sécrétion de CyPA est corrélée à une augmentation du nombre de neutrophiles présents dans les lavages. L'inhibition de l'interaction entre la CyPA et le CD147 réduit le nombre des neutrophiles, démontrant ainsi l'importance de l'activité chimioattractante de la CyPA dans le recrutement des neutrophiles sur le site de l'inflammation. La même équipe a montré dans un modèle murin d'asthme allergique que l'injection d'ovalbumine conduit à la sécrétion de CyPA et de CyPB, à la migration d'éosinophiles et de lymphocytes T activés au niveau des poumons et des voies respiratoires et à la sécrétion des cytokines T<sub>h</sub>2 IL-5 et IL-13. L'utilisation d'anticorps bloquant anti-CD147 réduit le recrutement des lymphocytes activés sur le site de l'inflammation et diminue la production d'IL-5 et d'IL-13 (Gwinn *et al.*, 2006). De même, l'inhibition de l'activité PPIase des CyPA et CyPB par l'utilisation d'analogues de la CsA

imperméable aux cellules réduit l'infiltration des tissus par les lymphocytes T activés et des éosinophiles et la production de cytokine  $T_h2$  (Balsley *et al.*, 2010). De plus, il a été démontré que la CyPA a un rôle important dans la chronicité de la maladie. En effet, durant la phase quiescente, des leucocytes sont présents dans les voies respiratoires bien que le taux des chimiokines RANTES (*Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted*), Eotaxine ou MCP-1 soit similaire à celui retrouvé chez les individus sains. Par contre, la CyPA est détectée durant la phase chronique de la maladie et l'utilisation d'analogue de la CsA non immunosuppresseur réduit l'infiltration des voies respiratoires par les neutrophiles, éosinophiles, macrophages et lymphocytes T activés et diminue la sensibilité des souris à l'allergène (Stemmy *et al.*, 2011). Dans l'ensemble, ces données montrent la contribution de la CyPA dans la sévérité de la pathologie de l'asthme chronique.

## II. Rôle des TLRs dans l'immunité innée

Une infection microbienne conduit à l'activation du système immunitaire, une réponse indispensable pour éliminer les pathogènes. Cette réponse est orchestrée par le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Jusqu'à récemment, l'importance de l'immunité innée dans la réponse hôte-pathogène avait été peu étudiée. Désormais, on sait qu'elle fournit à l'organisme la première ligne de défense contre les invasions microbiennes et permet la mise en place de la réponse immunitaire adaptative en produisant des cytokines, des chimiokines ou encore des facteurs de maturation et d'activation des lymphocytes.

### A. La signalisation des TLRs

Les cellules du système immunitaire inné discriminent le soi du non-soi grâce à des récepteurs appelés PRRs (*Pattern recognition receptors*) qui reconnaissent les PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*). Ces PAMPs sont des structures moléculaires conservées essentielles à la survie des microorganismes et que l'on ne retrouve pas chez l'hôte, comme par exemple le LPS ou le peptidoglycane. Jusqu'à présent, quatre groupes de PRRs ont été décrits chez les mammifères. Parmi eux, les TLRs (*Toll-like receptors*) ont largement été étudiés et caractérisés depuis leur découverte à la fin des années 1990 (Takeuchi & Akira, 2010).

## A. 1. Les TLRs

### A. 1. a. Structure des TLRs

Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I présentant une structure trimodulaire : i) une extrémité N-terminale extracellulaire qui consiste en la répétition de 16 à 28 motifs LRR (*Leucine rich repeat*) ; ii) un domaine transmembranaire et iii) un domaine C-terminal intracellulaire appelé domaine TIR (*Toll/IL-1R*).

Le domaine TIR est retrouvé dans le récepteur de l'IL-1 $\beta$  (*IL-1R*), mais également dans certaines protéines de *Drosophila melanogaster* comme le récepteur Toll (Gay & Keith, 1991). Initialement décrite pour son implication dans le développement de la polarité dorso-ventrale chez l'embryon, Toll a ensuite été impliqué dans la réponse immunitaire antifongique. L'homologie existante entre les domaine TIR chez Toll et chez l'IL-1R a conduit l'équipe de Medzhitov & Janeway à identifier chez l'Homme des protéines possédant ce domaine TIR et pouvant être impliquées dans la réponse immunitaire innée. Ainsi, le premier récepteur Toll humain identifié s'avérera par la suite être le TLR4 (Medzhitov *et al.*, 1997). Le domaine TIR est essentiel à la signalisation des TLRs puisqu'il permet l'homo- ou l'hétéro-dimérisation des récepteurs, conduisant ainsi au recrutement de molécules adaptatrices. Etant donné que l'IL-1R et les TLRs partagent le même domaine intracellulaire TIR, ils partagent également de manière générale les mêmes voies de signalisation.

Le domaine LRR est responsable des interactions entre le TLR et son ligand. L'analyse structurale des TLRs a permis de mettre en évidence la mise en conformation particulière de l'ectodomaine en forme de fer à cheval. La fixation du PAMP sur son récepteur induit la dimérisation de celui-ci. (Jin & Lee, 2008).

### A. 1. b. Expression et ligands des différents TLRs

Depuis la découverte du récepteur Toll humain, 10 et 12 TLRs fonctionnels ont été découverts chez l'Homme et la Souris respectivement, les TLR1 à TLR9 étant conservés chez les deux espèces. Par contre, le TLR10 murin est non fonctionnel (Chuang *et al.*, 2001 ; Hasan *et al.*, 2005) et les TLR11, TLR12 et TLR13 ne sont pas exprimés chez l'Homme (Zhang *et al.*, 2004 ; Wu *et al.*, 2008 ; Mishra *et al.*, 2008). Les TLRs sont divisés en deux groupes selon leur localisation cellulaire et de leurs PAMPs respectifs. Le premier groupe est

constitué des TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10 qui sont exprimés à la surface cellulaire et qui reconnaissent principalement des constituants des membranes microbiennes comme les lipides ou les lipoprotéines. L'autre groupe est constitué des TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 qui sont exprimés exclusivement dans les vésicules intracellulaires telles que le réticulum endoplasmique, les endosomes ou les lysosomes et qui reconnaissent les acides nucléiques microbiens. Ceux-ci sont généralement impliqués dans la réponse antivirale (Takeuchi et Akira, 2010) (Tableau 1).

**Tableau 1 : Les TLRs et leurs ligands** (d'après Takeuchi & Akira, 2010).

TLR	Localisation	Adaptateur	Ligand	Origine du ligand
TLR2-TLR1	Membrane plasmique	MyD88, MAL	Lipopeptides triacylés	Bactérie
TLR2-TLR6	Membrane plasmique	MyD88, MAL	Lipopeptides diacylés	Mycoplasme
TLR2	Membrane plasmique	MyD88, MAL	Lipoprotéines, Peptidoglycane	Bactérie
			Lipoarabinomannane	Mycobactérie
			Zymozan	Champignon
			Hémagglutinine	Virus
TLR3	Endolysosome	TRIF	ARN double brin	Virus
TLR4	Membrane plasmique	MyD88, MAL TRIF, TRAF	LPS	Bactérie
TLR5	Membrane plasmique	MyD88	Flagelline	Bactérie
TLR7	Endolysosome	MyD88	ARN simple brin	Virus
TLR8	Endolysosome	MyD88	ARN simple brin	Virus
TLR9	Endolysosome	MyD88	ADN CpG	Bactérie, Virus
TLR10	Membrane plasmique	MyD88	Lipopeptides triacylés	Bactérie

### A. 1. b. -i) Les TLRs de surface cellulaire

Le TLR4 est le premier TLR de mammifère à avoir été découvert. Il est exprimé par les cellules immunitaires, notamment par les macrophages et les cellules dendritiques, mais également par les cellules endothéliales (Medzhitov *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1999). Le TLR4 est impliqué dans la reconnaissance du LPS, un constituant de la membrane externe des bactéries. C'est la portion lipidique du LPS, à savoir le lipide A, qui est responsable de l'activité immunostimulante du LPS. La reconnaissance du LPS par le TLR4 nécessite des molécules accessoires : MD-2 (*Myeloid differentiation factor 2*), le CD14 et la LBP (*LPS binding protein*). Il semble qu'il n'y ait pas d'interactions directes entre le LPS et le TLR4. C'est la LBP, une glycoprotéine présente dans le sérum, qui se lie au LPS. Le CD14, qui est lié à la membrane, interagit avec la LPB. Grâce à son domaine LRR, le CD14 transfère le LPS de la LBP au complexe TLR4-MD-2, entraînant sa dimérisation avec un autre complexe TLR4-MD-2, une étape essentielle à la transduction du signal puisqu'elle permet le recrutement des protéines adaptatrices MyD88 et TRIF (Kawai & Akira, 2010).

Le TLR2 est impliqué dans la détection d'un large nombre de PAMPs : les lipoprotéines bactériennes, peptidoglycane et acides lipotechoïques, les lipoarabinomannane des mycobactéries, le zymozan ou encore l'hémagglutinine des virus. Généralement, le TLR2 forme des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6. Les hétérodimères TLR2-TLR1 et TLR2-TLR6 reconnaissent respectivement des lipopeptides triacylés et diacylés des bactéries à Gram négatif et des mycoplasmes (Kawai & Akira, 2010). La stimulation du TLR2 avec des lipopeptides acylés entraîne la production de cytokines inflammatoires, mais pas d'IFN de type I dans les macrophages et les cellules dendritiques. Pourtant, dans les monocytes, la stimulation du TLR2 avec un composant viral conduit à la production d'IFN, suggérant un rôle spécifique du TLR2 dans la réponse antivirale selon le type cellulaire (Barbalat *et al.*, 2009).

Le TLR5 reconnaît la flagelline, un constituant du flagelle bactérien. Contrairement aux autres TLRs, le TLR5 n'est pas exprimé par les macrophages et les cellules dendritiques conventionnelles chez la souris. Par contre, on le retrouve fortement exprimé au niveau de l'intestin par les cellules dendritiques de la lamina propria et des poumons (Uematsu *et al.*, 2006).

Le TLR10 est exprimé par les lymphocytes B et les cellules dendritiques plasmocytoïdes. Il présente de fortes homologies de séquence avec le TLR1 et le TLR6.

D'ailleurs, il peut s'hétérodimériser avec le TLR2 et reconnaît les mêmes ligands que le TLR1. Par contre il ne conduit pas à l'activation des voies NF- $\kappa$ B et IFN bien qu'il recrute l'adaptateur MyD88 (Hasan *et al.*, 2005 ; Guan *et al.*, 2010).

### A. 1. b. -ii) Les TLRs intracellulaires

Le TLR3 est exprimé par les cellules dendritiques, les macrophages mais également par les fibroblastes et les cellules épithéliales et reconnaît les ARNs double brin (ARNdb) : l'acide polyinosinique polycytidylique (Poly I:C) qui est un analogue synthétique d'ARN, l'ARN génomique purifié de virus et rétrovirus à ARNdb ou encore l'ARNdb produit durant la réplication d'ARN simple brin (ARNsb) de virus. Le TLR3 est essentiel dans la réponse antivirale puisqu'il permet la production d'IFN de type I et de cytokines inflammatoires suite au recrutement de TRIF et à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF3 (*IFN regulatory factor*) (Alexopoulou *et al.*, 2001 ; Vercammen *et al.*, 2007).

Le TLR7 et le TLR8 sont très similaires. Ils sont tous deux exprimés par la plupart des cellules immunitaires comme les cellules dendritiques, les lymphocytes B ou les monocytes. Ils reconnaissent des ARNsb viraux ou bactériens riches en uridine et guanidine (Diebold *et al.*, 2004 ; Heil *et al.*, 2004 ; Lund *et al.*, 2004). Dans les cellules dendritiques plasmocytoïdes, le TLR7 induit fortement l'expression d'IFN de type I conduisant à l'activation d'une réponse humorale. Par contre, dans les cellules dendritiques myéloïdes, le TLR8 induit la synthèse de cytokines inflammatoires conduisant à une réponse immunitaire de type T<sub>h</sub>1 (Bauer *et al.*, 2008).

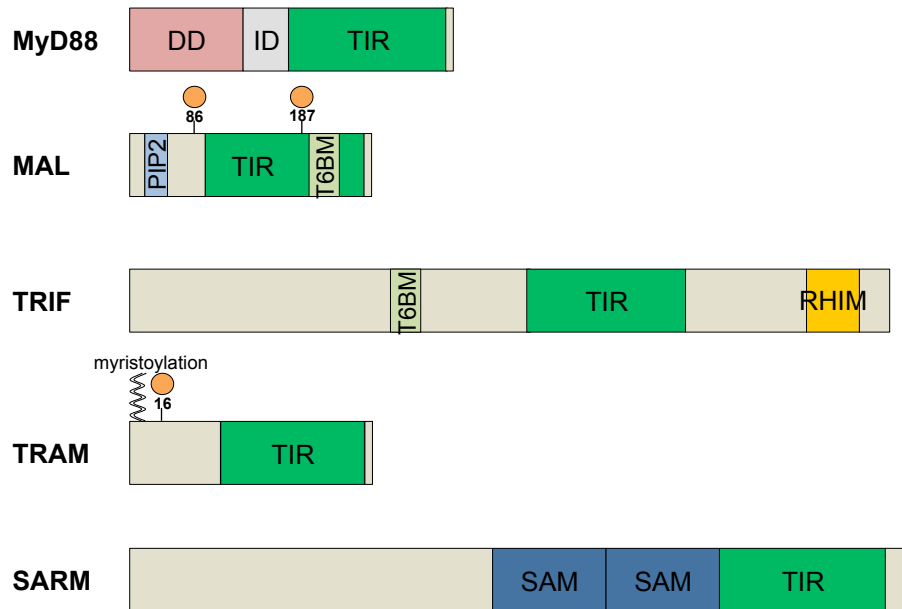
Le TLR9 est exprimé principalement par les lymphocytes B mémoire et les cellules dendritiques plasmocytoïdes et il reconnaît l'ADN non méthylé riche en motifs CpG de bactéries et de virus. (Hemmi *et al.*, 2000 ; Bauer *et al.*, 2001, 2008).

## A. 2. Voies de signalisation associées aux TLRs

La stimulation des TLRs génère l'induction de différents facteurs inflammatoires. De manière globale, le TLR3 et le TLR4 activent à la fois la synthèse d'IFN de type I et de cytokines inflammatoires, tandis que les TLR1, TLR2, TLR6, TLR5 et TLR10 sont principalement impliqués dans l'expression de cytokines inflammatoires. Ces différences sont



expliquées par le recrutement spécifique, au niveau du domaine TIR des TLRs, de protéines adaptatrices. Au nombre de quatre (MyD88, MAL, TRIF et TRAM), ces adaptateurs induisent l'activation de voies de signalisation distinctes (O'Neill & Bowie, 2007 ; Kawai & Akira, 2010) (Figure 10).



**Figure 10 : Représentation schématique des domaines fonctionnels présents chez les protéines adaptatrices de la famille TIR.** Le domaine DD de MyD88 lui permet d'interagir avec IRAK-4. MAL et TRIF présentent chacun un site d'interaction pour TRAF6. TRIF contient un site RHIM qui lui permet d'interagir avec RIP1. Les domaines SAM de SARM sont nécessaires à son activité inhibitrice. MAL et TRAM sont localisés au niveau de la membrane plasmique grâce au site de fixation du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) pour MAL et au site de myristoylation pour TRAM. MAL et TRAM présentent également des sites de phosphorylation sur les résidus Tyr<sup>86</sup> et Tyr<sup>187</sup> pour MAL et Ser<sup>16</sup> pour TRAM (d'après O'Neill & Bowie, 2007).

### A. 2. a. Voie dépendante de MyD88

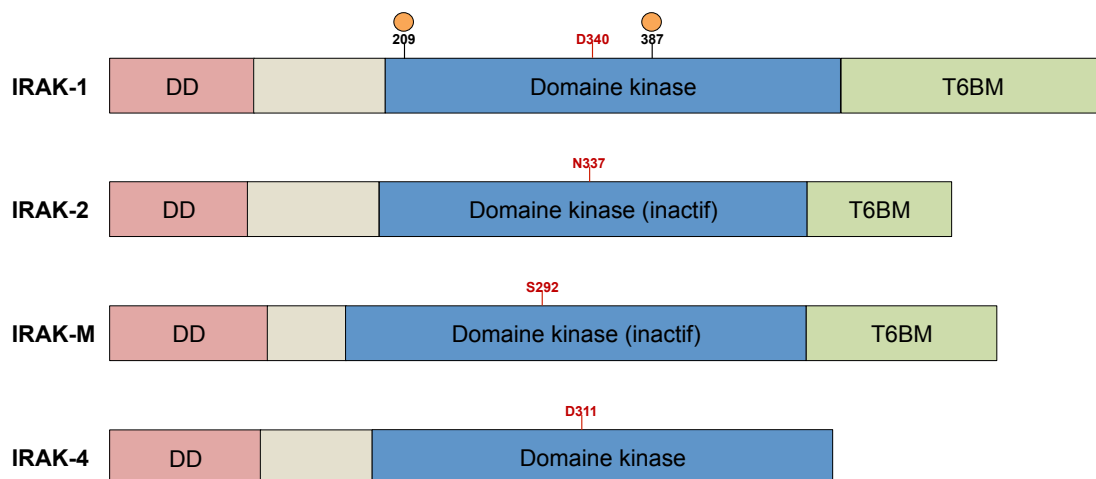
MyD88 (*Myeloid differentiation factor-88*) fut le premier adaptateur des TLRs à avoir été décrit. Depuis quelques années, sa fonction centrale dans la signalisation des TLRs se clarifie (Medzhitov *et al.*, 1998). Des souris invalidées pour MyD88 montrent des défauts d'activation de NF-κB et des MAPKs suite à l'activation des TLRs excepté pour le TLR3 qui utilise un adaptateur autre que MyD88 et pour le TLR4 dont l'activation des voies de signalisation dépend non seulement de MyD88 mais également d'autres adaptateurs (Kawai *et*

*al.*, 1999 ; Takeuchi *et al.*, 2000). Par ailleurs le recrutement de MyD88 au TLR2 et au TLR4 ne se fait pas directement et nécessite l'intervention de MAL (*MyD88 adapter-like protein*). Cet adaptateur joue un rôle de pontage entre les domaines TIR des TLR2 et TLR4 et MyD88. L'inactivation de l'expression de MAL entraîne un défaut dans l'induction de l'expression de cytokines inflammatoires suite à la stimulation des deux TLRs (Fitzgerald *et al.*, 2001 ; Ulrichs *et al.*, 2007 ; Ulrichs & Tavernier, 2008).

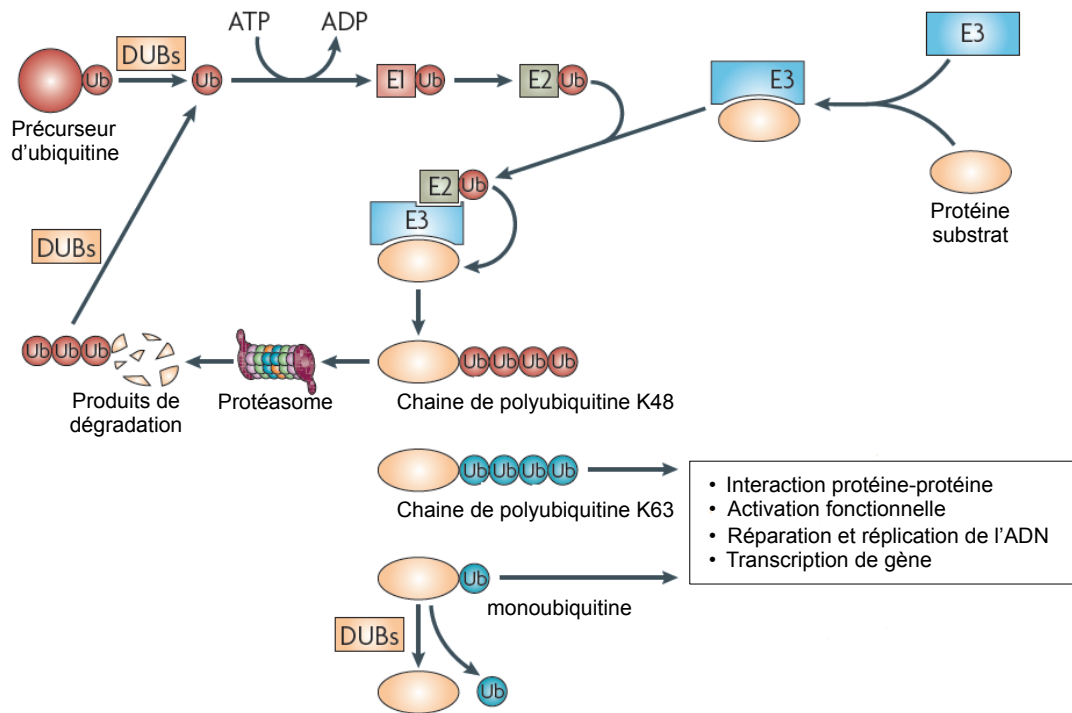
MyD88 possède un domaine DD (*Death domain*) présent en N-terminal qui interagit avec IRAK-4 (*IL-1R associated kinase-4*) et permet ainsi le recrutement et l'activation de la kinase au complexe récepteur (Burns *et al.*, 1998 ; Suzuki *et al.*, 2002a). Les IRAKs constituent une famille de quatre membres : IRAK-1, IRAK-2, IRAK-4 et IRAK-M. A l'exception de IRAK-4, toutes présentent un domaine C-terminal impliqué dans les interactions avec TRAF6 (*TNF-receptor associated factors 6*). Par contre, seul IRAK-1 et IRAK-4 possèdent un domaine central kinase (Figure 11). Des études réalisées sur des souris *Irak-4<sup>-/-</sup>* ont montré qu'elles sont résistantes aux réponses induites par le LPS (Suzuki *et al.*, 2002b). En effet, l'activation de IRAK-4 permet le recrutement de IRAK-1 au complexe récepteur. Activée, IRAK-1 s'autophosphoryle, recrute TRAF6 et se dissocie du complexe récepteur (Flannery & Bowie, 2010) (Figure 10). IRAK-2 semble également avoir un rôle à jouer dans la signalisation associée à MyD88. En effet, si une déficience en IRAK-1 entraîne une diminution de l'expression des gènes induit par NF- $\kappa$ B, l'inactivation de IRAK-1 et IRAK-2 inhibe complètement l'expression de ces mêmes gènes. Par contre, une déficience en IRAK-2 n'entraîne qu'un défaut d'expression des gènes tardifs induits par le LPS, suggérant que IRAK-1 et IRAK-2 présentent des fonctions redondantes dans les étapes précoces de la signalisation NF- $\kappa$ B et qu'en plus IRAK-2 intervient dans les étapes tardives (Keating *et al.*, 2007 ; Kawagoe *et al.*, 2008).

La famille TRAF rassemble sept protéines caractérisées par un domaine C-terminal TRAF impliqué dans des interactions protéiques homo- et hétérotypiques et par un domaine N-terminal RING responsable d'une activité E3 ubiquitine ligase pour les protéines TRAF2 à TRAF7. Cette activité leur permet de fixer des chaînes d'ubiquitine sur des résidus lysines des protéines cibles à l'aide des enzymes E1 qui activent la chaîne d'ubiquitine et des enzymes E2 qui transfèrent les chaînes activées aux enzymes E3 (Figure 12). Les protéines TRAF2, TRAF5 et TRAF6 sont des régulateurs positifs clés des voies NF- $\kappa$ B et MAPK et présentent des activités similaires. TRAF2 et TRAF5 interviennent dans la signalisation des TNFRs (*TNF receptors*) tandis que TRAF6 est retrouvé associé à la signalisation des TLRs et de l'IL-

1R (Chung *et al.*, 2002). L'interaction entre IRAK-1 et TRAF6 conduit à l'activation de TRAF6 qui s'auto-ubiquitine. Les chaînes poly-ubiquitinyllées K63 portées par TRAF6 permettent le recrutement d'un complexe constitué de la kinase TAK1 (*Transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1*) et des protéines régulatrices TAB1 (*TAK1 binding protein 1*) et TAB2 ou TAB3. Le recrutement de ce complexe se fait grâce au domaine UBD (*Ubiquitin binding domain*) que possèdent TAB2 et TAB3 et qui reconnaît les chaînes polyubiquitine K63 (Kanayama *et al.* 2004). L'interaction de TAB2 et TAB3 avec TRAF6 favoriserait son auto-ubiquitination. Les chaînes polyubiquitine serviraient alors d'échafaudage afin de recruter le complexe IKK (*I $\kappa$ B kinase*). L'expression d'une protéine TRAF6 ayant perdu son domaine RING ou l'invalidation de l'expression de TAK1 ou de TAB2 et TAB3 bloque l'activation du complexe IKK (Deng *et al.*, 2000 ; Ishitani *et al.*, 2003 ; Takaesu *et al.*, 2003 ; Lamothe *et al.*, 2007, 2008) (Figure 13).



**Figure 11 : Représentation schématique des domaines fonctionnels présents chez les protéines IRAKs.** Chaque membre contient un domaine DD leur permettant d'interagir avec MyD88. IRAK-1 et IRAK-4 présentent un résidu d'acide aspartique respectivement en position 340 et 311 qui est essentielle pour leur activité kinase. Par contre, IRAK-2 et IRAK-M présentent des mutations au niveau de ce résidu, rendant leur domaine kinase inactif. IRAK-1, IRAK-2 et IRAK-M sont capables d'interagir avec TRAF6 *via* leur domaine T6BM. IRAK-4 phosphoryle les acides aminés Thr<sup>209</sup> et Thr<sup>387</sup> présents chez IRAK-1 (d'après Janssens & Beyaert, 2003 ; Fannery & Bowie, 2010).



**Figure 12 : Le processus d'ubiquitylation.** L'ubiquitylation consiste en la liaison d'une molécule d'ubiquitine (monoubiquitylation) sur un résidu lysine de protéines cibles. Les molécules d'ubiquitine présentent sept lysines qui peuvent servir de point d'ancrage pour l'ajout d'autres molécules d'ubiquitine (polyubiquitylation). Deux types de polyubiquitylation sont fréquentes: la polyubiquitylation K63 qui conduit à la dégradation protéasomale et la polyubiquitylation K48 qui est impliquée dans la régulation de divers processus cellulaires. La réaction d'ubiquitylation est réalisée par l'action séquentielle de 3 enzymes : E1 qui active l'ubiquitine, E2 qui transfère l'ubiquitine à E3 et E3 qui lie l'ubiquitine à un résidu de lysine. Les déubiquitylases (DUBs) peuvent enlever les chaînes d'ubiquitine des protéines et des produits de la dégradation protéasomale (d'après Sun, 2008) .

Les cellules dendritiques plasmocytoides sont une sous-population de cellules dendritiques connues pour produire de fortes quantités d'IFN de type I, notamment d'IFN- $\alpha$  en réponse à une infection virale (Colonna *et al.*, 2004). Dans ces cellules, l'induction d'IFN de type I suite à l'activation des TLR7, TLR8 et TLR9 est dépendante de la voie MyD88 (contrairement aux TLR3 et TLR4 qui utilisent la voie dépendante de TRIF), suggérant l'existence d'une voie de signalisation spécifique pour l'induction d'IFN- $\alpha$  dans ces cellules. D'ailleurs, l'inactivation de l'expression de MyD88, d'IRAK-1, d'IRAK-4 et de TRAF6 inhibe l'expression d'IFN- $\alpha$  (Uematsu *et al.*, 2005). Les cellules de souris déficientes pour IKK $\alpha$  montrent elles aussi un défaut d'expression d'IFN- $\alpha$  (Hoshino *et al.*, 2006).

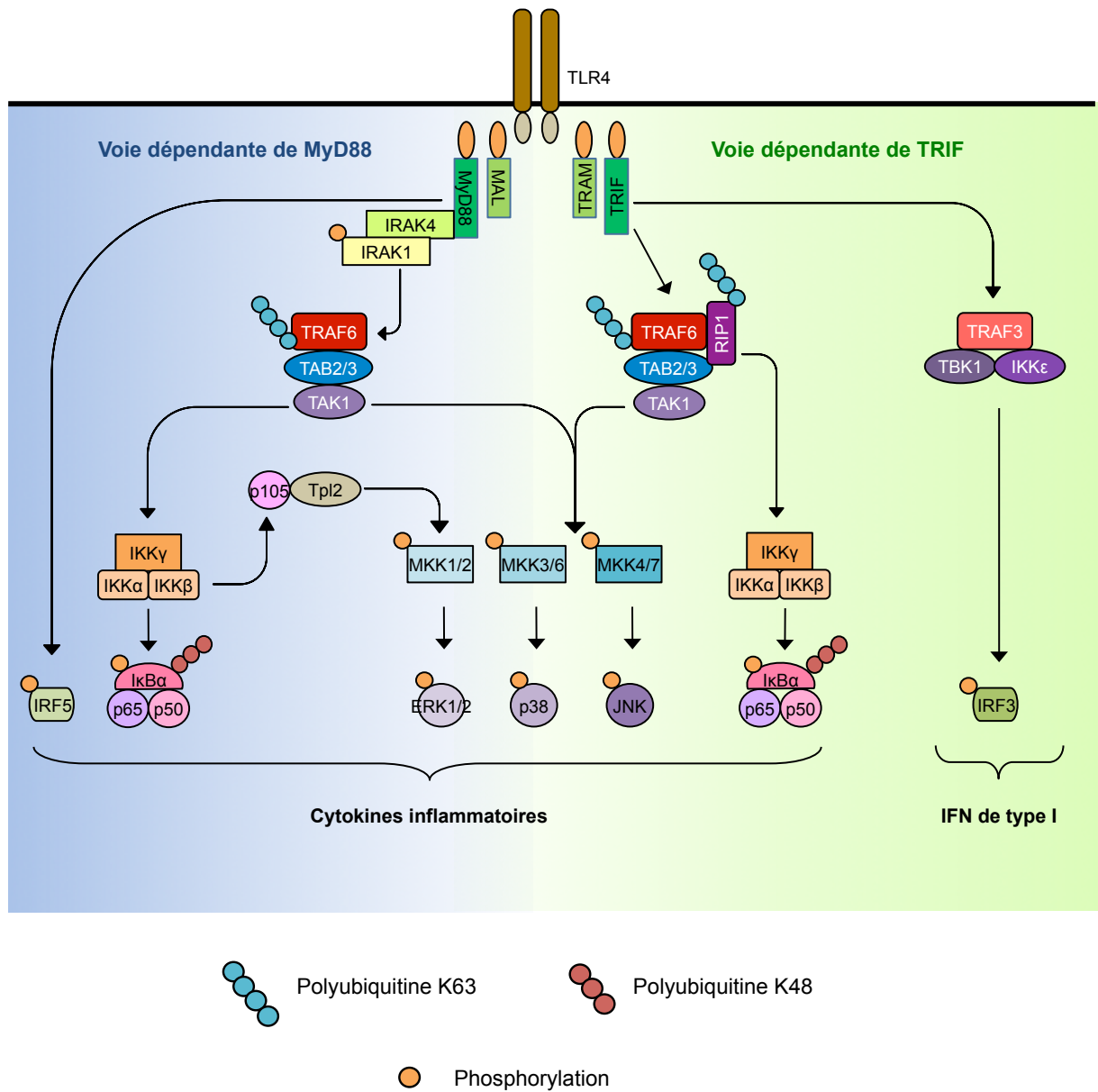
## A. 2. b. La voie dépendante de TRIF

En réponse au LPS, les cellules déficientes pour MyD88 sont toujours capables d'activer la voie NF- $\kappa$ B. Par contre, l'expression de cytokines inflammatoires est retardée dans ces cellules. De plus, l'expression d'IFN- $\beta$  dans ces mêmes cellules est observée, suggérant l'existence d'un autre adaptateur impliqué dans l'activation retardée des voies NF- $\kappa$ B, MAPK et dans l'induction d'IFN de type I (Kawai *et al.*, 1999). Dans ce contexte, TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$* ) a été identifié comme étant impliqué dans la voie indépendante de MyD88. D'ailleurs, des souris déficientes pour TRIF montrent des défauts d'activation des IRFs en réponse au LPS tandis que l'activation précoce des voies NF- $\kappa$ B et MAPK est normale. Par contre, la production de cytokines inflammatoires dans les cellules *Myd88*<sup>-/-</sup> ou *Trif*<sup>-/-</sup> est inférieure à celle observée dans les cellules sauvages, suggérant que les deux adaptateurs sont nécessaires pour une induction maximale de cytokines inflammatoires en réponse au LPS (Yamamoto *et al.*, 2003a). L'interaction entre le domaine TIR du TLR4 et TRIF ne se fait pas directement et nécessite la présence d'un autre adaptateur TRAM (*TIR-related adaptor molecule*) dont le rôle de pont est semblable à celui de MAL pour MyD88 (Oshiumi *et al.*, 2003a ; Yamamoto *et al.*, 2003b) (Figure 13).

L'induction de cytokines inflammatoires et d'IFN de type I suite à la stimulation du TLR3 est normale dans les souris déficientes pour MyD88 tandis que des cellules invalidées pour TRIF montrent une inhibition de l'activation des voies de signalisation associées au TLR. Par ailleurs, des cellules *Tram*<sup>-/-</sup> répondent normalement à la stimulation par du poly I:C, suggérant que TRIF est le seul adaptateur utilisé par le TLR3 (Oshiumi *et al.*, 2003a, 2003b).

TRIF présente des domaines d'interaction avec TRAF6 et leur mutation entraîne une diminution de l'activation de NF- $\kappa$ B alors que l'activation de IRF3 reste inchangée (Sato *et al.*, 2003 ; Jiang *et al.*, 2004). TRIF présente également un domaine RHIM (*RIP homotypic interacting motif*) impliqué dans des interactions avec les protéines RIP1 (*Receptor-interacting protein 1*) (Figure 10). Dans les cellules déficientes pour RIP1, l'activation de NF- $\kappa$ B induite par le TLR3 est inhibée (Meylan *et al.*, 2004). De plus, des cellules invalidées pour MyD88 et pour RIP1 montrent un défaut d'activation de NF- $\kappa$ B en réponse au LPS. Par contre, RIP1 ne participe pas à l'activation de IRF3 induite par le TLR3 et le TLR4 (Cusson-Hernance *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2010). TRIF recrute également TRAF3 qui interagit avec les kinases TBK1 (*TANK (TRAF-associated NF- $\kappa$ B activator) binding kinase 1*) et IKK $\epsilon$

et est impliqué dans l'induction d'IFN de type I (Oganesyanyan *et al.*, 2003 ; Häcker *et al.*, 2006) (Figure 13).



**Figure 13 : Schéma général des voies de signalisation associées au TLR4**  
(d'après Takeuchi & Akira, 2010).

## A. 2. c. La voie PI3K

La GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*) est une Ser/Thr kinase impliquée dans une multitude de processus physiologiques puisqu'elle régule notamment l'activité de facteurs de transcription. La GSK3 est constitutivement active dans les cellules à l'état basal mais sa phosphorylation par diverses kinases entraîne son inhibition. Martin *et al.* (2005) ont montré que la stimulation du TLR4 par le LPS induit la phosphorylation de la kinase et qu'elle est corrélée à l'activation de la Ser/Thr kinase Akt/PKB (*Protein kinase B*). L'activation d'Akt/PKB est induite, *via* PDK1 (*3'-phosphoinositide-dependent kinase-1*), par le PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate) qui provient de la phosphorylation par la PI3K du PIP2 (Phosphatidylinositol (4,5) biphosphate). Par conséquent, l'inhibition de la GSK3 suite à la stimulation du TLR4 suggère l'implication de la PI3K dans la régulation de la signalisation de TLRs.

La PI3K de classe IA est impliquée dans la régulation de la signalisation des TLRs. Il s'agit d'un hétérodimère constitué d'une sous unité régulatrice p85 qui se fixe au niveau des domaines intracellulaires des récepteurs *via* des phosphotyrosines et d'une sous unité catalytique p110. Les TLR1, TLR2 et TLR5 présentent une séquence YxxM mais la mutation de celle-ci au niveau du TLR2 n'inhibe pas l'interaction de la PI3K avec le récepteur, suggérant l'existence d'un autre mécanisme pour recruter la PI3K aux TLRs (Arbibe *et al.*, 2000). D'ailleurs, la stimulation des TLR3, TLR4 et TLR6, qui ne possèdent pas cette séquence, induit tout de même l'activation de la PI3K.

Si la PI3K induit l'inhibition de l'activité de la GSK3, son recrutement au niveau des TLRs devrait avoir un effet négatif sur l'expression de cytokines inflammatoires puisque la GSK3 est impliquée dans l'activation de facteurs nécessaires à leur transcription. Cependant, différents travaux suggèrent également un rôle positif de la PI3K dans la signalisation des TLRs. Arbibe *et al.* (2000) ont montré que dans les cellules THP-1, le recrutement de la PI3K suite à l'activation du TLR2 est nécessaire pour l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B. Dans les macrophages de souris, l'activation de la PI3K suite à la stimulation du TLR4 est nécessaire à la localisation nucléaire de NF- $\kappa$ B et à la fixation du facteur de transcription sur l'ADN. L'inhibition de l'activité de la PI3K par des inhibiteurs entraîne une diminution de l'expression de l'IL-1 $\beta$  mais pas du TNF- $\alpha$  (Ojaniemi *et al.*, 2003).

## A. 3. Activation des facteurs de transcription

### A. 3. a. La voie NF- $\kappa$ B

Le schéma général de la voie NF- $\kappa$ B consiste en une série d'éléments de régulation positive ou négative. L'activation des kinases IKKs conduit à la phosphorylation, ubiquitination et dégradation des protéines I $\kappa$ B. Il en résulte alors la libération et l'activation des dimères NF- $\kappa$ B qui migrent jusqu'au noyau où ils se fixent sur des séquences d'ADN spécifiques et induisent la transcription des gènes cibles (Hayden & Ghosh, 2008).

#### A. 3. a. -i) Le complexe IKK

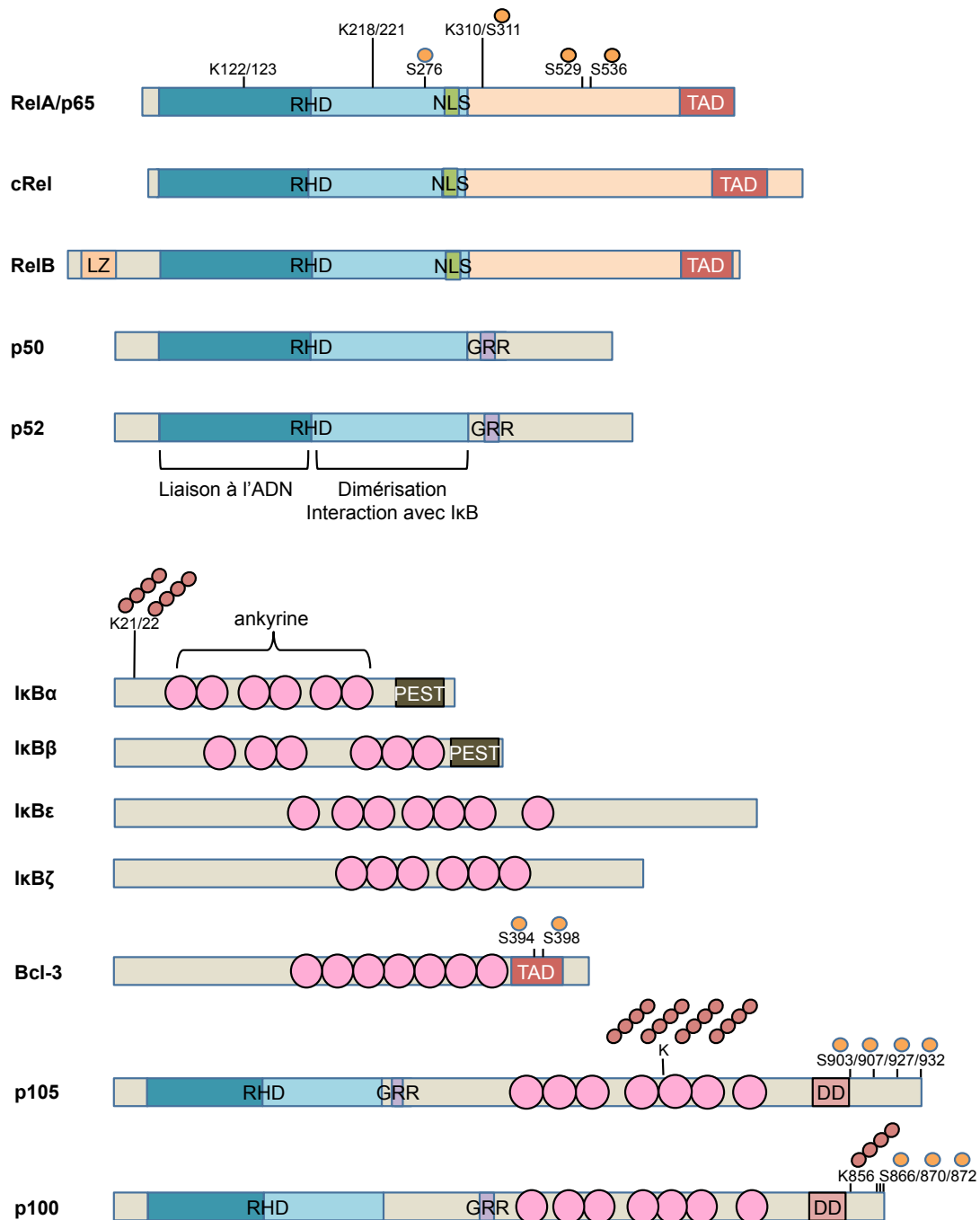
Le complexe IKK est constitué des kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  ainsi que d'une sous unité régulatrice IKK $\gamma$  également appelée NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modulator*). IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  partagent une séquence protéique similaire qui présente un domaine N-terminal kinase et une extrémité C-terminale constituée du motif LZ (*Leucine zipper*) et d'un domaine NBD (*NEMO binding domain*). IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  se dimérisent *via* leur motif LZ et deux dimères IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  s'associent à un trimère ou plus généralement à un tétramère de protéines IKK $\gamma$  pour former un complexe catalytique actif (Zandi *et al.*, 1997 ; Yamaoka *et al.*, 1998 ; Tegethoff *et al.*, 2003 ). Ce complexe présente une activité catalytique lente et son activation requiert la phosphorylation de sérines. Il semble que l'oligomérisation de IKK $\gamma$  induite par la polyubiquitination de TRAF6 et de RIP1 soit importante pour la phosphorylation de IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  puisque des protéines IKK $\gamma$  mutées incapables de s'oligomériser ne stimulent plus l'activation des kinases IKK (Tegethoff *et al.*, 2003). Cependant, il reste à déterminer si l'activation des kinases se fait par transautophosphorylation ou à l'aide de la kinase TAK1. La mutation du domaine LZ responsable de la dimérisation d'IKK $\alpha$  et d'IKK $\beta$  entraîne un défaut de phosphorylation des kinases suggérant une activation des kinases par transautophosphorylation (Tang *et al.*, 2003). Pourtant, il a été démontré que TAK1 est capable de phosphoryler IKK $\beta$  et que l'inactivation du gène codant pour TAK1 entraîne une inhibition de l'activation du complexe IKK induite par la stimulation des TLRs (Wang *et al.*, 2001 ; Sato *et al.*, 2005).



### A. 3. a. -ii) La famille NF- $\kappa$ B

La famille de facteurs de transcription NF- $\kappa$ B comprend cinq membres : p65 (ou RelA), c-Rel, RelB, p50 et p52 (les deux derniers provenant respectivement de la protéolyse des protéines précurseurs p105 et p100). Ces protéines partagent toutes au niveau de leur extrémité N-terminale un domaine conservé RHD (*Rel homology domain*) de 300 acides aminés. Ce domaine est responsable de l'homo- ou hétéro-dimérisation des protéines Rel, de leur localisation nucléaire grâce à la séquence NLS (*Nuclear localization sequence*) ou des interactions des dimères NF- $\kappa$ B avec les protéines I $\kappa$ Bs. Les protéines p65, c-Rel et RelB possèdent également un domaine TAD (*Transcription activation domain*) au niveau de leur extrémité C-terminale. Ce domaine est nécessaire à la transcription des gènes cibles. Par conséquent, les dimères NF- $\kappa$ B qui possèdent une de ces sous unités sont des activateurs de la transcription tandis que les protéines p50 et p52, qui ne possèdent pas ce domaine, ne présentent pas d'activité transcriptionnelle intrinsèque (Huxford & Ghosh, 2009) (Figure 14).

Les protéines précurseurs p100 et p105 ont deux fonctions : la rétention des protéines NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme et la génération de protéines p52 et p50. Pour la première, p100 et p105 s'associent avec les autres protéines Rel permettant ainsi à leur domaine ankyrine d'agir comme une protéine I $\kappa$ B (Rice *et al.*, 1992 ; Naumann *et al.*, 1993 ; Solan *et al.*, 2002). Bien que leur séquence soit similaire, la génération des protéines p50 et p52 à partir de leur précurseur respectif est différente et seule p105 est impliquée dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B canonique. p105 subit une protéolyse constitutive contrôlée qui permet la formation de p50 pouvant s'associer à d'autres protéines Rel (Lin & Ghosh, 1996 ; Lin *et al.*, 1998). Par contre, lorsque p105 est associée à un dimère NF- $\kappa$ B, la protéolyse contrôlée ne peut avoir lieu. p105 est alors dégradé de façon similaire à I $\kappa$ B- $\alpha$ . IKK $\beta$  phosphoryle p105 entraînant ainsi son ubiquitination, sa dégradation complète et la libération du facteur de transcription (Cohen *et al.*, 2004). La génération de p52 requiert également la dégradation contrôlée de p100. Par contre cet événement est inductible. C'est IKK $\alpha$  qui phosphoryle p100 induisant ainsi sa polyubiquitination. La libération de dimères contenant p52 conduit à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B non canonique.



**Figure 14 : Représentation schématique des protéines de la famille NF-κB/Rel et IκB.**

p65/RelA présente des sites de modifications post-traductionnelles (acétylation sur les résidus Lys et phosphorylation sur les résidus Ser). Le domaine LZ de RelB est impliqué dans sa transactivation. Les domaines TAD sont nécessaires à l'activité transcriptionnelle des protéines p65/RelA, cRel et RelB et les domaines NLS permettent leur translocation au noyau. Les domaines ankyrine sont impliqués dans les interactions entre les protéines IκB et Rel. Les séquences PEST dirigent IκB-α et IκB-β au protéasome après ajout de chaînes ubiquitine sur les résidus Lys. Bcl-3 est phosphorylé par la GSK3 sur des résidus Ser présents au niveau de son domaine transactivateur. p105 et p100 sont phosphorylés sur des résidus Ser afin d'être ubiquitinylées sur les résidus de Lys puis dégradées (d'après Perkins *et al.*, 2006).

### A. 3. a. -iii) Les IκBs : substrats du complexe IKK et inhibiteurs des complexes NF-κB

La famille IκB présente huit membres classés en trois sous familles : les IκBs typiques comprenant IκB-α, IκB-β et IκB-ε, les IκBs atypiques avec IκB-ζ, IκBNS et Bcl-3 (*B-cell leukemia*) et les protéines précurseurs p100 et p105. Les IκBs sont caractérisés par la présence de cinq à sept motifs répétés d'ankyrine qui leur permettent des interactions avec les protéines NF-κB. En général, chaque IκB s'associe préférentiellement à un dimère NF-κB. IκB-α et IκB-β interagissent avec les complexes contenant les protéines p65 ou c-Rel avec une préférence de IκB-α pour l'hétérodimère p65/p50 tandis que RelB se lie exclusivement à p100. Les IκBs atypiques sont retrouvées associées à p50 et p52 (Dobrzanski *et al.*, 1994 ; Yamamoto & Takeda, 2008) (Figure 14).

Les IκBs typiques agissent en séquestrant les dimères NF-κB dans le cytosol, prévenant ainsi la transcription de leurs gènes cibles. La stimulation des TLRs conduit à l'activation de la voie NF-κB canonique qui implique les protéines p65, p50 et c-Rel. La sous unité IKKβ du complexe IKK phosphoryle des sérines conservées présentes au niveau de la région N-terminale des IκBs typiques. Cette phosphorylation entraîne leur polyubiquitination par des chaînes ubiquitines K48 et leur dégradation protéasomale (Figure 14). IκB-α est le membre le mieux étudié de la famille IκB. Des études cristallographiques du complexe IκB-α/p65/p50 ont montré que IκB-α masque la séquence NLS de p65 tandis que celle de p50 est accessible (Huxford *et al.*, 1998 ; Jacobs & Harrison, 1998). IκB-α présente également une séquence NES (*Nuclear export sequence*). Le complexe IκB-α/p65/p50 fait constamment la navette entre le noyau et le cytosol bien que la localisation du complexe soit principalement cytosolique. La dégradation de IκB-α entraîne la perte de la séquence NES et la libération de la séquence NLS de p65, provoquant la translocation de l'hétérodimère NF-κB dans le noyau.

La dégradation de IκB ne permet pas à elle seule une activation complète du facteur de transcription NF-κB. En effet, des modifications sont nécessaires afin de moduler la fixation de NF-κB aux sites κB ou l'interaction entre NF-κB et les co-activateurs de la transcription. Des phosphorylations de sérines présentes au niveau du domaine TAD et du domaine RHD sont réalisées par diverses kinases et favorisent l'interaction entre p65 et les co-activateurs de la transcription CBP (*CREB (cAMP response element binding) binding protein*) et p300. L'acétylation de divers résidus lysine a également été décrite comme une modification pouvant augmenter ou inhiber l'activité transcriptionnelle de NF-κB selon les acides aminés

touchés (Chen & Greene, 2004) (Figure 14).

En comparaison aux autres I $\kappa$ Bs, les I $\kappa$ Bs atypiques sont retrouvées associées exclusivement dans le noyau aux homodimères p50/p50 et p52/p52 et hétérodimères p50/p52 et régulent l'expression de gènes tant positivement que négativement (Yamamoto & Takeda, 2008). Par exemple, dans les macrophages stimulés par le LPS, la surexpression de Bcl-3 conduit à une baisse de production de TNF- $\alpha$  alors que la production d'IL-6 n'est pas affectée (Kuwata *et al.*, 2003). Les travaux de Yamamoto *et al.* (2004) ont montré que I $\kappa$ B- $\zeta$  qui est exprimé en réponse à l'activation des TLR2, TLR4 et TLR5 est nécessaire à l'expression de l'IL-6. En effet, I $\kappa$ B- $\zeta$  interagit avec les dimères p50/p50 et se fixe sur le promoteur de la cytokine. L'inactivation de l'expression de I $\kappa$ B- $\zeta$  ou de p50 inhibe l'expression de l'IL-6 mais également de l'IL-12p40 en réponse au LPS (Yamamoto *et al.*, 2004 ; Trinh *et al.*, 2006). De même, l'IL-6 est surexprimée dans les cellules déficientes pour I $\kappa$ BNS en réponse au LPS (Kuwata *et al.*, 2006).

### A. 3. b. Les voies MAPK

Les MAPKs constituent un groupe de sérine/thréonine kinases très conservées chez les Eucaryotes. Elles ont un rôle important dans divers processus cellulaires tels que la prolifération, la réponse au stress, l'apoptose et la défense immunitaire puisqu'elles activent divers facteurs de transcription tels que ELK-1, ATF2, AP-1. Dans la réponse TLR, trois voies MAPK ont été caractérisées pour y jouer un rôle.

Les MAPKs partagent des séquences identiques à 60-70 % et diffèrent par la séquence et la taille de leur boucle d'activation. Leur activation est relayée à travers une cascade de phosphorylations séquentielles qui débute par la phosphorylation des MAPK kinases (MAPKKs) sur deux résidus de sérines par les MAPK kinase kinases (MAPKKKs). Les MAPKKs activées phosphorylent alors les MAPKs sur des résidus de tyrosine et thréonine présents au niveau d'un motif TXY (où X est Glu, Pro et Gly pour ERK, JNK et p38 MAPK respectivement), provoquant un changement de conformation et une augmentation de l'activité catalytique de ces dernières. Les MAPKKs (également appelées MKKs ou MEKs) présentent de fortes spécificités de substrats générant peu de variations dans la cascade MAPKK-MAPK. A l'inverse, les MAPKKKs (ou MEKKs) possèdent des structures différentes qui varient en fonction du type cellulaire et du stimulus (Chen *et al.*, 2001).

### *A. 3. b. -i) Les kinases ERK1/2*

ERK1 et ERK2 sont des protéines de 44 et 42 kDa respectivement qui partagent 83 % d'homologies entre elles et dont la plupart des différences sont retrouvées hors du domaine kinase. Les kinases ERK1/2 sont exprimées par la plupart des cellules et à de fortes concentrations. MKK1 et MKK2 présentent en N-terminal un site de fixation pour les protéines ERK1/2 et les phosphorylent sur les sites phosphoaccepteurs Thr203-Glu-Tyr205 pour ERK1 et Thr185-Glu-Tyr187 pour ERK2 (Raman *et al.*, 2007).

### *A. 3. b. -ii) Les kinases JNK*

Les kinases JNK (également appelées SAPK (*Stress activated protein kinase*)) sont codées par trois gènes distincts, JNK1, JNK2 et JNK3 et douze variants issus de l'épissage alternatif de leur ARNm sont exprimés. Les protéines JNK présentent 85 % d'homologies et ont des tailles allant de 46 à 55 kDa. JNK1 et JNK2 (54 et 46 kDa respectivement) sont ubiquitairement exprimées tandis que JNK3 est retrouvée dans le cerveau. JNK1/2 sont phosphorylées sur les sites Thr183-Pro-Tyr185 par MKK4 et MKK7. L'activation de deux MKKs est nécessaire pour une activation maximale de JNK1/2 puisque MKK4 phosphoryle les résidus Tyr185 tandis que MKK7 phosphorylent les résidus Thr183 (Lawler *et al.*, 1998 ; Fleming *et al.*, 2000).

### *A. 3. b. -iii) Les kinases p38*

Quatre membres de la famille p38 MAPK ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ ) ont été caractérisés. Les protéines p38 MAPK partagent 60 % d'identité. p38 $\alpha$  et - $\beta$  sont retrouvées dans la plupart des cellules tandis que p38 $\delta$  et - $\gamma$  ont des profils d'expression plus restreints. MKK3 et MKK6 sont toutes les deux nécessaires pour une activation maximale des p38 MAPK. p38 $\alpha$ , - $\delta$ , et - $\gamma$  sont phosphorylées par MKK3/6 tandis que p38 $\beta$  est préférentiellement activée par MKK6. La phosphorylation de p38 MAPK se fait sur le site Thr180-Gly-Tyr182 (Enslin *et al.*, 1998). *In vitro*, il a été démontré que MKK4 peut également phosphoryler p38 MAPK. D'ailleurs, dans le cas où MKK3 et MKK6 sont absents, MKK4 assume le rôle d'activateur de p38 MAPK (Brancho *et al.*, 2003).

### A. 3. b. -iv) Les MAPKKKs

Suite à l'activation des TLRs, plusieurs kinases ont été identifiées pour activer les MAPKs (Figure 13). Les MAPKKKs de la famille Raf sont les kinases majeures de MKK1/2. Les isoformes Raf sont activées par les GTPases de la famille Ras. Dans les cellules quiescentes, les protéines Ras sont liées au GDP et sont inactives. Un stimulus extracellulaire cause le remplacement du GDP par le GTP entraînant l'activation de Ras qui peut alors recruter les kinases Raf à la membrane. Activées, ces dernières phosphorylent et activent MKK1/2. D'ailleurs, la transfection de macrophages de souris avec des dominants négatifs des protéines Ras et Raf bloque l'expression du TNF- $\alpha$  induite par le LPS (Geppert *et al.*, 1994).

TAK1 peut phosphoryler *in vitro* MKK6 et l'inactivation de son expression entraîne des défauts d'activation de p38 MAPK et JNK suite à la stimulation par l'IL-1 $\beta$  de fibroblastes (Sato *et al.*, 2005).

*In vitro*, Tpl2 (*Tumor progression locus 2*) peut activer les différentes kinases responsables de l'activation des MAPKs. De plus, la surexpression de la kinase entraîne une activation de ERK1/2, JNK et p38 MAPK (Salmeron *et al.*, 1993 ; Chiariello *et al.*, 2000). Dans la cellule, Tpl2 est retrouvée associée à une petite portion cellulaire de p105. Active, elle est cependant incapable de phosphoryler les MAPKs et c'est la dégradation de p105 induite par IKK $\beta$  qui permet la libération de la kinase (Beinke *et al.*, 2003 ; Waterfield *et al.*, 2004 ; Babu *et al.*, 2006). Des macrophages de souris *Tpl2*<sup>-/-</sup> ont montré que l'activation de ERK1/2 est bloquée en réponse à la stimulation des TLR2 et TLR4 alors que l'activation de JNK et p38 MAPK reste inchangée. De plus, l'expression du TNF- $\alpha$  en réponse au LPS est réduite dans ces cellules conférant aux souris une résistance au choc septique (Dumitru *et al.*, 2000 ; Sugimoto *et al.*, 2004).

ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*) est activée suite à la stimulation des TLRs et phosphoryle *in vitro* MKK3, MKK4 et MKK6. Dans les cellules dendritiques stimulés par le LPS, ASK1 est nécessaire à l'activation de p38 MAPK mais pas de JNK. D'ailleurs des souris *Ask1*<sup>-/-</sup> produisent de faibles taux de TNF- $\alpha$  après injection de LPS et montrent une résistance au choc septique. Cependant, l'activation de p38 MAPK dans les cellules dendritiques stimulées par des agonistes des TLR2, TLR3 et TLR9 ne requiert pas la participation de ASK1 (Matsukawa *et al.*, 2004).

### A. 3. c. Les IRFs

La famille des IRFs (*IFN regulatory factor*) consiste en neuf membres (IRF1 à IRF9) qui partagent un domaine N-terminal DBD (*DNA binding domain*) leur permettant de se fixer aux ISRE (*IFN-stimulated response element*) et un domaine IAD (*IFR association domain*) impliqué dans leur homo- ou hétérodimérisation (à l'exception de IRF1 et IRF2) avec des membres de la famille IRF ou avec d'autres facteurs de transcription. Ils sont les inducteurs principaux des IFNs de type I mais peuvent également induire l'expression de cytokines inflammatoires. L'activation des IRFs est dépendante du TLR stimulé et de l'adaptateur recruté (Tamura *et al.*, 2008).

#### A. 3. c. -i) Activation d'IRF3 et IRF7 par la voie dépendante de TRIF

Les homologues IRF3 et IRF7 sont des régulateurs clés de l'expression des IFNs de type I. IRF3 est constitutivement exprimé et réside dans le cytosol sous forme latente. Son activation par phosphorylation entraîne sa dimérisation et sa translocation nucléaire (Lin *et al.*, 1998b ; Sato *et al.*, 1998a). Si IRF3 présente divers sites potentiels de phosphorylation dans sa région C-terminale, Mori *et al.* (2004) ont montré que la phosphorylation de Ser<sup>386</sup> est essentielle pour l'activation de IRF3. Contrairement à IRF3, IRF7 est faiblement exprimé dans les cellules et son expression est fortement induite par les IFN de type I. En effet, ceux-ci induisent l'expression de IRF9 et STAT1 qui forment un complexe nécessaire à la transcription du gène *Irf7*. Tout comme IRF3, la phosphorylation de IRF7 entraîne sa dimérisation et sa translocation depuis le cytosol jusqu'au noyau. IRF3 et IRF7 agissent différemment sur les gènes de la famille des IFNs de type I. IRF3 induit préférentiellement la transcription du gène *Ifnb* tandis que IRF7 active la transcription des gènes *Ifna* et *Ifnb* (Marie *et al.*, 1998 ; Sato *et al.*, 1998b).

L'activation du TLR3 conduit à l'expression des IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ . Si IRF3 joue un rôle essentiel dans cette induction, l'expression d'IFN de type I est toujours observée dans les cellules dendritiques *Irf3*<sup>-/-</sup>. Par contre, cette induction est totalement inhibée lorsque les cellules sont déficientes pour l'expression de IRF3 et IRF7. Ce sont les kinases IKK $\epsilon$  et TBK1 qui sont responsables de l'activation des IRF3 et IRF7. Toutefois, IKK $\epsilon$  n'a qu'un rôle mineur dans ce phénomène tandis que l'invalidation de TBK1 dans des fibroblastes embryonnaires de souris entraîne une forte diminution de l'expression d'IFN- $\beta$  (Fitzgerald *et*

*al.*, 2003 ; McWhirter *et al.*, 2004).

Dans les cellules dendritiques déficientes pour le gène *Irf3*, l'expression d'IFN- $\beta$  en réponse au LPS est abolie tandis qu'elle est normale dans les cellules *Irf7*<sup>-/-</sup> (Sakaguchi *et al.*, 2003 ; Honda *et al.*, 2005). D'ailleurs, les souris *Irf3*<sup>-/-</sup> montrent une résistance au choc septique pour lequel l'induction d'IFN- $\beta$  est importante. Pourtant sous certaines conditions, IRF7 semble participer à l'induction d'IFN- $\beta$ . En effet, la surexpression d'IRF7 dans des cellules *Irf3*<sup>-/-</sup> permet l'expression d'IFN- $\beta$  induite par le LPS dans les cellules dendritiques. L'induction d'IFN- $\beta$  par le TLR4 nécessite la phosphorylation d'IRF3 par TBK1 (Sakaguchi *et al.*, 2003).

### A. 3. c. -ii) Activation d'IRF7 par la voie dépendante de MyD88

Contrairement aux TLR3 et TLR4, les TLR7 et TLR9, qui sont exprimés principalement dans les cellules dendritiques plasmocytoïdes, utilisent exclusivement l'adaptateur MyD88 et une voie de signalisation spécifique pour induire l'expression d'IFN de type I. Des cellules dendritiques plasmocytoïdes de souris *Irf7*<sup>-/-</sup> montrent un défaut d'expression d'IFN de type I alors que ce n'est pas le cas pour les cellules *Irf3*<sup>-/-</sup>, démontrant que c'est le facteur de transcription IRF7 qui est responsable de l'induction de l'expression d'IFN de type I dans ces cellules (Kawai *et al.*, 2004). D'ailleurs, IRF7 qui est fortement exprimé de façon constitutive dans les cellules dendritiques plasmocytoïdes interagit avec le complexe MyD88/IRAK-1/IRAK-4/TRAF6 alors que ce n'est pas le cas d'IRF3 (Kawai *et al.*, 2004 ; Uematsu *et al.*, 2005). Il a été démontré que IRAK-1 phosphoryle IRF7 et que des cellules déficientes pour IRAK-1 présentent un défaut d'expression d'IFN- $\alpha$  (Uematsu *et al.*, 2005). *In vitro*, IKK $\alpha$  peut également interagir avec IRF7 et le phosphoryler. D'ailleurs, des souris *Ikka*<sup>-/-</sup> montrent des défauts dans l'induction d'IFN- $\alpha$  (Hoshino *et al.*, 2006). Les deux kinases seraient donc importantes pour avoir une induction maximale d'expression d'IFN de type I dans les cellules dendritiques plasmocytoïdes.

### A. 3. c. -iii) Activation d'IRF5

De façon similaire à IRF7, IRF5 interagit aussi avec MyD88 et TRAF6. Takaoka *et al.* (2005) ont montré qu'IRF5 n'est pas nécessaire à l'induction d'IFN de type I en réponse au



agonistes des TLRs. Par contre, IRF5 régule l'expression de cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 ou l'IL-12. Toutefois, l'induction de cytokines dépend du type cellulaire et du TLR stimulé. En effet, des macrophages *Ifr5*<sup>-/-</sup> montrent une induction normale de cytokines en réponse au LPS ou à des lipopeptides tandis qu'il y'a un défaut d'expression de ces cytokines lorsque le TLR3 des cellules dendritiques mais pas des macrophages est stimulé (Yasuda *et al.*, 2007). Le rôle précis d'IRF5 dans l'induction d'IFN de type I ainsi que son mécanisme d'activation et d'action restent cependant imprécis. Il est possible qu'une autre kinase capable de s'associer à MyD88 soit responsable de l'activation de IRF5. Il reste cependant à déterminer comment le TLR3, dont la signalisation est dépendante de TRIF, active IRF5 et induit l'expression des cytokines inflammatoires. Il a toutefois été reporté qu'IRF5 est phosphorylé par TBK1 et IKK $\epsilon$  *in vitro* mais que des cellules déficientes pour ces deux kinases montrent une expression normale des cytokines inflammatoires (Hemmi *et al.*, 2004).

## **B. Désactivation des voies de signalisation des TLRs**

L'activation des TLRs est essentielle pour stimuler les réponses immunitaires innée et adaptative afin d'éliminer au mieux les pathogènes de l'organisme. Toutefois, une activation prolongée des voies de signalisation associées aux TLRs est délétère pour l'organisme et conduit très souvent au développement de maladies auto-immunes ou de maladies inflammatoires chroniques. Afin que des réponses inflammatoires incontrôlées ne submergent l'organisme, celles-ci subissent une importante régulation négative qui a lieu à différents niveaux. Cette régulation permet également de modifier le phénotype des cellules immunitaires, notamment des macrophages afin de les rendre tolérants à une seconde activation par des produits bactériens et éviter ainsi une production excessive de facteurs pro-inflammatoires.

### **B. 1. Régulation des voies de signalisation**

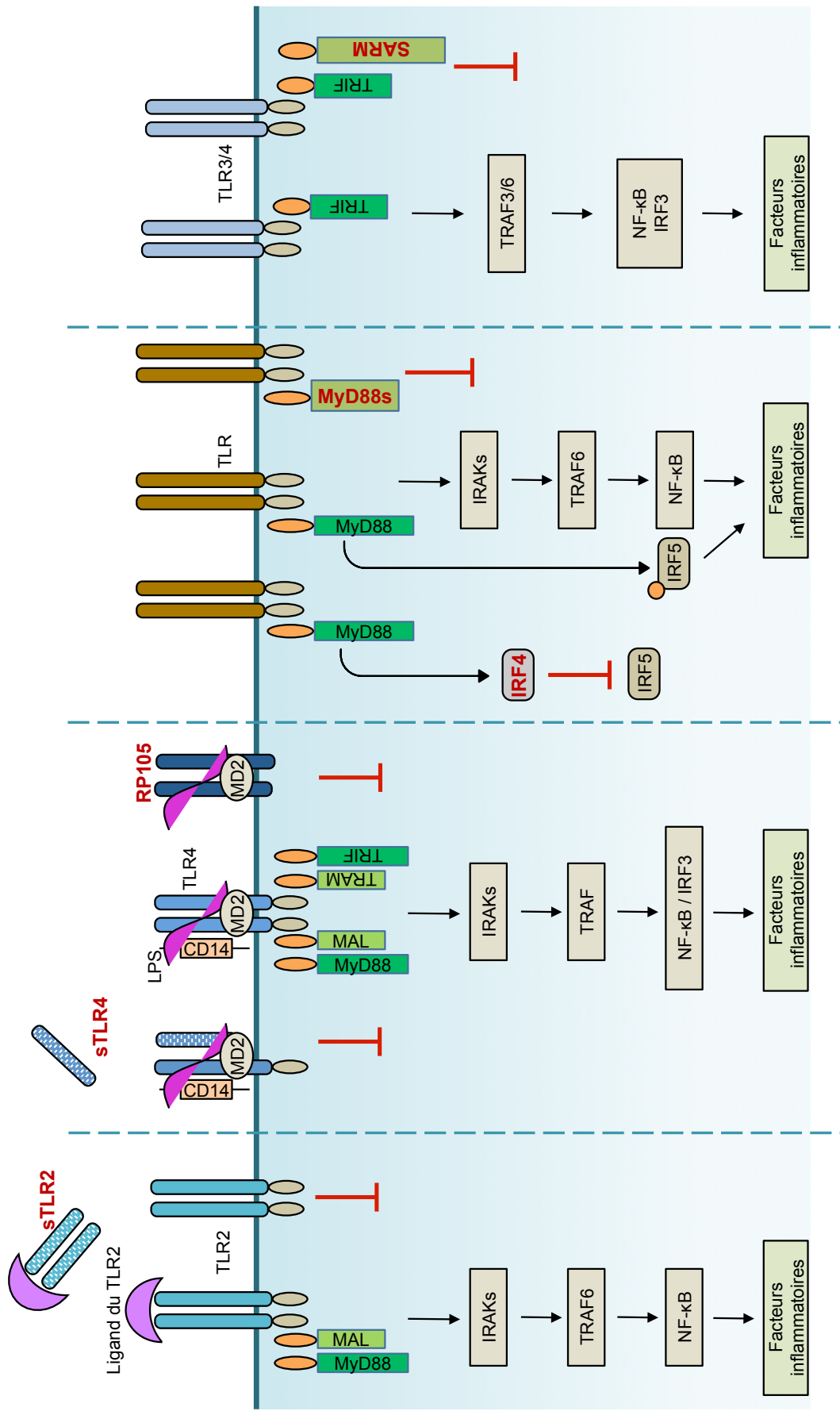
#### **B. 1. a. Régulation par des compétiteurs**

Les récepteurs solubles assurent un important mécanisme de régulation négative pour

les cytokines et les chimiokines. Généralement, ces récepteurs qui sont qualifiés de leurre, interagissent avec les ligands mais sont incapables de transmettre le signal puisqu'ils ne possèdent pas de domaine intracellulaire. Un mécanisme de régulation extracellulaire de la signalisation des TLRs existe et implique deux TLRs solubles : sTLR4 et sTLR2 (Figure15).

La forme soluble du TLR4 est issue de l'épissage alternatif de l'ARNm du TLR4. Son expression est induite dans les macrophages stimulés par du LPS et dans les lymphocytes activés par un anticorps anti-CD3 (Iwami *et al.*, 2000). Il a été démontré que le sTLR4 est capable d'interagir avec MD-2 et que le complexe sTLR4/MD-2 fixe le LPS, entraînant une diminution de la fixation du LPS à la surface cellulaire. Ainsi, le sTLR4 inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B, conduisant à une diminution de l'expression de TNF- $\alpha$  et de l'IL-8 (Hyakushima *et al.*, 2004). Il a également été démontré que dans un modèle murin d'inflammation du poumon, l'administration de sTLR4 réduit le recrutement des neutrophiles en réponse au LPS et le taux de TNF- $\alpha$  présent dans le lavage broncho-alvéolaire est moins élevé en comparaison au souris non traitées avec le sTLR4 (Mitsuzawa *et al.*, 2006).

La forme soluble du TLR2 est constitutivement sécrété par les monocytes circulants et sa sécrétion peut être augmentée au cas d'activation des cellules. Par contre, le sTLR2 n'est pas sécrété par les lymphocytes. Contrairement au sTLR4, le sTLR2 n'est pas issu d'un épissage alternatif de l'ARNm du TLR2 mais provient d'une modification post-traductionnelle du récepteur transmembranaire. Cette modification a lieu au niveau d'un compartiment intracellulaire et résulte en une réserve de sTLR2 au sein de la cellule. Dans le lait et le plasma où le sTLR2 est également retrouvé, il interagit avec la forme soluble du CD14 (Le Boudier *et al.*, 2003). Les cellules surexprimant le sTLR2 montrent une diminution des réponses induites par des ligands du TLR2 avec une baisse d'expression du TNF- $\alpha$  et de l'IL-8. Par ailleurs, l'administration de sTLR2 simultanément à l'administration de composés bactériens atténue le recrutement de neutrophiles dans la cavité péritonéale tandis que le recrutement des cellules mononuclées n'est pas affecté. De plus, l'administration de sTLR2 n'altère pas la clairance des bactéries (Raby *et al.*, 2009).



**Figure 15 : Schéma représentatif de protéines inhibitrices impliquées dans l'activation des voies de signalisation associées aux TLRs.** Les protéines inhibitrices (en caractères rouge) entrent en compétition avec les TLRs pour la fixation PAMPs ou avec les protéines impliquées dans les voies de signalisation (d'après Liew *et al.*, 2005).

MyD88 est un adaptateur essentiel qui est requis pour la signalisation de l'ensemble des TLRs à l'exception du TLR3. En 2002, Janssens *et al.* révèlent l'existence d'un variant issu de l'épissage alternatif de l'ARNm codant pour l'adaptateur. Cette protéine appelée MyD88s est principalement exprimée dans la rate et son expression peut être induite suite à la stimulation de monocytes par du LPS. L'analyse protéique de MyD88s a mis en évidence la perte du domaine intermédiaire reliant le domaine TIR au domaine DD chez la protéine non tronquée. Sans ce domaine, MyD88s ne peut interagir avec IRAK-4, ce qui induit un défaut de phosphorylation et d'activation d'IRAK-1 et par conséquent un défaut d'activation des gènes NF- $\kappa$ B dépendants (Janssens *et al.*, 2002 ; Burns *et al.*, 2003).

SARM (*Sterile  $\alpha$ - and armadillo containing motif*) appartient à la famille des adaptateurs qui possèdent un domaine TIR. Cependant, contrairement aux quatre autres adaptateurs impliqués dans l'activation des voies de signalisation associées aux TLRs, SARM est un régulateur négatif de la voie dépendante de TRIF. En effet, l'invalidation de l'expression de SARM entraîne une augmentation des réponses induites par les ligands des TLR3 et TLR4. En plus du domaine TIR, SARM présente deux domaines SAM (*Sterile  $\alpha$  motif*) (Figure 10 p47). Ces trois domaines sont impliqués dans les interactions avec TRIF. SARM possède également en N-terminal un domaine qui semble être impliqué dans la stabilisation de la protéine induite entre autre par le LPS. Aussi, après stimulation des TLR3 et TLR4, le complexe SARM/TRIF est stabilisé, inhibant ainsi l'activation de la voie dépendante de TRIF. Toutefois le mécanisme impliqué dans cette inhibition reste à déterminer (Carty *et al.*, 2006 ; O'Neill, 2006).

Les travaux de Negishi *et al.* (2005) ont montré que tout comme IRF5 et IRF7, IRF4 interagit avec MyD88. L'expression d'IRF4 est restreinte aux cellules immunitaires et son ARNm est induit par la stimulation des TLRs. Des macrophages péritonéaux issus de souris invalidées pour le gène *Irf4* ont montré qu'ils sont plus sensibles au LPS, au peptidoglycane ou à l'ADN en comparaison aux macrophages de souris sauvages. L'absence d'IRF4 provoque une production excessive de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL12p40) suggérant l'implication de IRF4 dans la régulation négative de la signalisation des TLRs (Honma *et al.*, 2005). En effet, l'analyse des sites d'interactions entre MyD88 et les IRFs a révélé que IRF4 entre en compétition avec IRF5 mais pas avec IRF7 (Negishi *et al.*, 2005).

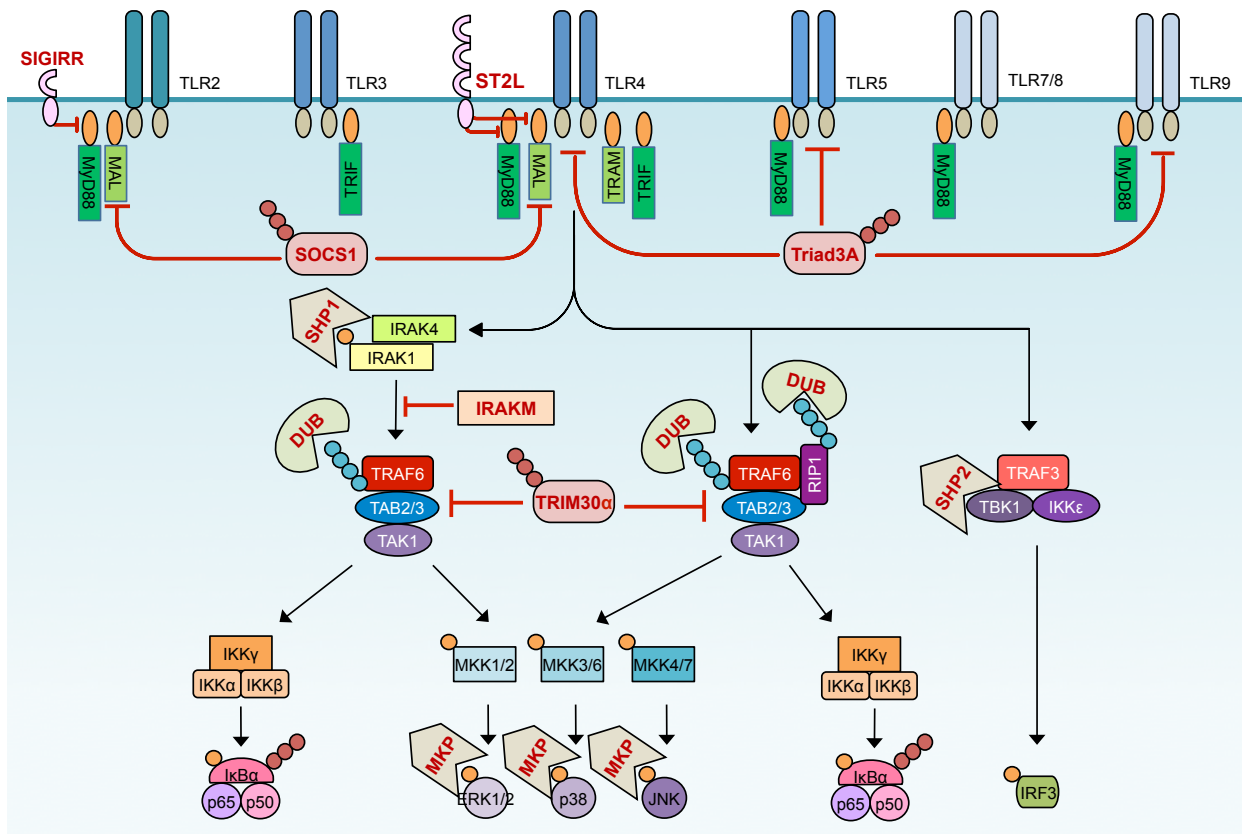
RP105 (*Radioprotective 105*) est une protéine transmembranaire de type I qui présente des similitudes avec les TLRs puisque sa partie extracellulaire constitue un domaine LRR. Par

contre, RP105 ne présente pas de domaine TIR. L'analyse phylogénétique de RP105 a montré qu'il appartient à la famille du TLR4. D'ailleurs, RP105 présente d'autres similitudes avec le TLR4. En effet, l'activité de RP105 dépend de la protéine MD-1, homologue de MD-2 et son profil d'expression est similaire au TLR4 (Miyake *et al.*, 1995, 1998). L'ensemble de ces données a suggéré que RP105 est un inhibiteur du TLR4. En effet, l'expression de RP105 et de MD-1 inhibe la formation du complexe TLR4/MD-2/LPS et les souris invalidées pour RP105 présentent une production excessive de TNF- $\alpha$  en réponse au LPS. Toutefois, il semble que l'activité inhibitrice de RP105 ne soit pas due à l'interaction entre le complexe RP105/MD-1 et le LPS (Divanovic *et al.*, 2007).

### B. 1. b. Régulation par dégradation

La dégradation ou la déstabilisation d'un transducteur de signal est un des principaux mécanismes permettant l'arrêt de l'activation d'une voie de signalisation. L'addition de chaînes d'ubiquitine de type K48 par des E3 ubiquitine ligases permet d'adresser des protéines au protéasome 26S afin de les dégrader. Ce mécanisme est utilisé afin de réguler l'activation des voies de signalisation associées aux TLRs et quelques protéines présentant une activité E3 ubiquitine ligase ont été décrites (Figure 16).

Triad3A (*Triad domain-containing protein 3*) est une de ces enzymes les plus étudiées. Découverte par une approche de double hybride grâce à sa capacité d'interagir avec le domaine TIR du TLR9, elle est exprimée dans de nombreux tissus et lignées cellulaires. Sa structure présente deux domaines RING qui sont responsables de son activité E3 ubiquitine ligase. La surexpression de Triad3A entraîne la dégradation du TLR4 et du TLR9 et dans une moindre mesure la dégradation du TLR3 et du TLR5. Par contre le TLR2 qui est incapable d'interagir avec Triad3A n'est pas touché. De façon similaire, la surexpression de l'enzyme entraîne un défaut d'activation de NF- $\kappa$ B après stimulation des TLR4 et TLR9. Si la signalisation du TLR5 est un peu touchée par Triad3A, la stimulation du TLR2 et du TLR3 induit une activation normale de NF- $\kappa$ B. A l'inverse, l'utilisation d'ARNs interférents dirigés contre Triad3A entraîne une forte activation de NF- $\kappa$ B suite à la stimulation des TLR4 et TLR9 tandis qu'aucun changement n'est observé activation des TLR2 et TLR3 (Chuang & Ulevitch, 2004). La même équipe a par la suite mis en évidence des interactions entre Triad3A et les adaptateurs TRIF, MAL et la kinase RIP1 ainsi que la dégradation de ces dernières lorsque Triad3A est surexprimée (Fearn *et al.*, 2006).



**Figure 16 : Schéma représentatif des protéines impliquées dans les mécanismes de rétrocontrôle négatif de la signalisation des TLRs.** Divers mécanismes sont mis en place afin d'inhiber l'activation des protéines de signalisation. Les ubiquitine ligases E3 induisent la dégradation des protéines *via* l'ajout de chaînes de polyubiquitine K48 (SOCS1, Triad3A, TRIM30 $\alpha$ ). Des enzymes inhibent l'activité des protéines de signalisation en les déphosphorylant (MKP, SHP1, SHP2) ou en clivant les chaînes de polyubiquitine K63 (DUB). Les adaptateurs à domaine TIR (SIGIRR et ST2L) interagissent avec MAL et MyD88, empêchant ainsi leur recrutement au complexe récepteur. IRAK-M bloque le recrutement de TRAF6 par IRAK-1 (d'après Liew *et al.*, 2005).

Shi *et al.* (2006) ont montré que TRIM30 $\alpha$ , qui fait partie de la famille des protéines TRIM et possède un domaine RING, participe également à la régulation négative de la signalisation des TLRs. L'ARNm de TRIM30 $\alpha$  est principalement détecté dans les organes du système immunitaire tels que la rate, le thymus ou les ganglions lymphatiques suite à l'activation des TLRs. TRIM30 $\alpha$  interagit avec TAK1 ainsi que TAB2 et TAB3 et induit la dégradation de TAB2 et TAB3 entraînant un défaut de signalisation et d'activation de NF- $\kappa$ B. La surexpression de TRIM30 $\alpha$  entraîne une diminution de l'expression du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 suite à la stimulation des cellules par du LPS en comparaison aux cellules normales. A l'inverse, l'inactivation de l'expression de TRIM30 $\alpha$  entraîne une surexpression de ces cytokines. D'ailleurs, des souris surexprimant TRIM30 $\alpha$  sont plus résistantes au choc septique

alors qu'à l'inverse des souris n'exprimant pas TRIM30 $\alpha$  montrent une hypersensibilité au LPS.

La famille SOCS (*Suppressor of cytokine signalling*) rassemble 8 protéines dont l'expression est induite suite à l'activation d'un récepteur de cytokine selon la voie JAK/STAT et dont la fonction consiste à inhiber l'activité transcriptionnelle de STAT afin de réguler négativement cette voie de signalisation. Les protéines SOCS sont caractérisées par la présence d'un domaine SH2 nécessaire pour interagir avec les protéines cibles en reconnaissant un résidu de tyrosine phosphorylé. Différentes équipes ont montré que l'expression de SOCS1 est induite après stimulation des macrophages par du LPS et que SOCS1 est impliqué dans le rétrocontrôle négatif de l'activation des TLRs. L'inactivation de l'expression de SOCS1 entraîne une surexpression du TNF- $\alpha$  et de l'IL-12 et augmente la sensibilité des souris à la toxicité du LPS. Le mécanisme d'action de SOCS1 est encore imprécis. Toutefois il semble que SOCS1 qui présente une activité E3 ubiquitine ligase soit impliqué dans la dégradation de MAL. Suite à la stimulation du TLR2 et du TLR4, MAL est rapidement phosphorylé par la Btk (*Bruton's tyrosine kinase*) et est reconnu par SOCS1 via son domaine SH2 qui peut alors induire sa polyubiquitination et sa dégradation par le protéasome 26S. Un défaut de dégradation de MAL suite à l'inactivation du gène *Socs1* entraîne une activation prolongée de NF- $\kappa$ B et une surexpression du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 suite à la stimulation des TLR2 et TLR4 (Baetz *et al.*, 2004 ; Gringas *et al.*, 2004).

### **B. 1. c. Régulation par déubiquitination**

L'ubiquitylation est une modification importante au niveau de nombreuses voies de signalisation, notamment de celles des TLRs puisqu'elle permet, entre autre, le recrutement et l'activation de nombreuses protéines. Toutefois cette modification est réversible. Des déubiquitylases sont capables de cliver les chaînes de polyubiquitine des protéines cibles et depuis quelques années, la recherche ne cesse de découvrir de nouvelles enzymes, démontrant ainsi leur importance dans la régulation des voies de signalisation associées aux TLRs (Figure 16).

A20 fut décrite pour la première fois comme une protéine protégeant les cellules de la toxicité du TNF- $\alpha$ . Par la suite, il a été établi que la surexpression de A20 entraîne une régulation négative de l'activation de NF- $\kappa$ B dans la plupart des voies de signalisation. De

plus, des macrophages de souris invalidées pour le gène codant A20 montrent une activation prolongée du complexe IKK en réponse au LPS, suggérant un rôle de A20 quant à la régulation de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Lee *et al.*, 2000 ; Boone *et al.*, 2005). A20 est faiblement exprimée dans la plupart des cellules et son expression peut être rapidement induite par des cytokines pro-inflammatoires et par les ligands des TLRs. La région N-terminale de A20 contient un domaine DUB (*Deubiquitylating enzyme*) qui lui permet de cliver les chaînes polyubiquitinylées de protéines cibles (Verstrepen *et al.*, 2010). Pour cela, A20 recrute des protéines adaptatrices telles que les ABIN (*A20-binding inhibitor of NF- $\kappa$ B*) ou TAX1BP1 (*TAX1-binding protein 1*) qui présentent des domaines UBD et permettent des interactions avec les chaînes ubiquitine K63. Toutefois, le mécanisme d'action d'A20 n'a pas encore été clairement élucidé et il semble qu'il soit différent selon les substrats. A20 recrute TAX1BP1 pour interagir avec RIP1, clive ses chaînes d'ubiquitine K63 et induit ensuite sa dégradation protéasomale grâce à son activité E3 ubiquitine ligase qu'elle possède (Boone *et al.*, 2004 ; Hitotsumatsu *et al.*, 2008). Par contre, A20 interagit avec TRAF6 *via* TAX1BP1, rompant ainsi l'interaction entre TRAF6 et l'enzyme E2 et limitant ainsi l'auto-polyubiquitination de TRAF6. De plus A20 ubiquitine ces deux dernières afin d'induire leur dégradation (Shembade *et al.*, 2010).

La CYLD (*cylindromatosis*), initialement identifiée comme un gène suppresseur de tumeurs est une déubiquitinylase qui régule l'activation de diverses protéines notamment les protéines TRAF, RIP1, TAK1 (Bignell *et al.*, 2000 ; Kovalenko *et al.*, 2003). Yoshida *et al.* (2005) ont montré que la CYLD est induite suite à la stimulation du TLR2 et qu'elle inhibe l'expression du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-8 en déubiquitinylant TRAF6. Il semble que la CYLD soit capable d'interagir avec les chaînes ubiquitine. Toutefois, il a été démontré que l'interaction entre TRAF6 et CYLD nécessite la présence de l'adaptateur p62 (Sun, 2008).

### **B. 1. d. Régulation par déphosphorylation**

Les MAPKs sont des éléments clés de la régulation de la synthèse de facteurs inflammatoires et leur activation peut être modulée par divers mécanismes. Etant donné que les MAPKs sont activées par phosphorylation, leur déphosphorylation orchestrée par des phosphatases est un moyen efficace pour les désactiver. Les DUSPs (*Dual-specificity phosphatases*) sont capables de déphosphoryler les résidus Tyr et Ser/Thr de protéines cibles. Parmi les DUSPs se trouve des MKPs (*MAPK phosphatases*) qui ont pour spécificité la



déphosphorylation des résidus Tyr et Thr des MAPKs. Certaines MKPs sont localisées dans le noyau et leur expression est rapidement induite en réponse à divers stimuli, suggérant leur implication dans le rétrocontrôle négatif de la signalisation des MAPKs. La génération de souris déficientes pour diverses MKPs a montré que ces phosphatases présentent des spécificités de substrats différentes et que leurs activités ne sont pas redondantes (Liu *et al.*, 2007).

MKP-1, l'archétype des MKPs est une protéine de 40 kDa, exprimée dans divers tissus. Son expression est rapidement et transitoirement induite par les agonistes des TLRs et résulte en la déphosphorylation de p38 MAPK et de JNK dans une moindre mesure. MKP-1 est un élément important du rétrocontrôle négatif de l'activation des macrophages. En effet, l'expression de MKP-1 induite par le LPS est corrélée à une déphosphorylation de JNK et p38 MAPK alors que ERK1/2 n'est pas touchée. L'inhibition de l'activité de MKP-1 bloque cette déphosphorylation tandis que sa surexpression entraîne une forte inhibition de l'expression du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 induite par le LPS (Chen *et al.*, 2002). L'inactivation de l'expression de MKP-1 chez des souris entraîne une surproduction de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'une augmentation du taux de mortalité en réponse au LPS (Zhao *et al.*, 2006).

Les tyrosines phosphatases peuvent également réguler la signalisation des TLRs. An *et al.* (2008) ont montré que SHP1 (*SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1*) peut interagir avec IRAK1 et inhiber son activité, provoquant ainsi un défaut d'activation des MAPKs et de NF- $\kappa$ B. L'inactivation de l'expression de SHP1 entraîne ainsi une surproduction des cytokines proinflammatoires en réponse à la stimulation des TLRs tandis que l'expression de l'IFN de type I n'est pas touchée. SHP2 régule également la signalisation des TLRs en ciblant la voie dépendante de TRIF. Toutefois cette régulation est indépendante de la fonction phosphatase de SHP2 qui agit en interagissant avec le domaine kinase de TBK1. L'inactivation de l'expression de SHP2 entraîne une surproduction du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\beta$  en réponse à la stimulation du TLR3 (An *et al.*, 2006). Ces données suggèrent des rôles opposés dans la régulation de la réponse inflammatoire : SHP1 favoriserait la réponse antivirale tandis que SHP2 l'inhiberait.

### **B. 1. e. Régulation par des protéines transmembranaires**

Le gène *St2* (*Supressor of tumorigenicity*) code pour le récepteur de l'IL-33 et fait

partie de la famille des récepteurs à domaine TIR. Deux variants issus de l'épissage alternatif de l'ARNm ont été décrits : ST2L qui est une protéine transmembranaire de type I exprimée par la plupart des cellules hématopoïétiques et sST2 qui correspond à la région extracellulaire de ST2L et qui est exprimée par les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Contrairement aux autres récepteurs TIR, ST2 n'est pas capable d'activer NF- $\kappa$ B bien qu'il active les MAPKs. Les travaux de Brint *et al.* (2004) ont montré que le LPS induit l'expression de ST2L dans les macrophages et que des souris invalidées pour l'expression de ST2L produisent des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires en réponse au LPS en comparaison aux souris sauvages. ST2L agit en séquestrant les adaptateurs MyD88 et MAL, impliquant des interactions entre domaine TIR. Par contre, il n'intervient pas dans la régulation négative de la voie dépendante de TRIF. Des souris *St2*<sup>-/-</sup> ne sont pas sensibles au choc septique induit par le LPS alors qu'elles sont incapables de développer une tolérance à l'endotoxine. Cela s'explique par le fait que ST2L qui est présent dans les cellules n'est transloqué à la membrane plasmique qu'après 4 heures de stimulation par le LPS. Ainsi ST2L n'intervient pas réellement dans le rétrocontrôle négatif de l'activation des TLRs mais contribuerait plutôt aux mécanismes de tolérance.

sST2 est également un régulateur négatif de l'inflammation. Toutefois son mode d'action est différent de ST2L. sST2 est détecté dans le sérum de patients sains et son taux augmente chez les patients atteints de maladies autoimmunes. Il se fixe aux macrophages et cette interaction est renforcée après stimulation par le LPS. *In vivo*, l'administration de sST2 inhibe la sécrétion de TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-12 dans le sérum et diminue le taux de mortalité en réponse au LPS. A l'inverse, l'inhibition de l'activité régulatrice de sST2 par l'utilisation d'anticorps bloquants augmente les effets toxique du LPS (Sweet *et al.*, 2001).

SIGIRR (*Single immunoglobulin IL-1-related protein*) est également un récepteur présentant un domaine TIR. Egalement appelé TIR8, il est fortement exprimé par les cellules immunitaires et par les cellules épithéliales au niveau des reins, du foie et du système digestif. Son expression est diminuée suite à la stimulation par le LPS. Par contre, les macrophages de patients atteints de septicémie expriment plus le récepteur en comparaison aux patients sains (Galanda *et al.*, 2009). Les souris déficientes pour SIGIRR montrent une augmentation de l'activation de NF- $\kappa$ B corrélée à un taux élevé de production de cytokines en réponse à la stimulation des TLR4 et TLR9 (Wald *et al.*, 2003 ; Galanda *et al.*, 2004). Par contre, tout comme pour ST2, la voie dépendante du TLR3 n'est pas touchée par l'invalidation de l'expression de SIGIRR, suggérant encore une fois un mécanisme régulant l'activation de la

voie dépendante de MyD88 (Garlanda *et al.*, 2004). Le mécanisme d'action de SIGIRR n'est pas encore clairement établi mais de façon similaire à ST2, SIGIRR recruterait IRAK1 et TRAF6 à la membrane après activation des TLRs *via* les domaines TIR (Qin *et al.*, 2005).

### B. 1. f. Autres protéines inhibitrices

IRAK-M est un membre de la famille des protéines IRAK qui a perdu son activité Ser/Thr kinase et dont l'expression est induite suite à la stimulation des TLRs. Des macrophages invalidés pour l'expression d'IRAK-M montrent une production élevée de cytokines en réponse à l'activation des TLRs par rapport aux cellules non invalidées, due à une augmentation de la phosphorylation des MAPKs et à une importante dégradation de I $\kappa$ B- $\alpha$ . Par ailleurs, ces cellules ne montrent pas de diminution de l'expression des cytokines suite à une restimulation par le LPS, indiquant une perte de la tolérance des macrophages pour l'endotoxine. C'est en interagissant avec IRAK-1 qu'IRAK-M inhibe l'activation des MAPKs. En effet, IRAK-M bloque la dissociation d'IRAK-1 du complexe récepteur et empêche ainsi la formation du complexe IRAK-1/TRAF6 (Kobayashi *et al.*, 2002 ; Nakayama *et al.*, 2004 ; Hassan *et al.*, 2009).

Les  $\beta$ -arrestines 1 et 2 sont des protéines impliquées dans la désensibilisation et l'endocytose de différents récepteurs de surface cellulaire. Elles interagissent avec diverses molécules comme les kinases de la famille Src ou les MAPKs et modulent leur phosphorylation ou leur ubiquitination. Les travaux de Wang *et al.* (2006) ont montré que les  $\beta$ -arrestines interagissent avec TRAF6 suite à l'activation de la voie dépendante de MyD88. Cet événement empêche l'autoubiquitination et l'oligomérisation de TRAF6, résultant en un défaut d'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B et en une diminution de l'expression des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8. A l'inverse, une inhibition de l'expression de  $\beta$ -arrestine 2 entraîne une surproduction de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 en réponse au LPS, et des souris exposées pour la seconde fois au LPS montrent un taux de survie moindre lorsqu'elles n'expriment pas le gène *Arrb2*.

Un autre mécanisme impliquant la  $\beta$ -arrestine 2 dans la régulation de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B a été décrit par Kizaki *et al.* (2008). Ces travaux montrent que la  $\beta$ -arrestine 2 interagit avec I $\kappa$ B- $\alpha$  et que sa surexpression entraîne une inhibition de la dégradation de I $\kappa$ B- $\alpha$ , bloquant ainsi la libération de NF- $\kappa$ B.

Tollip (*Toll interacting protein*) est un régulateur endogène de la signalisation des TLRs qui agit selon deux mécanismes distincts. Tollip est présent dans la cellule à l'état basal où il interagit avec IRAK-1, inhibant ainsi l'autophosphorylation de la kinase. Cependant, l'activation de IRAK-1 suite à la stimulation par le LPS conduit à la phosphorylation de Tollip, induisant ainsi la dissociation du complexe. (Burns *et al.*, 2000 ; Zhang & Ghosh, 2002). L'activation des TLRs conduit également à la stabilisation de l'expression du régulateur qui se fixe alors aux domaines TIR des TLR2 et TLR4 (Bulut *et al.*, 2001 ; Zhang & Ghosh, 2002). Le rôle exact de Tollip dans le rétrocontrôle négatif de la signalisation des TLRs reste incompris. En effet, la surexpression de Tollip entraîne une diminution de l'expression de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  après activation des TLRs tandis que l'inactivation de son expression n'induit pas la suractivation de NF- $\kappa$ B (Zhang & Ghosh, 2002 ; Didierlaurent *et al.*, 2006).

SIKE (*Suppressor of IKK $\epsilon$* ) régule l'activation de IRF3 suite à la stimulation du TLR3. Présent dans la cellule à l'état basal où il interagit avec TBK1 et IKK $\epsilon$ , son expression est augmentée après stimulation par LPS et il se dissocie alors du complexe. La surexpression de SIKE empêche les interactions entre TRIF, TBK1, IKK $\epsilon$  et IRF3, résultant en un défaut de l'activation de IRF3 et de la transcription des gènes IRSE dépendants. Par contre, SIKE ne bloque pas les interactions entre TRIF et RIP1 et n'altère pas l'expression des gènes NF- $\kappa$ B dépendants (Huang *et al.*, 2005 ; Piao *et al.*, 2009).

## B. 2. Inhibition transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

### B. 2. a. Régulation de l'activité des facteurs de transcription

Le GSK3 phosphoryle le second résidu de Ser/Thr des sites consensus Ser/Thr-X-X-X-Ser/Thr-P présents au niveau des facteurs de transcription afin d'augmenter leur activité transcriptionnelle en favorisant leur translocation nucléaire et leur fixation sur les régions promotrices. La phosphorylation de la GSK3 par Akt/PKB au niveau de la Ser<sup>9</sup> entraîne une inactivation de la GSK3 et de nombreuses études ont montré l'implication de la voie PI3K/Akt dans la régulation négative de la signalisation des TLRs (Wang *et al.*, 2011). Dans les cellules dendritiques murines déficientes pour la PI3K, l'activation des TLRs par différents agonistes induit une forte expression d'IL-12 en comparaison aux cellules non invalidées (Fukao *et al.*, 2002). Aksoy *et al.* (2005) ont montré que dans les cellules dendritiques dérivés de monocytes, l'inhibition de la PI3K par des composés chimiques

augmente la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et la synthèse d'IFN- $\beta$  suite à la stimulation du TLR3 et du TLR4. Dans les cellules THP-1 exprimant un dominant négatif de Akt/PKB, l'activité du promoteur du TNF- $\alpha$  en réponse au LPS est supérieure aux cellules normales. Cette observation est corrélée à l'absence de phosphorylation de GSK3 et à une translocation plus importante de NF- $\kappa$ B et de AP-1 dans le noyau (Guha & Mackman, 2002).

ATF3 (*Activating transcription factor-3*) est un facteur de transcription membre de la famille ATF/CREB qui se lie sur les sites consensus CRE. Gilchrist *et al.* (2006) ont montré que son expression est induite après stimulation de macrophages de souris par le LPS et qu'il se fixe sur le promoteur du gène de l'IL-6 et de l'IL-12 à proximité du site de fixation de NF- $\kappa$ B. La stimulation de macrophages de souris *Atf3*<sup>-/-</sup> par le LPS entraîne une surproduction des ARNm d'IL-6 et d'IL-12 en comparaison aux cellules non invalidées. ATF3 agirait en se fixant sur les sites d'acétylation des histones, entraînant ainsi une modification de la structure de la chromatine et empêchant ainsi la fixation de facteurs de transcriptions tels que NF- $\kappa$ B.

Pin-1 (*peptidyl-prolyl isomerase 1*) présente la capacité de se fixer à IRF3 après qu'il ait été phosphorylé, résultant en l'inhibition de la transcription des gènes dépendants. L'interaction de Pin-1 avec IRF3 conduit à la polyubiquitinylation et à la dégradation protéasomale du facteur de transcription et les souris *Pin-1*<sup>-/-</sup> produisent des taux élevés d'IFN- $\beta$  suite à l'activation du TLR3 en comparaison aux cellules normales. Il a également été démontré que Pin-1 peut interagir avec p65, protégeant ainsi la protéine de la dégradation induite par SOCS1 et augmentant sa translocation nucléaire. Ces données suggèrent un rôle pour Pin-1 dans la régulation de la réponse anti-virale (Ryo *et al.*, 2003 ; Saitoh *et al.*, 2006).

A l'origine, les travaux portant sur Bcl-3 montraient que la protéine est capable d'induire l'expression de gènes NF- $\kappa$ B dépendants. Toutefois, il est désormais clairement établi que Bcl-3 régule également négativement les réponses inflammatoires induites par l'activation des TLRs. En effet, l'expression de Bcl-3 est fortement induite suite à la stimulation des TLR2, TLR4 et TLR5 alors que les agonistes des TLR7/TLR8 et TLR9 n'induisent que modérément son expression (Brasier *et al.*, 2001). Le promoteur du gène codant Bcl-3 présente des sites  $\kappa$ B essentiels à l'expression de Bcl-3 en réponse au LPS (Wessells *et al.*, 2004). Des dominants négatifs de p65 entraîne un défaut d'expression de Bcl-3 tandis que la transfection de cellules par une protéine mutée p65 constitutivement active résulte en l'expression de Bcl-3 (Brasier *et al.*, 2001). Bcl-3 se fixe aux dimères p50/p50, induit leur translocation nucléaire et renforce leur fixation sur les sites  $\kappa$ B des gènes cibles

(Zhang *et al.*, 1994 ; Caamano *et al.*, 1996 ; Watanabe *et al.*, 1997). Cet événement n'affecte pas la translocation nucléaire du complexe p65/p50 mais par contre empêche sa fixation sur l'ADN (Kuwata *et al.*, 2003). Cramody et al (2007) ont également reporté que la fixation de Bcl-3 sur les complexe p50/p50 empêche l'ubiquitination et de dégradation protéasomale de p50. L'invalidation de l'expression de Bcl-3 résulte en la surexpression des ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  suite à l'activation des TLRs en comparaison aux cellules normales (Kuwata *et al.*, 2003 ; Wessells *et al.*, 2004 Carmody *et al.*, 2007). Bcl-3 a un rôle important dans la tolérance des cellules puisque son expression est prolongée après l'activation du TLR4. Suite à une seconde stimulation des cellules par le LPS, p65 ne se fixe pas sur le promoteur du TNF- $\alpha$  puisque le complexe p50/p50 occupe les sites  $\kappa$ B. Par contre lorsque les cellules sont invalidées pour l'expression de Bcl-3, p65 est retrouvé fixé aux sites  $\kappa$ B. D'ailleurs, l'invalidation du gène *Bcl3* entraîne la surexpression du TNF- $\alpha$  suite à une seconde activation du TLR4 et diminue le taux de survie des souris en réponse au LPS (Carmody *et al.*, 2007).

I $\kappa$ B- $\zeta$  et I $\kappa$ BNS sont également impliquées dans la régulation des gènes NF- $\kappa$ B dépendants dont l'expression est induite suite à la stimulation des TLRs. Toutefois, ces deux protéines I $\kappa$ B ont des fonctions opposées. En effet, I $\kappa$ B- $\zeta$  inhibe la fixation du complexe p65/p50 sur les sites  $\kappa$ B des promoteurs en favorisant la fixation du complexe p50/p50 et inhibe ainsi l'expression du TNF- $\alpha$  en réponse au LPS. Par contre I $\kappa$ B- $\zeta$  induit l'expression de l'IL-6 (Yamazaki *et al.*, 2001 ; Muta *et al.*, 2003 ; Motoyama *et al.*, 2005 ; Totzke *et al.*, 2006). A l'inverse, I $\kappa$ BNS inhibe l'expression de l'IL-6 mais pas du TNF- $\alpha$  en réponse au LPS (Hirotsu *et al.*, 2005 ; Kuwata *et al.*, 2006b).

## B. 2. b. Régulation post-transcriptionnelle

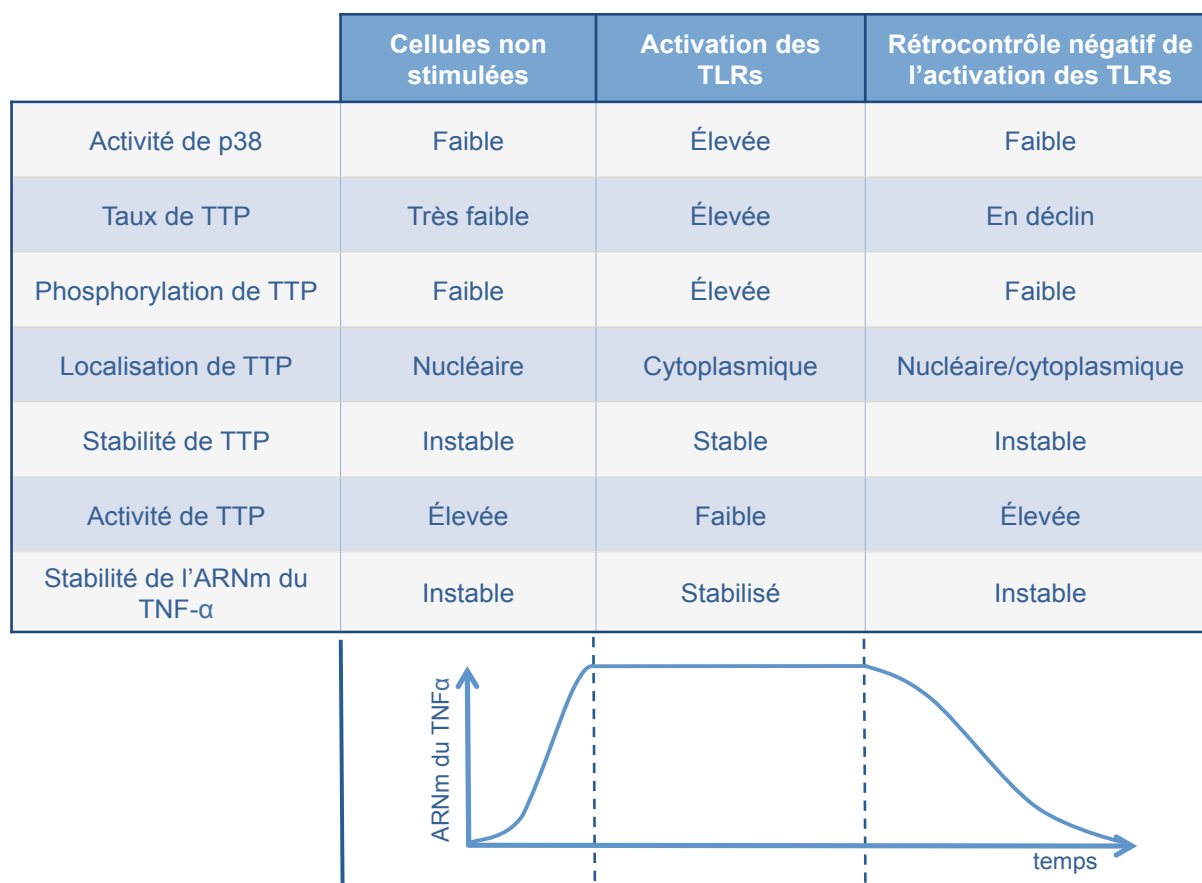
Même si la transcription d'un gène peut être rapidement réprimée, l'accumulation d'ARNm va conduire à une forte production de la protéine. Aussi les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle sont des moyens efficaces afin de modifier la stabilité et/ou la traduction des ARNm et ainsi contrôler le taux d'expression d'un gène. La régulation post-transcriptionnelle implique généralement les régions 5' ou 3' UTRs (*Untranslated regions*) de l'ARNm mature et des protéines RBP (*RNA-binding protein*) qui interagissent spécifiquement avec ces régions.

### B. 2. b. -i) Déstabilisation et dégradation des ARNm

Dans l'étude des mécanismes de régulation post-traductionnelle, les travaux se sont focalisés sur les séquences AREs (*Adenosine/uridine-rich elements*) présentes au niveau des régions 3'UTRs de nombreux transcrits codant par exemple pour le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8 ou encore l'IFN- $\gamma$ . Parmi les protéines impliquées dans la déstabilisation et la dégradation des ARNm, la TTP (*Tristetraproline*) est actuellement la mieux caractérisée. Des souris invalidées pour TTP montrent une inflammation généralisée avec un développement spontané d'arthrite due à une surproduction du TNF- $\alpha$  (Taylor *et al.*, 1996). Des macrophages issus de ces souris ont révélé que la transcription du gène du TNF- $\alpha$  n'est pas affectée par l'absence de la TTP. Par contre, le temps de demi-vie des transcrits est considérablement augmenté en comparaison aux macrophages issus de souris sauvages (Carballo *et al.*, 1998). TTP interagit avec les ARNm cibles et diverses protéines : des enzymes de déadénylation, le complexe exosome constitué d'hélicases et de 3'5' exonucléases et le complexe impliqué dans le décoiffage de l'ARNm et leur dégradation 5'3' (Eulalio *et al.*, 2007). L'activation de TTP est sous le contrôle de p38 MAPK. En effet, p38 MAPK active MK2 (*MAPK activated protein kinase-2*) qui est responsable de la phosphorylation de TTP. Cette modification permet l'interaction entre TTP et la protéine 14-3-3 et empêche la fixation de TTP aux ARNm cibles. L'inactivation de l'expression de MK2 entraîne une forte diminution de l'expression du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 et de l'IL-1 $\beta$  (Neininger *et al.*, 2002). Un défaut de phosphorylation de TTP due à des mutations entraîne une activation constitutive de la protéine et par conséquent une diminution de l'expression induite par le LPS d'un gène rapporteur placé sous le contrôle du 3'UTR du TNF- $\alpha$ . Mais l'activité de MK2 est contrebalancée par la PP2A et les enzymes MK2 et PP2A agissent de façon séquentielle afin de contrôler l'expression, la localisation et l'activation de TTP (Sun *et al.*, 2007). Ainsi, MK2 en phosphorylant TTP empêche sa dégradation tandis que 14-3-3 contrôle sa redistribution cytoplasmique, conduisant à une accumulation de TTP inactive dans un premier temps et résultant en la synthèse de facteurs inflammatoires. Puis l'action de PP2A permet la déphosphorylation de TTP, conduisant à sa libération et ainsi à la dégradation des transcrits cibles afin de stopper la réaction inflammatoire (Brook *et al.*, 2006) (Figure 17).

En déphosphorylant p38 MAPK, MKP-1 régule également l'activité de TTP et contrôle ainsi l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Récemment, des travaux ont montré que MKP-1 favorise également la translocation nucléaire de AUF1 (*ARE/poly-(U) binding degradation factor 1*), une RBP présentant une activité similaire à TTP. D'ailleurs,

l'invalidation de l'expression de MKP-1 entraîne un défaut d'interaction entre AUF1 et les ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6, résultant en une augmentation du temps de vie des ARNm en comparaison au cellules exprimant MKP-1 (Yu *et al.*, 2011).



**Figure 17 : Expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$  selon l'activité de p38 MAPK et de TTP.**

### *B. 2. b. -ii) Inhibition de la traduction*

Plusieurs RBPs bloquent la traduction de transcrits qui codent pour des protéines de régulation de l'inflammation. Bien que des macrophages issus de souris invalidées pour l'expression de TIA-1 (*T cell intracellular antigen -1*) expriment des taux similaires d'ARNm du TNF- $\alpha$  en réponse au LPS que des macrophages de souris sauvages, les macrophages *Tia-1*<sup>-/-</sup> sécrètent plus de cytokine, suggérant que TIA-1 agit comme régulateur de la traduction (Piecyk *et al.*, 2000). TIAR (*TIA-1 related protein*) qui présente de fortes homologies avec TIA-1 réprime la traduction de MMP-13, une collagénase impliquée dans le développement



de la polyarthrite rhumatoïde (Yu *et al.*, 2003). TIA-1 agit en promouvant la formation d'un complexe d'initiation de la traduction non conforme et en dirigeant l'ARNm vers les granules de stress, des lieux de stockage d'ARNm associés à des complexe de pré-initiation de la traduction et qui se forment dans la cellules en cas de stress nutritif ou inflammatoire. TIAR a également été retrouvé dans ces granules de stress, lui suggérant un mécanisme d'action similaire à TIA-1 (Anderson *et al.*, 2004).

### B. 3. Régulation par les miRNAs

Les réponses induites suite à la stimulation des TLRs sont régulées par divers mécanismes qui agissent au niveau des voies de signalisation mais également au niveau de l'expression même des gènes cibles codant pour des cytokines, chimiokines ou facteurs inflammatoires. Les miRNAs (*microRNAs*) sont des petits ARNs endogènes qui régulent l'expression de protéines. Ils s'associent avec les transcrits sur la base de leur complémentarité et induisent la dégradation des ARNm ou inhibent leur traduction. Récemment, des études ont montré que les miRNAs peuvent être exprimés suite à l'activation des TLRs et qu'ils sont impliqués dans l'inhibition de leur signalisation à divers niveaux (O'Neill *et al.*, 2009).

#### B. 3. a. Régulation de l'expression des TLRs

Les analyses bioinformatiques des régions 3'UTR des TLRs ont révélé la présence de séquences conservées pouvant être des cibles potentielles des miRNAs. D'autres séquences non conservées ont également été identifiées comme cibles des miRNAs suggérant leur implication dans une régulation différentielle de l'expression des TLRs selon les tissus et les cellules où les miRNAs sont transcrits.

La stimulation des macrophages péritonéaux de souris par le LPS induit l'expression de différents miRNAs tels que miR-155, let-7e ou encore miR-181c (Androulidaki *et al.*, 2009). Les travaux de Chen *et al.* (2007) ont montré que l'expression du TLR4 est régulée dans les cellules épithéliales biliaires par les miRNAs membres de la famille let-7 dont let-7i. La stimulation de ces cellules par le LPS conduit à la diminution de l'expression de let-7i. Cette observation suggère une régulation différente de l'expression du TLR4 dans ces cellules

en comparaison aux macrophages péritonéaux de souris. En effet, les macrophages ont pour fonction de surveiller l'organisme d'une infection pathogène et l'expression du TLR4 est par conséquent essentielle pour mener à bien cette mission. Par contre, après qu'ils aient été activés suite à la reconnaissance d'un ligand microbien, les macrophages doivent être désactivés afin de prévenir une expression excessive de facteurs pro-inflammatoires. A l'inverse, les cellules épithéliales ont besoin d'être activées au préalable afin répondre au mieux à l'inflammation et la présence de miRNA dirigé contre le TLR4 dans ces cellules permet une expression de base du récepteur qui peut être augmentée en cas de besoin. La régulation du TLR4 par let-7i a lieu au niveau traductionnel puisque l'expression du miRNA ne modifie pas la synthèse de l'ARNm du TLR4. Par contre, la transfection de ces cellules par un ARN antisens let-7i induit une surexpression du récepteur (Chen *et al.*, 2007). Dans les macrophages péritonéaux de souris, un antisens let-7e induit la surexpression de l'ARNm du TLR4 (Androulidaki *et al.*, 2009).

A l'heure actuelle, peu de données concernant la régulation de l'expression des TLRs par les miRNAs sont disponibles, limitant la compréhension de l'importance de cette régulation dans l'inflammation.

### **B. 3. b. Régulation de l'expression des protéines de signalisation**

De nombreux miRNAs ont été identifiés comme régulateurs de l'expression de diverses protéines ayant une fonction importante dans la signalisation de l'ensemble des TLRs. Taganov *et al.* (2006) ont montré que la stimulation des TLR2, TLR4 et TLR5 induit l'expression de miR-146 dans les THP-1 alors que la stimulation des TLR3, TLR7 et TLR9 ne conduit pas à l'expression du miRNA. Le promoteur du gène codant miR-146 présente des éléments de réponse pour NF- $\kappa$ B et IRF3/IRF7. La mutation des sites  $\kappa$ B entraîne un défaut d'expression de miR-146 alors que ce n'est pas le cas pour les IRSE. L'expression de miR-146 conduit à la diminution de l'expression de TRAF6 et IRAK1. miR-155 est induit suite à l'infection par *Helicobacter pylori* et régule l'expression de plusieurs protéines : MyD88 selon un mécanisme transcriptionnel et TAB2 et IKK $\epsilon$  selon un mécanisme traductionnel. L'utilisation d'inhibiteurs ou d'ARN antisens de miR-155 conduit à la surexpression de l'IL-8 en réponse à *H. pylori* (Ceppi *et al.*, 2008 ; Xiao *et al.*, 2009 ; Tang *et al.*, 2010). Dans les cellules ovariennes cancéreuses, la faible expression de miR-199a conduit à une importante expression de sa cible IKK $\beta$ , résultant en une importante prolifération de ces cellules (Chen *et*

*al.*, 2008).

### **B. 3. c. Régulation de l'expression des facteurs de transcription**

En réponse à l'infection par le KSHV (*Kaposi's sarcoma associated Herpes virus*), les cellules endothéliales lymphatiques expriment miR-132 qui inhibe l'expression de p300 résultant en la diminution de l'expression de l'IFN- $\beta$ . L'inhibition de l'expression de miR-132 restaure l'expression de p300 et de l'IFN- $\beta$  et diminue la réplication du KSHV dans les cellules. L'infection des monocytes par l'HSV-1 et l'HCMV (*Human cytomegalovirus*) induit également l'expression de miR-132 (Lagos *et al.*, 2010).

Dans les monocytes, les ligands des TLR2, TLR4 et TLR7/8 stimulent l'expression de miR-9 de façon NF- $\kappa$ B dépendante. Le LPS induit également la transcription du gène *NFKB1* qui code pour p105. Toutefois le taux de protéines synthétisées reste constant. La transfection des monocytes par un vecteur codant pour miR-9 entraîne une diminution de l'expression de p105, indiquant que la régulation de l'expression de la protéine est due à une régulation traductionnelle de son ARNm par miR-9 (Bazzoni *et al.*, 2009).

### **B. 3. d. Régulation de l'expression des cytokines**

L'expression des cytokines est également contrôlée par des miRNAs. Certains miRNAs ont pour cibles les régions 3'UTR des ARNm codant les cytokines. Tili *et al.* (2007) ont montré que l'expression de miR-125b qui est induite dans les macrophages après stimulation par le LPS est corrélée à la diminution de l'expression d'un vecteur placé sous le contrôle de la région 3'UTR du TNF- $\alpha$ . D'autres travaux ont montré que des miRNAs s'associent aux RBPs afin de réguler de façon post-transcriptionnelle ou traductionnelle l'expression des cytokines. Aini, MiR-16 s'associe à TTP afin de dégrader les ARNm du TNF- $\alpha$ . L'inactivation de l'expression de TTP ou de miR-16 restaure l'expression du TNF- $\alpha$  (Jing *et al.*, 2007). El Gazzar & Mc Call (2010) ont mis en évidence l'expression des miR-221, miR-579 et miR-125b en réponse à une seconde stimulation par le LPS. miR-221 s'associe à TTP et AUF1 afin d'inhiber l'expression des transcrits du TNF- $\alpha$  et l'inactivation de l'expression de miR-221 restaure la synthèse de l'ARNm du TNF- $\alpha$ . Par contre, cette inactivation de miR-221 ne restaure pas l'expression de la protéine puisque miR-579 et miR-125b inhibent la traduction des transcrits du TNF- $\alpha$  en association avec TIAR. La mutation

des sites de fixation des trois miRNAs au niveau de la région 3'UTR du transcrit du TNF- $\alpha$  conduit à la synthèse de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et à l'expression de la cytokine dans les macrophages tolérants restimulés par le LPS.



# *Travaux personnels*

---



# **Chapitre I :**

## **Etude de la fixation de la CyPB sur les macrophages**





## A. Introduction

Les cyclophilines sont des protéines ubiquitaires très conservées au cours de l'évolution. Elles présentent de fortes homologues de séquence au niveau du noyau central qui comprend le site enzymatique et la poche de fixation de la CsA (Handschumacher *et al.*, 1984 ; Fischer *et al.*, 1989). Au sein de cette famille, les CyPA et CyPB extracellulaires ont été caractérisées pour leurs propriétés inflammatoires (Yurchenko *et al.*, 2010).

La CyPA est majoritairement retrouvée au niveau du cytosol tandis que la CyPB est localisée au niveau du réticulum endoplasmique. Cette dernière peut également être constitutivement sécrétée par certaines cellules telles que les chondrocytes ou les kératinocytes (De Ceuninck *et al.*, 2003 ; Fearon *et al.*, 2011). Par contre, en réponse au stress oxydatif ou à des stimuli inflammatoires, les CyPA et CyPB sont toutes deux sécrétées par les cellules immunitaires, les cellules musculaires lisses vasculaires (Sherry *et al.*, 1992 ; Jin *et al.*, 2000). Parallèlement, il a été démontré que les cyclophilines extracellulaires présentent une activité chimioattractante pour les lymphocytes T, les monocytes et les neutrophiles par un mécanisme lié à la génération d'un flux calcique intracellulaire et l'activation de la voie p44/p42 MAPK (Sherry *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1992 ; Allain *et al.*, 2002). De plus, des travaux réalisés au Laboratoire ont révélé que la CyPB est capable d'augmenter l'adhérence des lymphocytes sur la matrice extracellulaire par un mécanisme dépendant de l'activation des intégrines (Allain *et al.*, 2002). L'ensemble de ces données suggère la participation des cyclophilines dans le recrutement des cellules sur le site de l'inflammation.

Les réponses cellulaires induites par les cyclophilines sécrétées ont suggéré la présence de récepteurs à la surface des cellules cibles. Ainsi, les travaux menés au Laboratoire ont mis en évidence l'existence de deux sites de fixation pour la CyPB : l'un de nature protéique, l'autre de nature glycanique (Allain *et al.*, 1994 ; Denys *et al.*, 1997, 1988b).

L'équipe de Bukrinsky ont mis en évidence la fixation des CyPA et CyPB au CD147, une glycoprotéine membranaire initialement décrite comme un inducteur de métalloprotéinases (Pushkarsky *et al.*, 2001 ; Yurchenko *et al.*, 2001, 2002). Des travaux de mutagenèse dirigée ont permis de caractériser l'interaction entre la CyPB et le CD147 qui fait intervenir la région centrale conservée des cyclophilines (Carpentier *et al.*, 2002). D'ailleurs l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre le CD147, la mutation du site PPIase ou encore l'utilisation de CsA bloque les effets des cyclophilines (Carpentier *et al.*, 2002 ; Allain *et al.*, 2002 ; Yurchenko *et al.*, 2002).

La fixation de la CyPB sur les lymphocytes est diminuée lorsque les cellules sont mises en présence d'héparine libre ou traitées par l'héparinase. Ces données ont suggéré que le second site de fixation de la CyPB correspond à des chaînes HS portées par les HSPGs (Denys *et al.*, 1998b). L'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre les HSPGs et l'invalidation de l'expression des HSPGs par ARN interférence ont permis de démontrer que les activités de la CyPB sont dépendantes du syndécan-1 (Pakula *et al.*, 2007). Des expériences de mutagenèse dirigée ont révélé au niveau de la région N-terminale de la CyPB l'implication des acides aminés <sup>3</sup>KKK<sup>5</sup> et <sup>14</sup>YFD<sup>16</sup> dans la fixation de la cyclophiline aux chaînes HS. Plus récemment, le motif structural héparinique a été caractérisé. Il s'agit d'un octasaccharide présentant en position 2 non réductrice une glucosamine 3-O-sulfatée (Vanpouille *et al.*, 2004, 2007). Cette modification rare des chaînes HS est générée par les 3-OSTs (Figure 8 p37) et l'invalidation de la 3-OST-3, qui est fortement exprimée dans les monocytes et les lymphocytes T, entraîne une diminution de la fixation de la CyPB aux lymphocytes T (Vanpouille *et al.*, 2007 ; Deligny *et al.*, 2010). Les sites de fixation de la CyPB au CD147 et aux chaînes HS sont diamétralement opposés ce qui permet à la CyPB d'interagir simultanément avec ces deux récepteurs. Par contre, la CyPA qui ne possède pas les séquences <sup>3</sup>KKK<sup>5</sup> et <sup>14</sup>YFD<sup>16</sup> présente une affinité très faible pour les HS (Denys *et al.*, 1998b ; Carpentier *et al.*, 1999b).

La fixation des CyPA et CyPB induit le chimiotactisme des lymphocytes T, des monocytes et des neutrophiles par un mécanisme lié à la génération d'un flux calcique intracellulaire et l'activation de la voie p44/p42 MAPK . Ces réponses sont dépendantes du CD147 alors que les HSPGs ne semblent pas indispensables. En effet, la CyPB<sub>KKK</sub>- mutée génère un flux calcique et un chimiotactisme plus faible que ceux induits par la CyPB non mutée. De plus, ces réponses sont similaires à celles observées pour la CyPA, suggérant que la fixation de la CyPB aux HSPGs permet des réponses de plus grande amplitude (Yurchenko *et al.*, 2001 ; Allain *et al.*, 2002). L'adhérence, induite par la CyPB, des lymphocytes T à la matrice extracellulaire est dépendante du CD147 et des HSPGs. L'utilisation d'anticorps anti-CD147 et l'invalidation de l'expression du syndécan-1 inhibent l'activité pro-adhésive de la CyPB. De même, des cellules traitées à l'héparinase ou mises en présence d'inhibiteurs de l'activation de la voie p44/p42 MAPK montrent une inhibition de la phosphorylation des protéines ERK1/2 et de l'adhérence des lymphocytes à la matrice extracellulaire. D'ailleurs, la CyPA ou les CyPB<sub>KKK</sub>- ne présentent pas d'activité pro-adhésive (Allain *et al.*, 2002 ; Pakula *et al.*, 2007).

Les activités de la CyPB sur les lymphocytes ont été largement étudiées alors que les réponses induites par cette protéine sur les macrophages ont fait l'objet de peu d'études.

Dans ce contexte, le sujet de recherche qui m'a été confié durant ma thèse a été de déterminer les réponses induites par la CyPB sur les macrophages et d'étudier son rôle dans la régulation de l'activité de ces cellules immunitaires.

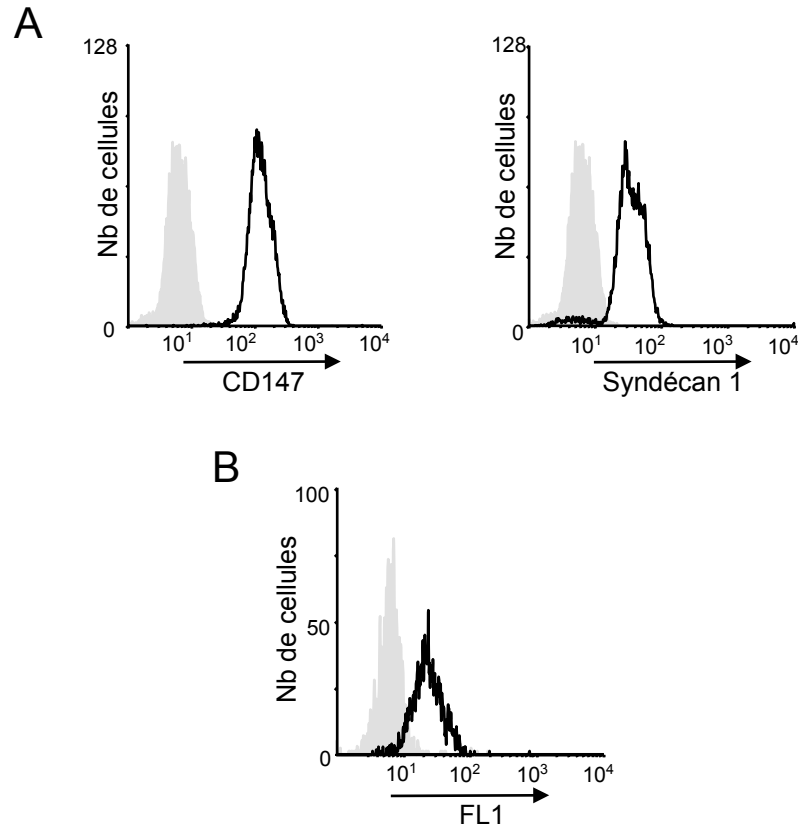
Pour mener à bien ce projet, nous avons réalisé nos expériences sur des macrophages humains dérivés de monocytes isolés du sang. Toutefois ces cellules primaires sont difficilement transfectables. Nous avons alors également cherché à identifier une lignée cellulaire présentant les mêmes réponses que les macrophages humains afin de palier les problèmes liés à la transfection. Pour cela, nous avons utilisé les cellules de la lignée promonocytaire THP-1 différenciées en macrophages par traitement à la 1,25-dihydroxylvitamine D3.

Dans un premier temps, nous avons étudié les réponses induites par la CyPB sur les macrophages humains et les cellules de la lignée THP-1. Nous avons vérifié si ces réponses sont dépendantes de l'activation des mêmes voies de signalisation que celles décrites pour les lymphocytes et si les mêmes récepteurs sont impliqués.

## **B. Résultats**

### **B. 1. Etude de la fixation de la CyPB sur les cellules THP-1**

Avant d'étudier les réponses induites par la CyPB sur les cellules THP-1, nous avons voulu savoir si ces cellules exprimaient bien les récepteurs de la CyPB. Pour cela, nous avons analysé la fixation d'anticorps anti-CD147 et anti-syndécan-1 sur les cellules par cytofluorimétrie en flux (Figure 18A). L'expérience a révélé que les cellules THP-1 expriment bien le CD147 et le syndécan-1, suggérant que la CyPB puisse se fixer sur ces cellules. Afin de valider cette hypothèse, nous avons utilisé la CyPB couplée à la fluorescéine et analysé sa fixation sur les cellules THP-1 par cytofluorimétrie en flux (Figure 18B). Comme montré dans la figure, les cellules THP-1 fixent la CyPB, ce qui est en accord avec la présence du CD147 et du syndécan-1 sur ces cellules.



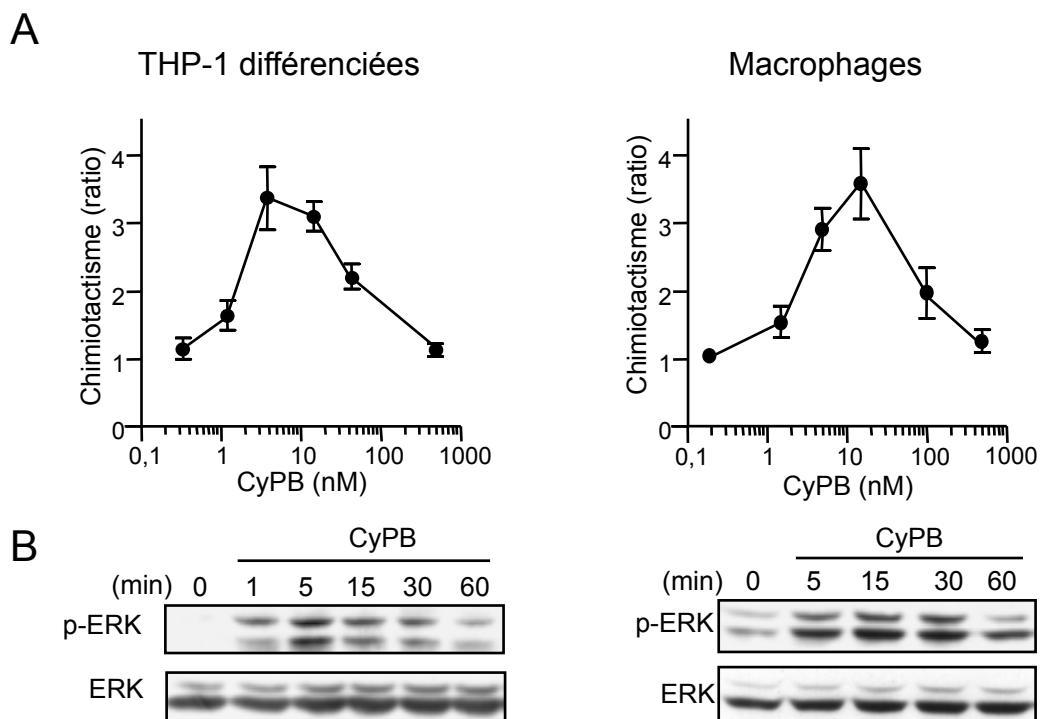
**Figure 18: Fixation de la CyPB sur les cellules THP-1.** **A.** Etude de l'expression du syndécan-1 et du CD147 dans les cellules THP1 différenciées en macrophages. L'expression du CD147 et du syndécan-1 est analysée par cytofluorimétrie en flux (histogramme blanc). La réactivité des anticorps est comparée aux isotypes contrôles (histogramme gris). **B.** Etude de la fixation cellulaire de la CyPB. Les cellules THP-1 sont incubées en présence de 50 nM de CyPB couplée à la fluorescéine. Après lavage, la fixation cellulaire est analysée par cytofluorimétrie en flux (histogramme blanc). La fixation non spécifique est déterminée en présence de 100 excès molaire de CyPB non marquée. Les résultats sont représentatifs de deux manipulations indépendantes.

## B. 2. Réponses induites par la CyPB sur les cellules THP-1

### B. 2. a. Activité chimiotactile

La CyPB possède une activité chimio-attractante et induit la migration des monocytes, des lymphocytes T et des neutrophiles. Toutefois, aucune donnée concernant l'activité chimiotactile de la CyPB vis a vis des macrophages n'était disponible. Nous avons donc, dans un premier temps, étudié la migration des cellules THP-1 en réponse à des concentrations croissantes de CyPB. L'allure de la courbe présentée en figure 19A est caractéristique de

l'effet induit par de nombreux facteurs chimiotactiles. La migration des cellules THP-1 est augmentée d'un facteur 3,5 en présence de 15 nM de CyPB, confirmant l'activité chimio-attractante de la CyPB envers ces cellules. Nous avons ensuite renouvelé cette expérience sur des macrophages humains obtenus à partir de monocytes isolés de sang humains. L'allure de la courbe obtenue est similaire à celle observée pour les cellules THP-1 et la migration des macrophages est également augmentée d'un facteur 3,5 en présence de 15nM de CyPB. Ces résultats indiquent que la CyPB est capable d'induire le chimiotactisme des cellules THP-1 et des macrophages humains de façon dose dépendante.



**Figure 19 : Réponses induites par la CyPB sur les cellules THP-1 et les macrophages humains.** **A.** Activité chimiotactile de la CyPB. L'étude du chimiotactisme est réalisée en présence de concentrations croissantes de CyPB. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules ayant migré en réponse à la CyPB par rapport au nombre de cellules ayant migré en absence de stimulus. **B.** Activation de la voie p44/p42 MAPK par la CyPB. Les cellules ont été incubées en présence de 50 nM de CyPB durant les temps indiqués. L'activation de la voie p44/p42 MAPK est analysée grâce à un anticorps dirigé contre les formes phosphorylées de ERK1/2 tandis qu'un anticorps anti-ERK1/2 montre les formes totales des kinases. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

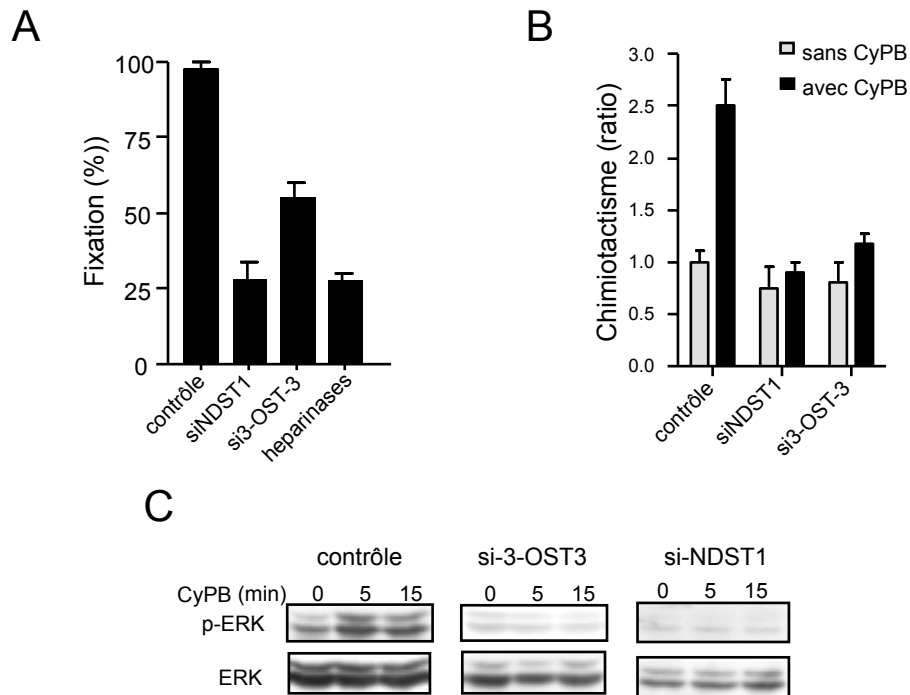
## B. 2. b. Activation de la voie p44/p42 MAPK

Dans de nombreux types cellulaires, la fixation de la CyPB induit l'activation de la voie p44/p42 MAPK. Nous avons alors étudié la phosphorylation de ERK1/2 suite à la stimulation des cellules THP-1 et des macrophages humains par la CyPB. Comme attendu, une augmentation de la phosphorylation des kinases est observée 5 minutes après que les cellules aient été mises en présence de 50 nM de CyPB (Figure 19B). L'activation de la voie p44/p42 MAPK est transitoire et le niveau de phosphorylation des kinases ERK1/2 revient à l'état basal après 60 minutes de stimulation.

## B. 3. Effet de l'invalidation des sites de fixation HS de la CyPB sur ses activités biologiques

### B. 3. a. Inhibition de la fixation de la CyPB sur les cellules THP-1

Nous avons montré que la CyPB se fixe sur les cellules THP-1 et induit l'activation de la voie p44/p42 MAPK et le chimiotactisme de ces cellules. Il a clairement été établi que les réponses cellulaires et moléculaires induites par la CyPB sont dépendantes de sa fixation au CD147 (Yurchenko *et al.*, 2001 ; Allain *et al.*, 2002). Toutefois, l'importance des chaînes HS portées par le syndécan-1 dans les réponses induites par la CyPB sur les macrophages n'a pas été étudiée. Nous avons donc inhibé les sites de fixation de la CyPB aux chaînes HS en traitant les cellules par un cocktail d'héparinases. L'élimination des chaînes HS inhibe d'environ 72 % la fixation de la CyPB à la surface des cellules THP-1 en comparaison aux cellules non traitées (Figure 20A). Ces résultats confirment l'importance des chaînes HS dans la fixation cellulaire de la CyPB. De précédents travaux réalisés au Laboratoire ont montré que la fixation de la CyPB aux chaînes HS est dépendante de la génération d'un motif particulier et que l'expression de la NDST1 (N-déacétylase/N-sulfotransférase 1), une enzyme clé de la maturation des HS (Figure 8 p37) et de la 3-OST-3 est importante pour la fixation de la CyPB sur les lymphocytes T (Vanpouille *et al.*, 2007 ; Deligny *et al.*, 2010). L'invalidation de l'expression de ces deux enzymes par ARN interférence entraîne une inhibition de la fixation de la CyPB sur les cellules THP-1 (Figure 20A). Cette inhibition est de l'ordre 72 % pour l'invalidation de l'expression de la NDST1 et de 45 % pour l'invalidation de l'expression de la 3-OST-3.



**Figure 20 : Contribution des chaînes HS dans les réponses induites par la CyPB sur cellules THP-1.** Les cellules THP-1 sont transfectées par les siRNA correspondants ou par le siGFP (contrôle). 48 h après traitement, les cellules sont utilisées pour différentes manipulations. **A.** Contribution des chaînes HS dans la fixation de la CyPB. Les cellules invalidées par ARN interférence ou incubées en présence d'un cocktail d'héparinases sont incubées en présence de 50 nM de CyPB couplée à la fluorescéine. Après lavage, la fixation cellulaire est analysée par cytofluorimétrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle. **B.** Contribution des chaînes HS dans l'activité chimiotactile de la CyPB. L'étude du chimiotactisme est réalisée en présence de concentrations croissantes de CyPB. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules ayant migré en réponse à la CyPB par rapport au nombre de cellules ayant migré en absence de stimulus. **C.** Contribution des chaînes HS dans l'activation de la voie p44/p42 MAPK par la CyPB. Les cellules invalidées pour l'expression de la NDST1 et de la 3-OST-3 ont été incubées en présence de 50 nM de CyPB durant les temps indiqués. L'activation de la voie p44/p42 MAPK est analysée grâce à un anticorps dirigé contre les formes phosphorylées de ERK1/2 tandis qu'un anticorps anti-ERK1/2 montre les formes totales des kinases. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

### B. 3. b. Inhibition de l'activité de la CyPB

Nous avons ensuite étudié l'importance des chaînes HS dans les réponses induites par la stimulation des cellules THP-1 par la CyPB. L'invalidation de l'expression de la NDST1 et



de la 3-OST-3 réduit respectivement de 90 % et de 85 % la migration cellulaire induite par la CyPB en comparaison aux cellules contrôles (Figure 20B). Dans ces mêmes cellules invalidées pour l'expression de la NDST1 et de la 3-OST-3, la phosphorylation des kinases ERK1/2 en réponse à la CyPB est inhibée (Figure 20C). Ces résultats confirment que les réponses cellulaires et moléculaires induites par la CyPB sont dépendantes de la fixation de la protéine aux chaînes HS portées par le syndécan-1.

## C. Discussion

Les réponses induites par les cyclophilines extracellulaires ont été étudiées par différents groupes. Les CyPA et CyPB induisent la migration des monocytes, des neutrophiles et des lymphocytes T (Sherry *et al.*, 1992 ; Yurchenko *et al.*, 2001, 2002 ; Allain *et al.*, 2002). Cette activité chimiotactile est dépendante de l'activation de la voie p44/p42 MAPK qui survient après fixation des cyclophilines sur le CD147.

Les réponses induites par les CyPA et CyPB sur les macrophages humains ont été peu étudiées. Toutefois des travaux ont montré que la CyPA se fixe sur les macrophages dérivés de monocytes isolés de sang humain (Yang *et al.*, 2008) et qu'elle présente une activité chimio-attractante pour les cellules THP-1 (Payeli *et al.*, 2008).

Afin d'étudier les réponses induites par la CyPB dans les macrophages humains, nous avons dans un premier temps vérifié s'ils répondaient bien à la CyPB et si les cellules de la lignée THP-1 pouvaient servir de modèle cellulaire afin de palier les difficultés rencontrées lors des expériences de transfection.

Des travaux préliminaires ont montré que la fixation de la CyPB sur le CD147 et le syndécan-1 est nécessaire pour activer la voie p44/p42 MAPK et induire le chimiotactisme des lymphocytes T (Pakula *et al.*, 2007). Nous avons donc étudié l'expression de ces récepteurs sur les cellules THP-1 différenciées en cellules de type macrophages. L'analyse par cytofluorimétrie en flux a révélé la présence des deux récepteurs sur les cellules THP-1, ce qui est corrélé à la fixation de la CyPB sur ces cellules.

Il a été démontré que la CyPA présente une activité chimiotactile vis à vis des cellules THP-1 (Payeli *et al.*, 2008). Il nous fallait toutefois vérifier si les cellules THP-1 sont un bon modèle cellulaire pour nos études futures. La stimulation de ces cellules induit bien l'activation de la voie p44/p42 MAPK et la migration de ces cellules, démontrant que les

cellules THP-1 répondent bien à la CyPB. Jusqu'à présent, seul Wang et al (2010) avait montré que les macrophages humains répondent à la CyPA. Nous avons donc également vérifié que la CyPB induit la phosphorylation des kinases ERK1/2 et la migration de ces cellules. En plus de répondre à la CyPB, les macrophages répondent de façon similaire aux cellules THP-1, ce qui signifie que cette lignée monocyttaire constitue un modèle cellulaire de choix pour nos futures investigations.

Au Laboratoire, de précédents travaux ont montré que les réponses induites par la stimulation des lymphocytes T par la CyPB sont dépendantes de la fixation de la protéine aux chaînes HS portées par le syndécan-1 (Allain *et al.*, 2002 ; Pakula *et al.*, 2007). Afin de comprendre l'importance de ce récepteur dans les activités de la CyPB, nous avons bloqué la génération d'un motif héparinique essentiel pour la fixation de la CyPB en invalidant l'expression des enzymes impliquées dans sa biosynthèse. Des expériences similaires avaient déjà été réalisées sur des cellules de la lignée lymphoblastique Jurkat (Vanpouille *et al.*, 2007 ; Deligny *et al.*, 2010). Comme attendu, la fixation de la CyPB sur les cellules THP-1 est dépendante des chaînes HS. De plus, l'invalidation des enzymes qui génèrent le motif de fixation HS de la CyPB entraîne une inhibition de l'activité chimiotactile de la CyPB pour les cellules THP-1 et une inhibition de l'activation de la voie p44/p42 MAPK dans ces mêmes cellules. Ces résultats confirment l'importance de ce récepteur dans les réponses moléculaires et cellulaires de la CyPB sur les macrophages.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que les macrophages humains et les cellules THP-1 répondent à la CyPB. L'utilisation des cellules de la lignée pro-monocytaire THP-1 différenciées en macrophages est un modèle cellulaire de choix pour étudier les réponses de la CyPB. De plus, des études concernant les réponses induites par la CyPA sur ce même modèle cellulaire ont déjà été réalisées, ce qui permettra une comparaison justifiée entre les activités de la CyPA et de la CyPB.



## **Chapitre II :**

# **Etude des mécanismes induits par la CyPB pour réguler l'expression du TNF- $\alpha$ induit par le LPS**



# Partie I :

## Etude du mécanisme de régulation transcriptionnelle

### Introduction

Depuis quelques années, les données de la littérature confèrent aux CyPA et CyPB un rôle de médiateur de l'inflammation. En effet, celles-ci sont fortement sécrétées en réponse à des stimuli inflammatoires, à une infection virale ou dans des conditions de stress oxydatif. La CyPA est retrouvée dans le milieu de cultures de macrophages et de cellules endothéliales suite à leur stimulation par le LPS (Sherry *et al.*, 1992 ; Kim *et al.*, 2004) ou dans les liquides synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Billich *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 2005). La CyPA est également détectée dans les surnageants de culture de cellules infectées par le HBV (Tian *et al.*, 2010) ou dans le plasma de patients atteints du HIV-1 avec la CyPB. Les CyPA et CyPB sont aussi sécrétées dans les milieux de culture de cellules endothéliales et de CMLV après stimulation par un inducteur de ROS (Liao *et al.*, 2000 ; Jin *et al.*, 2000 ; Suzuki *et al.*, 2006) ou dans les voies aériennes chez des modèles murins d'asthme allergique (Gwinn *et al.*, 2006 ; Balsley *et al.*, 2010).

De plus, il a été suggéré que les CyPA et CyPB participent à la pathogénèse de maladies inflammatoires. Chez les patients atteints de polyarthrite par exemple, la CyPA est sécrétée en abondance dans les liquides synoviaux et est corrélée à la sévérité de la maladie. La fixation de la CyPA sur le CD147 entraîne une augmentation de l'expression de MMPs qui sont à l'origine de la destruction de la matrice extracellulaire et de la dégradation des articulations mais également d'une augmentation du chimiotactisme des cellules inflammatoires qui envahissent alors la synovie (Kim *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010 Wang *et al.*, 2011). Dans des modèles murins d'asthme allergique, les CyPA et CyPB qui sont retrouvées au niveau des voies respiratoires lors de la phase aigüe de l'inflammation, induisent le chimiotactisme des neutrophiles ainsi que la sécrétion des cytokines Th<sub>2</sub> IL-5 et IL-13. Une fois de plus, l'interaction entre les cyclophilines et le CD147 est impliquée dans le développement de la maladie puisque l'utilisation d'anticorps bloquants

anti-CD147 inhibe le recrutement des neutrophiles et la sécrétion des cytokines (Gwinn *et al.*, 2006 ; Balsley *et al.*, 2010). Dans ce contexte, il a été démontré que la CyPA peut induire l'activation des voies de signalisation p38 MAPK, JNK et NF- $\kappa$ B, résultant en la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 ou l'IL-8 (Li *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2005 ; Yuan *et al.*, 2010).

Au niveau des macrophages, l'expression de cytokines pro-inflammatoires nécessite l'activation de récepteurs de l'immunité innée tels que les TLRs. L'activation de ces voies se fait par recrutement de diverses molécules adaptatrices qui interagissent et activent des kinases. Ces dernières participent à l'activation de facteurs de transcriptions tels que NF- $\kappa$ B nécessaires à la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires. Ces facteurs sont essentiels dans la régulation de l'inflammation puisqu'ils assurent un rôle de messenger entre les cellules impliquées dans ce processus. Toutefois une production excessive de ces médiateurs est néfaste pour l'organisme et peut conduire à des dommages cellulaires et tissulaires et induire un choc septique. C'est pourquoi la stimulation des TLRs conduit également à l'activation de mécanismes de rétrocontrôle négatif afin de limiter l'expression des cytokines pro-inflammatoires. La régulation peut se faire en bloquant les voies de transduction associées au TLR, en modulant l'activité des facteurs de transcription ou en agissant au niveau post-transcriptionnel.

Depuis sa découverte par Medzhitov *et al.* en 1997, la signalisation du TLR4 est largement utilisée comme modèle et l'étude des voies de signalisation qui y sont associées permet de comprendre les rouages de l'immunité innée. Les LPS sont les constituants principaux des parois des bactéries à Gram négatif et la reconnaissance de ces molécules par le TLR4 entraîne l'activation de voies de signalisation et la synthèse des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ou encore IL-8.

Les données actuelles suggèrent que la CyPA induit l'expression de facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 ou encore l'IL-8. Toutefois d'autres travaux ont contredit ces résultats et actuellement, il n'existe dans la littérature aucune publication similaire concernant la CyPB. Notre Laboratoire s'est alors intéressé à l'étude des réponses induites par la stimulation de macrophages par la CyPB. Afin de mener à bien cette étude, nos expériences ont été réalisées sur les macrophages dérivés de monocytes isolés du sang et sur les cellules de la lignée pro-monocytaire différenciées en THP-1. Dans un premier temps,

nous avons quantifié la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires suite à la stimulation de macrophages humains par la CyPB. De façon surprenante, nous n'avons constaté aucune induction de leur expression. A l'inverse, l'incubation des macrophages en présence de CyPB inhibe l'expression de ces cytokines induites par le LPS. Nous avons donc cherché à comprendre les mécanismes mis en place par la CyPB pour moduler l'activation des macrophages par le LPS et nous avons mis en évidence un mécanisme de régulation transcriptionnelle impliquant l'expression de Bcl-3.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *Journal of Immunology* : **Marcant, A.**, Denys, A., Melchior, A., Deligny, A., Martinez, P., Carpentier, A. & Allain, F. Cyclophilin B Attenuates the Expression of TNF- $\alpha$  in LPS-Stimulated Macrophages through the Induction of Bcl-3.





# **Cyclophilin B Attenuates the Expression of TNF- $\alpha$ in LPS-Stimulated Macrophages through the Induction of Bcl-3<sup>1</sup>**

**Adeline Marcant\*, Agnès Denys\*, Aurélie Melchior<sup>2\*</sup>, Pierre Martinez\*, Audrey Deligny<sup>3\*</sup>, Mathieu Carpentier\*, and Fabrice Allain<sup>4\*</sup>**

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

Running title: CyPB-mediated inhibition of TNF- $\alpha$  production from macrophages

**Extracellular cyclophilin A (CyPA) and CyPB have been well described as chemotactic factors for various leukocyte subsets, suggesting their contribution to inflammatory responses. Unlike CyPA, CyPB accumulates in extracellular matrixes, from which it is released by inflammatory proteases. Hence, we hypothesized that it could participate in tissue inflammation by regulating the activity of macrophages. In the current study, we confirmed that CyPB initiated *in vitro* migration of macrophages, but it did not induce production of pro-inflammatory cytokines. In contrast, pretreatment of macrophages with CyPB attenuated the expression of inflammatory mediators induced by LPS stimulation. The expression of TNF- $\alpha$  mRNA was strongly reduced after exposure to CyPB, but it was not accompanied by significant modification in LPS-induced activation of MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. LPS activation of a reporter gene under the control of TNF- $\alpha$  gene promoter was also markedly decreased in cells treated with CyPB, suggesting a transcriptional mechanism of inhibition. Consistent with this hypothesis, we found that CyPB induced the expression of Bcl-3, which was accompanied by a decrease in the binding of NF- $\kappa$ B p65 to the TNF- $\alpha$  promoter. As expected, interfering with the expression of Bcl-3 restored cell responsiveness to LPS, thus confirming that CyPB acted by inhibiting initiation of TNF- $\alpha$  gene transcription. Finally, we found that CypA was not efficient in attenuating the production of TNF- $\alpha$  from LPS-stimulated macrophages, which seemed to be due to a modest induction of Bcl-3 expression. Collectively, these findings suggest an unexpected role for CyPB in attenuation of the responses of pro-inflammatory macrophages.**

Macrophages are a primary source of a number of pro-inflammatory cytokines and chemokines, which are expressed in response to pathogen infection and other pathological stimuli. Although secretion of these pro-inflammatory mediators plays a beneficial role in protecting host from infection or injury, prolonged and excessive exposure is associated with a number of pathological disorders, including chronic inflammation, septic shock or rheumatoid arthritis. Thus, the inflammatory response of macrophages must be tightly regulated and a number of negative feedback systems have evolved to reduce the production of pro-inflammatory mediators. These include the expression of B-cell lymphoma-3 (Bcl-3)<sup>5</sup>, which has been reported to target NF- $\kappa$ B dependent gene expression. Bcl-3 was originally identified as a proto-oncogene in B-cell leukemia (1). It was later found to be expressed in various cell types, including monocytes/macrophages, lymphocytes, keratinocytes, in which it modulates cell proliferation and TLR signaling. Bcl-3 is a member of the I- $\kappa$ B family of NF- $\kappa$ B inhibitors. In contrast to the cytoplasmic I- $\kappa$ Bs, Bcl-3 associates with p50 and p52 homodimers but not with other NF- $\kappa$ B dimers in the nucleus (2). Binding of NF- $\kappa$ B p50 dimers to  $\kappa$ B sites was demonstrated to repress LPS-induced TNF- $\alpha$  gene transcription in macrophages, which has been related to a negative feed-back system to regulate production of the cytokine (3, 4). Bcl-3 is induced by LPS with delayed kinetic in macrophages and facilitates accumulation of NF- $\kappa$ B p50 homodimers in the nucleus. Therefore, LPS presumably causes transient induction of activating NF- $\kappa$ B p65/p50 heterodimers, which are then gradually replaced by p50 dimers associated to Bcl-3 (5). Bcl-3 has also been implicated in the anti-inflammatory properties of a number of regulatory cytokines. For instance, IL-10 induces the expression of Bcl-3 in LPS-stimulated macrophages, which is required to attenuate the production of TNF- $\alpha$  (6). Bcl-3 was also implicated in the down-regulatory effect of IL-4/IL-13 on the production of antimicrobial peptides from keratinocytes (7).

Originally described as the host cell receptors for the immunosuppressive drug cyclosporin A (8), cyclophilins are ubiquitously distributed intracellular proteins, mainly involved in the regulation of protein folding (9). However, accumulating data have implicated extracellular cyclophilins, *i.e.* CyPA and CyPB, as intercellular mediators in inflammation (10). High levels of extracellular cyclophilins have been observed in inflammatory disorders, such as sepsis, rheumatoid arthritis and atherosclerosis (11-13). Although cytosolic, CyPA can be secreted by macrophages and vascular smooth muscle cells in response to LPS and oxidative stress (14, 15). Unlike CyPA, CyPB is constitutively secreted by tissue resident cells, *e.g.* fibroblasts, chondrocytes and keratinocytes, and accumulates within the

extracellular matrix (16-18). Importantly, it is released intact by heparanase and matrix metalloproteinases (MMPs), suggesting that it can participate in tissue inflammation. Both CyPA and CyPB exhibit potent chemotactic properties *in vitro* and *in vivo*, indicating that they contribute to leukocyte infiltration during the acute phase of inflammation (14, 19-22). CD147, also known as an extracellular MMP inducer, was demonstrated to act as a signaling receptor for extracellular cyclophilins and to mediate their chemotactic activity *via* a mechanism involving  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization and p44/p42 MAPK activation (19, 20).

Although the role of cyclophilins in mediating leukocyte recruitment during the acute phase of inflammation is now well-established, their contribution to the expression of pro-inflammatory mediators in monocytes/macrophages is more controversial. CyPA was reported to induce the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8/IL-8 and CCL2/MCP-1 (23). However, these findings are in contradiction with other studies, which demonstrated that the levels of pro-inflammatory mediators were either undetectable or very low, but without any comparison to those obtained with TLR agonists (24-26). This discrepancy might be explained by the presence of LPS or other bacterial contaminations in recombinant CyPA preparations. This is in agreement with the study of Payeli *et al.* (24), who reported that some commercially available CyPA exhibits low purity and can be contaminated by endotoxin.

We have previously reported that CyPB is released from the extracellular matrix as a consequence of the activation of inflammatory MMPs and that it was more efficient than CyPA to trigger chemotaxis and integrin activation in T lymphocytes (17, 20). However, the contribution of CyPB to the inflammatory responses of macrophages has never been addressed. In the current study, we have therefore investigated the effects of CyPB on the major responses elicited by macrophages *in vitro*. Our results indicate that CyPB was efficient to initiate migration of macrophages but it did not induce the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. In contrast, pretreatment of macrophages with CyPB strongly reduced the expression of inflammatory mediators induced by subsequent stimulation with LPS. We then analyzed the inhibitory mechanisms by which CyPB inhibits LPS-induced production of TNF- $\alpha$ . We found that CyPB potently reduced TNF- $\alpha$  gene transcription in LPS-stimulated macrophages, and this was dependent on the expression of Bcl-3. Collectively, our results suggest an unexpected role for CyPB in the modulation of pro-inflammatory responses of macrophages.

## Materials and Methods

### *Production of recombinant cyclophilins*

Recombinant human CyPA and CyPB were produced in *E. coli* essentially as described in (20, 27). The material was further purified by heparin-Sepharose chromatography and detoxified on Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel (Pierce Biotechnology). The purity of recombinant proteins was determined to be > 98% by SDS-PAGE. LPS contamination was analyzed with the Limulus Amebocyte Lysate assay (Biowhittaker) and found to be less than 0.009 E.U./ $\mu$ g.

### *Preparation of human monocytes-derived macrophages and cell culture*

Human citrated venous blood samples were obtained from the local blood transfusion center (Etablissement de Transfusion Sanguine, Lille, France). Following isolation of PBMC by density centrifugation on Lymphoprep (AbCys), monocytes were purified by selection with magnetic beads coupled to CD14, according to the instructions of the manufacturer (BD Biosciences). Macrophages were obtained by incubating freshly isolated monocytes ( $10^6$  cells/mL) in complete RPMI 1640 medium supplemented with 10 ng/mL M-CSF (AbCys) for 5 days. The purity of cell populations was assessed by FACS and found > 95 %. Human promonocytic leukemia THP-1 cells (88081201, ECACC) were routinely cultured in RPMI 1640 supplemented with 10 % (v/v) heat-inactivated FCS and 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 (28).

### *In vitro chemotaxis assays*

Cell chemotaxis was assayed *in vitro* essentially as described (20). In brief, macrophages were adjusted at  $8 \times 10^6$  cells per ml in RPMI-1640 culture medium supplemented with 0.5% BSA. Chemotactic activity was evaluated in a microchemotaxis chamber containing 8- $\mu$ m pore polycarbonate membranes (Corning Costar Corp.). The chemotactic index was calculated as the number of cells migrating toward the test sample divided by the number of cells migrating toward control medium.

### *Measurement of cytokine/chemokine production in culture supernatants*

For cytokine and chemokine immunoassays, macrophages or THP-1 cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells per well in 96-well plates and incubated in the absence or presence of various

concentrations of recombinant cyclophilins and/or 10 ng/mL of LPS (*E.coli* 055:B5 ; Sigma). Supernatants were collected after 4 h or 16 h of stimulation and the production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL5/RANTES (AbCys), CXCL8/IL-8 and IL-10 was measured by sandwich ELISA, according the instructions of the manufacturers (R & D Systems).

#### *Western immunoblotting*

Cells ( $1 \times 10^6$  per point) were lysed in 60  $\mu$ L of 1 % Triton X-100 lysis buffer (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.9) containing 25 % (v/v) glycerol, 1 mM sodium NaVO<sub>3</sub>, 10 mM NaF and 1 x protease inhibitor mixture (Roche) for 3 h at 4 °C. The lysates were clarified by centrifugation at 10,000 g for 30 min at 4 °C, mixed with Laemmli buffer and boiled for 10 min. Proteins were separated by SDS-PAGE (10 %, w/v) and transferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher & Schull). Immunoblotting was performed using antibodies to p44/p42 MAPK (Erk1/2) (Sigma), phospho-JNK1/2 (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>, Thr<sup>221</sup>/Tyr<sup>223</sup>) (Upstate Biotechnology), JNK1/2, p38 MAPK, Bcl-3, GAPDH (Santa Cruz Biotechnology), NF- $\kappa$ B p65, phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser<sup>536</sup>), phospho-p44/p42 MAPK (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>), I- $\kappa$ B $\alpha$ , phospho-I- $\kappa$ B $\alpha$  (Ser<sup>32</sup>/Ser<sup>36</sup>) or phospho-p38 MAPK (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) (Cell Signaling Technology). In all cases, membranes were blocked for 1 h at room temperature in TBS supplemented with 0.1 % (v/v) Tween-20 and 5 % (w/v) nonfat dry milk, and then probed for 2 h with primary antibodies in TBS supplemented with 1 % (w/v) nonfat dry milk. After washing, the blots were developed using HRP-conjugated secondary antibodies and ECL detection kit (Amersham Biosciences).

#### *RNA isolation and real time RT-PCR*

Total RNA was isolated from  $3 \times 10^6$  cells using a NucleoSpin RNA II kit, according to the instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel). Reverse transcription of mRNA encoding TNF- $\alpha$  and Bcl-3 was performed from 2  $\mu$ g of total RNA with an oligo-dT primer and M-MLV reverse transcriptase (Promega). The transcript of GAPDH was used as a control to normalize for total mRNA input and to confirm efficiency of complementary DNA synthesis. PCR reactions were performed essentially as described in (29). The synthetic primers were designed by using Primer Premier 5.0 (Biosoft Int.), according to the published cDNA sequences of TNF- $\alpha$  and Bcl-3 (accession numbers: NM\_000594.2 and NM\_005178.3, respectively). Primer sets, purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium) were as follows: TNF- $\alpha$ , 5'-CTT CTC CTT CCT GAT CGT GG-3' (sense) and 5'-TCT CAG CTC CAC GCC

ATT-3' (antisense) ; Bcl-3, 5'-GAA AAC AAC AGC CTT AGC ATG GT-3' (sense) and 5'-TGC CGG AGT ACA TTT GCG-3' (antisense). PCR reactions were performed using the Mx3000P QPCR System and relative expression of amplified products was calculated with the MxPro QPCR software (Stratagene). The sequence of each amplified product was confirmed by sequencing (Genoscreen, Lille, France).

#### *Chromatin immunoprecipitation (ChIP)*

ChIP assays were performed using the MAGnify ChIP System from Invitrogen. According to the instructions of the manufacturers, cells ( $2 \times 10^5$  per sample) were suspended in lysis buffer and sonicated to obtain chromatin fragments containing DNA sequences of 200-500 bp. Chromatin was then diluted 10 times in ChIP buffer supplemented with antibodies coupled to protein A/G agarose magnetic beads. Immunoprecipitation was performed using antibodies to NF- $\kappa$ B p65 (Cell Signaling Technology), NF- $\kappa$ B p50, Bcl-3, c-Jun (Santa Cruz Biotechnology) or appropriate isotype-matched control IgGs (all from Sigma). Following treatment with reverse cross-linking buffer and proteinase K, DNA fragments from ChIP complexes or input control samples were purified with DNA purification magnetic beads and analyzed by real time PCR. Three sets of primers were designed to amplify the sequences of the TNF- $\alpha$  gene promoter covering the  $\kappa$ B1 site alone, a first cluster containing  $\kappa$ B3 and CRE sites ( $\kappa$ B3/CRE), and a second cluster containing  $\kappa$ B2,  $\xi$  and  $\kappa$ B2a sites ( $\kappa$ B2-2a) (accession number: M16441). Primer sets were as follows:  $\kappa$ B1, 5'-CTC TGA GGA ATG GGT TAC AGG A-3' (sense) and 5'-CCA GTG TGT GGC CAT ATC TTC-3' (antisense);  $\kappa$ B2-2a, 5'-CCA AGA CTG AAA CCA GCA TTA TG-3' (sense) and 5'-TGA GTC CTG AGG CCT GTG TTT G-3' (antisense);  $\kappa$ B3/CRE, 5'-CCC TCC AGT TCT AGT TCT ATC-3' (sense) and 5'-GGG GAA AGA ATC ATT CAA CCA G -3' (antisense).

#### *Reporter gene assays*

Induction of NF- $\kappa$ B-dependent gene transcription was analyzed by using a 5x multimerized  $\kappa$ B luciferase reporter construct (pNF- $\kappa$ B-luc, Agilent Technologies). Briefly, macrophages were transiently transfected with 1  $\mu$ g of the poly- $\kappa$ B reporter gene using the nucleofection technology according to Amaxa Biosystems instructions. After transfection, complete medium was added to the cells and incubated for 16 h. Cells were then stimulated with recombinant cyclophilins (50 nM) or LPS (10 ng/ml) for 8 h. Because the efficacy of transfection was weak in primary macrophages, we decided to use adenoviral construct to

study the activation of TNF- $\alpha$  promoter. The adenoviral vector encoding the luciferase reporter gene under the control of human TNF- $\alpha$  gene promoter (Advp5') has been described in (30) and was kindly provided by B. Foxwell (Kennedy Institute of Rheumatology, London, U.K.). For macrophage infection,  $1 \times 10^5$  cells per point at a density of  $1.10^6$  cells/ml were exposed to virus at the optimal multiplicity of infection (m.o.i.) 40:1 for 4 h in culture medium with 2,5 % FCS, followed by washing and reculturing for 16 h in complete medium. Infected cells were either directly used for analyzing the activation of the TNF- $\alpha$  promoter by CyPB (50 nM) or LPS (10  $\mu$ g/mL), or pre-incubated with CyPB (50 nM) or medium alone for 16 h and thereafter stimulated with LPS (10 ng/ml). After stimulation, cells were treated with luciferase assay kit (Promega) and luciferase activity was measured using a Tristar multimode microplate reader LB 941 (Berthold Technologies). Relative luciferase activities were normalized to protein content (micro BCA protein assay reagent kit, Pierce Biotechnology).

#### *RNA interference*

Synthetic small interfering RNA (siRNA) duplexes with symmetric 3'deoxythymidine overhangs were used to carry out RNA interference, essentially as described in (29). A set of three distinct synthetic siRNA duplexes, corresponding to the Bcl-3 mRNA sequences 5'-GAG CCU UAC UGC CUU UGU A(dTdT)-3', 5'-GAG CUC GAC AUC UAC AAC A(dTdT)-3' and 5'-CCC AAU UUC UUC CUU CCU U(dTdT)-3' was designed (Eurogentec) and tested for its efficiency to down-regulate the expression of Bcl-3. Negative control siRNAs, in which two nucleotides have been changed from the target sequence, were used to demonstrate the specificity of silencing (modified nucleotides, U  $\rightarrow$  A and A  $\rightarrow$  U, are underlined in target mRNA sequences). A synthetic siRNA duplex (siGFP) targeting GFP mRNA was used as an irrelevant control. THP-1 cells were transiently transfected by nucleofection and thereafter transferred into pre-warmed complete maintenance medium and cultured as described before. To monitor the transfection efficiency, a fluorescein-tagged siRNA duplex was transfected in parallel and the transfection rate was evaluated by FACS and found >85 %.

#### *Statistical Analysis*

Results are representative of at least three independent experiments conducted with either monocytes-derived macrophages from distinct donors or different preparations of differentiated THP-1 cells. Data are presented as means  $\pm$  SD. Statistical significance of the differences between means was performed by one-way ANOVA or two-tailed Student's *t* test



using GraphPad Prism software. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## Results

### *CyPB induces signaling events and chemotaxis on human primary macrophages*

In previous studies, we demonstrated that CyPB is a chemoattractant factor for human peripheral blood CD4<sup>+</sup> T lymphocytes *via* a mechanism dependent on the activation of p44/p42 MAPK (20, 31). In the current study, we confirmed these findings with human macrophages and extended them to show that CyPB also activates the NF- $\kappa$ B pathway (Fig. 1). As expected, *in vitro* migration of macrophages was achieved at 10 nM, which was similar to the concentration required to induce a migratory response in T cells. Moreover, Western blot experiments demonstrated that p44/p42 MAPK were rapidly phosphorylated following stimulation with 50 nM CyPB, peaking at 15 min. Next, we showed that I- $\kappa$ B $\alpha$ , which is complexed to NF- $\kappa$ B and inhibits its nuclear translocation in resting cells, was rapidly phosphorylated and subsequently degraded following cell stimulation with CyPB. In parallel experiments, we found that NF- $\kappa$ B p65 was phosphorylated, thus confirming activation of the canonical transcription factor. In contrast, CyPB failed to activate p38 MAPK and JNK, at concentration giving a full activation of p44/p42 MAPK and NF- $\kappa$ B. Increasing the concentrations of CyPB to 500 nM had no more effect on the phosphorylation status of these kinases (data not shown). This is in agreement with our previous work showing that CyPB at physiological concentrations did not activate p38 MAPK and JNK in T lymphocytes (31).

### *CyPB does not induce the expression of TNF- $\alpha$ in macrophages*

Previous studies had reported that CyPA induced the production of inflammatory factors, such as TNF- $\alpha$ , from monocytes/macrophages (23-26). Hence, we investigated whether CyPB was capable of inducing a similar response. Unlike LPS used as positive control (10 ng/mL), we found that CyPB, at concentrations varying from 0.1 to 1000 nM, neither induced the expression of TNF- $\alpha$  (Fig. 2A) nor the production of TNF- $\alpha$  mRNA (Fig. 2B) from macrophages in culture. NF- $\kappa$ B activated by CyPB was functional, since CyPB was efficient in inducing luciferase activity in a luciferase assay carried out with a poly-NF- $\kappa$ B dependent reporter gene (Fig. 2C). Importantly, there was no major difference with the activation induced by LPS (10 ng/mL), indicating that CyPB was almost as efficient as LPS in activating the NF- $\kappa$ B pathway. We then analyzed the effect of CyPB on macrophages that

transiently expressed the TNF- $\alpha$  promoter linked to the luciferase gene. To this end, we used an adenoviral construct (Advp5'), which encodes for luciferase under the control of TNF- $\alpha$  gene promoter (30). As expected, LPS strongly induced luciferase activity in infected cells. In contrast, CyPB was not capable of enhancing transcription of the Advp5' construct (Fig. 2D). A weak luciferase activity could be noted at 6 h, but it was not statistically different from the constitutive activation of the reporter gene. Collectively, these data seemed to indicate that the signaling events elicited by CyPB were not sufficient to activate the TNF- $\alpha$  promoter.

The promoter of the gene encoding TNF- $\alpha$  has been studied in great detail. It contains five  $\kappa$ B binding elements, which can be transactivated by NF- $\kappa$ B p65/p50. Two of them are denoted  $\kappa$ B1 and  $\kappa$ B3 and are distinctly located at distal (-873 to -864 nt) and proximal (-98 to -89 nt) regions of the promoter, respectively. Others, termed  $\kappa$ B2,  $\xi$  and  $\kappa$ B2a sites, are clustered within a 39-nt segment located 598 nt upstream of the transcriptional start. The TNF- $\alpha$  also contains several binding elements for c-Jun. Notably, a CRE binding site, which is close to the  $\kappa$ B3 element (-106 to -99 nt), is critically required for the binding of c-Jun/ATF-2 complexes and consequent activation of TNF- $\alpha$  promoter (33-37). To investigate the effect of CyPB on the binding of transcription factors to the TNF- $\alpha$  promoter, we performed ChIP assays on nuclear fractions extracted from macrophages that had been stimulated for 1 h with 50 nM CyPB or 10 ng/mL LPS. We used three pairs of primers for amplification of the sequences containing  $\kappa$ B1,  $\kappa$ B3/CRE, or clustered  $\kappa$ B2,  $\xi$  and  $\kappa$ B2a sites (termed  $\kappa$ B2-2a). As expected, LPS stimulation of macrophages induced the binding of NF- $\kappa$ B p65 and c-Jun to the TNF- $\alpha$  gene promoter, as demonstrated by amplification of the sequences from DNA complexes that have been precipitated with anti-p65 and anti-c-Jun antibodies. Consistent with other studies (33, 36), the strongest binding of NF- $\kappa$ B p65 was observed at the sites  $\kappa$ B2-2a and  $\kappa$ B1. Following CyPB stimulation, the sequences containing  $\kappa$ B1 and  $\kappa$ B2-2a sites were also amplified, indicating that CyPB induced the binding of NF- $\kappa$ B to distal  $\kappa$ B sites. However, CyPB did not induce the binding of c-Jun to the CRE site of TNF- $\alpha$  promoter, and this was accompanied by a weak binding of NF- $\kappa$ B p65 to  $\kappa$ B3 site (Fig. 2E). In all cases, DNA amplification in negative controls, in which ChIP reaction was performed with irrelevant antibodies, was either undetectable or lower than the basal levels of DNA complexes in unstimulated macrophages, thus confirming the specificity of the method. Collectively, these data indicate that CyPB was not capable of transactivating the proximal TNF- $\alpha$  promoter in macrophages, thus giving a possible explanation for the non-production of the pro-inflammatory cytokine.

*CyPB reduces LPS-induced cytokine production from human primary macrophages*

Next, we have analyzed the ability of CyPB to modulate the expression of other cytokines and chemokines by measuring the secretion of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, CXCL8/IL-8 and CCL5/RANTES from human macrophages in culture (Fig. 3). By comparison with LPS, CyPB induced a low but significant production of IL-6 from macrophages ( $0.32 \pm 0.16$  ng/mL with 50 nM CyPB,  $p < 0.05$ , versus  $4.56 \pm 0.42$  ng/mL with 10 ng/mL LPS,  $p < 0.001$ ;  $n = 6$ ). However, CyPB was not capable of inducing the production of other LPS-inducible inflammatory factors.

We then addressed the possibility that CyPB could modulate the inflammatory responses in activated macrophages. In the first experiments, the production of cytokines and chemokines in cells stimulated with CyPB alone or co-stimulated with LPS was compared. The levels of inflammatory proteins secreted in culture supernatants were not significantly modified, indicating that CyPB did not synergize with LPS to increase the expression of these cytokines (Fig. 3). Surprisingly, we found that a 16 h pretreatment with CyPB greatly decreased LPS-induced production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL8/IL-8 and CCL5/RANTES. The inhibitory effect of CyPB was not general, since LPS-induced production of IL-6 and IL-10 was not significantly reduced in CyPB-treated cells (Fig. 3). Collectively, these data support the hypothesis that CyPB down-regulates a pro-inflammatory pathway that is commonly involved in the expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL8/IL-8 and CCL5/RANTES, but not IL-6 and IL-10.

*CyPB attenuates LPS-induced expression of TNF- $\alpha$  by a transcriptional mechanism*

To investigate the mechanisms by which CyPB down-regulates the expression of pro-inflammatory cytokines, we next focused our studies on the expression of TNF- $\alpha$ . In a time-course experiment, a significant decrease in TNF- $\alpha$  production was observed after 4 h pretreatment with CyPB ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$ ). Longer exposure of macrophages to CyPB (16 h) resulted in ~75 % decrease. As expected, CyPB-mediated attenuation of TNF- $\alpha$  production was concentration-dependent. A concentration of 15 nM was efficient in obtaining a 50 % decrease in LPS-induced TNF- $\alpha$  production ( $n = 3$ ,  $p < 0.01$ ), and maximal inhibition was reached at 50 nM of CyPB. Moreover, CyPB did not reduce cell viability at concentrations ranging from 0.5 to 500 nM, indicating that the dramatic loss in cytokine production was not due to cytotoxic effect (data not shown).

CyPB may inhibit TNF- $\alpha$  production by inhibiting LPS-induced signaling events or by interfering with one of the three following steps: mRNA transcription, protein translation or even secretion. To discriminate between these possibilities, we first analyzed the effect of CyPB on signaling pathways elicited by LPS in macrophages. In our hands, LPS-induced activation of p38 MAPK, JNK or p44/p42 MAPK was not significantly altered by a 16 h pretreatment with CyPB. A weak difference in the extent of phosphorylation of p38 was observed. However, this difference was trivial compared to the dramatic loss in the cytokine production from the same cells. CyPB was also unable to inhibit I- $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, degradation and/or resynthesis, and neither was LPS-dependent phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 (Fig. 4). This strongly suggests that CyPB does not attenuate TNF- $\alpha$  production by inhibiting one of the signaling pathways that are activated by exposure of macrophages to LPS.

Using real-time RT-PCR, we next analyzed the expression of TNF- $\alpha$  at the mRNA level in primary macrophages and differentiated THP-1 cells. In the absence of CyPB, LPS rapidly and transiently induced the expression of TNF- $\alpha$  mRNA in both cell types (Fig. 5A). Pretreatment of cells with CyPB strongly reduced the transcription of TNF- $\alpha$  induced by LPS. After one hour of LPS stimulation, the levels of transcription were reduced by ~75% and ~90% in THP-1 cells and primary macrophages, respectively (Fig. 5A). This was highly correlated with the inhibition of cytokine production (~75% in both cell types), thus supporting the idea that CyPB likely acts at the transcriptional level (Fig. 5B). To test this hypothesis, macrophages and THP-1 cells were infected with adenoviral construct Advp5' at the m.o.i. 40:1, as previously described (30). As expected, LPS activation of the reporter gene resulted in a potent stimulation of luciferase activity in both cell types. The kinetics of luciferase activity and TNF- $\alpha$  production followed similar profiles, with maximal expression reached after 4 h of stimulation with LPS. Advp5' virus-infected cells were then pretreated with CyPB for 16 h and luciferase activity was assayed. In both cell types, CyPB inhibited luciferase activity by ~75% in comparison to controls (Fig. 5C), which was identical to the extent of inhibition of TNF- $\alpha$  production. This indicates that the inhibitory activity of CyPB on the reporter gene and the endogenous gene are similar, thus supporting the hypothesis that transcriptional control of TNF- $\alpha$  gene promoter is the target of CyPB. These results also validate the use of the immortalized cell line THP-1 for further mechanistic studies.

### *CyPB induces the expression of Bcl-3*

Because CyPB down-regulates the activation of TNF- $\alpha$  gene promoter without interfering with LPS-induced signaling pathways, we focused our investigation on the expression of inducible factors that act downstream by inhibiting TNF- $\alpha$  synthesis at the transcriptional level. Among them, Bcl-3 was reported to negatively regulate TNF- $\alpha$  expression in macrophages by enhancing the binding of NF- $\kappa$ B p50 homodimer to  $\kappa$ B elements on the TNF- $\alpha$  gene promoter, thus inhibiting the transcriptional activity of canonical NF- $\kappa$ B p65/p50 heterodimer (3-5). Using real-time RT-PCR and Western blot, we showed that CyPB effectively induced the expression of Bcl-3 in primary macrophages and THP-1 cells. In both cell types, the expression of Bcl-3 mRNA peaked at 4-6 h and decreased thereafter to return to basal levels by 16 h. As expected, Bcl-3 was immunostained in samples from cells stimulated with CyPB, but contrary to its mRNA, the high level of the protein persisted at later time points (8-16 h) (Fig. 6A). Therefore, it seems that CyPB induced signaling events that not only induced the expression of Bcl-3 but also stabilized the protein.

To investigate whether CyPB-induced accumulation of Bcl-3 could be related to the down-regulation of TNF- $\alpha$  gene expression, we performed ChIP assays on nuclear fractions extracted from cells pretreated with CyPB and thereafter stimulated with LPS (Fig. 6B). In absence of CyPB, LPS stimulation induced the binding of NF- $\kappa$ B p65 and p50 to  $\kappa$ B sites of TNF- $\alpha$  gene promoter. As expected, antibody to Bcl-3 did not allow immunoprecipitation of any DNA complexes. In contrast to cells treated with LPS only, CyPB pretreatment critically suppressed LPS-induced binding of NF- $\kappa$ B p65 to  $\kappa$ B sites, as shown by the strong decrease in amplification of sequences targeted by anti-p65 antibody. Conversely, the three sequences were amplified following immunoprecipitation with anti-p50 and anti-Bcl-3 antibodies. Moreover, the relative patterns of amplification of DNA sequences were similar to those obtained in absence of CyPB, thus indicating that access of NF- $\kappa$ B p65 to the  $\kappa$ B sites was similarly repressed by Bcl-3 (Fig. 6B).

### *Silencing the expression of Bcl-3 reduced the inhibitory effect of CyPB*

To gain evidence into the relationships between expression of Bcl-3 and inhibition of LPS-induced production of TNF- $\alpha$ , we used a model based on RNA interference in THP-1 cells. First, we checked that treatment of cells with either irrelevant siRNA (siGFP) or negative control siRNA, in which two nucleotides have been changed from the target sequence, did not induce any decrease in the expression of Bcl-3 induced by CyPB (data not

shown). In contrast, cell treatment with specific siRNA (termed siBcl-3) resulted in a significant decrease in Bcl-3 expression at the mRNA and protein levels (~80 % of inhibition by comparison with negative control siRNA) (Fig. 7A). We next analyzed whether silencing the expression of Bcl-3 led to a consequent decrease in the inhibitory activity of CyPB. In cells treated with negative control siRNA, CyPB potently reduced LPS-induced expression of TNF- $\alpha$  mRNA, indicating that the transfection procedure had not modified cell responsiveness. The same experiment was then reproduced with specific siRNA. As expected, cell treatment with CyPB had a poor inhibitory effect on TNF- $\alpha$  expression in LPS-stimulated cells. After one hour of LPS stimulation, the expression of TNF- $\alpha$  mRNA was only reduced by 25 % in siBcl-3 transfected cells compared to the 75 % inhibition obtained in samples from cells transfected with negative control siRNA (Fig. 7B). Finally, we analyzed the effect of silencing Bcl-3 in THP-1 cells infected with the adenoviral vector Advp5'. As expected, treatment with negative control siRNA did not modify cell responsiveness, since LPS-induced luciferase activity was strongly reduced following a 16 h-incubation with CyPB. In contrast, siBcl-3 treatment resulted in a dramatic loss in the activity of CyPB. Indeed, a modest inhibition of LPS-induced luciferase activity was observed in treated cells, thus confirming that knockdown of Bcl-3 has restored the capability of LPS to activate TNF- $\alpha$  gene promoter in the presence of CyPB (Fig. 7C). Altogether, these results clearly demonstrate that CyPB reduced TNF- $\alpha$  expression in LPS-stimulated macrophages *via* a transcriptional mechanism dependent on the expression of Bcl-3.

*CyPA is not efficient to reduce LPS-induced TNF- $\alpha$  production from macrophages*

It has been reported that CyPA induces chemotaxis and activation of p44/p42 MAPK and NF- $\kappa$ B pathways in monocytes/macrophages (26). Consequently, our results suggest that both CyPA and CyPB may induce the same responses in macrophages. To test this hypothesis, we analyzed the effect of CyPA on the expression of TNF- $\alpha$  by macrophages. In our hands, CyPA was not more efficient than CyPB to induce the expression of the pro-inflammatory cytokine (data not shown). Similarly to what we described for CyPB, we then investigated whether CyPA could modulate the production of TNF- $\alpha$  from LPS-activated macrophages. To this end, macrophages from the same individuals were pretreated for 16 h with various concentrations of CyPA or CyPB before LPS stimulation. As described above, maximal inhibition of LPS-induced secretion of TNF- $\alpha$  was reached at 50 nM of CyPB. In contrast, a 10-fold higher concentration of CyPA was required to induce only a modest

reduction in TNF- $\alpha$  production (~15%) compared with cells treated with LPS alone (Fig. 8A).

Next, we analyzed the effect of CyPA on the expression of Bcl-3 at the mRNA and protein levels. As shown in Fig. 8B, CyPA induced a transient expression of Bcl-3 mRNA, although less than CyPB. Moreover, Bcl-3 was immunostained in samples from cells stimulated with CyPA, but the protein level peaked at 4 h and rapidly returned to basal level by 8 h of treatment, suggesting that it was rapidly degraded following its expression (Fig. 8C). To confirm these results, we performed ChIP assays with Bcl-3 and NF- $\kappa$ B in LPS-stimulated macrophages that have been pretreated with either CyPA or CyPB (Fig. 8D). A 4 h-pretreatment resulted in ~ 50 % reduction in the binding of NF- $\kappa$ B p65 compared to LPS alone, and this was accompanied by an enhanced binding of Bcl-3 to  $\kappa$ B sites, thus suggesting a competition for the same DNA sequences. But unlike CyPB, a 16-h pretreatment with CyPA had no inhibitory effect on the binding of NF- $\kappa$ B p65 to  $\kappa$ B sites, and the three sequences were not amplified any more following immunoprecipitation with anti-Bcl-3 antibodies. Collectively, these results indicate that CyPA was inefficient in sustaining a high expression of Bcl-3 in macrophages, which is a possible explanation for the inability to reduce the production of TNF- $\alpha$  to a similar extent than CyPB.

## Discussion

Previous studies have reported that CyPA acts as a potent chemoattractant to monocytes/macrophages and induces the activation of p44/p42 MAPK and NF- $\kappa$ B pathways (14, 24-26). Data concerning the effect on CyPA on cytokine production are, however, more contradictory. A first study reported that it could induce the production of high levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  or RANTES from monocytes/macrophages (23). Otherwise, more recent works have casted doubt on these findings, since CyPA preparations substantially free of endotoxin failed to induce the expression of TNF- $\alpha$  and other pro-inflammatory factors. A low production of IL-6 and/or IL-8 was however reported, but the levels of secreted cytokines were not comparable to those obtained after stimulation by TLR agonists (24-26). Although CyPB is also secreted by inflammatory stimuli (16, 17), its contribution to the responses of macrophages has not been addressed. In the current work, we confirmed that CyPB induces a migratory response in macrophages and activates p44/p42 MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. We also found that CyPB does not induce the production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, CXCL8/IL-8 and CCL5/RANTES from human macrophages in culture. We observed a low production of

IL-6 from CyPB-stimulated macrophages, which was not however comparable to that obtained with LPS.

It is important to note that CyPB is constitutively secreted in the extracellular matrix, from which it can be released by the action of activated MMPs (17). This observation suggested that CyPB could participate in the regulation of tissue inflammation. Therefore, we investigated whether macrophage exposure to CyPB could modulate the production of inflammatory factors. Although CyPB did not modify the response of LPS-stimulated macrophages when added simultaneously, a 16 h-pretreatment with CyPB prior the addition of LPS efficiently decreased the production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL8/IL-8 and CCL5/RANTES from the same cells. Moreover, the inhibitory effect appeared to target the expression of specific pro-inflammatory mediators, because the production of IL-6 and IL-10 was not affected by CyPB. These findings raised the intriguing possibility that, in addition to inducing a migratory response in macrophages, CyPB may also act as an anti-inflammatory factor and mediate tolerance to cells that were exposed to pro-inflammatory stimuli.

The expression of TNF- $\alpha$  requires phosphorylation and degradation of I- $\kappa$ B as well as activation of p44/42 MAPK, JNK and p38 MAPK, which ultimately leads to the activation of transcription factors such as NF- $\kappa$ B, ATF-2 and c-Jun. These factors have been shown to functionally cooperate with each other for the recruitment of coactivators and efficient gene transcription (33-35, 37). We demonstrated here that NF- $\kappa$ B activated by CyPB was functional. However, CyPB was unable to activate JNK and p38 MAPK in macrophages. Consistent with these results, our ChIP experiments showed that c-Jun did not bind to the TNF- $\alpha$  promoter in CyPB-treated macrophages. This may explain why CyPB was unable to induce the expression of TNF- $\alpha$ , and possibly other pro-inflammatory cytokines and chemokines that have NF- $\kappa$ B and c-Jun binding sites in their promoters in a similar configuration to the TNF- $\alpha$  promoter. Importantly, other studies also reported that CyPA did not induce the activation of p38 MAPK and JNK pathways in responsive cells (15, 31, 32). Hence, our current work extends previous studies to demonstrate that, besides stimulating monocytes/macrophages chemotaxis, extracellular CyPA and CyPB may induce a low production of specific cytokines, *e.g.* IL-6, without leading to a generalized production of pro-inflammatory mediators.

TNF- $\alpha$  produced by TLR-dependent activation of monocytes/macrophages is usually considered to be a key driver of the subsequent inflammation. Although beneficial in protecting the host from infection or injury secretion, the production of this pro-inflammatory



mediator must be tightly regulated to avoid deleterious effects. This regulation may be achieved by inhibition of TLR-dependent signaling events, mRNA transcription, protein translation or secretion. Here, we have studied in depth the mechanisms by which CyPB attenuated the production of TNF- $\alpha$  from LPS-stimulated macrophages and our findings strongly suggest a transcriptional mechanism of inhibition. First, 16 h pretreatment of macrophages with CyPB did not significantly affect the LPS-induced activation of MAPK and NF- $\kappa$ B pathways in macrophages. Second, LPS-induced expression of TNF- $\alpha$  mRNA was strongly reduced in cells that were exposed to CyPB, which correlated with the inhibition of the cytokine production. Finally, LPS activation of a reporter gene under the control of TNF- $\alpha$  gene promoter was strongly inhibited in cells that have been treated with CyPB. A number of cellular processes could inhibit transcriptional induction of pro-inflammatory protein gene expression. However, the demonstration that efficient inhibition of TNF- $\alpha$  production required a long-term exposure to CyPB prior LPS-stimulation was suggestive of a mechanism that requires the expression of an inducible inhibitory factor. Previous studies have reported that the action of many regulatory mediators, including IL-4, IL-9, IL-10 or adiponectin, was dependent, at least in part, on the induction of Bcl-3 (6, 7, 38, 39). As expected, we found that Bcl-3 was highly expressed in macrophages that were stimulated with CyPB and remained present at high levels even after 16 h of stimulation. Although Bcl-3 is a member of the I- $\kappa$ B family of NF- $\kappa$ B inhibitors, it does not interact with canonical NF- $\kappa$ B heterodimers in the cytosol, but rather accumulates in association with p50 or p52 homodimers in the nucleus. Notably, Bcl-3 was reported to negatively regulate the expression of pro-inflammatory cytokines by enhancing the binding of inhibitory NF- $\kappa$ B p50 dimers to  $\kappa$ B sites on target gene promoters (1-6, 38). Consistent with this, we found that expression of Bcl-3 was related to an inhibition of NF- $\kappa$ B p65 binding to the TNF- $\alpha$  gene promoter. These data strongly support the hypothesis that CyPB inhibits LPS-induced TNF- $\alpha$  expression by a transcriptional mechanism, in which Bcl-3 associates with NF- $\kappa$ B p50 homodimers and forms inhibitory complexes with high affinity to  $\kappa$ B sites. Interestingly, other studies have reported on the absence of repressive effect of Bcl-3 on the expression of IL-6 and IL-10 (5, 6). This may explain our finding that CyPB also reduced the expression of IL-1 $\beta$ , CXCL8/IL-8 and CCL5/RANTES, whereas it had no significant effect on the production of IL-6 and IL-10 from LPS-activated macrophages.

Both CyPA and CyPB interact with the same signaling receptor, *i.e.* CD147, which leads to the activation of common signaling pathways in responsive cells (10, 19, 20).

Although most, if not all, responses triggered by CyPA can also be induced by CyPB, we demonstrated here that CyPA was not efficient in attenuating the production of TNF- $\alpha$  from LPS-stimulated macrophages. These findings were not surprising, since we previously reported that, in contrast to CyPA, CyPB is capable to induce adhesion of T lymphocytes and monocytes/macrophages to fibronectin, a mechanism dependent on the activation of  $\beta$ 1 integrins. We also demonstrated that CyPB is a high-affinity ligand for cell surface proteoglycans and that this interaction is required to induce sustained signaling and consequent activation of integrins (20, 31). In the current work, we showed that both cyclophilins induced the expression of Bcl-3. However, CyPA was not capable of sustaining a high level of expression of Bcl-3. It has been reported that the activity of Bcl-3 is tightly regulated by phosphorylation and polyubiquitination (40). Consistent with these observations, our results support the hypothesis that CyPB likely induced sustained and/or complementary signaling events that post-translationally regulate Bcl-3, in addition to inducing its expression. Further investigations are currently in progress to validate this model and to identify the underlying mechanisms responsible for the induction and subsequent accumulation of Bcl-3 in CyPB-treated macrophages.

Our findings on a potential anti-inflammatory effect of CyPB are intriguing, since extracellular cyclophilins are commonly described as pro-inflammatory factors (10). However, other studies have already reported that numerous mediators, primarily identified for their pro-inflammatory properties, may also display anti-inflammatory action towards LPS-stimulated macrophages. As example, chemerin is a potent chemoattractant factor for immature DC, macrophages and NK cells (41). It was also reported to strongly reduce inflammatory responses of macrophages induced by LPS stimulation, thus indicating that CyPB and chemerin share common properties. Cyclophilins have also been reported to induce the expression of MMPs (23-26). These enzymes are commonly associated with acute inflammation, in which they are required for the degradation of ECM and establishment of a chemotactic gradient for infiltrating leukocytes. However, several lines of evidence have illustrated their involvement in remodeling of collagens and cell proliferation, which is a key part of the resolution of inflammation and tissue repair (42). Besides its role in MMP regulation, our study suggests another participation of CyPB to all the phases of inflammation. Indeed, it can act as a potent chemoattractant to monocytes/macrophages during the acute phase of inflammation, and participate later to resolution, by attenuating the production of pro-inflammatory factors from activated macrophages.

In conclusion, our findings demonstrate that CyPB may control macrophage activation by attenuating the production of inflammatory factors, thus highlighting an unexpected anti-inflammatory activity. Complete comprehension of the mechanisms by which CyPB regulates the responses of macrophages will allow for understanding its contribution to the different phases of inflammation.

### Acknowledgements

We are grateful to Brian Foxwell for providing us the adenoviral vector encoding the luciferase reporter gene under control of human TNF- $\alpha$  gene promoter. We thank Christophe Vanpouille and Amy Padre for critical reading of the manuscript.

### References

1. McKeithan, T.W., H. Ohno, and M.O. Diaz. 1990. Identification of a transcriptional unit adjacent to the breakpoint in the 14;19 translocation of chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1: 247-255
2. Simmonds, R.E., and B.M. Foxwell. 2008. Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 47: 584-590
3. Watanabe, N., T. Iwamura, T. Shinoda, and T. Fujita. 1997. Regulation of NFKB1 proteins by the candidate oncoprotein BCL-3: generation of NF-kappaB homodimers from the cytoplasmic pool of p50-p105 and nuclear translocation. *EMBO J.* 16: 3609-3620
4. Cao, S, X. Zhang, J.P. Edwards, and D.M. Mosser. 2006. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* 281: 26041-26050
5. Wessells, J., M. Baer, H.A. Young, E. Claudio, K. Brown, U. Siebenlist, and P.F. Johnson. 2004. BCL-3 and NF-kappaB p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages. *J. Biol. Chem.* 279: 49995-50003
6. Kuwata, H, Y. Watanabe, H. Miyoshi, M. Yamamoto, T. Kaisho, K. Takeda, and S. Akira. 2003. IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages. *Blood* 102: 4123-4129
7. Büchau, A.S., D.T. McLeod, S. Morizane, P.F. Kotel, T. Hata, and R.L. Gallo. 2009. Bcl-3 acts as an innate immune modulator by controlling antimicrobial responses in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 129: 2148-2155
8. Handschumacher, R.E., M.W. Harding, J. Rice, R.J. Drugge, and D.W. Speicher. 1984. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226: 544-547
9. Schiene, C., and G. Fischer. 2000. Enzymes that catalyse the restructuring of proteins.

10. Yurchenko, V., S. Constant, E. Eisenmesser, and M. Bukrinsky. 2010. Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clin. Exp. Immunol.* 160: 305-317
11. Billich, A., G. Winkler, H. Aschauer, A. Rot, and P. Peichl. 1997. Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 185: 975-980
12. Tegeder, I., A. Schumacher, S. John, H. Geiger, G. Geisslinger, H. Bang, and K. Brune. 1997. Elevated serum cyclophilins levels in patients with severe sepsis. *J. Clinical Immunol.* 17: 380-386
13. Satoh, K., T. Matoba, J. Suzuki, M.R. O'Dell, P. Nigro, Z. Cui, A. Mohan, S. Pan, L. Li, Z.G. Jin, C. Yan, J. Abe, and B.C. Berk. 2008. Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 117: 3088-3098.
14. Sherry, B., N. Yarlett, A. Strupp, and A. Cerami. 1992. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 3511-3515
15. Jin, Z.G., M.G. Melaragno, D.F. Liao, C. Yan, J. Haendeler, Y.A. Suh, J.D. Lambeth, and B.C. Berk. 2000. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ. Res.* 87: 789-796
16. Gonzalez-Cuadrado, S., C. Bustos, M. Ruiz-Ortega, A. Ortiz, C. Guijarro, J.J. Plaza, and J. Egido. 1996. Expression of leucocyte chemoattractants by interstitial renal fibroblasts: up-regulation by drugs associated with interstitial fibrosis. *Clin. Exp. Immunol.* 106: 518-522
17. De Ceuninck, F., F. Allain, A. Caliez, G. Spik, and P.M. Vanhoutte. 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
18. Fearon, P., A.A. Lonsdale-Eccles, O.K. Ross, C. Todd, A. Sinha, F. Allain, and N.J. Reynolds. 2011. Keratinocyte secretion of cyclophilin B via the constitutive pathway is regulated through its cyclosporin-binding site. *J. Invest. Dermatol.* 131: 1085-1094
19. Yurchenko, V., M. O'Connor, W.W. Dai, H. Guo, B. Toole, B. Sherry, and M. Bukrinsky. 2001. CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 786-788
20. Allain, F., C. Vanpouille, M. Carpentier, M.-C. Slomianny, S. Durieux, and G. Spik. 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
21. Arora, K., W.M. Gwinn, M.A. Bower, A. Watson, I. Okwumabua, H.R. MacDonald, M.I. Bukrinsky, and S.L. Constant. 2005. Extracellular cyclophilins contribute to the

- regulation of inflammatory responses. *J. Immunol.* 175: 517-522
22. Gwinn, W.M., 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, and S.L. Constant. 2006. Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention. *J. Immunol.* 177: 4870-4879
  23. Kim, H., W.J. Kim, S.T. Jeon, E.M. Koh, H.S. Cha, K.S. Ahn, and W.H. Lee. 2005. Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages. *Clin. Immunol.* 116: 217-224
  24. Payeli, S.K., C. Schiene-Fischer, J. Steffel, G.G. Camici, I. Rozenberg, T.F. Lüscher, and F.C. Tanner. 2008. Cyclophilin A differentially activates monocytes and endothelial cells: role of purity, activity, and endotoxin contamination in commercial preparations. *Atherosclerosis* 197: 564-571
  25. Wang, L., C.H. Wang, J.F. Jia, X.K. Ma, Y. Li, H.B. Zhu, H. Tang, Z.N. Chen, and P. Zhu. 2010. Contribution of cyclophilin A to the regulation of inflammatory processes in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Immunol.* 30: 24-33
  26. Yuan, W., H. Ge, and B. He. 2010. Pro-inflammatory activities induced by CyPA-EMMPRIN interaction in monocytes. *Atherosclerosis* 213: 415-421
  27. Spik, G., B. Haendler, O. Delmas, C. Mariller, M. Chamoux, P. Maes, A. Tartar, J. Montreuil, K. Stedman, H.P. Kocher, R. Keller, P.C. Hiestand, and N.R. Movva. 1991. A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *J. Biol. Chem.* 266: 10735-10738
  28. Melchior, A., A. Denys, A. Deligny, J. Mazurier, and F. Allain. 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
  29. Deligny, A., A. Denys, A. Marcant, A. Melchior, J. Mazurier, T.H. van Kuppevelt, and F. Allain. 2010. Synthesis of heparan sulfate with cyclophilin B-binding properties is determined by cell type-specific expression of sulfotransferases. *J. Biol. Chem.* 285: 1701-1715
  30. Denys, A., I.A. Udalova, C. Smith, L.M. Williams, C.J. Ciesielski, J. Campbell, C. Andrews, D. Kwaitkowski, and B.M. Foxwell. 2002. Evidence for a dual mechanism for IL-10 suppression of TNF-alpha production that does not involve inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase or NF-kappa B in primary human macrophages. *J. Immunol.* 168: 4837-4845
  31. Pakula, R., A. Melchior, A. Denys, C. Vanpouille, J. Mazurier, and F. Allain. 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
  32. Yurchenko, V., G. Zybarth, M. O'Connor, W.W. Dai, G. Franchin, T. Hao, H. Guo, H.C. Hung, B. Toole, P. Gallay, B. Sherry, and M. Bukrinsky. 2002. Active site residues of

- cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J. Biol. Chem.* 277: 22959-22965
33. Udalova, I.A., J.C. Knight, V. Vidal, S.A. Nedospasov, and D. Kwiatkowski. 1998. Complex NF-kappaB interactions at the distal tumor necrosis factor promoter region in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 21178-21186
  34. Liu, H., P. Sidiropoulos, G. Song, L.J. Pagliari, M.J. Birrer, B. Stein, J. Anrather, and R.M. Pope. 2000. TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta. *J. Immunol.* 164:4277-4285
  35. Tsai E.Y., J.V. Falvo, A.V. Tsytsykova, A.K. Barczak, A.M. Reimold, L.H. Glimcher, M.J. Fenton, D.C. Gordon, I.F. Dunn, and A.E. Goldfeld. 2000. A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 20: 6084-6094
  36. Udalova, I.A., A. Richardson, A. Denys, C. Smith, H. Ackerman, B. Foxwell, and D. Kwiatkowski. 2000. Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promoter region. *Mol. Cell. Biol.* 20: 9113-9119
  37. Guha, M., and N. Mackman. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 13: 85-94
  38. Richard, M., J. Louahed, J.B. Demoulin, and J.C. Renauld. 1999. Interleukin-9 regulates NF-kappaB activity through BCL3 gene induction. *Blood* 93: 4318-4327
  39. Folco, E.J., V.Z. Rocha, M. López-Illasaca, and P. Libby. 2009. Adiponectin inhibits pro-inflammatory signaling in human macrophages independent of interleukin-10. *J. Biol. Chem.* 284:25569-25575
  40. Keutgens, A., X. Zhang, K. Shostak, I. Robert, S. Olivier, A. Vanderplasschen, J.P. Chapelle, P. Viatour, M.P. Merville, F. Bex, A. Gothot, and A. Chariot. 2010. Bcl-3 degradation involves its polyubiquitination through a FBW7-independent pathway and its binding to the proteasome subunit PSMB1. *J. Biol. Chem.* 285: 25831-25840
  41. Luangsay, S., V. Wittamer, B. Bondue, O. De Henau, L. Rouger, M. Brait, J.D. Franssen, P. de Nadai, F. Huaux, and M. Parmentier. 2009. Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model. *J. Immunol.* 183: 6489-6499
  42. Gill, S.E., and W.C. Parks. 2008. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40:1334-1347

## Footnotes

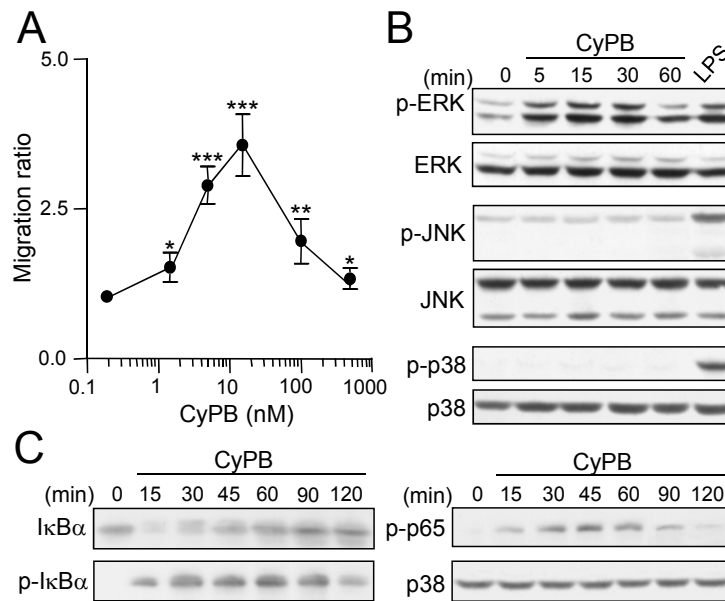
<sup>1</sup>This investigation was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Université des Sciences et Technologies de Lille, France.

<sup>2</sup>Current address: Laboratory of Glycobiology and Developmental Genetics, University of Leuven, Leuven, Belgium.

<sup>3</sup>Current address: Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Uppsala, Sweden.

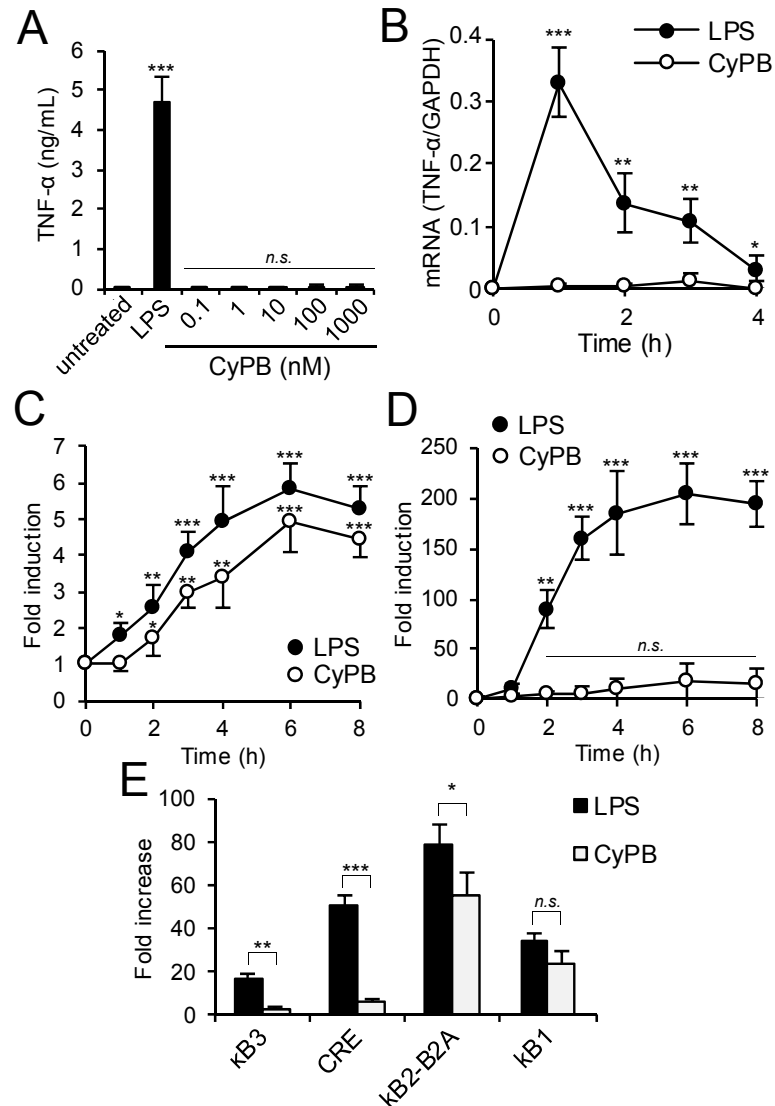
<sup>4</sup>Address correspondence and reprint requests to Dr. Fabrice Allain, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel: 33-3-20-33-72-39; Fax: 33-3-20-43-65-55. E-mail address: [fabrice.allain@univ-lille1.fr](mailto:fabrice.allain@univ-lille1.fr)

<sup>5</sup>Abbreviations used in this paper: Bcl-3, B-cell leukemia-3; ChIP, chromatin immunoprecipitation; CyPA, cyclophilin A; CyPB, cyclophilin B; MMPs, matrix metalloproteinases, m.o.i., optimal multiplicity of infection; siRNA, small-interfering RNA.



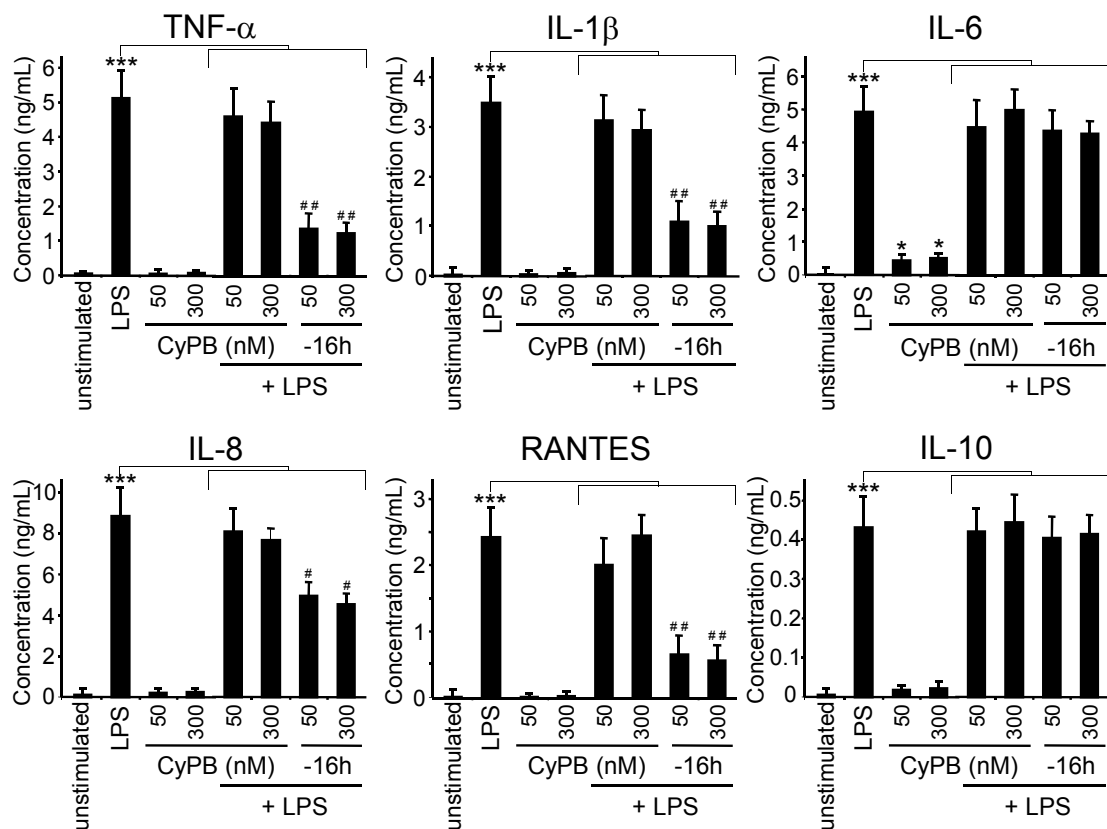
**FIGURE 1.** CyPB induces migration of macrophages and activation of p44/p42 MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. *A*, The chemotactic response of monocyte-derived macrophages was expressed as the number of cells migrating toward the indicated concentrations of CyPB divided by the number of cells migrating toward culture medium. Data represent means  $\pm$  SD of triplicate obtained with macrophages from a single individual and are representative of three experiments conducted with cells of different donors. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . *B*, Macrophages were stimulated in the presence of 50 nM CyPB for the indicated times. Cell lysates were then subjected to Western blotting for phospho-p44/p42 MAPK (p-ERK), phospho-JNK (p-JNK) or phospho-p38 MAPK (p-p38). Parallel immunoblotting with anti-total ERK, JNK and p38 confirmed equal loading of samples. *C*, CyPB-induced activation of NF- $\kappa$ B pathway was analyzed by measuring modifications in the levels of total I- $\kappa$ B, phospho-I- $\kappa$ B (p-I $\kappa$ B) and phospho-NF- $\kappa$ B p65 (p-p65). Total p38 was used as a loading control. In each case, experiments were performed with monocyte-derived macrophages from three different individuals with comparable results.



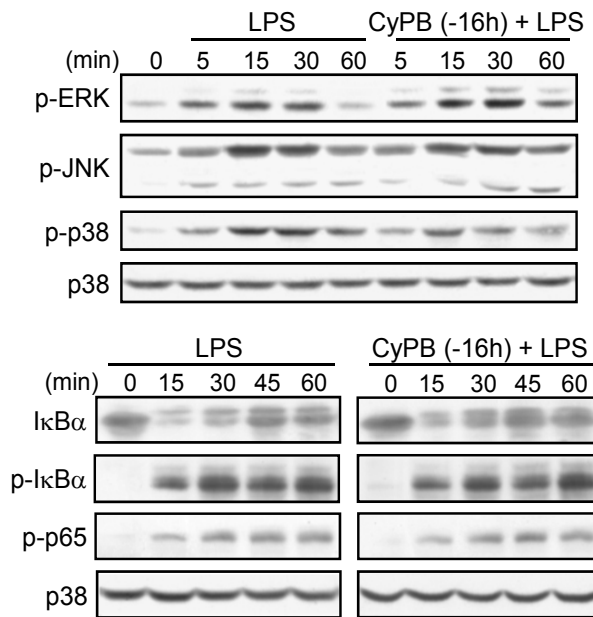


**FIGURE 2.** CyPB does not induce the expression of TNF- $\alpha$  in macrophages. *A*, Monocyte-derived macrophages were treated with the indicated concentrations of CyPB or 10 ng/mL LPS. TNF- $\alpha$  production was assessed by ELISA in culture supernatant after 4 h of incubation. Results represent means  $\pm$  SD of triplicate obtained with cells from a single individual and are representative of three separate experiments. *B*, Macrophages were treated with 10 ng/mL LPS (●) or 50 nM CyPB (○). At the indicated times, the level of TNF- $\alpha$  mRNA was measured by qPCR. Relative transcript abundance was normalized to endogenous control GAPDH mRNA. Data are means  $\pm$  SD from triplicates and are representative of at least three experiments performed independently. *C*, Macrophages were transfected with the pNF- $\kappa$ B-luc construct or *D*, infected with the Advp5' vector, and thereafter stimulated with 10 ng/mL LPS (●) or 50 nM CyPB (○). At the indicated times, cells were harvested and prepared for analysis of luciferase activity. The luciferase data, normalized to protein content, are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate and represent fold changes in test samples by

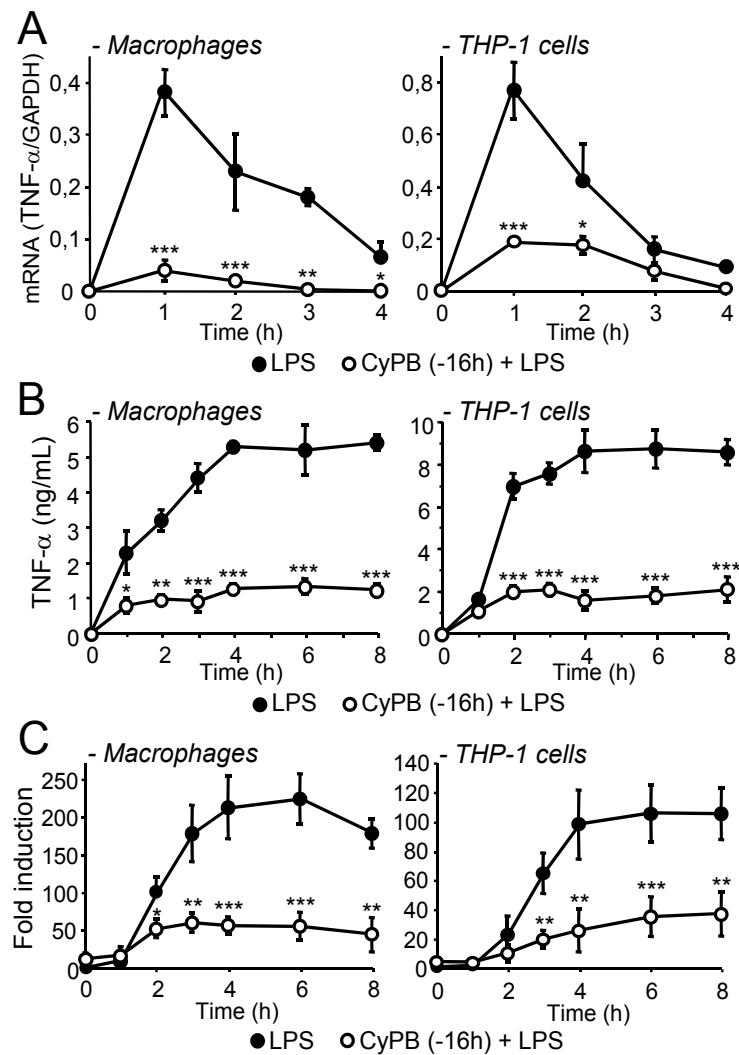
comparison with unstimulated cells. Results are representative of three separate experiments.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  versus untreated cells; *n.s.*, not significant. *E*, Macrophages were stimulated with LPS (10 ng/mL) or CyPB (50 nM) for 1 h, and the binding of NF- $\kappa$ B and c-Jun to the TNF- $\alpha$  promoter was assessed by ChIP. Following precipitation with antibodies to p65 or c-Jun, the relative binding of the transcription factors to *cis* binding elements (kB1, kB2-2a, kB3 and CRE) was assessed by qPCR of DNA fragments using TNF- $\alpha$  promoter specific primers. Data were normalized with the levels of *cis* elements present in the samples (input). Results are expressed as fold changes by comparison with unstimulated cells and are representative of three experiments.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ , significant difference between CyPB- and LPS-stimulated cells.



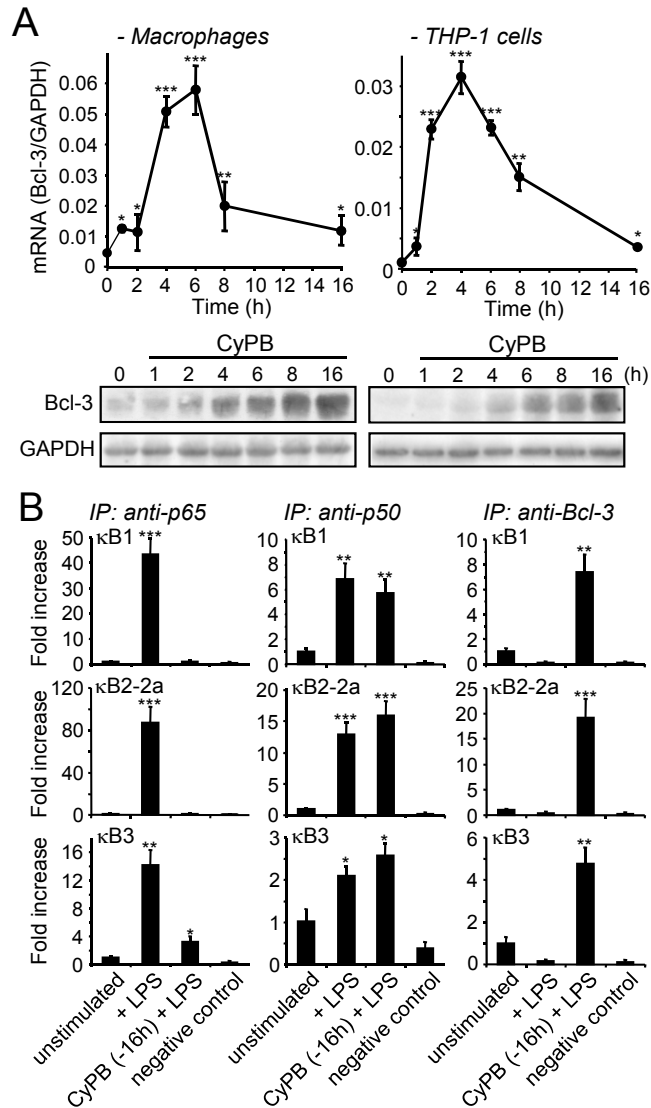
**FIGURE 3.** CyPB inhibits LPS-induced cytokine production from macrophages. Monocyte-derived macrophages were treated with the indicated concentrations of CyPB and subsequently stimulated or not with 10 ng/mL LPS. Cytokine/chemokine production was assessed by ELISA in culture supernatant after 4 h of incubation for TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and after 16 h of incubation for IL-6, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8 and IL-10. Each bar of the histograms represents mean  $\pm$  SD of triplicate obtained with cells from a single individual and results are representative from at least three separate experiments.  $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$  versus unstimulated cells;  $\#p < 0.05$ ,  $##p < 0.01$ , significant decrease compared with LPS alone.



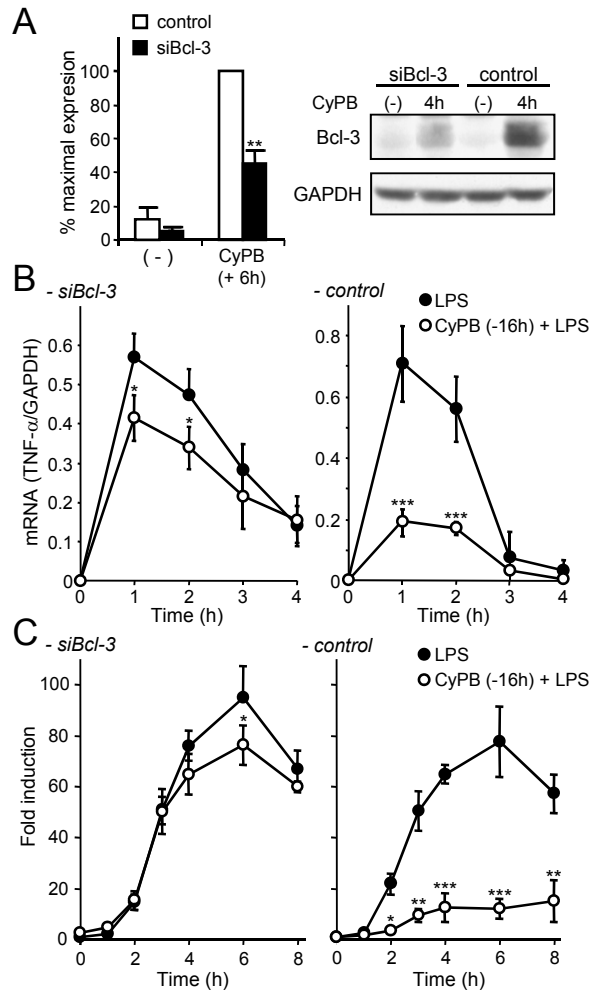
**FIGURE 4.** CyPB does not affect LPS-induced activation of signaling pathways. Monocyte-derived macrophages were either untreated or treated with 50 nM CyPB for 16 h and subsequently stimulated with 10 ng/mL LPS. At the indicated times, cell lysates were subjected to Western blotting for the phosphorylated forms of MAPK (p-ERK, p-JNK and p-p38), phosphorylated and total forms of I-κB, and phospho-NF-κB p65. Total p38 was used as a loading control. In each case, experiments were performed with macrophages from three different individuals with comparable results.



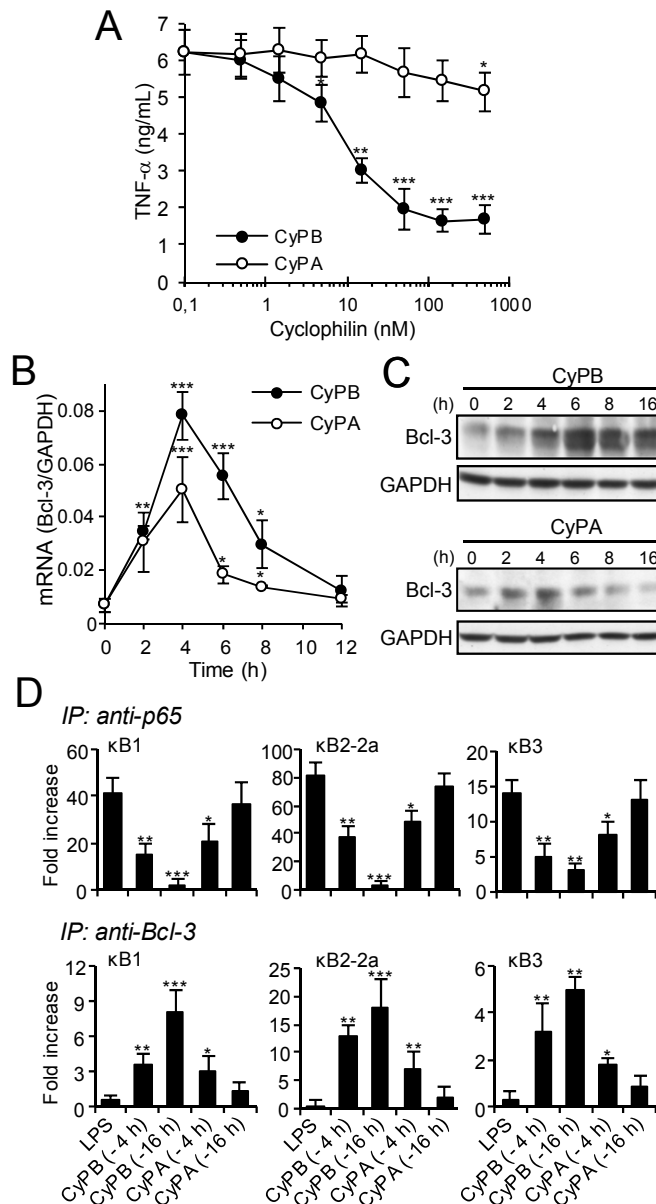
**FIGURE 5.** CyPB attenuates LPS-induced expression of TNF- $\alpha$  through inhibition of gene transcription. *A*, Monocyte-derived macrophages and THP-1 cells were either untreated ( $\bullet$ ) or treated with 50 nM CyPB ( $\circ$ ) for 16 h and subsequently stimulated with 10 ng/mL LPS. At the indicated times, the level of TNF- $\alpha$  mRNA was measured by RT-qPCR. Relative transcript abundance was normalized to endogenous control GAPDH mRNA. Data are means  $\pm$  SD from triplicates and are representative of at least three experiments performed independently. *B*, Supernatants from the same experiments were subjected to ELISA to determine TNF- $\alpha$  production. *C*, Macrophages and THP-1 cells were infected with the Advp5' vector. Following a subsequent 16 h-incubation without ( $\bullet$ ) or with ( $\circ$ ) 50 nM CyPB, infected cells were stimulated with 10 ng/mL LPS. At the indicated times, cells were prepared for analysis of luciferase activity. The luciferase data, normalized to protein content, are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate and represent fold changes in test samples by comparison with unstimulated cell samples. Results are representative of three separate experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , significant decrease compared with LPS alone.



**FIGURE 6.** CyPB induces the expression of Bcl-3. *A*, Monocyte-derived macrophages and THP-1 cells were stimulated with 50 nM CyPB. At the indicated times, cells were harvested and the relative abundance of mRNA for Bcl-3, normalized to endogenous control GAPDH, was measured by qPCR. In parallel experiments, whole cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunostained with antibody to Bcl-3. Western blot for GAPDH served as loading control. In each case, results are representative of at least three experiments performed independently. *B*, Untreated and CyPB-treated macrophages were stimulated with LPS (10 ng/mL) for 1 h and changes in the binding of NF- $\kappa$ B to specific sites on the TNF- $\alpha$  promoter was assessed by ChIP. Following precipitation with antibodies to p65, p50 or Bcl-3, the relative binding of transcription factors to kB elements (kB1, kB2-2a, kB3) was assessed by qPCR. Negative control samples incubated with irrelevant antibodies were represented. Results were normalized with the levels of kB elements present in the samples (input). Data are expressed as fold changes by comparison with unstimulated cells and are representative from three experiments conducted with macrophages of different individuals. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus untreated cells.



**FIGURE 7.** Bcl-3 deficiency affects CyPB-mediated attenuation of TNF- $\alpha$ . THP-1 cells were transfected with siRNA targeting mRNA for Bcl-3 (siBcl-3) or GFP (negative control), as described in “Materials and Methods”. *A*, Transfected cells were stimulated or not with 50 nM CyPB and the down-regulation of the expression of Bcl-3 was assessed by RT-qPCR and Western blot. Data are representative of at least three separate experiments. \*\* $p < 0.01$  versus negative control. *B*, siRNA-treated cells were either untreated (●) or treated with 50 nM CyPB (○) for 16 h and subsequently stimulated with 10 ng/mL LPS. At the indicated times, the level of TNF- $\alpha$  mRNA was measured by RT-qPCR. Relative transcript abundance was normalized to endogenous control GAPDH mRNA. Data are means  $\pm$  SD from triplicates from a single experiment and are representative of three performed independently. *C*, siRNA-treated cells were infected with the Advp5' vector and subsequently incubated without (●) or with (○) 50 nM CyPB for 16 h. Thereafter, infected cells were stimulated with 10 ng/mL LPS and luciferase activity was measured at the indicated times. The luciferase data, normalized to protein content, are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate and represent fold changes in test samples by comparison with unstimulated cells samples. Results are representative of three separate experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , significant decrease compared with LPS alone.



**FIGURE 8.** Comparison of the effects of CyPA and CyPB on LPS-induced expression of TNF- $\alpha$ . *A*, Monocyte-derived macrophages were treated with the indicated concentrations of CyPA ( $\circ$ ) or CyPB ( $\bullet$ ) for 16 h and subsequently stimulated with 10 ng/mL LPS. Supernatants were collected after 4 h of stimulation and the production of TNF- $\alpha$  was measured by ELISA. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate obtained with cells from the same individual and results are representative from three separate experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , significant decrease compared with LPS alone. *B*, Macrophages were treated with 50 nM CyPB ( $\bullet$ ) or CyPA ( $\circ$ ). At the indicated times, the level of Bcl-3 mRNA was measured by RT-qPCR. Relative transcript abundance was normalized to GAPDH mRNA. Data are means  $\pm$  SD from triplicates and are representative of three experiments performed independently. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus untreated

cells. *C*, Macrophages were stimulated with either CyPA or CyPB (both at 50 nM) for the indicated times. Whole cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunostained with antibody to Bcl-3. Western blot for GAPDH served as loading control. The experiment was performed with cells from three different individuals with comparable results. *D*, Macrophages were treated with CyPA or CyPB for 4 h or 16 h, and subsequently stimulated with LPS (10 ng/mL) for 1 h. Changes in the binding of NF- $\kappa$ B to the TNF- $\alpha$  promoter was assessed by ChIP with antibodies to p65 and Bcl-3. The relative binding of transcription factors to kB elements was assessed by qPCR. Results were normalized by the levels of kB elements present in the samples (input) and expressed as fold changes by comparison with unstimulated cells and are representative from three distinct experiments. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  versus LPS alone.





## Discussion

Les CyPA et CyPB sont depuis quelques années considérées comme des médiateurs de la réponse inflammatoire. En effet, elles sont sécrétées dans les milieux extracellulaires en réponse à des stimuli inflammatoires. Elles présentent une activité chimiotactile et induisent le recrutement de sous-populations leucocytaires sur le site de l'inflammation (Sherry *et al.*, 1992 ; Yurchenko *et al.*, 2001, 2002 ; Allain *et al.*, 2002). Plus récemment, ce rôle de médiateur inflammatoire a été renforcé par des travaux démontrant que la stimulation de monocytes/macrophages par la CyPA induit l'activation des voies p38 MAPK, JNK et NF- $\kappa$ B et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-8 ou encore l'IL-6 (Kim *et al.*, 2005). Par contre, les réponses induites par la CyPB sur ces cellules restaient peu connues et c'est dans ce contexte que nous avons entrepris de les étudier.

Les données présentes dans la littérature désignent le CD147 comme un récepteur commun aux cyclophilines extracellulaires et jusqu'à présent, les travaux publiés ont montré que la fixation de la CyPA sur ses cellules cibles induit des réponses similaires à celles observées pour la CyPB. L'étude par immunorévélation a confirmé l'activation de la voie NF- $\kappa$ B suite à la stimulation des macrophages humains par la CyPB. Par contre, la fixation de la CyPB sur les macrophages n'induit pas l'activation de p38 MAPK et de JNK. De plus, l'analyse de l'expression des cytokines pro-inflammatoires par ELISA a montré des résultats contraires à ceux observés pour la CyPA puisque la CyPB n'induit pas l'expression du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-8 et de l'IL-6. Ces résultats sont en contradiction avec ceux publiés par Kim *et al.* (2005) qui ont montré que la CyPA induit l'activation des voies MAPK et la sécrétion du TNF- $\alpha$ , de l'IL8 et de l'IL-1 $\beta$ . Toutefois, les données concernant la CyPA sont controversées. En effet, Wang *et al.* (2010) ne détecte pas ces cytokines dans les milieux de culture de cellules THP-1 stimulées par la CyPA. De plus, Payéli *et al.* (2008) ont montré que les préparations de CyPA commerciales peuvent contenir des endotoxines qui sont responsables de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Au Laboratoire, la CyPB recombinante est produite dans un système procaryote et nous avons pris soin de la détoxifier avant de stimuler les macrophages. Nous avons également quantifié le taux de LPS présent dans les échantillons de CyPB. Celui-ci n'excède pas 0,09 EU/ $\mu$ g de CyPB. Ainsi, lorsque la CyPB est utilisée à la concentration de 300 nM, la quantité de LPS retrouvé dans le milieu de culture est inférieure à 0,06 ng/ml. La stimulation des macrophages par notre protéine recombinante induit l'activation des voies p44/p42 MAPK et NF- $\kappa$ B mais pas la sécrétion de

TNF- $\alpha$ . Ces résultats démontrent que notre CyPB est biologiquement active et que la quantité d'endotoxine présente n'est pas suffisante pour activer les macrophages humains.

De Ceuninck *et al.* (2003) ont montré que la CyPB est sécrétée dans la matrice extracellulaire de façon constitutive et a suggéré qu'elle participait à la régulation de l'inflammation. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'incubation des macrophages en présence de CyPB pouvait moduler l'expression des facteurs inflammatoires. Leur quantification dans le milieu de culture a montré qu'un prétraitement d'au moins 16 h des macrophages en présence de CyPB réduit considérablement la sécrétion de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , de RANTES et d'IL-8 induite suite à la stimulation des cellules par le LPS.

Afin de comprendre les mécanismes mis en place par la CyPB pour réguler l'expression des facteurs pro-inflammatoires, nous avons étudié l'induction de l'expression du TNF- $\alpha$  suite à la stimulation des macrophages humains et des cellules THP-1 par le LPS. Dans un premier temps, nous avons démontré par immunorévélation que la CyPB ne modifie pas de façon significative l'activation induite par le LPS des voies de signalisation p44/p42 MAPK, p38 MAPK, JNK et NF- $\kappa$ B. En revanche, nous avons observé dans les macrophages et les cellules THP-1 que la diminution de la sécrétion du TNF- $\alpha$  est corrélée à une inhibition de l'expression de son ARNm. Ces données ont suggéré que la CyPB pouvait réguler l'expression du TNF- $\alpha$  par un mécanisme transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel. Le transcrite du TNF- $\alpha$  présente au niveau de la région 3'UTR des éléments ARE impliqués dans la régulation de la stabilité et de la traduction de l'ARNm. Aussi, nous avons choisi d'utiliser un gène rapporteur placé sous le contrôle du promoteur du gène du TNF- $\alpha$  afin de nous affranchir des effets de la régulation post-transcriptionnelle du TNF- $\alpha$  lors de nos expériences. Dans les macrophages humains et les cellules THP-1, l'activation du TLR4 par le LPS induit la transcription du gène rapporteur, résultant en l'expression de la luciférase avec une cinétique similaire à l'expression du TNF- $\alpha$ . Lorsque les cellules sont pré-incubées avec la CyPB, l'expression de la luciférase est inhibée de façon similaire à l'expression du TNF- $\alpha$ . Ces résultats indiquent que le promoteur du gène du TNF- $\alpha$  est suffisant pour que la CyPB inhibe l'expression de la cytokine et que la région 3'UTR de l'ARNm du TNF- $\alpha$  n'est pas indispensable à l'activité inhibitrice de la CyPB.

De nombreux mécanismes ont été décrits pour réguler l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B. Toutefois, afin que l'activité inhibitrice de la CyPB soit optimale, les cellules doivent être mises en présence de la protéine durant au moins 16 heures avant des les stimuler avec le LPS. Cela a suggéré que le mécanisme de régulation transcriptionnel mis en place par la

CyPB nécessite la synthèse de protéines. Les IκBs atypiques, qui sont exprimées suite à l'activation des TLRs, sont connues pour moduler positivement ou négativement l'expression des cytokines inflammatoires. Récemment, il a été démontré que des cytokines pouvaient également induire l'expression de Bcl-3. D'ailleurs, l'activité anti-inflammatoire de l'IL-10 est en partie dépendante de Bcl-3 (Kuwata *et al.*, 2003). Afin de vérifier si la CyPB inhibe la transcription du gène du TNF- $\alpha$  *via* Bcl-3, nous avons observé son profil d'expression dans les macrophages humains et les cellules THP-1 stimulées par la CyPB. L'analyse par PCR en temps réel a révélé que l'ARNm de Bcl-3 est transitoirement détecté après stimulation des cellules par la CyPB avec un pic d'expression à 4 heures. Cette observation a été corrélée à l'accumulation de Bcl-3 dans ces mêmes cellules.

Des travaux ont reporté que Bcl-3 inhibe la transcription des gènes NF- $\kappa$ B dépendants en fixant les dimères p50/p50, favorisant ainsi leur translocation nucléaire et leur fixation aux sites  $\kappa$ B présents sur le promoteur du gène du TNF- $\alpha$  sans altérer la translocation du complexe p65/p50 (Caamano *et al.*, 1996 ; Watanabe *et al.*, 1997 ; Kuwata *et al.*, 2003). Afin de vérifier le rôle de Bcl-3 dans l'activité inhibitrice de la CyPB, nous avons étudié les complexes NF- $\kappa$ B présents au niveau de sites  $\kappa$ B du promoteur du gène du TNF- $\alpha$ . Pour cela, nous avons choisi de réaliser sur les cellules THP-1 des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine à l'aide d'anticorps dirigés contre p65, p50 et Bcl-3 et d'amorces capable d'amplifier les séquences d'ADN correspondant à différents sites  $\kappa$ B présents sur le promoteur du gène du TNF- $\alpha$ . Wessells *et al.* (2004) ont étudié le rôle de Bcl-3 dans l'inhibition de la transcription du gène du TNF- $\alpha$  et ont pour cela fait exprimer des gènes rapporteurs placés sous le contrôle de différents sites  $\kappa$ B. Bcl-3 inhibe la transcription des gènes rapporteurs qu'ils soient sous le contrôle des sites  $\kappa$ B2 ou  $\kappa$ 3, démontrant l'absence de spécificité de fixation du complexe p50/p50 associé à Bcl-3 pour les sites  $\kappa$ B. De manière générale, nous n'avons pas observé de différences notables de fixation des différents complexes sur les sites  $\kappa$ B1,  $\kappa$ B2 et  $\kappa$ 3. Comme attendu, la stimulation des cellules THP-1 par le LPS induit la fixation de p65 et de p50 sur le promoteur du gène du TNF- $\alpha$ . Par contre, la pré-incubation des cellules en présence de CyPB inhibe la fixation de p65 sur les sites  $\kappa$ B puisqu'il est difficile d'amplifier les séquences d'ADN après immunoprécipitation à l'aide d'anticorps dirigé contre p65. A l'inverse, l'immunoprécipitation par des anticorps anti-p50 et anti-Bcl-3 permet une amplification importante des sites  $\kappa$ B. L'ensemble de ces résultats démontre qu'en induisant l'expression de Bcl-3, la CyPB favorise la fixation des complexes inhibiteurs p50/p50 sur les sites de fixation  $\kappa$ B du promoteur du TNF- $\alpha$ , inhibant ainsi

l'activité transcriptionnelle du complexe p65/p50.

Finalement, dans le but de valider le rôle de Bcl-3 dans la régulation transcriptionnelle induite par la CyPB de l'expression du TNF- $\alpha$ , nous avons invalidé l'expression de la protéine par ARN interférence dans les cellules THP-1. Suite à la stimulation par le LPS, la CyPB n'inhibe plus la transcription du gène du TNF- $\alpha$  dans les cellules invalidées pour Bcl-3. De façon similaire, la CyPB est incapable d'inhiber l'expression du gène rapporteur placé sous le contrôle du promoteur du gène du TNF- $\alpha$  lorsque l'expression de Bcl-3 est invalidée. Ces résultats montrent bien que la CyPB régule négativement la transcription du gène du TNF- $\alpha$  *via* l'expression de Bcl-3.

Nous avons observé que le prétraitement des macrophages en présence de CyPB diminue l'expression de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-8 et de CCL5 induite par le LPS, ce qui est en accord avec de précédents travaux qui montraient que Bcl-3 inhibe l'expression de ces facteurs inflammatoires (Jamaluddin *et al.*, 2005 ; Carmody *et al.*, 2007). Selon les travaux de Riemann *et al.* (2005), Bcl-3 régule négativement la transcription du gène de l'IL-10. Pourtant, l'incubation des cellules en présence de CyPB ne modifie pas la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire en réponse au LPS. Or d'autres travaux ont montré que l'invalidation de l'expression de Bcl-3 ou de I $\kappa$ BNS diminue l'expression de l'IL-10 en réponse au LPS (Wessells *et al.*, 2004 ; Kuwata *et al.*, 2006), suggérant l'implication d'autres complexes transactivateurs que NF- $\kappa$ B dans la régulation de l'expression de la cytokine. D'ailleurs, la CyPB n'intervient pas dans la régulation des gènes dépendants de I $\kappa$ B- $\zeta$  puisque l'expression de l'IL-6 qui est induite par cette I $\kappa$ B atypique n'est pas affectée par la CyPB (Yamazaki *et al.*, 2001).

Puisque les CyPA et CyPB partagent le même récepteur protéique CD147, nous avons voulu savoir si la CyPA était capable d'induire l'expression de Bcl-3 et d'inhiber l'expression du TNF- $\alpha$ . Le prétraitement des macrophages humains par la CyPA ne diminue pas de façon significative l'expression du TNF- $\alpha$  induite par le LPS, ce qui est en accord avec la faible expression de Bcl-3 observée dans les cellules stimulées par la CyPA. Ces résultats suggèrent que l'activité inhibitrice la CyPB serait due à la fixation de la protéine sur les chaînes HS portées par le syndécan-1. La transcription du gène codant pour Bcl-3 est dépendante de NF- $\kappa$ B. Or des travaux ont montré que la CyPA induit l'activation du facteur de transcription. Par ailleurs, l'activité de Bcl-3 est régulée par diverses modifications post-traductionnelles et bien qu'une expression importante de Bcl-3 soit détectée dans les cellules après 8 heures de stimulation par la CyPB, celle-ci est incapable d'inhiber fortement la synthèse du TNF- $\alpha$ .

Cela suggère qu'en plus de réguler l'expression de Bcl-3 au niveau transcriptionnel, la CyPB met en place des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle afin de stabiliser son expression. Il serait donc intéressant de comparer les cinétiques d'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B par les deux cyclophilines et de rechercher des voies de signalisation spécifiques à la CyPB et impliquées dans l'expression et la stabilisation de Bcl-3.



# Partie II :

## Etude du mécanisme de régulation post-transcriptionnelle

### A. Introduction

Nos précédents travaux ont montré qu'un prétraitement des macrophages par la CyPB diminue la sécrétion induite par le LPS de facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-8 et RANTES. L'analyse de la transcription du gène du TNF- $\alpha$  a révélé que celle-ci est inhibée dans les cellules ayant été en présence de CyPB. Nous avons mis en évidence l'expression de Bcl-3, une I $\kappa$ B atypique qui se complexe aux dimères répresseurs p50/p50 et favorise leur fixation sur les sites  $\kappa$ B du promoteur du gène du TNF- $\alpha$ , démontrant ainsi une régulation transcriptionnelle de l'expression du TNF- $\alpha$ .

L'ARNm du TNF- $\alpha$  possède des séquences ARE au niveau de son extrémité 3'UTR qui sont impliquées dans la régulation post-transcriptionnelle de son expression. Des souris dont les séquences ARE ont été ôtées au niveau du gène du TNF- $\alpha$  produisent plus de TNF- $\alpha$  en réponse au LPS en comparaison aux souris sauvages. Pourtant, les macrophages prélevés chez ces souris ne présentent pas d'augmentation de la transcription du gène du TNF- $\alpha$ . Par contre, une accumulation de l'ARNm du TNF- $\alpha$ , corrélée à une diminution de leur dégradation est observée dans les cellules (Kontoyiannis *et al.*, 1999).

Les souris invalidées pour le gène codant TTP développent des maladies chroniques inflammatoires telles que l'arthrite dont le développement peut être ralenti par l'utilisation d'anticorps anti-TNF- $\alpha$  (Taylor *et al.*, 1996). D'ailleurs, l'invalidation de l'expression de TTP entraîne une augmentation du temps de demi vie des ARNm du TNF- $\alpha$  (Carballo *et al.*, 1998). La fixation de TTP sur les séquences ARE de l'ARNm du TNF- $\alpha$  conduit à la déadénylation et à la dégradation du transcrit du TNF- $\alpha$  (Lai *et al.*, 1999).

Les séquences ARE de l'ARNm du TNF- $\alpha$  sont également impliquées dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du TNF- $\alpha$ . TIA-1 et TIAR s'y fixent et inhibent la traduction du transcrit du TNF- $\alpha$ . L'invalidation de TIA-1 et de TIAR entraîne une



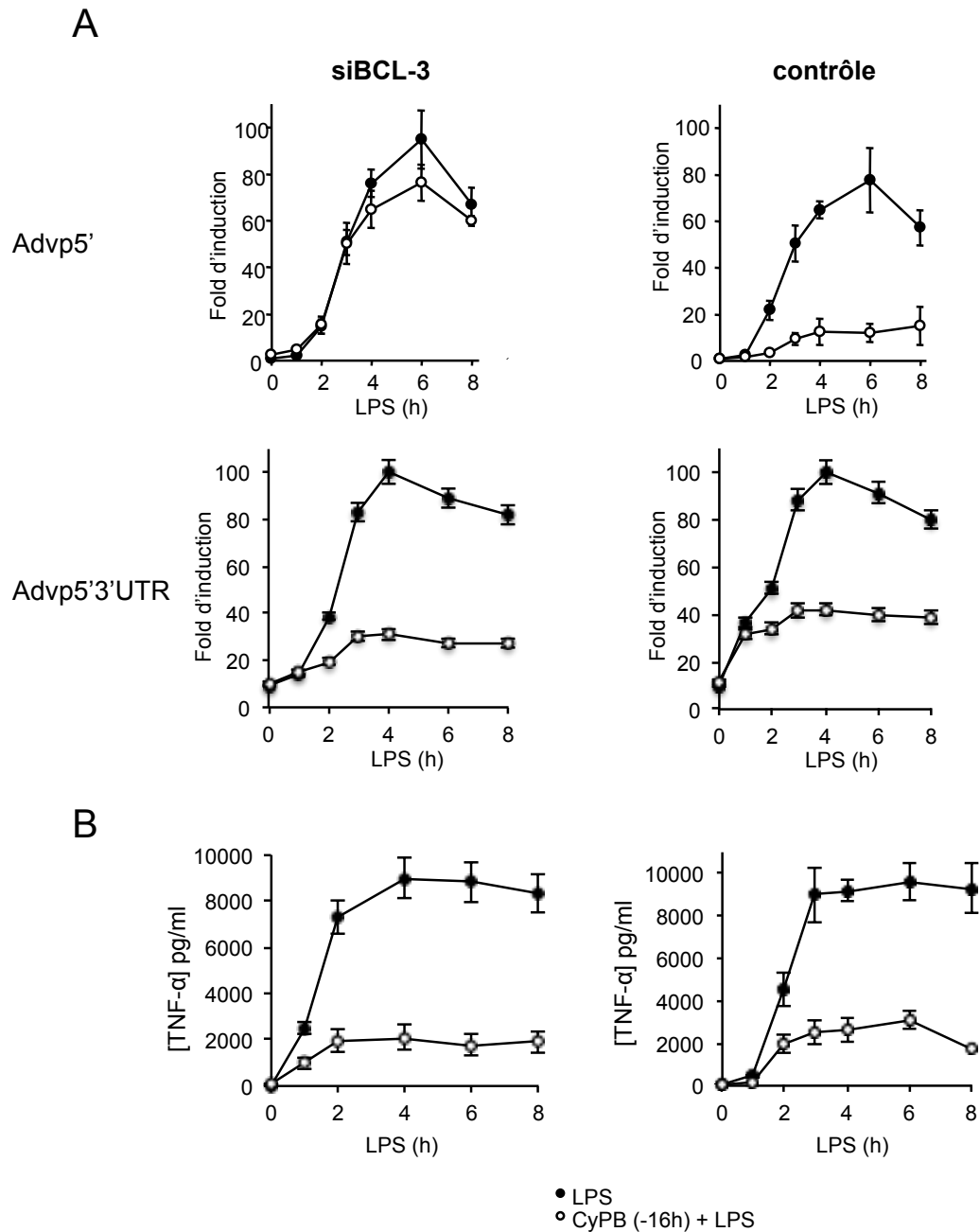
augmentation de l'expression du TNF- $\alpha$  en réponse au LPS alors que le taux d'ARNm ne varie pas (Gueydan *et al.*, 1999 ; Piecyk *et al.*, 2000).

Généralement, les cytokines anti-inflammatoires potentialisent leurs effets en mettant en place divers mécanismes de régulation. C'est le cas notamment de l'IL-10 qui inhibe l'expression du TNF- $\alpha$  au niveau transcriptionnel en induisant l'expression de Bcl-3 et en agissant au niveau post-transcriptionnel *via* l'expression de TTP (Kuwata *et al.*, 2003 ; Schalijo *et al.*, 2009). Nous avons donc vérifié si l'activité inhibitrice de la CyPB est également dépendante d'un autre mécanisme que celui de la régulation transcriptionnelle.

## B. Résultats

### B. 1. Mise en évidence d'une régulation post-transcriptionnelle

Afin de mettre en évidence une régulation post-transcriptionnelle de l'expression du TNF- $\alpha$  par la CyPB, nous avons utilisé un gène rapporteur placé sous le contrôle du promoteur du gène du TNF- $\alpha$  complété ou non par la région 3'UTR. Après avoir invalidé l'expression de Bcl-3 par ARN interférence, nous avons induit l'expression de la luciférase dans les cellules THP-1 pré-incubées ou non en présence de CyPB et nous avons comparé les résultats obtenus (Figure 21A). Comme démontré précédemment, l'invalidation de l'expression de Bcl-3 dans les cellules exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur du gène du TNF- $\alpha$  inhibe l'effet de la CyPB sur la régulation de la luciférase, résultant en un taux d'expression similaire aux cellules non traitées par la CyPB. Par contre, dans les cellules transfectées par un siRNA contrôle, la CyPB inhibe l'expression du gène rapporteur. De façon surprenante, lorsque l'expression de la luciférase est également sous le contrôle de la région 3'UTR du gène du TNF- $\alpha$ , malgré l'invalidation de l'expression de bcl-3, la CyPB inhibe toujours l'expression de la luciférase. De plus, le taux d'inhibition est comparable aux cellules contrôles. Nous avons alors confirmé ce résultat en dosant par ELISA la quantité de TNF- $\alpha$  sécrété par les cellules THP-1 (Figure 21B). De façon similaire, dans les cellules invalidées pour Bcl-3, le taux de TNF- $\alpha$  sécrété en réponse au LPS est diminué lorsque les cellules sont au préalable incubées en présence de CyPB. Ces résultats confirment bien la mise en place par la CyPB d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle.



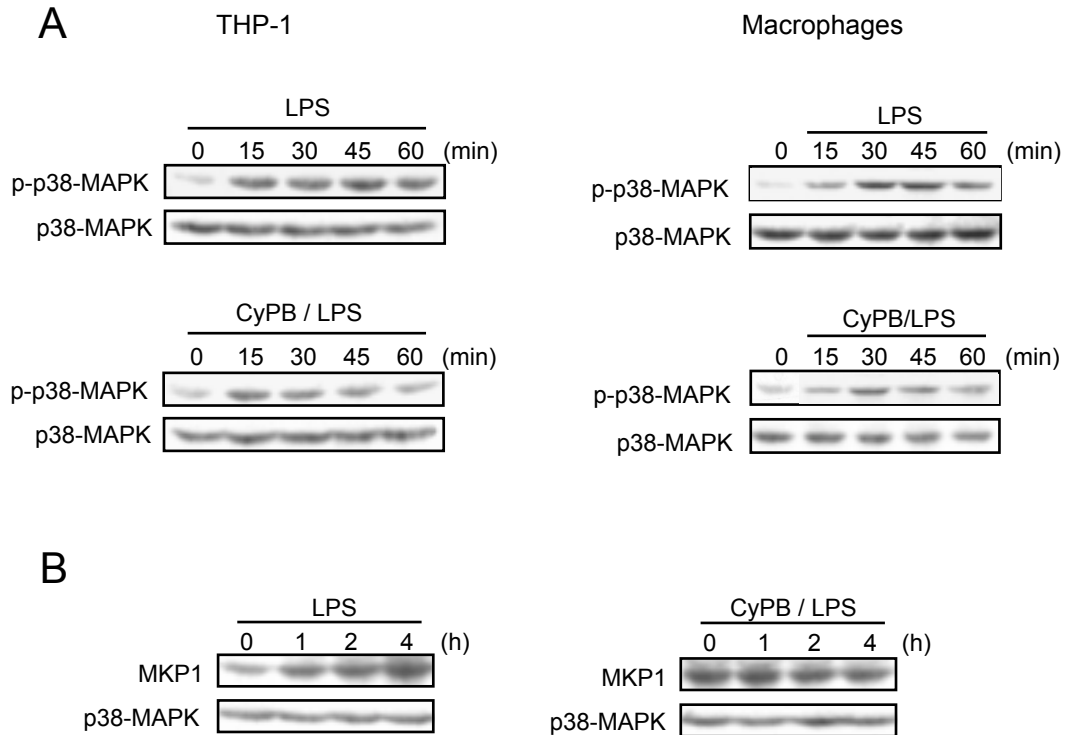
**Figure 21 : Régulation post-transcriptionnelle de l'expression du TNF- $\alpha$ .** Les cellules THP-1 sont transfectées par les siRNA dirigés contre Bcl-3 ou par le siGFP (contrôle) puis infectées par l'adénovirus codant pour le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur du gène du TNF- $\alpha$  additionné ou non par sa région 3'UTR. Les cellules sont ensuite pré-incubées en présence de CyPB puis stimulées par le LPS. **A.** Analyse de l'expression de la luciférase. **B.** Analyse de la sécrétion du TNF- $\alpha$  dans le milieu de culture des cellules transfectées. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

## B. 2. Etude du mécanisme de régulation post-transcriptionnelle

Précédemment, nous avons observé que le prétraitement des macrophages humains en présence de CyPB diminue la phosphorylation de p38 MAPK induite par le LPS sans toutefois l'inhiber totalement. Des travaux ont montré que l'activation de p38 MAPK empêche la déadénylation des ARNm présentant des séquences ARE, bloquant ainsi leur dégradation (Dean *et al.*, 2003). Par contre, la dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse ayant des propriétés anti-inflammatoires inhibe l'activation de p38 MAPK en induisant l'expression de MKP-1, résultant en la dégradation des ARNm (Lasa *et al.*, 2001, 2002 ; Abraham *et al.*, 2006).

### B. 2. a. Effet de la CyPB sur la phosphorylation de p38 MAPK

Nous avons analysé la phosphorylation de p38 MAPK en réponse au LPS dans les macrophages humains et les cellules THP-1 pré-incubés ou non en présence de CyPB (Figure 22A). Comme démontré précédemment, la CyPB réduit partiellement l'activation de la kinase en comparaison aux macrophages humains non traités par la CyPB. Dans les cellules THP-1, la CyPB induit également une diminution de la phosphorylation de p38 MAPK en réponse au LPS. Nous avons alors étudié par immunorévélation la présence de la phosphatase MKP-1 dans les cellules THP-1 stimulées par le LPS et pré-incubées ou non par la CyPB (Figure 22B). Dans les cellules non traitées par la CyPB, MKP-1 n'est visible qu'après 1heure de stimulation par le LPS. Ce résultat était attendu puisque le LPS induit l'expression de la phosphatase qui intervient dans le rétrocontrôle négatif de la production de TNF- $\alpha$ . A l'inverse les cellules prétraitées par la CyPB expriment déjà un taux élevé de MKP-1 avant stimulation par le LPS. Ce résultat suggère que la CyPB induit l'expression de MKP-1, ce qui conduirait à l'inactivation de p38 MAPK et potentiellement à la déstabilisation de l'ARNm du TNF- $\alpha$ .

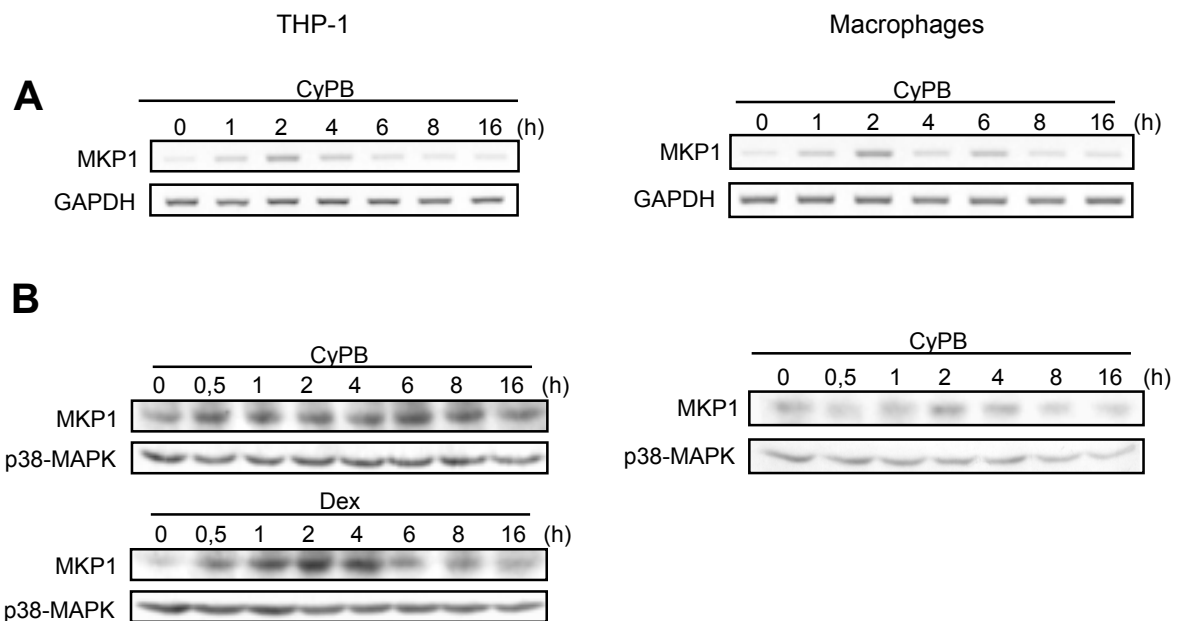


**Figure 22 : Diminution de la phosphorylation de p38 MAPK.** Les cellules THP-1 et les macrophages sont incubés ou non en présence de 50 nM CyPB puis stimulés par le LPS. **A.** L'activation de p38 MAPK a été analysée par immunorévélation à l'aide d'un anticorps dirigé contre les formes phosphorylées de p38 MAPK tandis qu'un anticorps anti-p38 MAPK montre les formes totales des kinases. **B.** L'analyse de l'expression de MKP-1 par immunorévélation a été réalisée sur les cellules THP-1. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

### B. 2. b. Effet de la CyPB sur l'expression de MKP-1

Afin d'analyser l'effet de la CyPB sur l'expression de MKP-1, les cellules THP-1 et les macrophages humains ont été stimulés en présence de CyPB. L'analyse par RT-PCR montre une expression transitoire de l'ARNm de la phosphatase, qui est optimale après 2 h de stimulation à la fois dans les macrophages humains et dans les cellules THP-1 (Figure 23A). L'analyse de l'expression de la protéine par immunorévélation révèle que MKP-1 est présente dans les cellules THP-1 dès 1 heure et dans les macrophages humains dès 2 heures de stimulation par la CyPB (Figure 23B). Si la protéine est encore détectée dans les cellules THP-1 après 16 h de stimulation, ce n'est pas le cas dans les macrophages où l'expression de

MKP-1 n'est que transitoire et diminue à partir de 8 heures de stimulation. De plus, l'expression de la phosphatase est plus faible dans les macrophages en comparaison aux cellules THP-1. Afin de comparer le niveau d'expression de MKP-1 dans ces cellules, nous avons également stimulés les cellules THP-1 par la dexaméthasone. Cet anti-inflammatoire induit l'expression de MKP-1 dès 30 min de stimulation et la phosphatase est présente dans les cellules jusqu'à 4 h post-traitement. Par ailleurs, la dexaméthasone est un bien meilleur inducteur de l'expression de MKP-1 en comparaison avec la CyPB.

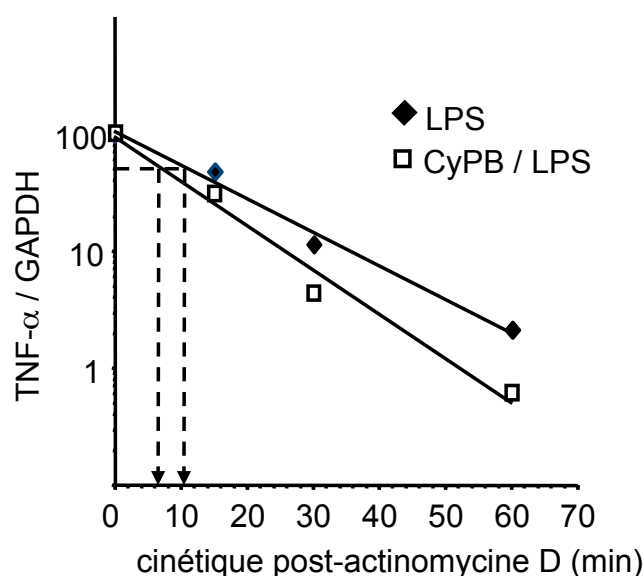


**Figure 23 : Expression de MKP-1 induite par la CyPB.** Les cellules THP-1 et les macrophages ont été stimulés par 50 nM de CyPB ou par 100 nM de dexaméthasone. Les cellules ont été récupérées afin d'analyser par RT-PCR (A) et par immunorévélaiton (B) l'expression de MKP-1. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

### B. 2. c. Effet de la CyPB sur la stabilité de l'ARNm du TNF- $\alpha$

Puisque nous avons corrélé la diminution de la phosphorylation de p38 MAPK à l'expression de MKP-1, nous avons voulu savoir si la CyPB modulait la stabilité de l'ARNm du TNF- $\alpha$ . Pour cela, nous avons analysé par PCR en temps réel le temps de demi-vie de l'ARNm du TNF- $\alpha$  dans les cellules THP-1 pré-incubées ou non en présence de CyPB et

stimulées par le LPS (Figure 24). Après avoir inhibé la synthèse *de novo* de l'ARNm du TNF- $\alpha$  en bloquant la transcription à l'aide d'actinomycine D, un taux moins important de transcrit du TNF- $\alpha$  est détecté dans les cellules mises en présence de CyPB. Ces résultats montrent une dégradation plus rapide de l'ARNm du TNF- $\alpha$  dans ces cellules. Par contre, les différences observées entre les cellules non traitées et traitées par la CyPB ne sont pas élevées puisque le temps de demi-vie de l'ARNm du TNF- $\alpha$  qui est de  $12,8 \pm 1,3$  min est réduit à  $8,8 \pm 1,8$  min dans les cellules prétraitées.

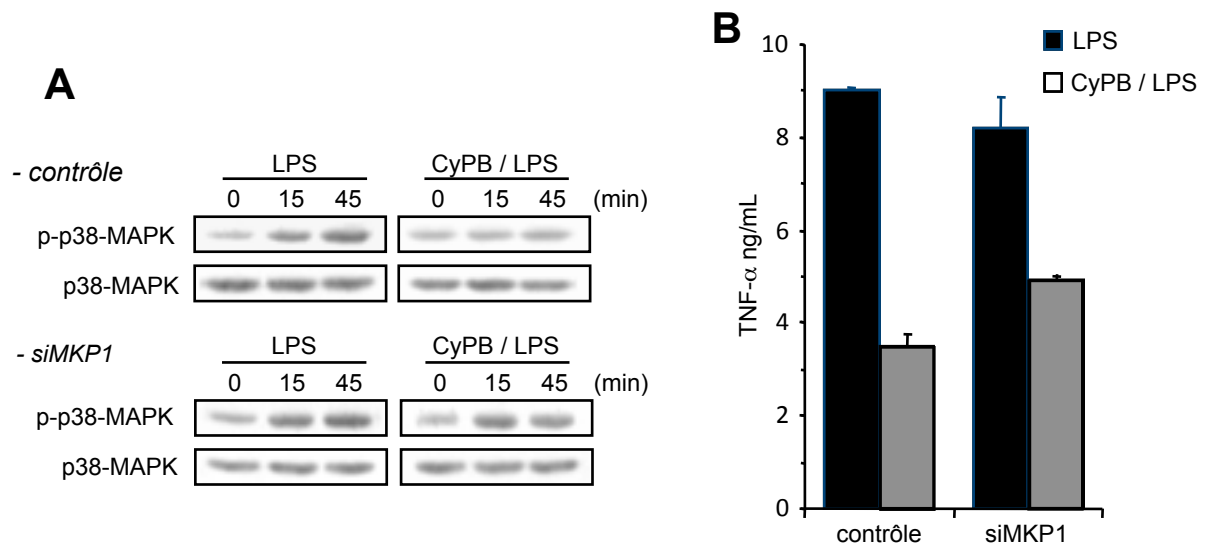


**Figure 24 : Diminution du temps de demi-vie de l'ARNm du TNF- $\alpha$ .** Les cellules THP-1 ont été pré-incubées ou non en présence de 50 nM de CyPB puis stimulées par du LPS. Après 1 h de stimulation, l'actinomycine D (5  $\mu$ g/mL) a été ajoutée afin de bloquer la transcription du gène du TNF- $\alpha$ . Les cellules ont été récupérées toutes les 15 minutes et le taux d'ARNm du TNF- $\alpha$  présent a été analysé par PCR en temps réel. Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes.

### B. 3. Implication de MKP-1 dans l'activité inhibitrice de la CyPB

Afin de confirmer la part de MKP-1 dans l'activité inhibitrice de la CyPB, nous avons invalidé par ARN interférence l'expression de la phosphatase dans les cellules THP-1. Dans un premier temps, nous avons corrélié l'effet de l'inhibition de l'expression de MKP-1 à la phosphorylation de p38 MAPK (Figure 25B). Dans les cellules THP-1 traitées avec le siRNA contrôle, l'activation de p38 MAPK est maximale dans les cellules stimulées par le LPS, mais

est diminuée lorsque celles-ci sont au préalable incubées avec la CyPB. Par contre p38 MAPK est activée en réponse au LPS dans les cellules invalidées pour l'expression de MKP-1, qu'elles aient subi ou non un prétraitement en présence de CyPB. Ces résultats confirment que la phosphatase MKP-1, dont l'expression est induite par la CyPB, déphosphoryle p38 MAPK. Nous avons alors analysé la conséquence de l'invalidation de l'expression de MKP-1 sur l'inhibition de la synthèse du TNF- $\alpha$  par la CyPB (Figure 25C). Alors que la CyPB inhibe de 60 % ( $59,5 \pm 4,4$  %) l'expression du TNF- $\alpha$  dans les cellules contrôles, l'inhibition est encore de 40 % ( $38,2 \pm 3,5$  %) dans les cellules invalidées pour MKP-1. Même si les expériences d'invalidation confirment l'implication de MKP-1 dans l'inhibition de p38 MAPK, les derniers résultats suggèrent un rôle mineur de la phosphatase dans l'inhibition de l'expression du TNF- $\alpha$  par la CyPB.



**Figure 25 : Implication de MKP-1 dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du TNF- $\alpha$ .** Les cellules THP-1 ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre MKP-1 ou contre la GFP (contrôle) puis incubées ou non en présence de 50 nM de CyPB et stimulées par le LPS. **A.** L'analyse de l'activation de p38 MAPK a été réalisée par immunorévélation. **B.** La sécrétion du TNF- $\alpha$  par les cellules a été dosée par ELISA. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

## C. Discussion

Les travaux portant sur la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du TNF- $\alpha$  ont montré l'implication de différentes protéines. Elles agissent en reconnaissant des séquences ARE présentes au niveau de la région 3' UTR des ARNm pour déstabiliser les transcrits du TNF- $\alpha$  ou inhiber leur traduction. Nos précédents travaux ont montré que la CyPB régule la transcription du gène du TNF- $\alpha$ . Toutefois nous avons observé que l'inhibition de ce mécanisme de régulation transcriptionnelle ne bloque pas l'activité de la CyPB. En effet si la CyPB n'est plus capable d'inhiber la synthèse de l'ARNm du TNF- $\alpha$ , la sécrétion de la cytokine dans les milieux de culture reste cependant diminuée.

Nous avons observé que, dans les cellules THP-1 et les macrophages humains pré-incubés en présence de CyPB, l'activation de p38 MAPK en réponse au LPS est diminuée. MKP-1 est une phosphatase qui déphosphoryle p38 MAPK et JNK et son implication dans la régulation de l'expression de facteurs inflammatoires a largement été démontrée (Chen *et al.*, 2002 ; Shepherd *et al.*, 2004 ; Nimah *et al.*, 2005). Les cellules THP-1 et les macrophages humains stimulés par la CyPB expriment bien MKP-1. Comme toute protéine impliquée dans le contrôle de l'activation des voies de signalisation, l'activité de MKP-1 est finement régulée. Son expression est induite par l'activation de la voie p44/p42 MAPK par le LPS ou la dexaméthasone (Chen *et al.*, 2002). De plus, son expression est stabilisée par la phosphorylation des Ser<sup>359</sup> et Ser<sup>364</sup> par les mêmes kinase (Brondello *et al.*, 1999). Puisque la CyPB induit l'activation de la voie p44/p42 MAPK, il serait intéressant d'étudier le rôle des kinases ERK1/2 dans l'induction de l'expression de MKP-1.

Lasa *et al.* (2001, 2002) ont déjà montré que l'activité anti-inflammatoire de la dexaméthasone est dépendante de l'expression de MKP-1 qui déphosphoryle p38 MAPK. L'inactivation de p38 MAPK a une incidence importante sur l'expression du TNF- $\alpha$  avec une augmentation de la déstabilisation de son ARNm puisque la kinase inhibe l'activité de TTP. (Lai *et al.*, 1999 ; Mahtani *et al.*, 2001 ; Dean *et al.*, 2003). Nous avons observé que la CyPB diminue elle aussi le temps de demi-vie des ARNm du TNF- $\alpha$ , suggérant que MKP-1 dont l'expression est induite par la CyPB, permet l'activation de TTP et la déstabilisation des ARNm du TNF- $\alpha$ . Toutefois, les effets de la dexaméthasone sur la déstabilisation des ARNm sont bien plus marqués (Lasa *et al.*, 2001). Ceci n'est pas surprenant puisque en comparaison à l'expression de MKP-1 induite par la dexaméthasone, la CyPB semble être un faible inducteur de la phosphatase.



La participation de MKP-1 dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du TNF- $\alpha$  a été étudiée en observant l'expression du TNF- $\alpha$  dans les cellules invalidées pour la phosphatase. Si l'utilisation de siRNA dirigés contre MKP-1 restaure la phosphorylation de p38 MAPK induite par le LPS dans les cellules THP-1 pré-incubées en présence de CyPB, il n'y a pas de réelle différence au niveau de la sécrétion du TNF- $\alpha$ . Pourtant ce résultat ne permet pas de conclure quant à l'implication de MKP-1 dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du TNF- $\alpha$  par la CyPB. En effet, la CyPB est capable d'inhiber l'expression de la luciférase placée sous le contrôle du promoteur du gène du TNF- $\alpha$  bien qu'elle ne puisse pas réguler au niveau post-transcriptionnel l'expression de la cytokine. De même, l'inactivation de Bcl-3 inhibe la régulation transcriptionnelle de l'expression du gène du TNF- $\alpha$  sans pour autant empêcher la CyPB d'inhiber la sécrétion du TNF- $\alpha$ . Ces données montrent que les mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle sont indépendants et suffisants pour inhiber l'expression du TNF- $\alpha$ . Aussi, il n'est pas surprenant que l'inactivation de l'expression de MKP-1 n'entraîne pas de changement majeur au niveau de l'activité inhibitrice de la CyPB. Afin de mieux étudier le mécanisme de régulation post-transcriptionnelle, il serait plus juste de s'affranchir des effets de la régulation transcriptionnelle en utilisant un gène rapporteur placé uniquement sous le contrôle de la région 3'UTR du gène du TNF- $\alpha$ .

La faible expression de MKP-1 suite à la stimulation des cellules par la CyPB laisse supposer qu'un mécanisme supplémentaire pourrait être mis en place par la CyPB pour réguler au niveau post-transcriptionnel l'expression du TNF- $\alpha$ . D'ailleurs, il a été démontré que les cytokines IL-4 et IL-13 inhibent l'expression du TNF- $\alpha$  en régulant la traduction de son ARNm (Mijatovic *et al.*, 1997). L'utilisation du gène rapporteur placé sous le contrôle de la région 3'UTR du gène du TNF- $\alpha$  dans les cellules invalidées pour l'expression de MKP-1 fournirait des renseignements quant à la participation de la phosphatase et d'autres protéines dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du TNF- $\alpha$ .

Dans l'ensemble, ces résultats montrent qu'en plus de réguler la transcription du gène du TNF- $\alpha$ , la CyPB agit également au niveau post-transcriptionnel. S'il est évident que MKP-1 régule l'activation de p38 MAPK, l'implication de la phosphatase dans l'inhibition de l'expression du TNF- $\alpha$  par la CyPB doit encore être confirmée.

# *Discussion*

---



Initialement décrites en 1984 par Handschumacher *et al.* comme récepteurs de la CsA, les cyclophilines ont été impliquées au fil des années dans de nombreuses activités. Les données bibliographiques témoignent de leur participation dans le transport de protéines néosynthétisées, dans la régulation de l'activité de protéines de signalisation ou de l'activité des facteurs de transcription, dans la régulation de l'apoptose ou encore dans l'infection par certains virus tel que le HIV. Les CyPA et CyPB ont la caractéristique d'être retrouvées dans les milieux extracellulaires. En effet, la CyPB est sécrétée de façon constitutive par les chondrocytes, les kératinocytes ou les fibroblastes (Caroni *et al.*, 1991 ; Gonzalez-Cuadrado *et al.*, 1996 ; De Ceuninck *et al.*, 2003 ; Fearon *et al.*, 2011). De plus, elle est retrouvée dans les milieux biologiques tels que le lait ou le plasma (Spik *et al.*, 1991 ; Allain *et al.*, 1995). A l'inverse, la CyPA n'est pas présente de façon constitutive dans les milieux extracellulaires. Par contre, elle est sécrétée avec la CyPB dans les milieux de culture de CMLV en condition de stress oxydatif (Liao *et al.*, 2000 ; Jin *et al.*, 2000), dans le sérum de patients atteints de septicémie ou infectés par le HIV (Tegeder *et al.*, 1997 ; Endrich & Gehring, 1998 ; Dear *et al.*, 2007 ; Tian *et al.*, 2010) ou dans les voies respiratoires chez des modèles murins d'asthme allergique (Gwinn *et al.*, 2006 ; Balsley *et al.*, 2010). La CyPA a également été retrouvée dans le milieu de culture de macrophages murins (Sherry *et al.*, 1992) ou de cellules endothéliales (Kim *et al.*, 2004) stimulés par le LPS et dans les liquides synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Billich *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 2005).

La caractérisation des CyPA et CyPB dans les milieux extracellulaires a encouragé les recherches sur les activités de ces formes sécrétées. Les CyPA et CyPB partagent le même récepteur protéique, le CD147. La fixation des cyclophilines au CD147 entraîne l'activation de la voie p44/p42 MAPK et la migration des monocytes, lymphocytes T et neutrophiles (Sherry *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 1992 ; Yurchenko *et al.*, 2001, 2002 ; Allain *et al.*, 2002). Toutefois, les réponses induites suite à la fixation de la CyPA sur le CD147 sont de moins grandes amplitudes que celles observées pour la CyPB. Les travaux réalisés au Laboratoire ont montré que la CyPB se fixe également aux chaînes HS portées par le syndécan-1 (Pakula *et al.*, 2007). La CyPB induit l'adhérence des lymphocytes T à la fibronectine et cette activité est dépendante des chaînes HS. Par contre, la CyPB<sub>KKK</sub> qui est incapable de se fixer au syndécan-1, présente une activité chimioattractante plus faible que la CyPB non mutée (Allain *et al.*, 2002 ; Melchior *et al.*, 2008). Ainsi, les sites de fixation des CyPA et CyPB ne sont pas tous communs, et si la fixation de la CyPB aux cellules cibles engendre les mêmes réponses que pour la CyPA, la CyPB présente des activités supplémentaires.

Dans l'ensemble, ces données confèrent aux CyPA et CyPB un rôle de médiateur de l'inflammation. Plus récemment, plusieurs équipes ont montré que la CyPA induit la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 ou l'IL-8. Ces activités sont dépendantes de l'activation des kinases ERK1/2, p38 MAPK et JNK ainsi que de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Jin *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2006 ; Yuan *et al.*, 2010). Dans les macrophages issus de monocytes isolés de sang humain, nous avons confirmé l'activation induite par la CyPB des voies p44/p42 MAPK et NF- $\kappa$ B. Par contre, nous n'avons observé ni activation des kinases p38 MAPK et JNK ni sécrétion de facteurs pro-inflammatoires. Ces résultats sont en accord avec divers auteurs dont les travaux contredisent l'activité pro-inflammatoire de la CyPA. En effet, Yurchenko *et al.* (2002) et Yang *et al.* (2007) ne détectent pas d'augmentation de la phosphorylation de p38 MAPK et JNK suite à la stimulation des cellules par la CyPA. Payeli *et al.* (2008) ne détectent pas de TNF- $\alpha$  suite à la stimulation des cellules THP-1 par la CyPA. Par contre, la quantité d'IL-6 détectée dans les surnageants des cellules passe de 6 pg/mL dans les cellules non stimulées à 11 pg/mL dans les cellules stimulées par 1  $\mu$ g/mL de CyPA. Wang *et al.* (2010) ne détectent ni TNF- $\alpha$ , ni IL-1 $\beta$ , ni IL-6 après stimulation des cellules THP-1 par la CyPA alors que la quantité d'IL-8 sécrétée par ces cellules passe de 300 à 450 pg/mL après stimulation par la CyPA. Bien que les différences d'expression des cytokines soient significatives entre les cellules témoins et celles stimulées par la CyPA, leurs niveaux d'expression en réponse à la CyPA ne sont pas comparables à ceux observés en présence d'agonistes des TLRs, ce qui laisse supposer que tout comme la CyPB, la CyPA n'est pas un inducteur de cytokines pro-inflammatoires.

En revanche, notre étude sur les macrophages humains montre que la CyPB inhibe l'expression de ces cytokines pro-inflammatoires induites par le LPS et que cette inhibition est optimale après un prétraitement des cellules durant 16 h. L'analyse du mécanisme sous-jacent à cette activité a permis de révéler l'expression de Bcl-3 dans les cellules stimulées par la CyPB. Cette I $\kappa$ B atypique est connue pour induire la fixation des dimères p50/p50 sur les sites  $\kappa$ B, bloquant ainsi la fixation des dimères p65/p50 (Wessells *et al.*, 2004). Des travaux ont montré que l'expression de Bcl-3 est dépendante de l'activation de STAT3 induite par l'IL-6 et l'IL-10 (Kuwata *et al.*, 2003 ; Brocke-Heidrich *et al.*, 2006) et de l'activation de NF- $\kappa$ B induite par le LPS (Brazier *et al.*, 2001). Au Laboratoire, la stimulation des cellules par la CyPB n'induit pas l'activation de STAT3, ce qui n'a rien de surprenant puisque le CD147 n'est pas connu pour activer les voies de signalisation JAK/STAT. Par contre, la CyPB induit bien l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, et l'utilisation de MG132, un inhibiteur protéasomale

bloquant l'activation de NF- $\kappa$ B, entraîne un défaut d'expression de Bcl-3 dans les cellules THP-1 stimulées par le LPS (résultats non publiés). Ces résultats suggèrent que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par la CyPB est essentielle à l'expression de bcl-3. Des données récentes montrent que la stimulation du CD147 conduit à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et d'ailleurs la CyPA active elle aussi la voie NF- $\kappa$ B (Jin *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2010 ; Yuan *et al.*, 2010). Pourtant, nous avons observé que la stimulation des macrophages par la CyPA n'induit qu'une faible expression de Bcl-3 résultant en une faible inhibition de l'expression du TNF- $\alpha$  en réponse au LPS. Ces résultats laissent supposer que l'activité inhibitrice de la CyPB est dépendante de sa fixation sur les chaînes HS du syndécan-1.

Les chaînes HS permettent de présenter les médiateurs solubles à leur récepteur de signalisation. Les travaux de Derksen *et al.* (2002) montrent que la fixation du HGF (*Hepatocyte growth factor*) est dépendante des chaînes HS portées par le syndécan-1. Le traitement de cellules de lignées plasmocytaires malignes par des héparitinases diminue l'activation de la voie p44/p42 MAPK, suggérant que les chaînes HS renforcent l'activation des voies de signalisation. Dans le cas de la CyPB, l'élimination des chaînes HS par un traitement à l'héparinase inhibe l'activation de la voie p44/p42 MAPK ainsi que l'adhérence cellulaire à la fibronectine. L'ajout de chaînes HS libres ou d'une forte concentration en CyPB ne restaure pas ces activités. (Allain *et al.*, 2002 ; Pakula *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que la participation du protéoglycane ne se limite pas à la présentation de la CyPB à son récepteur protéique. D'ailleurs, l'invalidation de l'expression du syndécan-1 inhibe l'activation de la voie p44/p42 MAPK induite par la CyPB et l'adhérence des cellules à la fibronectine (Pakula *et al.*, 2007). La constante d'affinité entre les cyclophilines et le CD147 serait équivalente à celle d'une enzyme pour son substrat (Yurchenko *et al.*, 2002 ; Allain *et al.*, 2002 ; Sclegel *et al.*, 2009). Les chaînes HS pourraient donc servir à maintenir l'interaction entre la CyPB et le CD147. Puisqu'il n'a jamais été décrit d'interaction spécifique entre la CyPA et les chaînes HS de protéoglycanes membranaires, l'interaction de la CyPA avec le CD147 ne serait pas renforcée. De plus, Carpentier *et al.* (1999b) ont suggéré que la CyPB possède une plus forte affinité pour le récepteur protéique que la CyPA. Le fait que la CyPA ne soit pas capable d'induire l'adhérence des lymphocytes à la matrice extracellulaire laisse supposer que le syndécan-1 et les chaînes HS confèrent à la CyPB des activités supplémentaires à celles de la CyPA, et notamment la capacité d'induire l'expression de Bcl-3 et d'inhiber par conséquent la transcription des gènes NF- $\kappa$ B dépendants.

Bien que la transcription induite par la CyPB du gène codant pour Bcl-3 soit

transitoire, l'expression de la protéine n'est optimale qu'après 16 h de stimulation des cellules par la CyPB, suggérant qu'en plus d'induire l'expression de Bcl-3, la CyPB active également des mécanismes régulant son activité. Bcl-3 a été décrit pour activer ou réprimer la transcription de gènes cibles en association avec les dimères p50/p50 et p52/p52 mais les mécanismes permettant de réguler son activité n'ont toujours pas été clairement définis. Toutefois, des travaux montrent que Bcl-3 subit diverses modifications post-traductionnelles et qu'elle est capable d'interagir avec de nombreux facteurs régulant positivement ou négativement la transcription. La phosphorylation de Bcl-3 peut être réalisée par différentes kinases. Les travaux de Viatour *et al.* (2004) ont montré que la phosphorylation de Bcl-3 par la GSK3 induit sa dégradation protéasomale. Puisque la CyPB induit l'activation de la PI3K (Melchior *et al.*, 2008), la GSK3 pourrait être en conséquence inactivée et la CyPB bloquerait ainsi la dégradation protéasomale de Bcl-3. La stimulation de macrophages par le LPS induit également la phosphorylation de Bcl-3. Bien que la kinase responsable de cette modification n'est pas encore été identifiée, cette phosphorylation augmente la stabilité et l'activité de Bcl-3 (Bundy & McKeithan, 1997 ; Caamano *et al.*, 1995 ; Wessels *et al.*, 2004). L'activité de Bcl-3 semble également régulée par une E3 ubiquitine ligase. En effet, dans les kératinocytes où l'expression de la déubiquitinyase CYLD est inhibée, Bcl-3 associée aux protéines p50 et p52 est accumulée dans le noyau et augmente l'expression de la cycline D1, résultant en la prolifération de ces cellules (Massoumi *et al.*, 2006). La stimulation des macrophages par la CyPB pourrait donc conduire à l'expression ou à l'activation de protéines régulant l'expression et l'activité de Bcl-3.

Bcl-3 et MKP-1 sont impliquées dans le rétrocontrôle négatif de l'activation des voies de signalisation associées aux TLRs et dans les mécanismes de tolérance des cellules de l'immunité innée. Leur expression est induite suite à l'activation des TLRs et, associées à d'autres régulateurs, elles stoppent l'expression des gènes activés par la stimulation des TLRs et empêchent la réactivation des voies de signalisation associées (Nimah *et al.*, 2005 ; Carmody *et al.*, 2007). Pourtant, l'activité inhibitrice de la CyPB requiert une pré-incubation des cellules en sa présence durant 16 h avant l'activation des TLRs. Dans ce cas, l'activité de Bcl-3 et de MKP-1 n'est pas requise dans le but de stopper l'expression des cytokines pro-inflammatoires mais plutôt de modifier le phénotype des macrophages afin de les rendre tolérants au LPS. C'est le cas par exemple de ST2L, un récepteur dont l'expression tardive à la surface cellulaire ne lui permet pas d'intervenir dans les mécanismes de rétrocontrôle négatif de l'activation des TLRs. Par contre, ST2L est impliqué dans les mécanismes de

tolérance suite à une seconde stimulation des TLRs (Brint *et al.*, 2004).

Sherry *et al.* (1992) ont montré que la CyPA est un produit de sécrétion des macrophages en réponse au LPS. Actuellement, aucune donnée ne montre que la sécrétion de la CyPB augmente en réponse au LPS mais nous avons observé que la stimulation des cellules THP-1 par le LPS conduit à une augmentation de la transcription du gène codant pour la CyPB. Puisque la CyPA et la CyPB sont généralement sécrétées en réponse aux mêmes stimuli inflammatoires, il est envisageable que la stimulation des macrophages par le LPS conduit à la sécrétion de CyPB. Dans ce cas, la CyPB pourrait avoir un rôle important dans la mise en place de la tolérance. Il serait alors intéressant d'étudier les effets de l'invalidation de son expression dans des macrophages stimulés à deux reprises par le LPS.

Toutefois, la stimulation des TLRs conduit déjà à l'expression de nombreux régulateurs de l'activation des voies de signalisation et il est possible que la CyPB n'ait pas de rôle prépondérant dans le mécanisme de la tolérance. Actuellement, les éléments que nous avons accumulés sur le rôle de la CyPB dans la régulation de l'activité des macrophages semblent indiquer qu'elle agirait plutôt en modifiant le phénotype répondeur des macrophages afin de limiter dès la première activation des TLRs la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires.

De façon similaire, la PI3K, qui est constitutivement exprimée dans les cellules de l'immunité innée, est rapidement activée suite à la stimulation des TLRs. En induisant la phosphorylation de GSK3, PI3K inhibe l'activité de facteurs de transcription et régule ainsi l'amplitude de la réponse inflammatoire (Askoy *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2011). Fukao *et al.* (2002) ont même supposé que la PI3K régule la balance  $T_h1/T_h2$ . En effet, l'invalidation de l'expression de la PI3K entraîne une surproduction de l'IL-12, du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$  suite à l'infection de souris par *Leishmania major* tandis que l'expression des cytokines de type  $T_h2$  est diminuée. De la même manière, la CyPB inhibe la transcription des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires. Par contre, dans un modèle murin d'asthme allergique, elle induit le chimiotactisme des éosinophiles qui est corrélé à l'expression des cytokines  $T_h2$  IL5 et IL-13 (Gwinn *et al.*, 2006 ; Balsley *et al.*, 2010). Ainsi, la CyPB pourrait favoriser la réponse immunitaire de type  $T_h2$  alors qu'elle inhiberait la réponse  $T_h1$ .

En prenant en compte son activité chimiotactile, la CyPB pourrait également recruter les macrophages sur le site de l'inflammation et inhiber leurs réponses pro-inflammatoires suite à leur stimulation. Certaines cytokines anti-inflammatoires présente cette propriété. En



effet, depuis quelques années, les recherches portant sur l'activation alternative des macrophages ne cesse de s'accroître. Reflétant la nomenclature  $T_h1/T_h2$ , la polarisation des macrophages a été classée en deux sous types. Les macrophages M1 sont induits par les cytokines  $T_h1$  comme le  $TNF-\alpha$ , l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  ou par l'activation des TLRs. Ils sécrètent d'importants taux de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines qui participent au recrutement des cellules  $T_h1$  et sont impliqués dans la résistance contre les pathogènes et les tumeurs. Les macrophages M2 sont décrits comme des macrophages ayant un rôle important dans les réponses inflammatoires de type  $T_h2$ , dans la phase de résolution de l'inflammation ou dans les mécanismes de réparation tissulaire. Plusieurs variants de macrophages M2 existent. Les M2a sont induits par l'IL-4 et l'IL-13. Ils produisent peu de cytokines inflammatoires et ne répondent pas à l'IL-1 $\beta$ . Par contre, ils expriment de nombreux récepteurs scavenger, recrutent les cellules immunitaires  $T_h2$  et favorisent la croissance cellulaire et la formation de collagène afin de promouvoir la réparation tissulaire. Les M2b sont induits par les complexes immuns associées aux ligands des TLRs et par l'activation de ces récepteurs. Ces macrophages aux propriétés anti-inflammatoires produisent de faibles taux d'IL-12 mais sécrètent en abondance l'IL-10. Par ailleurs, ils conservent leur capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires telles que le  $TNF-\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  ou l'IL-6. Les M2b sont responsables de la protection contre la toxicité du LPS. Ils sont également impliqués dans l'activation des lymphocytes  $T_h2$  mais aussi dans les mécanismes d'immunorégulation *via* le recrutement des lymphocytes T régulateurs. Les M2c sont quant à ceux induits par divers stimuli tels que l'IL-10, le TGF- $\beta$  ou les glucocorticoïdes, ce qui engendre des phénotypes différents. Toutefois les M2c présentent un profil de macrophage désactivé avec une importante production de l'IL-10 qui inhibe l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Ces macrophages ne possèdent plus leur fonction de présentation d'antigène mais participent à la collecte de débris cellulaires *via* l'expression de récepteurs scavenger. Ces macrophages participent à l'étape de guérison (Martinez *et al.*, 2008). Par ses propriétés inflammatoires communes avec d'autres facteurs inflammatoires tels que l'IL-4 ou l'IL-10, la CyPB pourrait contribuer à la polarisation des macrophages en cellules M2. En effet, la CyPB induit le recrutement de cellules de type  $T_h2$  et diminue l'expression de cytokines pro-inflammatoires. De plus, au Laboratoire, nous avons observé que la prolifération lymphocytaire en réponse à la présentation de CD3 par des macrophages incubés en présence de CyPB est inhibée (résultats non publiés). Nous avons alors comparé le phénotype des macrophages stimulés en présence de CyPB, d'IL-10 ou d'IL-4/IL-13. L'analyse par cytofluorimétrie en flux de l'expression de marqueurs de M2 tels que DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular*

*adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) pour les M2a ou CD163 pour les M2c suggère que la CyPB seule n'a pas la capacité d'activer de façon alternative ces cellules. Toutefois, la CyPB pourrait agir en synergie avec les cytokines anti-inflammatoires et potentialiser leurs effets sur la polarisation des macrophages. Par conséquent, l'analyse de l'expression des marqueurs et de la sécrétion des cytokines et chimiokines en réponses à la CyPB pourrait fournir des éléments quant au rôle de la CyPB dans la régulation de l'activité des macrophages.

L'étude des activités des cyclophilines extracellulaires permet de mieux appréhender leur rôle dans la pathogénicité de maladies inflammatoires et de cancers. En effet, de nombreux travaux ont montré que les CyPA et CyPB sont sécrétées dans diverses pathologies et modèles expérimentaux et des agents ciblant le CD147 ou les cyclophilines montrent des effets anti-inflammatoires significatifs. Toutefois, la plupart des études portent sur le rôle de la CyPA et peu d'informations concernant la CyPB sont disponibles.

La CyPA est présente en quantité importante dans le fluide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Billich *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 2005). Damsker *et al.* (2009) ont montré qu'elle est également fortement exprimée par les cellules présentes au niveau des articulations dans un modèle murin d'arthrite induite par le collagène. Chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, une forte expression du CD147 est observée au niveau des macrophages provenant de fluide synovial (Zhu *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'expression du CD147 est corrélée à une augmentation de l'expression des MMP-9 et MMP-2 et d'une augmentation de la migration et de l'invasion cellulaire (Zhu *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2011). La stimulation de macrophages par la CyPA induit les mêmes effets que ceux observés lors de l'augmentation de l'expression du CD147 tandis que l'inactivation de l'expression du CD147 ou l'utilisation de CsA ou d'antagonistes peptidiques du CD147 les inhibe considérablement (Kim *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2011). Ces résultats montrent que la CyPA a un effet néfaste sur la pathogénicité de la polyarthrite rhumatoïde puisqu'elle sa fixation sur le CD147 engendre des réponses qui entretiennent le contexte inflammatoire.

De Ceuninck *et al.* (2003) ont montré que la CyPB est sécrétée par les chondrocytes, des cellules présentes au niveau du cartilage qui veillent au maintien du tissu en synthétisant et dégradant les composants de la matrice extracellulaire. De plus, la CyPB est retrouvée au

sein de cette matrice extracellulaire, d'où elle peut d'ailleurs être libérée par l'action des MMPs. Dans la littérature, aucune donnée n'est disponible sur le rôle de la CyPB dans l'évolution de la polyarthrite rhumatoïde. En effet, il n'a jamais été démontré qu'elle est sécrétée par les cellules de la synovie de patients malades ou que sa fixation au CD147 induit l'expression de MMPs. Les données que nous apportons quant à l'activité inhibitrice de la CyPB vis à vis des facteurs pro-inflammatoires pourrait laisser supposer qu'elle ait un rôle bénéfique dans l'évolution de la maladie. Toutefois, les données bibliographiques relatent l'exemple de nombreuses maladies inflammatoires où les fonctions anti-inflammatoires et régulatrices de facteurs sont exacerbées ou détournées au profit de la maladie. C'est le cas par exemple du TGF- $\beta$  qui est impliqué dans l'homéostasie cellulaire *via* la régulation du remodelage de la matrice extracellulaire. Pourtant, l'altération de sa signalisation peut conduire au développement de fibroses (Gordon & Blobe, 2008).

Dans le cas de cancer, la CyPA et la CyPB sont également fortement exprimées. Par contre, peu de données relatent la sécrétion des cyclophilines par ces cellules. Dans des lignées cellulaires de cancer du poumon, la CyPA qui est fortement exprimée est capable d'induire la prolifération de ces cellules (Yang *et al.*, 2007). Vizio *et al.* (2005), ont montré que la CyPB est retrouvée dans les surnageants de culture de lignées cellulaires pancréatiques cancéreuses. Encore une fois, le rôle des cyclophilines extracellulaires dans le processus du cancer n'est pas encore compris. Au Laboratoire, nous avons observé que les macrophages incubés en présence de CyPB sont incapables d'induire la prolifération de lymphocytes *via* la présentation du CD3. Cette activité inhibitrice de la CyPB serait corrélée à l'expression de la molécule co-inhibitrice B7-H4 (résultats non publiés) que l'on retrouve exprimée principalement dans les cas de cancers (Yi & Chen, 2009). Des macrophages au profil phénotypique semblable aux macrophages M2 sont retrouvés associés aux tumeurs. Ces TAM (*Tumor-associated macrophages*) qui présentent globalement des propriétés anti-inflammatoires sont impliqués dans l'établissement d'un environnement favorable au développement de tumeurs *via* la sécrétion de facteurs favorisant l'angiogenèse, la croissance cellulaire et l'invasion des métastases et l'inhibition de la réponse inflammatoire (Mantovani & Sica, 2010). La CyPB pouvant être sécrétée dans le cas de tumeurs, elle pourrait également promouvoir le développement de cancers *via* ses propriétés immunorégulatrices.

Dans l'ensemble, nos travaux apportent de nouvelles données sur le rôle de la CyPB

dans la régulation de la réponse inflammatoire. En effet, si la CyPA semble être capable d'induire l'expression de facteurs pro-inflammatoires, ce n'est pas le cas pour la CyPB qui au contraire, inhibe leur expression. Ces résultats confèrent à la CyPB un rôle dans l'inhibition de la réponse inflammatoire. Nous avons également démontré que la CyPA ne présente pas cette activité immunorégulatrice, suggérant que les cyclophilines extracellulaires régulent différemment le processus inflammatoire. Des études approfondies concernant l'importance des chaînes HS et du syndécan-1 dans la signalisation de la CyPB permettraient de mieux comprendre les réponses induites par la CyPA et la CyPB. Par ailleurs, le fait que la CyPB soit sécrétée de façon constitutive par certaines cellules et qu'elle soit présente dans le lait de femme laisse supposer qu'elle n'est pas capable d'induire l'expression de facteur pro-inflammatoire et que son activité serait à l'inverse impliquée dans la régulation négative de l'activation des cellules immunitaires. D'ailleurs, nos récents travaux montrant un rôle de la CyPB dans l'inhibition de la prolifération lymphocytaire renforcent cette idée d'activité immuno-inhibitrice. La poursuite de ces travaux permettrait d'apporter de nouveaux éléments quant aux rôles des cyclophilines dans la modulation de la pathogénicité de maladies inflammatoires et de cancers.



# *Matériels et Méthodes*

---



## A. 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*). Le taux de LPS résiduel dosé par Limulus (*BioWhittaker*) est inférieur à 0,09 E.U./ $\mu$ g de CyPB. La CyPB est utilisée à une concentration finale de 50 nM (1  $\mu$ g/mL). Le LPS (*Escherichia coli* 055B5), la dexaméthasone et l'actinomycine D proviennent de chez *Sigma* et sont utilisés aux concentrations respectives de 10 ng/ml, 100 nM et 5  $\mu$ g/ml. Les anticorps utilisés et les conditions expérimentales qui s'y rapportent sont reportés dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Présentation des anticorps et conditions d'utilisation**

Anticorps primaire	Référence	Origine	Dilution
phospho-p38 MAPK	Cell signaling	Polyclonal de souris	1/2000
p38 MAPK	Santa Cruz	Polyclonal de lapin	1/2000
phospho-ERK1/2	Santa Cruz	Polyclonal de souris	1/2000
ERK1/2	Sigma	Polyclonal de lapin	1/10000
MKP-1	Santa Cruz	Polyclonal de lapin	1/2000
Syndécan-1	Santa Cruz	Ployclonal de chèvre	1/100
CD147	BD Pharmingen	Monoclonal de souris	1/1000
Anticorps secondaire			
Anti-Ig de lapin	Amersham		1/40000
Anti-IG de souris	Amersham		1/10000
Anti-Ig de chèvre couplé à la fluorescéine	Sigma		1/400
Anti-Ig de souris couplé à la fluorescéine	Sigma		1/64



## **B. Culture cellulaire et isolement des monocytes du sang**

La lignée THP-1 (88081201, *ECACC*) est une lignée humaine promonocytaire capable de se différencier en cellules de type macrophage. Elles sont cultivées à 37°C dans du milieu RPMI 1640 (*Cambrex*) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF), 2 mM de L-glutamine, 10 mM de gentamycine et 20 µM de β-mercaptoéthanol, dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. La différenciation en cellules de type macrophage est réalisée durant 72 h par ajout de 50 nM de 1-α-25-dihydroxy-vitamine D3 (*Calbiochem*) dans du milieu complet dépourvu de β-mercaptoéthanol. Avant manipulation, les cellules sont placées à une densité de 1.10<sup>6</sup> cellules/mL dans du milieu complet sans β-mercaptoéthanol.

Les monocytes sont isolés à partir du sang humain provenant de l'Etablissement Français du Sang (Lille). Le sang dilué dans du tampon DPBS (phosphate 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2) est déposé sur un milieu de séparation de densité 1,077 (*Lymphoprep*, *AbCys*). Après centrifugation, les cellules mononucléaires ou PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) sont récupérées puis lavées par du PBS. Les monocytes sont isolés par sélection positive en incubant les PBMC (100.10<sup>6</sup> cellules/mL) en présence d'anticorps anti-CD14 couplés à des billes magnétiques pendant 30 min à raison de 35 µL de billes / 10.10<sup>6</sup> cellules totales (*BD*, *Biosciences*). La suspension cellulaire diluée à 50.10<sup>6</sup> cellules/mL est alors placée sur l'aimant BD IMagnet. Après deux lavages, les cellules CD14+ sont recueillies et leur pureté est estimée par cytofluorimétrie en flux (> 95%). La différenciation en macrophages est induite par incubation des monocytes (1.10<sup>6</sup> cellules/mL) en présence de M-CSF (10 ng/mL) (*AbCys*) pendant 5 jours dans du milieu RPMI complet.

## **C. Dosage ELISA du TNF-α**

Les surnageants des cellules sont collectés afin de doser le TNF-α produit à l'aide du kit 4MST (*AbCys*). Selon les indications du fabricant, l'anticorps de capture est adsorbé pendant une nuit à 4°C sur une plaque 96 puits Maxisorb (*Nalge Nunc*). La plaque est ensuite bloquée par une solution de PBS, Tween-20 0,05 %, BSA 1 %, durant 2 h à température ambiante. Après plusieurs lavages, les surnageants dilués sont déposés sur la plaque avec l'anticorps de détection du TNF-α couplé à la biotine. Après 2 h d'incubation, la plaque est lavée et la streptavidine

couplée à la peroxydase est distribuée. La révélation est réalisée à l'obscurité par ajout d'une solution de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (*Sigma*). Le degré de coloration est mesuré à 450 nm.

## **D. Détection de l'expression des protéines par immunorévélation**

Les lysats totaux sont préparés à partir de  $1.10^6$  cellules/point, par incubation pendant 3 h à 4°C dans le tampon (phosphate 20 mM, Triton X-100 1 %, NaCl 200 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, glycérol 20 %, pH 8,0) additionné d'inhibiteurs de protéases (Roche) et de phosphatases (orthovanadate de sodium 1 mM, NaF 10 mM, Sigma). Les lysats cellulaires clarifiés par centrifugation sont déposés sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 10 %. La migration est réalisée durant 1 nuit à 50 V dans un tampon composé de Tris 16,5 mM, glycine 125 mM, SDS 1 %, pH 8,8. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose durant 3 h à 250 mA à 4°C. Après transfert, la membrane est saturée 2 h dans une solution de TBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) - Tween-20 0,1 % - lait 5 %, à température ambiante. Les anticorps primaires (Tableau 2) sont ensuite incubés une nuit à 4°C dans une solution de TBS-Tween - lait 3 %. Après plusieurs lavages avec une solution de TBS-Tween, la fixation des anticorps secondaires (Tableau 2) couplés à la peroxydase est réalisée durant 1 h à 20°C. La révélation des protéines est réalisée par chimioluminescence (ECL, Western Blotting System, *Amersham Biosciences*). Afin d'utiliser plusieurs fois la même membrane, celle-ci est traitée dans une solution de Tris/HCl 62,5 mM, pH 6,8 contenant 2 % de SDS et 100 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol durant 1 h à 56°C afin de déshybrider les anticorps fixés. Après lavages, la membrane peut de nouveau être utilisée pour des expériences d'immunorévélation.

## **E. Analyse de l'expression des ARNm par RT-PCR**

Les ARN totaux sont isolés à partir de  $3.10^6$  cellules à l'aide du kit NucleoSpin RNA II (*Macherey-Nagel*). La réaction de rétrotranscription est réalisée dans un volume final de 50  $\mu$ L contenant 2  $\mu$ g d'ARN totaux, 1  $\mu$ L d'oligo-dT (500  $\mu$ g/ml), 1  $\mu$ L de transcriptase reverse M-MLVRT (200 U/ $\mu$ L), 10  $\mu$ L de tampon M-MLVRT (5X), 2  $\mu$ L de dNTP (10 mM) et 0,5  $\mu$ L de RNasin (40 U/ $\mu$ L) (*Promega*). L'amplification génique est réalisée à partir de 2  $\mu$ L du produit de rétrotranscription dans un volume final de 25  $\mu$ L en présence de 0,125  $\mu$ L de GoTaq DNA polymérase (5 U/ $\mu$ L), 5  $\mu$ L de tampon (5X), 0,5  $\mu$ L de dNTP (10 mM) (*Promega*) et 0,125  $\mu$ L (1

µg/mL) de chaque amorce (*Eurogentec*). Les réactions de polymérisation réalisées dans un Mastercycler (*Eppendorf*) comprennent les étapes suivantes : 1 min de dénaturation de l'ADN à 94°C, 1 min d'hybridation des amorces à la température adéquate et 1 min d'élongation à 72°C. Chaque fragment est amplifié selon un nombre de cycles défini afin de ne pas entrer dans la phase de saturation. Parallèlement, la GAPDH (glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase-3A) est amplifiée afin de contrôler la qualité et la quantité des ADNc utilisés dans les réactions de PCR. Les produits de l'amplification sont déposés sur gel d'agarose contenant de bromure d'éthidium puis visualisés par transillumination à la longueur d'onde de 302 nm. L'analyse semi-quantitative est réalisée à l'aide du logiciel Quantity One (*BioRad*). Les séquences des couples d'amorces sont MKP- 1 : 5'-GCT-GTG-CAG-CAA-ACA-GTC-GA-3' (sens) et 5'-CGA-TTA-GTC-CTC-ATA-AGG-TA-3' (antisens), GAPDH : 5'GGT-GGA-CCT-GAC-CTG-CCG-TCT-A-3' (sens) et 5'-GAG-GTC-CAC-CAC-CCT-GTT-GTG-3' (antisens).

## **F. Invalidation de gènes par ARN interférence**

Les duplexes siRNA (*small-interfering RNA*) (*Eurogentec*) ciblant les protéines NDST1 et 3-OST3 ont précédemment été décrits dans les travaux de Vanpouille *et al.* (2007) et Deligny *et al.* (2010) tandis que la séquence du siRNA dirigé contre MKP1 est issue de Wahab *et al.* (2007). Un siRNA 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 Nucléofector (*Amaxa Biosystems*) selon un protocole optimisé pour la lignée cellulaire THP-1. 2.10<sup>6</sup> cellules en cours de différenciation depuis 48 h sont resuspendues dans 100 µl de solution V (*Amaxa Biosystems*) et 4 µg de siRNA puis transférées dans une cuvette *Amaxa*. Après le choc électrique, la suspension cellulaire est immédiatement diluée dans du milieu RPM1 complet dépourvu de β-mercaptoéthanol et placée à 37°C pendant 24 h avant manipulation.

## **G. Analyse par cytofluorimétrie en flux**

La fixation de la CyPB à la surface des cellules THP-1 a été réalisée en incubant 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 syndécan-1 et du CD147 est analysée en incubant les

cellules THP-1 avec les anticorps correspondants (Tableau 2) dans du DPBS/BSA 1% pendant 1h 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*) et les données ont été analysées grâce au logiciel CellQuest.

## **H. Etude du chimiotactisme**

Les expériences de chimiotactisme sont réalisées en utilisant des chambres de micro-diffusion (Corning Costar) contenant deux compartiments séparés par une membrane de polycarbonate. Les cellules ( $0,8 \cdot 10^6$ ) sont placées dans 100  $\mu$ L de RPMI 1640 complété par 0,5 % (W/V) de BSA dans le compartiment supérieur, tandis que 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 une solution de bleu de méthylène à 1 % (w/v) dans du tampon borate 100 mM, pH 8,2, puis lysées par 100  $\mu$ L de HCl 0,1N. L'intensité de la coloration libérée par la lyse des cellules est mesurée à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque puis reliée au nombre de cellules se référant à une courbe étalon exprimant le nombre de cellules en fonction de l'absorbance (Allain *et al.*, 2002).

## **I. Analyse de l'expression de gène rapporteur**

Des vecteurs adénoviraux codant pour la luciférase placée sous le contrôle du promoteur du gène du TNF- $\alpha$  (Advp5') additionné ou non avec la région 3'UTR du gène du TNF- $\alpha$  (Advp5'3') ont été généreusement donnés par B. Fowell (Kennedy Institute of Rheumatology, London, UK). L'infection est réalisée à la m.o.i. (multiplicity of infection) de 40 :1 pendant 4 h dans du milieu RPMI additionné de 2,5 % de SVF décomplémenté. Les cellules sont ensuite lavées, remises en culture durant 4 h puis pré-incubées en présence de 50 nM de CyPB durant 16 h avant d'être stimulées par 10 ng/mL de LPS. Après stimulation, l'activité de la luciférase est mesurée à l'aide du kit Luciferase Assay System (Promega) et du lecteur de plaque Tristar LB 941 (Berthold Technologies). L'activité de la luciférase est normalisée par quantification des protéines à l'aide du kit micro BCA (Pierce Biotechnology).



# *Annexe*

---



# Synthesis of Heparan Sulfate with Cyclophilin B-binding Properties Is Determined by Cell Type-specific Expression of Sulfotransferases<sup>\*S</sup>

Received for publication, May 7, 2009, and in revised form, October 7, 2009. Published, JBC Papers in Press, November 23, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.018184

Audrey Deligny<sup>‡</sup>, Agnès Denys<sup>‡</sup>, Adeline Marcant<sup>‡</sup>, Aurélie Melchior<sup>‡</sup>, Joël Mazurier<sup>‡</sup>, Toin H. van Kuppevelt<sup>§</sup>, and Fabrice Allain<sup>†1</sup>

From the <sup>‡</sup>Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche 8576 du CNRS, Institut de Recherche Fédératif 147, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France and the <sup>§</sup>Department of Matrix Biochemistry, Nijmegen Center for Molecular Life Sciences, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands

Cyclophilin B (CyPB) induces migration and adhesion of T lymphocytes via a mechanism that requires interaction with 3-*O*-sulfated heparan sulfate (HS). HS biosynthesis is a complex process with many sulfotransferases involved. *N*-Deacetylases/*N*-sulfotransferases are responsible for *N*-sulfation, which is essential for subsequent modification steps, whereas 3-*O*-sulfotransferases (3-OSTs) catalyze the least abundant modification. These enzymes are represented by several isoforms, which differ in term of distribution pattern, suggesting their involvement in making tissue-specific HS. To elucidate how the specificity of CyPB binding is determined, we explored the relationships between the expression of these sulfotransferases and the generation of HS motifs with CyPB-binding properties. We demonstrated that high *N*-sulfate density and the presence of 2-*O*- and 3-*O*-sulfates determine binding of CyPB, as evidenced by competitive experiments with heparin derivatives, soluble HS, and anti-HS antibodies. We then showed that target cells, *i.e.* CD4<sup>+</sup> lymphocyte subsets, monocytes/macrophages, and related cell lines, specifically expressed high levels of NDST2 and 3-OST3 isoforms. Silencing the expression of NDST1, NDST2, 2-OST, and 3-OST3 by RNA interference efficiently decreased binding and activity of CyPB, thus confirming their involvement in the biosynthesis of binding sequences for CyPB. Moreover, we demonstrated that NDST1 was able to partially sulfate exogenous substrate in the absence of NDST2 but not vice versa, suggesting that both isoenzymes do not have redundant activities but do have rather complementary activities in making *N*-sulfated sequences with CyPB-binding properties. Altogether, these results suggest a regulatory mechanism in which cell type-specific expression of certain HS sulfotransferases determines the specific binding of CyPB to target cells.

Initially identified as cyclosporin A-binding proteins, cyclophilins are peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases involved in various biological processes, including protein folding, mitochon-

drial 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)<sup>2</sup> 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<sup>+</sup> 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  $\beta$ 1 integrins (4, 8, 9).

HS consists of alternating *N*-acetyl/*N*-sulfate glucosamine (GlcNAc/GlcNS) and GlcUA/IdoUA residues clustered in a series of domains of relatively high IdoUA content and sulfate density (NS domains), bound by short transition zones with intermediate sulfation patterns 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 predominantly to 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).

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 remain *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 GlcNH<sub>2</sub>. The further modifications include C<sub>5</sub>-epimerization

\* This work was supported by the CNRS and the Université des Sciences et Technologies de Lille, France.

<sup>S</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Tables I–III and Figs. S1–S2.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: 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.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: CyPB, cyclophilin B; ANTS, 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid; dp, degree of polymerization; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FCS, fetal calf serum; GlcNH<sub>2</sub>, *N*-unsubstituted D-glucosamine; GlcNS, *N*-sulfated D-glucosamine; HS, heparan sulfate; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NDST, *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase; OST, *O*-sulfotransferase; siRNA, small interfering RNA; VSV, vesicular stomatitis virus; BSA, bovine serum albumin; MES, 4-morpholineethanesulfonic acid.



## Synthesis of HS with CyPB-binding Properties

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 GlcNH<sub>2</sub> units. These modifications involve HS biosynthetic enzymes, including *N*-deacetylases/*N*-sulfotransferases (NDSTs), C<sub>5</sub>-epimerase, and 2-*O*, 3-*O*, and 6-*O*-sulfotransferases (2-OST, 3-OSTs, and 6-OSTs) (11–13). In the general scheme of HS biosynthesis, GlcNAc *N*-deacetylation and *N*-sulfation by NDSTs create the prerequisite substrate needed for the next enzymatic modifications. Four NDSTs have been cloned and characterized, NDST1 and NDST2 being widely expressed in all the tissues analyzed (14, 15). 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. In contrast, mice lacking NDST2 develop and reproduce normally. No significant alteration in tissue HS structure was found, except in mast cells where heparin biosynthesis is severely disturbed. These studies suggest that NDST1 is required for initiation of *N*-sulfation of the nascent precursor, whereas NDST2 may fill in or extend the sections of *N*-sulfated residues in heparin and highly sulfated HS species (16–19). 3-OSTs catalyze the least abundant modification in HS. Seven 3-OST isoforms have been recognized in humans, with 3-OST1, 3-OST3 (3A and 3B), and 3-OST5 being the most widely expressed in various tissues and cell types. Interestingly, these isoenzymes exhibit fine differences in substrate specificity, suggesting their involvement in making tissue-specific HS with different biological functions. Although 3-OST1 is known to exclusively generate an HS-binding site for antithrombin III, 3-OST3 isoforms transfer sulfate groups to the 3-OH position of GlcNH<sub>2</sub> and/or GlcNS adjacent to the IdoUA2S residue, thus providing an entry receptor for herpesvirus type I. In contrast, 3-OST5 exhibits broad substrate specificity and generates products with affinity to herpesvirus type I and antithrombin III (20–25).

Our preliminary works have illustrated the importance of a 3-*O*-sulfated *N*-unsubstituted GlcN (GlcNH<sub>2</sub>3S) residue in high affinity CyPB binding to heparin and cell surface HS expressed on peripheral blood CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and Jurkat T cells (26). 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. Moreover, 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 highly *N*-sulfated sequence (6, 26, 27). Several lines of evidence indicate that the sulfation pattern of HS may be determined by cell type-specific expression of certain isoforms of HS sulfotransferases and by their relative expression as a response to different cellular conditions. In this study, we explored the relationships between the expression of HS sulfotransferases and their ability to generate HS motifs with CyPB-binding and -activating properties. Following the demonstration that *N*-, 2-*O*-, and 3-*O*-sulfations of HS sequences were critically important to support the efficient binding of CyPB, we showed that activated/memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, monocytes/macrophages, Jurkat and THP-1 cells,

which are target cells of CyPB, specifically expressed high levels of mRNA encoding NDST2 and 3-OST3 isoforms. To know whether the binding of CyPB may be regulated at the biosynthetic stage of HS modifications, we used RNA interference to specifically down-regulate the expression of HS sulfotransferases. The ability of cell surface HS to bind to CyPB was dramatically reduced by silencing the expression of NDST1, NDST2, 2-OST, and 3-OST3. Moreover, we found that NDST1 and NDST2 have no redundant activities but rather have complementary activities in making *N*-sulfated HS motifs with CyPB-binding properties. Altogether, these results suggest a regulatory mechanism in which the expression of some HS sulfotransferases determines the specificity of binding of CyPB to target cells.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—Recombinant human CyPB and human milk lactoferrin were produced and purified as described previously (28, 29). 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. Porcine intestine mucosal HS was obtained from Celsius Laboratories (Cincinnati, OH). Rabbit antibodies to ERK1/2, which recognize p44/p42 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. The expression level of cell surface glycosaminoglycans was analyzed by using phage display-derived vesicular stomatitis virus (VSV)-tagged single-chain antibodies, which have been described previously for their ability to specifically recognize different glycosaminoglycan epitopes. The antibodies were as follows: MPB49 (irrelevant) and AO4B08, HS4C3, HS4E4, RB4Ea12 (specific for HS epitopes), and IO3H10 (specific for chondroitin sulfate) (30–35). The characteristics of these antibodies are presented in supplemental Table S1. Mouse anti-VSV antibody (P5D4) and fluorescein-conjugated anti-mouse IgG were from Sigma. Reagents for electrophoresis and cell culture were from Bio-Rad and Lonza BioWhittaker (Basel, Switzerland), respectively. All other chemicals, except where otherwise mentioned, were purchased from Sigma.

**Cells**—Human lymphoblastic Jurkat T cells (clone E6-1, ATCC TIB-152, Manassas, VA) and promonocytic leukemia THP-1 cells (88081201, ECACC, Porton Down, Salisbury, UK) were routinely cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 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-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, as described previously (9). Human epithelium-like cervical tumor cell line HeLa (ATCC CCL-2) and breast tumor cell lines MCF7 (ATCC HTB-22), MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), and T-47D (ATCC HTB-133) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium, containing 10% (v/v) fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, and 1% (w/v) penicillin/streptomycin. Cell lines were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. 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). Stimulation of T lymphocytes was obtained by incubating CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T cells in the presence of precoated anti-CD3 antibody (5 μg/ml) (Immunotech, Marseille, France) in complete RPMI 1640 medium for 16 h. Monocytes were activated with lipopolysaccharide (10 ng/ml) (Sigma) for 16 h in complete RPMI 1640 medium. Macrophages were obtained by incubating freshly isolated monocytes (10<sup>6</sup> cells/ml) in complete RPMI 1640 medium supplemented with 10 ng/ml macrophage colony-stimulating factor (AbCys, Paris, France) for 5 days. The purity of cell populations was assessed by flow cytometry and found to be >95%.

**Preparation of HS and Heparin Derivatives**—Partially *N*-desulfated heparin was produced as described previously (36). Briefly, pyridinium salt of heparin was treated with dimethyl sulfoxide/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 (36). 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 (37). Freshly prepared HNO<sub>2</sub> reagent was added to the dry oligosaccharide sample and incubated for 15 min at room temperature. Reaction was stopped by the addition of saturated Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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 described previously (27). Briefly, dried samples (5–50 nmol) were dissolved in 5 μl of acetic acid/water (3:17, v/v) containing 0.2 M of 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid (ANTS) (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) and 5 μl 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-Sephadex G-15 column, and thereafter dried under vacuum.

**Real Time PCR**—Total RNA was isolated from 3 × 10<sup>6</sup> cells using a NucleoSpin RNA II kit, according to the instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Reverse transcription was performed from 2 μg of total RNA with an oligo(dT) primer and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI). PCR amplifications were performed using a Mx4000 Multiplex Quantitative PCR system (Stratagene, La Jolla, CA). Synthetic primers for NDST1, NDST2, 2-OST, 3-OST1, 3-OST3, and 3-OST5 were designed by using Primer Premier 5.0 (Biosoft International, Palo Alto, CA), according to the published cDNA sequences. The primer set for 3-OST3 detects the same sequence in both isoenzymes 3-OST3A and 3-OST3B, which have the identical catalytic domain. The transcript of hypoxanthine-guanine

phosphoribosyltransferase was used as a control to normalize the expression of our genes of interest. The primer sets are presented in supplemental Table S2. The sequence of each amplified product was confirmed by sequencing (Genoscreen, Lille, France). Each reaction consisted of 25 μl containing 2 μl of diluted cDNA sample (1:5), 12.5 μl of Brilliant SYBR Green quantitative PCR master mix (two times) (Stratagene), 1 μl of forward primer (7.5 μM for 2-OST and 3-OST3; 15 μM for NDST1, NDST2, and 3-OST5; and 22.5 μM for 3-OST1 and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase), 1 μl of reverse primer (7.5 μM for 2-OST; 15 μM for NDST1, NDST2, 3-OST1, 3-OST5, and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; and 22.5 μM for 3-OST3) (Eurogentec, Seraing, Belgium), and 8.5 μl of water. Each PCR 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 temperature of annealing (60 °C for NDST1, NDST2, 2-OST, and 3-OST5; 67 °C for 3-OST1; 68 °C for 3-OST3; and 51 °C for hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) 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 PCRs were prepared for each sample. The point at which the PCR product is first detected above a fixed threshold, termed cycle threshold (*C<sub>t</sub>*), was determined for each sample, and the average *C<sub>t</sub>* of triplicate samples was used for further analysis. The relative quantification of transcripts was calculated as described previously (38).

**RNA Interference**—Synthetic small interfering RNA (siRNA) duplexes with symmetric 3'-deoxythymidine overhangs (Eurogentec) were used to carry out RNA interference. A set of three distinct synthetic siRNA duplexes for the same target sequences was designed and tested for their efficiency to down-regulate the expression of mRNA encoding NDST1, NDST2, 2-OST, and 3-OST3. siRNAs giving at least 75% of gene inhibition were retained for next experiments (supplemental Table S3). 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) targeting green fluorescent protein mRNA was used as an irrelevant control. Negative control siRNAs, in which two nucleotides have been changed from the target sequence, were used to demonstrate the specificity of silencing. Jurkat T cells were transiently transfected using the nucleofection technology according to Amaxa Biosystems protocol (Amaxa, Cologne, Germany). Briefly, cells were resuspended in 100 μl of Cell Line Nucleofector Solution V, and the cell suspension were nucleofected with 4 μg of siRNA using the program V-001. After nucleofection, cells were transferred into prewarmed complete maintenance medium and were cultured as described before. To monitor the transfection efficiency, a fluorescein-tagged siRNA duplex was transfected in parallel, and the transfection rate was evaluated by flow cytometry and found to be >85%. We also used rescuing reagents to demonstrate the specificity of the

## Synthesis of HS with CyPB-binding Properties

siRNA-mediated silencing of each target sequence. For expression of sequences refractory to siNDST1 and siNDST2, we decided to use plasmids expressing mRNA of mouse NDST1 (pBud-NDST1) and NDST2 (pcDNA-NDST2). These plasmids have been provided by L. Kjellén (Uppsala University) and are presented in Ref. 39. Transient cell transfection with these plasmids allowed the expression of enzymes for which the catalytic activity is closely related to the one of human NDST1 and NDST2. However, the mRNA sequences encoding mouse enzymes were distinct enough from human target sequences to make the expression plasmids refractory to silencing. Primers for verification of mouse NDST1 and NDST2 expression have been designed in Ref. 39 and were used here to check for the expression of mRNA encoding both enzymes in transfected Jurkat T cells. To make 2-OST and 3-OST3 resistant to related siRNA, we used pcDNA-2-OST and pcDNA-3-OST3B plasmids as templates for site-directed mutagenesis, according to the QuickChange XL site-directed mutagenesis protocol (Stratagene). Both plasmids have been produced at home from human full-length cDNA, according to Refs. 21 and 40. pcDNA-2OST<sup>REF</sup> and pcDNA-3OST3B<sup>REF</sup> were generated by introducing six silent mutations without changing the amino acid sequences of human 2-OST and 3-OST3B, respectively. The sense primers for the mutagenesis were as follows: 5'-G TCA TTG CAA GAT CAG GTG **CGG TTC GTT AAA AAC** ATT ACT TCC TGG AAA GAG ATG-3' and 5'-G GGC CTC AAG AGG ATC ATC **ACC GAT AAA CAT TTT TAT TTC** AAC AAG ACC AAG GGC-3', for 2-OST and 3-OST3B, respectively (letters in boldface are silently mutated nucleotides and underlined are the target sequences of siRNA). Point mutations were checked by full DNA sequencing. For rescue experiments, cells were first treated with siRNA as described above and cultured for 24 h. Thereafter, cells were transfected with 5  $\mu$ g of plasmids expressing sequences refractory to siRNA. To avoid dramatic change in HS maturation or toxic side effect related to a decrease in the availability of sulfate donor, cells were used 24 h post-transfection to limit the expression of exogenous sulfotransferases. As expected, mortality was not increased in cells transfected with refractory plasmids by comparison with mock-transfected cells. Moreover, binding of anti-HS antibodies was increased by less than 20% in cells transfected with refractory plasmids, thus indicating that a 24-h treatment had only a moderate effect on the overall HS modifications.

**Carbohydrate Electrophoresis and Mobility Shift Assay**—ANTS-labeled dodecasaccharides (0.6 nmol) and CyPB (0.1 nmol) were mixed in 20  $\mu$ l of electrophoresis binding buffer, containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, and incubated in the absence or presence of heparin derivatives or soluble HS (20  $\mu$ g) for 30 min at room temperature. Following addition of 5  $\mu$ 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 bromphenol 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 ( $25 \times 10^6$ /ml) were lysed in solubilization buffer containing 50 mM MES, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100 (v/v), pH 7.0, supplemented with protease inhibitor mixture (Roche Applied Science) and DNase I for 16 h at 4 °C. Following centrifugation at  $10,000 \times g$  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* (41). 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 dimethyl sulfoxide at 100 °C for 2 h and thereafter N-reacetylated as described previously (36). 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  $\mu$ g of solubilized proteins) with 5  $\mu$ g of acceptor and 10  $\mu$ M of 3'-phosphoadenosyl-5'-phosphosulfate in a total volume of 50  $\mu$ l of solubilization buffer, for 3 h at 37 °C. The reaction was stopped by the addition of 200  $\mu$ l of a solution of 10% (v/v) trichloroacetic acid 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<sub>2</sub> at pH 1.5. The cleavage products were fractionated on Bio-Gel P-6 (Bio-Rad) column equilibrated in 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (20  $\times$  0.8 cm). Fractions of 500  $\mu$ l were collected and analyzed for fluorescence by using a TriStar LB 941 multimode microplate reader (Berthold, Bad Wildbad, Germany).

**Flow Cytometry Analysis**—The expression level of cell surface glycosaminoglycans was determined by incubating cells ( $5 \times 10^5$  cells per sample) with VSV-tagged single-chain antibodies in Dulbecco's phosphate-buffered saline 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. Nonspecific 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. Moreover, pretreatment of cells with DPBS containing 1 M NaCl did not modify the binding of antibodies, ruling out the possibility that HS epitopes could be masked by extracellular ligands. 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 BD Biosciences). After washing, cells were labeled with fluorescein-conjugated anti-mouse IgG. In all

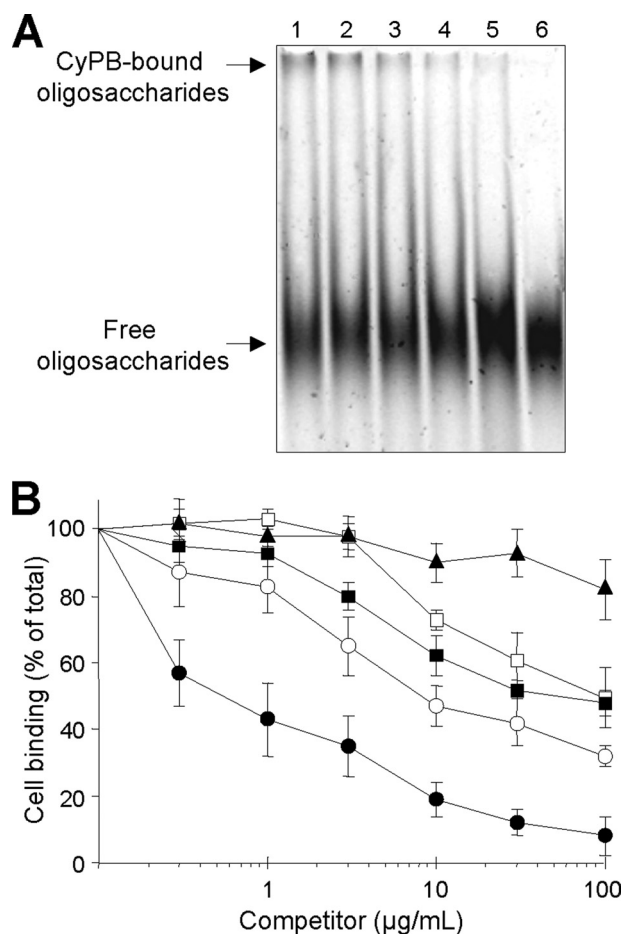
experiments, cells were washed twice and immediately used for analysis. Data were monitored on a flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences) and analyzed with CellQuest software (Mountain View, CA). Results are expressed as variations of fluorescence mean values ( $\Delta FMV\%$ ).

**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 Ref. 42. Briefly, cells in DPBS/BSA (at the concentrations of  $8 \times 10^6$  per ml for T cells, monocyte/macrophages, Jurkat and THP-1 cells, and  $5 \times 10^6$  per ml for epithelia cells) were allowed to adhere to immobilized ligand (1  $\mu\text{g}$  of CyPB or 4  $\mu\text{g}$  of lactoferrin per well, respectively) for 45 min at 20 °C. After washing with phosphate-buffered saline, 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 either pretreated for 1 h at 37 °C with heparinases (0.2 unit/ $10^6$  cells), prior adhesion assays, or incubated in the presence of soluble ligands (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of CyPB or 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of lactoferrin) to determine nonspecific binding. 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 Ref. 26. Jurkat T cells were cultured overnight in the presence of 1% (v/v) fetal calf serum and stimulated with 50 nM CyPB or 250 nM lactoferrin at 37 °C. At various times, cells ( $10^6$  per sample) were washed in cold phosphate-buffered saline and lysed for 3 h at 4 °C in 75  $\mu\text{l}$  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 mixture. 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 & Schüll). 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 electrophoretic mobility shift assay 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 (27). In a first set of experiments, we used the same approach to investigate the



**FIGURE 1. Competition of CyPB binding to heparin-derived oligosaccharides and cell surface HS.** A, ANTS-labeled dp12 (0.6 nmol) and CyPB (0.1 nmol) were mixed in the absence (control) or presence of heparin derivatives or soluble HS (20  $\mu\text{g}$ ). After a 30-min incubation, samples were subjected to electrophoretic mobility shift assay. 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  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) in the absence (control) or presence of increasing concentrations of heparin derivatives or soluble HS as follows: 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 ( $0.8 \times 10^6$  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  $\pm$  S.D. of triplicates from at least three separate experiments.

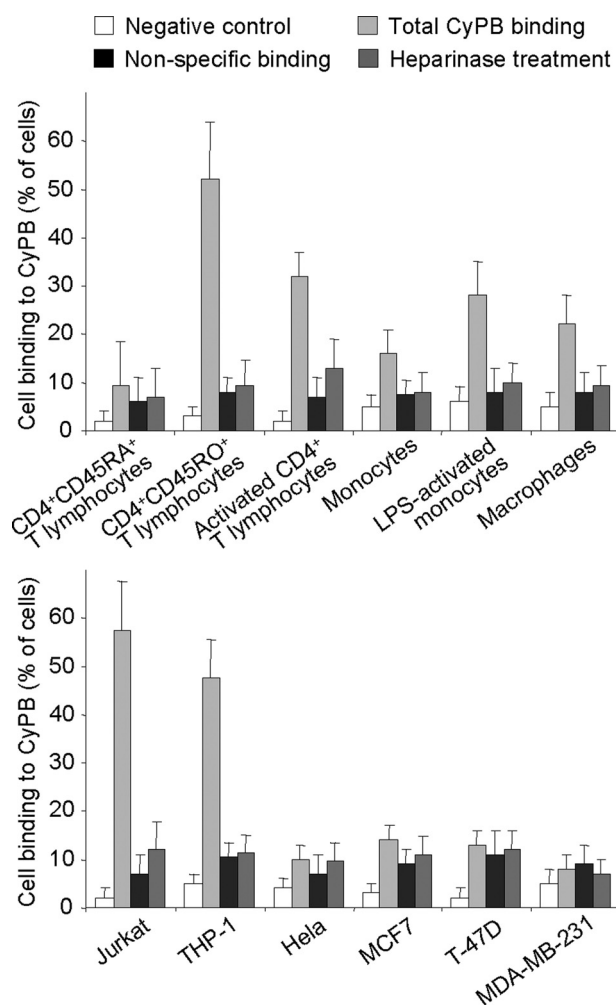
importance of *N*-sulfate density in CyPB binding. To this end, we analyzed the capability of chemically *N*-desulfated heparin derivatives and soluble HS to compete for the binding of CyPB to a heparin-derived dp12 (Fig. 1A). As reported previously, interaction of CyPB with fluorescent oligosaccharides led to formation of a complex that did not migrate 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

## Synthesis of HS with CyPB-binding Properties

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 ability 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 mucosae, 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 HNO<sub>2</sub> 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 clustered in NS domains, are 48.3 and 42.2%, respectively. This indicates that CyPB binding is dependent on *N*-sulfate density but also on the 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 (IC<sub>50</sub>) of unmodified heparin was approximately 0.5 μg/ml, although the IC<sub>50</sub> 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 porcine mucosal HS were also poor competitors, with IC<sub>50</sub> around 10 and 100 μg/ml, respectively.

**CyPB Binding to Cell Surface HS Is Dependent on the Interaction with Specific *N*-Sulfated Motifs**—In previous studies, we analyzed the interactions between CyPB and cell surface HS by using a method in which T lymphocytes were allowed to adhere to immobilized ligand (26, 42). We therefore used the same approach to compare the binding of CyPB to various subsets of T lymphocytes and monocytes/macrophages. As shown in Fig. 2, no specific interaction could be observed between CyPB and CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T cells. In contrast, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T cells and activated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes strongly interacted with the immobilized ligand, thus indicating that CyPB binding is dependent on the stage of activation and/or maturation of CD4<sup>+</sup> T cells. Freshly isolated monocytes and monocyte-derived macrophages also specifically interacted with immobilized CyPB, although to a lesser extent than T lymphocytes did. However, the binding was significantly increased following lipopolysaccharide stimulation of monocytes, indicating that the expression of binding sites for CyPB could be modulated by inflammatory stimuli. We then demonstrated that treatment with heparinases strongly reduced the binding of activated/memory CD4<sup>+</sup> T cells and monocytes/macrophages to immobilized CyPB, thus confirming the involvement of cell surface



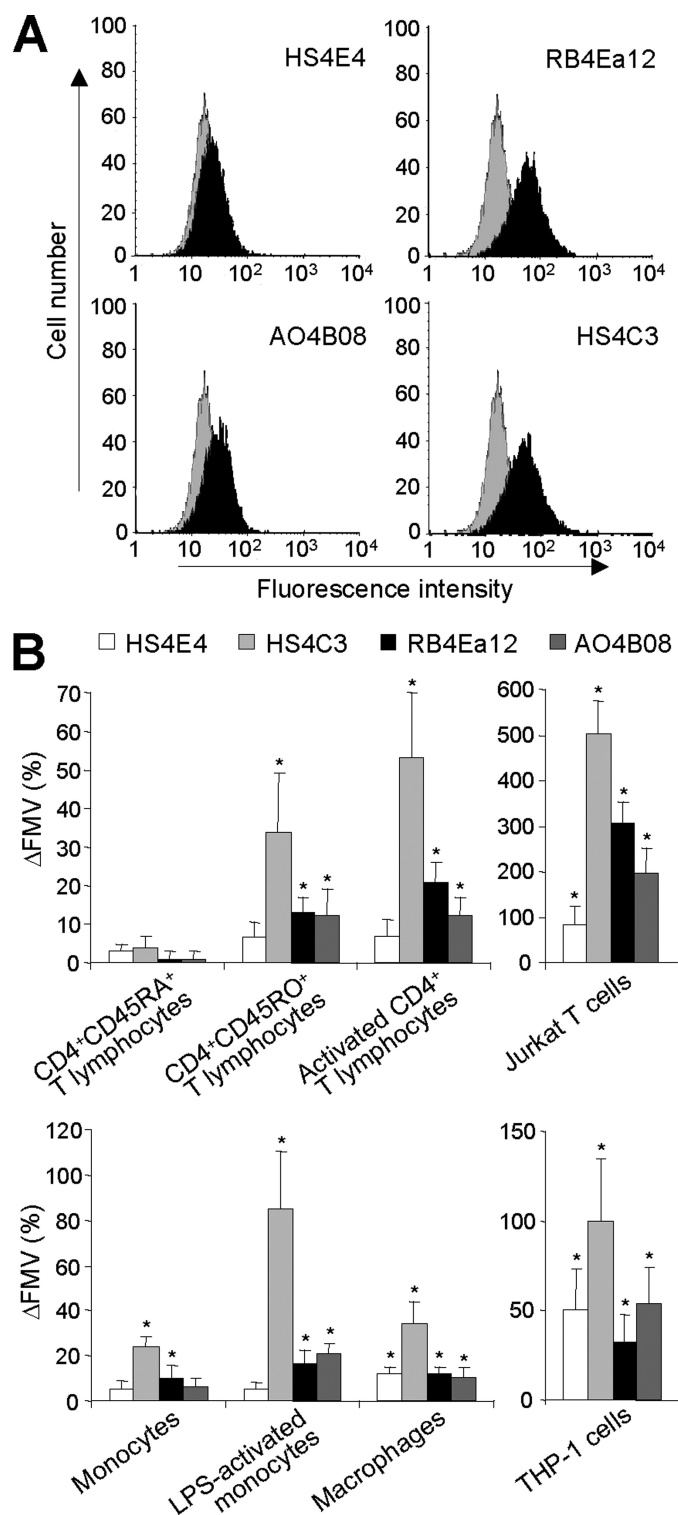
**FIGURE 2. CyPB binding to primary T lymphocyte subsets, monocytes/macrophages, and cell lines.** To analyze the interaction between CyPB and cell surface HS, cells were allowed to adhere to immobilized ligand (1 μg per well) for 45 min at 20 °C. After washing, adherent cells were fixed with 3% (w/v) formaldehyde, stained with 1% (w/v) methylene blue, and lysed with 0.1 M HCl. In control experiments, cells were either allowed to adhere to plastic in the absence of CyPB (negative control), pretreated for 1 h at 37 °C with heparinases (0.2 units/10<sup>6</sup> cells) prior to adhesion assays, or incubated in the presence of 100 μg/ml soluble CyPB to determine nonspecific binding. Cell adhesion was estimated by using standard curves in which absorbance was related to cell numbers. Results are presented as percentages of initially added cells (8 × 10<sup>6</sup> per ml for T cell subsets, monocytes/macrophages, Jurkat and THP-1 cells, and 5 × 10<sup>6</sup> per ml for epithelia cell lines), which remained fixed to the adhesive substrate. Each bar of histograms represents mean ± S.D. of three independent experiments. Statistical significance was determined using the Student's *t* test, and *p* values <0.05 were considered as significant.

HS in the interactions. We reproduced the experiments with various cell lines. As already reported (9, 42), THP-1 and Jurkat T cells specifically interacted with CyPB. Interaction was efficiently reduced following heparinase treatment, thus confirming that both cell lines are appropriate cellular models to analyze the interaction between CyPB and cell surface HS. Epithelia cell lines express high levels of membrane-associated HS, which have been reported to support interactions with various extracellular ligands (43, 44). However, we found here that HeLa, MCF7, T-47D, and MDA-MB-231 epithelia cells were unable to specifically interact with immobilized CyPB. These last results suggest that the expression of HS with specialized

binding sequences is required to support the specific binding of CyPB to target cells.

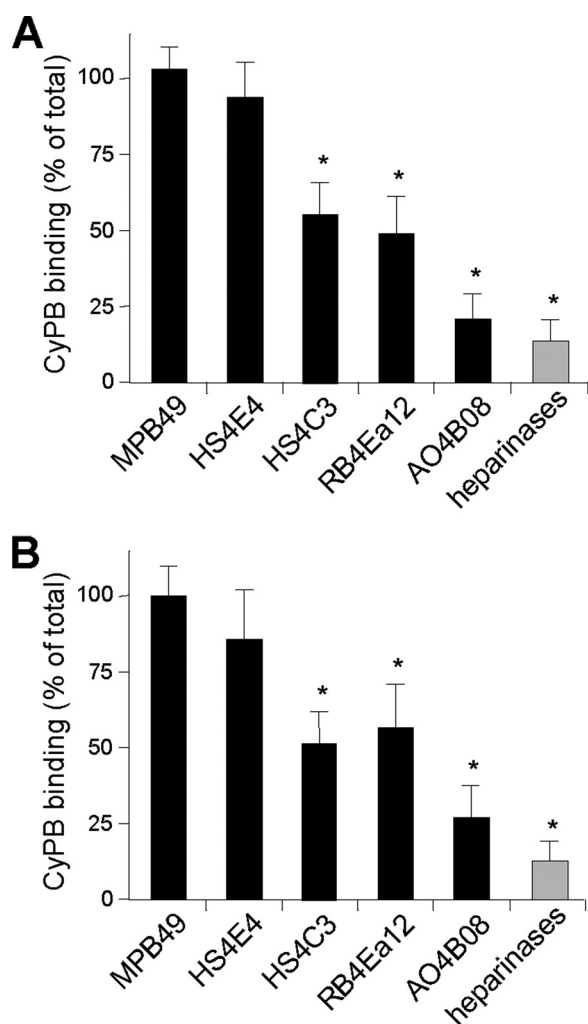
To gain insights into the structural features of HS expressed at the surface of activated/memory CD4<sup>+</sup> T cells and monocytes/macrophages, flow cytometric analysis was performed with antibodies recognizing specific sulfated HS epitopes. The reactivity of anti-HS antibodies was first determined with Jurkat T cells (Fig. 3A). HS4C3 and AO4B08, which react with highly sulfated HS/heparin epitopes, efficiently stained the 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 the cell surface of Jurkat T cells, whereas HS4E4, which recognizes distinct HS epitope with low *O*-sulfation, was the less reactive anti-HS antibody. We reproduced the experiments with CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and monocytes/macrophages (Fig. 3B). CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> and activated CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T lymphocytes was dependent on the stage of activation and/or maturation. Fluorescence values were low compared with 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<sup>+</sup> T lymphocytes and Jurkat T cells expressed cell surface HS with similar structural features. The reactivity of antibodies with primary monocytes was low (HS4C3 and RB4Ea12) or not significant (HS4E4 and AO4B08). Cell immunostaining with HS4C3, RB4Ea12, and AO4B08 was increased after stimulation with lipopolysaccharide, 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 found that anti-HS antibodies markedly reacted with THP-1 cells. Although the values of fluorescence were high compared with primary monocytes/macrophages, the profiles of cell immunostaining resembled each other, indicating that these cell types express cell surface HS with similar structural features.

Taking into account the reactivity of anti-HS antibodies (supplemental Table S1), these results indicate that membrane-associated HS on activated/memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, Jurkat T cells, monocytes/macrophages, and THP-1 cells contained highly sulfated sequences. We then analyzed the ability of anti-HS antibodies to inhibit the binding of CyPB to both THP-1 and Jurkat cells (Fig. 4). By comparison with the irrelevant antibody, 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



**FIGURE 3. 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 gray histogram represents the negative control. Data are representative of three separate experiments. *B*, detection of cell surface HS on CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subsets, monocytes/macrophages, Jurkat T cells, and THP-1 cells. Data are expressed as variation of fluorescence mean value ( $\Delta FMV$ %) and correspond to means  $\pm$  S.D. from at least three separate experiments obtained with peripheral blood cells from different donors. \*, significant difference compared with isotype control ( $p < 0.05$ ).

## Synthesis of HS with CyPB-binding Properties



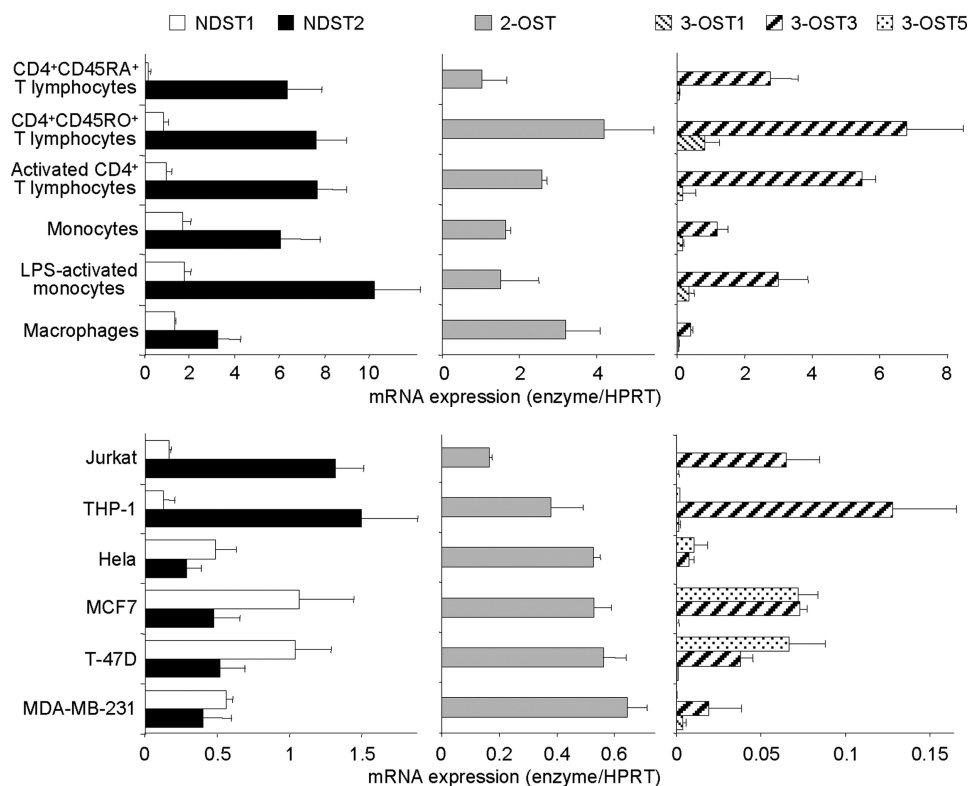
**FIGURE 4. Effect of anti-HS antibodies on the interaction of CyPB with cell surface HS.** Jurkat T cells (A) and THP-1 cells (B) were preincubated in the presence of anti-HS antibodies or isotype control and allowed to adhere to immobilized CyPB (1  $\mu$ g/well). Cell binding was related to the number of initially added cells ( $0.8 \times 10^6$  per well) remaining fixed to the adhesive substrate. Heparinase-treated cells were used as a control to estimate the participation of HS in the interaction. 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 the mean  $\pm$  S.D. of triplicates from three separate experiments. \*, significant difference compared with isotype control ( $p < 0.05$ ).

contrast, HS4C3, RB4Ea12, and AO4B08 efficiently reduced the interaction between CyPB and cell surface HS, confirming that CyPB interacted with highly modified HS motifs. HS4C3 was described to react with HS epitopes containing 3-O-sulfated groups, thus confirming the involvement of this modification on the interaction with CyPB. Surprisingly, AO4B08 was more efficient than HS4C3 and RB4Ea12 to inhibit the interaction, and also the epitope recognized by this antibody appeared less represented. Given that this antibody recognizes highly sulfated epitopes containing internal 2-O-sulfated IdoUA residue, these results indicate that HS sequences containing these structural modifications are also critically involved in the efficient interaction with CyPB.

*T Lymphocytes and Monocytes/Macrophages Specifically Express High Levels of NDST2 and 3-OST3 Isoforms*—In the following experiments, we analyzed whether structural features

of the high affinity CyPB-binding sites could be related to cell type-specific expression of certain HS sulfotransferases. Although 2-OST is represented by a single isoform, four NDST and seven 3-OST have been cloned and characterized. Among these isoenzymes, NDST1, NDST2, 3-OST1, 3-OST3 (3A and 3B), and 3-OST5 are widely expressed in various tissues, whereas the expression of other isoforms is mainly restricted to embryonic and/or brain tissues. We then decided to analyze the respective levels of expression of mRNAs encoding NDST1, NDST2, 2-OST, 3-OST1, 3-OST3, and 3-OST5 by real time reverse transcription-PCR. As shown in Fig. 5, NDST1 was barely detected in naive T lymphocytes by comparison with memory and activated CD4<sup>+</sup> T cells, whereas no notable variation in the expression of NDST2 could be distinguished between T cell subsets. Conversely, the expression of NDST2 in monocytes was modified following cell activation or maturation, although the same treatment had no significant effect on the level of mRNA encoding NDST1. These results suggest that the expression of both isoenzymes could be regulated by distinct mechanisms in lymphocyte and monocyte subsets. Nevertheless, a common feature of these cells is the relative expression of mRNAs encoding both isoenzymes. Indeed, the level of transcripts encoding NDST1 remained low in all the subsets of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and monocytes/macrophages by comparison with the high expression of NDST2. The level of expression of NDST1 and NDST2 in Jurkat T cells and THP-1 cells was lower than in primary cells, which could be due, however, to the transformed phenotype of cell lines. Most importantly, the relative expression of both isoenzymes was quite similar to those observed in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and monocytes/macrophages. We then analyzed the expression of mRNAs encoding these enzymes in HeLa, MCF7, T-47D, and MDA-MB-231 cell lines (Fig. 5). In contrast to Jurkat and THP-1, the transcript encoding NDST1 was the main NDST mRNA expressed in epithelia cells, thus suggesting that high expression of NDST2 relative to NDST1 may be a common feature of cells from lymphoid and myeloid lineages.

CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and monocytes/macrophages express mRNA encoding 2-OST. As above, some variations could be observed between subsets of T cells and monocytes/macrophages, indicating that the expression of 2-OST was also modulated by cell activation and/or maturation. Moreover, the expression of mRNA encoding 2-OST was low in Jurkat and THP-1 cells by comparison with primary cells, thus supporting the idea that the transformed phenotype of established cell lines decreases the expression of HS biosynthetic enzymes. As expected, epithelial cell lines also express mRNA encoding 2-OST. However, no notable difference could be observed with Jurkat and THP-1 cells, as the levels of expression remained in the same range of values. Finally, we quantified the levels of expression of mRNAs encoding 3-OST1, 3-OST3 (including 3-OST3A and -3B), and 3-OST5. As expected, we found that CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and monocytes/macrophages specifically expressed high levels of 3-OST3. 3-OST1 was barely detected, although no notable expression of 3-OST5 could be observed. The profiles of expression of 3-OST isoforms were quite similar in THP-1 and Jurkat, indicating that high expression of 3-OST3 relative to other 3-OST isoforms may also be a common feature



**FIGURE 5. Expression of mRNAs encoding HS sulfotransferases.** Total RNA was extracted from primary CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subsets, monocytes/macrophages, and various cell lines (Jurkat, THP-1, HeLa, MCF7, T-47D, and MDA-MB-231). Following reverse transcription, variations in the levels of expression of NDST1, NDST2, 2-OST, 3-OST1, 3-OST3, and 3-OST5 transcripts were quantified by real time PCR, as described under "Experimental Procedures." Relative transcript abundance was normalized to endogenous control hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) mRNA. Data are means  $\pm$  S.D. from triplicates and are representative of at least three experiments performed independently.

of cells from lymphoid and myeloid lineages. In support of this idea, we found that the expressions of these isoenzymes were quite different in epithelial cell lines. Indeed, 3-OST3 (and other isoforms) were poorly expressed in HeLa and MDA-MB-231 cells, whereas mRNAs encoding 3-OST3 and 3-OST5 were both detected at a similar level in MCF7 and T-47D cells lines. On the assumption that cell type-specific expression of HS sulfotransferases may regulate the structure of HS species, our results raise the intriguing possibility that synthesis of HS with CyPB-binding properties could be determined by the relative expression of certain isoforms of some sulfotransferases.

**Silencing the Expression of HS Sulfotransferases Efficiently Alters the Pattern of Sulfation of Cell Surface HS**—To gain evidence regarding the relationships between the expression of sulfotransferases in CyPB-responsive cells and structural features in HS sequences, we developed a model based on RNA interference in Jurkat T cells. We checked that treatment of cells with either irrelevant siRNA (siGFP) or negative control siRNAs, in which two nucleotides have been changed from the target sequence, did not induce any decrease in the expression of target mRNAs. The specific siRNAs were thereafter tested for their ability to suppress mRNAs encoding each enzyme. Cell treatment 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, 2-OST, and 3-OST3

was observed in Jurkat T cells treated with corresponding specific siRNA (supplemental Fig. S1A). Moreover, we checked for the absence of any cross-reactivity. As expected, the expression of mRNA encoding NDST2, 2-OST, and 3-OST3 was not significantly altered by siNDST1, nor was the expression of mRNA encoding NDST1, 2-OST, and 3-OST3 by siNDST2, demonstrating the specificity of both siRNAs used in this assay. In the same way, si2-OST and si3-OST3 significantly reduced the expression of target mRNA, without affecting the expression of others (supplemental Fig. S1B). Notably, we also checked that the transcripts of other HS biosynthetic enzymes were expressed at the same level in control and siRNA-treated cells (data not shown), thus indicating that the expected changes in the structural and functional properties of HS would only be due to silencing of target sequences encoding sulfotransferase isoforms.

We then analyzed whether silencing the expression of sulfotransferases led to a consequent

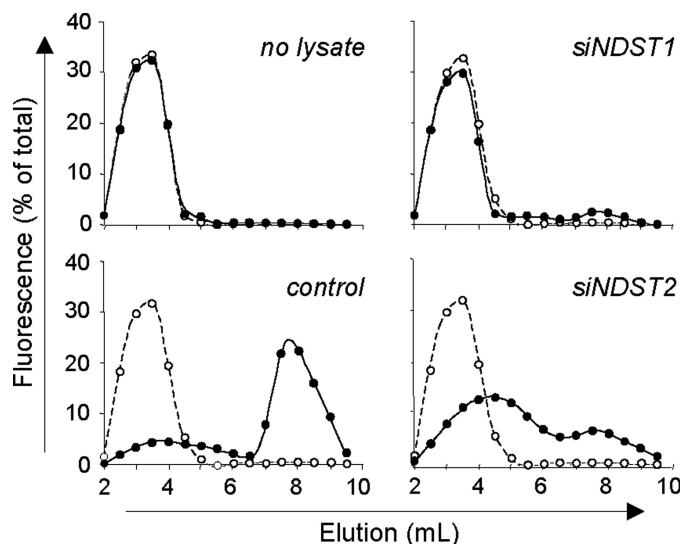
decrease in HS sulfation (supplemental Fig. S2). By comparison with cells transfected with irrelevant siRNA or negative control siRNA, silencing the expression of NDSTs resulted in a dramatic loss of the reactivity of HS4C3, AO4B08, and RB4Ea12, which all recognize *N*-sulfated epitopes. Moreover, specific 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). We also analyzed the binding of IO3H10 (1:150), which reacts with an epitope in chondroitin sulfate (32), to check whether down-regulation of NDSTs did not affect sulfation of other cell surface glycosaminoglycans. 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 glycosaminoglycans. To further demonstrate the specificity of siRNA-mediated silencing of NDST isoforms, we performed rescue experiments with plasmids expressing NDST sequences refractory to siRNA. As expected, transfection with plasmid encoding either NDST1 or NDST2 partially restored the binding of anti-HS antibodies, indicating that the loss of activity of endogenous NDST isoforms has been compensated by the expression of exogenous NDST isoforms refractory to siRNA. Silencing the expression of 2-OST and 3-OST3 had less effect on the reactivity of



## Synthesis of HS with CyPB-binding Properties

anti-HS antibodies. Cell immunostaining by HS4E4 and RB4Ea12 was not significantly modified, confirming that 2-*O*- and 3-*O*-sulfation are not required to support binding of these antibodies. Although the binding of AO4B08 was reported to require the presence of internal IdoUA2S residue, the reactivity of this antibody was weakly altered by silencing the expression of 2-OST. However, we found that the expression of mRNA encoding 2-OST was reduced by ~90% in transfected cells. Therefore, residual 2-*O*-sulfation of HS could be sufficient to support the binding of AO4B08. Finally, silencing the expression of 2-OST and 3-OST3 significantly reduced the binding of HS4C3. Among other HS modifications, the reactivity of this antibody is dependent on 2-*O* and 3-*O* sulfation, thus indicating that siRNAs had efficiently reduced the expression of target sequences. To confirm these results, rescue experiments were performed with plasmids expressing 2-OST and 3-OST3B sequences refractory to siRNA. As above, transfection of cells with refractory plasmids restored the binding of anti-HS antibodies, confirming the specificity of corresponding siRNA. Altogether, these data demonstrate that specific silencing of mRNAs encoding NDST1, NDST2, 2-OST, or 3-OST3 has led to significant changes in the pattern of HS sulfation, thus confirming that these HS sulfotransferases were enzymatically active in Jurkat T cells.

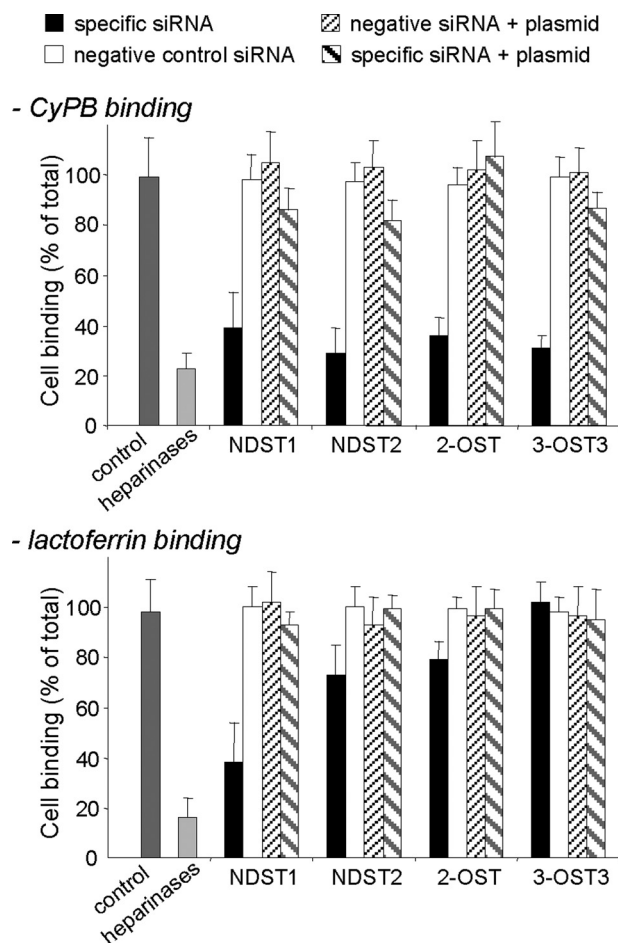
**Silencing the Expression of NDST1 or NDST2 Differently Alters *N*-Sulfation**—Although the reactivity of anti-HS antibodies was informative to analyze siRNA-induced alterations in HS sulfation, it was not discriminant enough to know whether NDST1 and NDST2 have redundant or distinct activities. To establish how silencing the expression of these isoenzymes modified *N*-sulfate density of HS, we therefore 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 HNO<sub>2</sub>, pH 1.5, which specifically target GlcNS residues (37). 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. 6). In the absence of 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 HNO<sub>2</sub> 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 small fraction (~10%) of fluorescent oligosaccharides was sensitive to nitrous acid degradation, indicating that only partial *N*-sulfation had occurred. Given that the expression of NDST2 was not altered in these cells, the fluores-



**FIGURE 6. Contribution of NDST1 and NDST2 to *N*-sulfotransferase activity in Jurkat T cells.** *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 ( $25 \times 10^6$ /ml) were lysed 48 h post-transfection. The sulfation reaction was performed by incubating cell lysate (100  $\mu$ g of solubilized proteins) with 5  $\mu$ g of substrate and 10  $\mu$ M 3'-phosphoadenosyl-5'-phosphosulfate. Newly modified *N*-sulfated oligosaccharides were purified and subjected to a deaminative cleavage with HNO<sub>2</sub> at pH 1.5, as described under "Experimental Procedures." The products of deaminative cleavage (●) and parent oligosaccharides (○) were fractionated on Bio-Gel P-6 column (20  $\times$  0.8 cm), and fractions of 500  $\mu$ 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.

cent 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 HNO<sub>2</sub> 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 HNO<sub>2</sub> 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 do not have redundant activity but rather have complementary activity, probably acting sequentially to fully modify HS sequences.

**Specific Binding and Activity of CyPB Are Controlled by the Expression of HS Sulfotransferases**—To study the biological consequence of silencing sulfotransferase expression, we analyzed the interaction between CyPB and cell surface HS in siRNA-treated cells (Fig. 7). Lactoferrin has been demonstrated to interact with leukocytes and epithelial cells, mainly as a con-



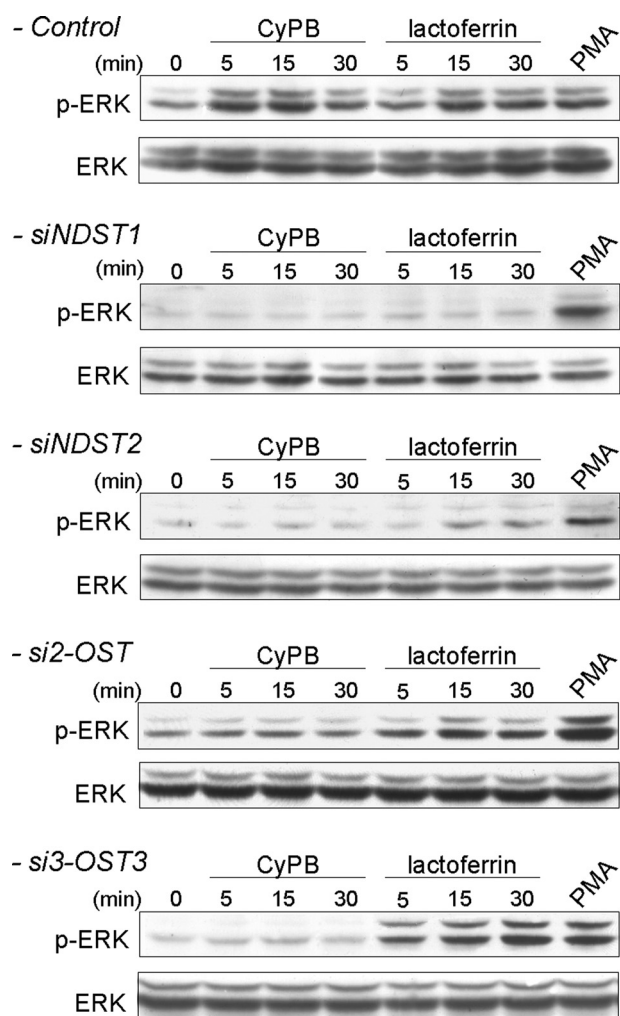
**FIGURE 7. Effect of siRNA targeting HS sulfotransferases on the binding of Jurkat T cells to immobilized ligands.** Involvement of NDST1, NDST2, 2-OST, and 3-OST3 in the generation of HS motifs with binding properties was analyzed by measuring the interaction of siRNA-treated Jurkat T cells with immobilized CyPB (1  $\mu$ g/well) or lactoferrin (4  $\mu$ g/well), 48 h post-transfection. In control experiments, cells were either treated with irrelevant siGFP or negative control siRNA. In rescue experiments, cells were first treated with specific siRNA or corresponding negative control siRNA for 24 h. Thereafter, cells were transfected with plasmids expressing sequences refractory to specific siRNA and used 24 h later for binding experiments. Cell binding was related to the number of initially added cells ( $0.8 \times 10^6$  per well) remaining fixed to the adhesive substrate. The binding of siGFP-treated cells (control) 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. Heparinase-treated cells were used as a control to estimate the participation of HS in the interaction. Each bar of histograms represents the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

sequence of interaction with *N*-sulfate groups in NS domains of HS (43, 44). 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 potentially inhibited (>75% of initial binding) by heparinase treatment, thus confirming that the method was also appropriate to analyze interactions between lactoferrin 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 for 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, because binding of Jurkat T cells was only reduced by  $\sim$ 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 specifically interact with CyPB. We then analyzed the effects of siRNA specific for 2-OST and 3-OST3 isoforms. Silencing the expression of 2-OST and 3-OST3 strongly reduced the binding of treated cells to immobilized CyPB (65 and 70% of inhibition, respectively), confirming that 2-*O*- and 3-*O*-sulfate groups were required to support the binding of the ligand. In contrast, cell binding to lactoferrin was poorly altered by the decrease of 2-*O*-sulfation ( $\sim$ 20% of inhibition), and down-regulation of the expression of 3-OST3 had no inhibitory effect on the interaction between this ligand and cell surface HS. In control experiments, we checked that the inhibitory effect produced by siRNA treatment could be significantly rescued by exogenous expression of refractory sequences, thus confirming the specificity of siRNA-mediated silencing.

The main intracellular event following CyPB or lactoferrin binding to T lymphocytes is the activation of the p44/p42 MAPK pathway (8, 26, 45). 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 NDST1 expression, because phorbol myristate acetate, which is a strong activator of the p44/p42 MAPK pathway, efficiently induced the phosphorylation of ERK1/2 in transfected cells (Fig. 8). Although down-regulation of the expression of NDST2 slightly affected cell surface binding of lactoferrin, the activation of p44/p42 MAPK was reduced in both treated cells. However, the inhibitory effect was not as dramatic as that observed with CyPB. Indeed, the ability of CyPB to activate p44/p42 MAPK pathway was abolished in siNDST2-treated cells, indicating that silencing the expression of NDST2 has rendered the cells unresponsive to the inflammatory factor. Previous data have shown that NDST2 was not required to initiate *N*-sulfation but would rather contribute to increase the density of *N*-sulfate groups. Consistent with these findings, our results suggest that *N*-sulfation by NDST1 is sufficient to support the binding of lactoferrin and partial activation of the signaling pathway. In contrast, the contribution of both NDST1 and NDST2 to high *N*-sulfation is absolutely required for generating HS motifs with CyPB-binding and -activating properties. As expected, down-regulation of 2-OST and 3-OST3 strongly inhibited the ability of CyPB to activate p44/p42 MAPK pathway, thus confirming the involvement of 2-*O*- and 3-*O*-sulfate groups in the binding of the protein. In contrast, the response induced by lactoferrin was only slightly reduced in si2-OST2-treated cells and remained unmodified in si3-OST3-treated cells, thus confirming the binding data (Fig. 8). Altogether, these results indicate that specific binding of CyPB to responsive cells and the consequent activation of the signaling pathway are dependent on the expression of highly modified HS.

## Synthesis of HS with CyPB-binding Properties



**FIGURE 8. Effect of siRNA targeting HS sulfotransferases on CyPB- and lactoferrin-induced activation of p44/p42 MAPK.** The contribution of NDST1, NDST2, 2-OST, and 3-OST3 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. Phorbol myristate acetate (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.

## DISCUSSION

Our previous studies (6, 26, 27) demonstrated that efficient binding of CyPB to heparin and cell surface HS expressed on T cells was dependent on the interaction with a highly sulfated HS sequence, in which a critical modification was the presence of a 3-*O*-sulfated GlcNH<sub>2</sub> residue. Although GlcNH<sub>2</sub> residues have been reported to be preferentially located in NA domains and in transition zones between NA and NS domains, 3-*O*-sulfated GlcNH<sub>2</sub>-containing sequences have been characterized within heparin and the highly sulfated NS domain of some HS species (21, 23, 46). These data prompted us to propose that the high affinity binding site of CyPB may be located in specialized NS domains of HS expressed at the membrane of target cells. This study further supports this hypothesis. We found that CyPB binding to partially *N*-desulfated heparin, which contained high levels of GlcNH<sub>2</sub> compared with unmodified heparin, was

not improved but rather was inhibited. This clearly demonstrates that GlcNH<sub>2</sub> residues are required but not sufficient to support interaction with CyPB. Moreover, these results indicate that *N*-sulfation rather than 6-*O*- and/or 2-*O*-sulfations was important to support CyPB binding, because chemical *N*-desulfation of heparin did not significantly reduce the rate of 6-*O*- and 2-*O*-sulfate groups. 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 sulfate groups in NS domains was also important for optimal binding of CyPB. Competitive binding experiments with anti-HS antibodies allowed us to further characterize the interaction of CyPB with cell surface HS. We demonstrated that HS4C3 reduced CyPB binding to responsive cells. HS4C3 was demonstrated to selectively identify 3-*O*-sulfated GlcN residues in the interaction. Importantly, the epitope recognized by HS4C3 was reported to colocalize with the HS motifs that interact with the envelope glycoprotein gD of HSV-1 (35). Given that the disaccharide unit IdoUA2S-GlcNH<sub>2</sub>3S±6S contributes to the specific binding of HSV-1 gD to heparin and cell surface HS of target cells (23), our findings strongly suggest that the HS sequences that react with CyPB and envelope protein of HSV-1 share common structural features. We also report that the binding reactions of CyPB to heparin and cell surface HS from T lymphocytes are quite similar (6, 26, 27). Interestingly, AO4B08 was more efficient than HS4C3 and RB4Ea12 to inhibit the interaction between CyPB and target cells. AO4B08 recognizes highly *N*- and *O*-sulfated HS motifs containing internal IdoUA2S residues (31, 33), thus suggesting that this modification was also important for the binding of CyPB. In contrast to AO4B08, HS4E4 recognizes low sulfated HS motifs but does not bind to highly sulfated structures such as some found in the heparin and NS domains of HS (31, 33), explaining why it was unable to inhibit the interaction between CyPB and responsive cells. Altogether, these data support the idea that CyPB interacts with a heparin-like sequence expressed at the surface of target cells.

The sulfation pattern varies considerably among HS species, which has been related to cell type-specific expression of certain isoforms of HS sulfotransferases and their relative expression depending on cellular conditions. Given that the density of *N*-sulfates and the presence of 2-*O*- and 3-*O*-sulfates appeared critical to support CyPB binding, we have then analyzed the expression of related HS sulfotransferases in various cell types. We found that target cells of CyPB, *i.e.* memory/activated T lymphocytes, monocytes/macrophages, and related established cell lines specifically expressed high levels of mRNA encoding NDST2 and 3-OST3. 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 (16), lymphoid tissues, *e.g.* thymus and spleen, and whole blood leukocytes (14, 47), thus indicating that high expression of NDST2 may be a common feature of cells from the hematopoietic line-

ages. 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. Interestingly, we found that epithelial cell lines express a lower level of NDST2 relative to NDST1, thus arguing for a role of this isoenzyme in making HS sequence with CyPB binding properties. Surprisingly, we found that naive CD4<sup>+</sup> T cells expressed high levels of NDST2 and 3-OST3, although they were devoid of any binding activity for CyPB. However, we demonstrated that these cells were not immunostained by anti-HS antibodies, indicating that they did not expressed cell surface HS. These findings are in agreement with previously published data reporting that naive T cells did not express any membrane-associated HS proteoglycans. For example, Forster-Horvath *et al.* (48) reported that CD44v3 is expressed intracellularly by naive T cells and rapidly exposed at the cell surface following cell stimulation. Likewise, we and others have shown that CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and monocytes/macrophages express various HS proteoglycans, *e.g.* syndecans and CD44v3, for which the mRNA level and cell surface expression are increased following cell activation and differentiation (8, 49, 50). In accordance with these data, we speculate that HS proteoglycans are rapidly exposed to the cell surface upon stimulation of naive T cells. Thereafter, cell differentiation may be accompanied by an increase in HS proteoglycan 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 CyPB functions.

Because high expression of NDST2 has been reported to correlate with high *N*-sulfate density in heparin and HS (51, 52), 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, 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. Obviously, several aspects regarding the regulation of expression of NDST isoforms and the relative contribution of each isoenzyme to the synthesis of HS remain unclear. 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 C<sub>5</sub>-epimerization, thus arguing for a direct relationship between NDST activity and *N*-sulfate density. Moreover, cells stably transfected with NDST2 synthesized HS with higher *N*-sulfate density by comparison with NDST1-transfected cells, suggesting that the *N*-sulfation pattern may be isoform-dependent (51). 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 (16–18). By using genetically modified mice, Ledin *et al.* (19) demonstrated that liver HS from wild-type and

knock-out animals all had the same structure despite significantly reduced NDST enzyme activity in NDST1<sup>+/-</sup>/NDST2<sup>-/-</sup> embryos. Moreover, 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 a complex formed by the association of different enzymes of HS biosynthesis, although NDST2 would be frozen out. In the absence of NDST1, NDST2 could occupy the NDST position in the HS biosynthesis complex and thus take place on *N*-sulfation of HS. Another intriguing hypothesis may be that NDST1 is required for partial *N*-sulfation of the nascent precursor and consequent initiation of other modifications, whereas 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 a previously modified substrate (53). By using the *Cre-loxP* system of gene inactivation, Wang *et al.* (54) 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 able to compensate for the absence of NDST2 but not vice versa. Our results are in agreement with these latest 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. This would be possible if NDST1 and NDST2 localized to different Golgi compartments. Actually, NDST1 was reported to interact with the HS polymerase EXT2, thus suggesting that it takes part in the first modifications of the HS precursor (55). In cells where NDST2 expression is high by comparison with NDST1, NDST2 may act in a late compartment and increase the level of *N*-sulfation in sequences that have been previously modified by enzymes in a more proximal part of the Golgi network.

We demonstrated in previous works that the binding of CyPB was dependent on the interaction with a HS sequence, in which a key modification was the presence of a 3-*O*-sulfated GlcNH<sub>2</sub> (26). As expected, we demonstrated here that silencing the expression of 3-OST3 dramatically reduced the binding of CyPB to target cells and consequently the activation of the signaling pathway, thus confirming previous results. In addition, we found that down-regulation of 2-OST also reduced CyPB binding and consequent activation of p44/p42 MAPK in responsive cells. These results suggested a direct role for 2-*O*-sulfate groups in the interaction between CyPB and cell surface HS. This is consistent with the demonstration that AO4B08, which recognizes internal IdoUA2S residues, was highly efficient at reducing the binding of CyPB to target cells. On the other hand, we found that silencing the expression of 2-OST significantly reduced the binding of HS4C3, indicating that

## Synthesis of HS with CyPB-binding Properties

alteration of the activity of 2-OST had reduced the subsequent reaction of HS 3-O-sulfation. Actually, 3-OST3 isoforms have been reported to transfer sulfate groups to the 3-OH position of GlcNH<sub>2</sub> and/or GlcNS residues, which are adjacent to IdoUA2S residues (21, 23, 25). Therefore, 2-O-sulfation of IdoUA residues is probably a limiting step for the unique substrate specificity of 3-OST3, suggesting that both 2-OST and 3-OST3 also have complementary activities to generate the HS-binding motif of CyPB.

An overall conclusion from our studies is that cell type-specific expression of certain isoforms of sulfotransferases may determine the specificity of extracellular ligand binding. Considering that a number of inflammatory and immunoregulatory mediators interact with cell surface HS to target subsets of T lymphocytes and monocytes/macrophages (56), this could play an important role in inflammatory and immune responses. Moreover, a growing interest has focused on the use of recombinant enzymes to synthesize HS-derived molecules with therapeutic application (57). In this context, 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 sulfated oligosaccharides with expected activity in the treatment of some inflammatory disorders.

*Acknowledgments*—We are grateful to Christophe Vanpouille (National Institutes of Health, Bethesda) for helpful discussions, Malcolm Lyon (University of Manchester, United Kingdom) for providing fully N-desulfated heparin, and Lena Kjellén (University of Uppsala, Sweden) for the generous gift of plasmids expressing NDST1 and NDST2.

### 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 Sci.* **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. U.S.A.* **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. Engl.* **41**, 391–412
11. Ori, A., Wilkinson, M. C., and Fernig, D. G. (2008) *Front. Biosci.* **13**, 4309–4338
12. Turnbull, J., Powell, A., and Guimond, S. (2001) *Trends Cell Biol.* **11**, 75–82
13. Esko, J. D., and Selleck, S. B. (2002) *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 435–471
14. Aikawa, J., and Esko, J. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 2690–2695
15. Aikawa, J., Grobe, K., Tsujimoto, M., and Esko, J. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 5876–5882
16. 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
17. 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
18. Ledin, J., Staatz, W., Li, J. P., Götte, M., Selleck, S., Kjellén, L., and Spillmann, D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 42732–42741
19. 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
20. 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
21. Liu, J., Shriver, Z., Blaiklock, P., Yoshida, K., Sasisekharan, R., and Rosenberg, R. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 38155–38162
22. Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D., and Spear, P. G. (1999) *Cell* **99**, 13–22
23. 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., and Sasisekharan, R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 33456–33467
24. Xu, D., Tiwari, V., Xia, G., Clement, C., Shukla, D., and Liu, J. (2005) *Biochem. J.* **385**, 451–459
25. Mochizuki, H., Yoshida, K., Shibata, Y., and Kimata, K. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 31237–31245
26. 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
27. Vanpouille, C., Denys, A., Carpentier, M., Pakula, R., Mazurier, J., and Allain, F. (2004) *Biochem. J.* **382**, 733–740
28. Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H., and Vliegthart, J. F. (1982) *Eur. J. Biochem.* **121**, 413–419
29. 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
30. 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
31. 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
32. Smetsers, T. F., van de Westerlo, E. M., ten Dam, G. B., Overes, I. M., Schalkwijk, J., van Muijen, G. N., and van Kuppevelt, T. H. (2004) *J. Invest. Dermatol.* **122**, 707–716
33. Smits, N. C., Lensen, J. F., Wijnhoven, T. J., Ten Dam, G. B., Jenniskens, G. J., and van Kuppevelt, T. H. (2006) *Methods Enzymol.* **416**, 61–87
34. 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
35. Tiwari, V., ten Dam, G. B., Yue, B. Y., van Kuppevelt, T. H., and Shukla, D. (2007) *FEBS Lett.* **581**, 4468–4472
36. Wei, Z., Lyon, M., and Gallagher, J. T. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 15742–15748
37. Shively, J. E., and Conrad, H. E. (1976) *Biochemistry* **15**, 3932–3942
38. Pfaffl, M. W. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, e45
39. Carlsson, P., Presto, J., Spillmann, D., Lindahl, U., and Kjellén, L. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 20008–20014
40. Rong, J., Habuchi, H., Kimata, K., Lindahl, U., and Kusche-Gullberg, M. (2000) *Biochem. J.* **346**, 463–468
41. Bame, K. J., Reddy, R. V., and Esko, J. D. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 12461–12468
42. Carpentier, M., Allain, F., Slomianny, M. C., Durieux, S., Vanpouille, C., Haendler, B., and Spik, G. (2002) *Biochemistry* **41**, 5222–5229
43. Pejler, G. (1996) *Biochem. J.* **320**, 897–903
44. 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
45. Dhennin-Duthille, I., Masson, M., Damiens, E., Fillebeen, C., Spik, G., and Mazurier, J. (2000) *J. Cell. Biochem.* **79**, 583–593
46. Westling, C., and Lindahl, U. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 49247–49255
47. Pallerla, S. R., Lawrence, R., Lewejohann, L., Pan, Y., Fischer, T., Schlo-

- mann, U., Zhang, X., Esko, J. D., and Grobe, K. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 16885–16894
48. Forster-Horváth, C., Bocsi, J., Rásó, E., Orbán, T. I., Olah, E., Tímár, J., and Ladányi, A. (2001) *Eur. J. Immunol.* **31**, 600–608
49. Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D. C., Huang, Y., and Ruscetti, F. W. (2005) *J. Virol.* **79**, 12692–12702
50. Wegrowski, Y., Milard, A. L., Kotlarz, G., Toulmonde, E., Maquart, F. X., and Bernard, J. (2006) *Clin. Exp. Immunol.* **144**, 485–493
51. Pikas, D. S., Eriksson, I., and Kjellén, L. (2000) *Biochemistry* **39**, 4552–4558
52. Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Pikas, D. S., and Kjellén, L. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 11902–11907
53. van den Born, J., Pikas, D. S., Pisa, B. J., Eriksson, I., Kjellen, L., and Berden, J. H. (2003) *Glycobiology* **13**, 1–10
54. Wang, L., Fuster, M., Sriramarao, P., and Esko, J. D. (2005) *Nat. Immunol.* **6**, 902–910
55. Presto, J., Thuveson, M., Carlsson, P., Busse, M., Wilén, M., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M., and Kjellén, L. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 4751–4756
56. Taylor, K. R., and Gallo, R. L. (2006) *FASEB J.* **1**, 9–22
57. Lindahl, U. (2007) *Thromb. Haemostasis* **98**, 109–115



# *Bibliographie*

---





- Abraham, S. M., T. Lawrence, A. Kleiman, P. Warden, M. Medghalchi, J. Tuckermann, J. Saklatvala, and A. R. Clark (2006), Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1, *J Exp Med*, 203(8), 1883-1889.
- Aksoy, E., W. Vanden Berghe, S. Detienne, Z. Amraoui, K. A. Fitzgerald, G. Haegeman, M. Goldman, and F. Willems (2005), Inhibition of phosphoinositide 3-kinase enhances TRIF-dependent NF-kappa B activation and IFN-beta synthesis downstream of Toll-like receptor 3 and 4, *Eur J Immunol*, 35(7), 2200-2209.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell (2001), Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3, *Nature*, 413(6857), 732-738.
- Allain, F., C. Vanpouille, M. Carpentier, M. C. Slomianny, S. Durieux, and G. Spik (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(5), 2714-2719.
- Allain, F., S. Durieux, A. Denys, M. Carpentier, and G. Spik (1999), Cyclophilin B binding to platelets supports calcium-dependent adhesion to collagen, *Blood*, 94(3), 976-983.
- Allain, F., A. Denys, and G. Spik (1996), Cyclophilin B mediates cyclosporin A incorporation in human blood T-lymphocytes through the specific binding of complexed drug to the cell surface, *Biochem J*, 317, 565-570.
- Allain, F., C. Boutillon, C. Mariller, and G. Spik (1995), Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies, *Journal of immunological methods*, 178(1), 113-120.
- Allain, F., A. Denys, and G. Spik (1994), Characterization of surface binding sites for cyclophilin B on a human tumor T-cell line, *J Biol Chem*, 269(24), 16537-16540.
- An, H., J. Hou, J. Zhou, W. Zhao, H. Xu, Y. Zheng, Y. Yu, S. Liu, and X. Cao (2008), Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1, *Nature immunology*, 9(5), 542-550.
- An, H., et al. (2006), SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production, *Immunity*, 25(6), 919-928.
- Anderson, P., K. Phillips, G. Stoecklin, and N. Kedersha (2004), Post-transcriptional regulation of proinflammatory proteins, *Journal of leukocyte biology*, 76(1), 42-47.
- Androulidaki, A., D. Iliopoulos, A. Arranz, C. Doxaki, S. Schworer, V. Zacharioudaki, A. N. Margioris, P. N. Tsihchlis, and C. Tsatsanis (2009), The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs, *Immunity*, 31(2), 220-231.
- Arber, S., K. H. Krause, and P. Caroni (1992), s-cyclophilin is retained intracellularly via a unique COOH-terminal sequence and colocalizes with the calcium storage protein calreticulin, *The Journal of cell biology*, 116(1), 113-125.
- Arbibe, L., J. P. Mira, N. Teusch, L. Kline, M. Guha, N. Mackman, P. J. Godowski, R. J. Ulevitch, and U. G. Knaus (2000), Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway, *Nature immunology*, 1(6), 533-540.
- Arora, K., W. M. Gwinn, M. A. Bower, A. Watson, I. Okwumabua, H. R. MacDonald, M. I. Bukrinsky, and S. L. Constant (2005), Extracellular cyclophilins contribute to the

regulation of inflammatory responses, *J Immunol*, 175(1), 517-522.

- Babu, G. R., W. Jin, L. Norman, M. Waterfield, M. Chang, X. Wu, M. Zhang, and S. C. Sun (2006), Phosphorylation of NF-kappaB1/p105 by oncoprotein kinase Tpl2: implications for a novel mechanism of Tpl2 regulation, *Biochim Biophys Acta*, 1763(2), 174-181.
- Baetz, A., M. Frey, K. Heeg, and A. H. Dalpke (2004), Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells, *J Biol Chem*, 279(52), 54708-54715.
- Balsley, M. A., M. Malesevic, E. J. Stemmy, J. Gigley, R. A. Jurjus, D. Herzog, M. I. Bukrinsky, G. Fischer, and S. L. Constant (2010), A cell-impermeable cyclosporine A derivative reduces pathology in a mouse model of allergic lung inflammation, *J Immunol*, 185(12), 7663-7670.
- Barbalat, R., L. Lau, R. M. Locksley, and G. M. Barton (2009), Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands, *Nature immunology*, 10(11), 1200-1207.
- Bartok, B., and G. S. Firestein (2010), Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis, *Immunol Rev*, 233(1), 233-255.
- Bauer, K., et al. (2009), Cyclophilins contribute to Stat3 signaling and survival of multiple myeloma cells, *Oncogene*, 28(31), 2784-2795.
- Bauer, S., S. Pigisch, D. Hangel, A. Kaufmann, and S. Hamm (2008), Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9, *Immunobiology*, 213(3-4), 315-328.
- Bauer, S., C. J. Kirschning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, and G. B. Lipford (2001), Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(16), 9237-9242.
- Bazzoni, F., M. Rossato, M. Fabbri, D. Gaudiosi, M. Mirolo, L. Mori, N. Tamassia, A. Mantovani, M. A. Cassatella, and M. Locati (2009), Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(13), 5282-5287.
- Beinke, S., J. Deka, V. Lang, M. P. Belich, P. A. Walker, S. Howell, S. J. Smerdon, S. J. Gamblin, and S. C. Ley (2003), NF-kappaB1 p105 negatively regulates TPL-2 MEK kinase activity, *Mol Cell Biol*, 23(14), 4739-4752.
- Berditchevski, F., S. Chang, J. Bodorova, and M. E. Hemler (1997), Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6, *J Biol Chem*, 272(46), 29174-29180.
- Bergeron, M. J., M. Burzle, G. Kovacs, A. Simonin, and M. A. Hediger (2011), Synthesis, maturation, and trafficking of human Na<sup>+</sup>-dicarboxylate cotransporter NaDC1 requires the chaperone activity of cyclophilin B, *J Biol Chem*, 286(13), 11242-11253.
- Bergsma, D. J., et al. (1991), The cyclophilin multigene family of peptidyl-prolyl isomerases. Characterization of three separate human isoforms, *J Biol Chem*, 266(34), 23204-23214.
- Berthoux, L., S. Sebastian, E. Sokolskaja, and J. Luban (2005), Cyclophilin A is required for TRIM5{alpha}-mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(41), 14849-14853.
- Bienkowska-Haba, M., H. D. Patel, and M. Sapp (2009), Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection, *PLoS pathogens*, 5(7), e1000524.

- Bierer, B. E., S. L. Schreiber, and S. J. Burakoff (1991), The effect of the immunosuppressant FK-506 on alternate pathways of T cell activation, *Eur J Immunol*, 21(2), 439-445.
- Bignell, G. R., et al. (2000), Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene, *Nature genetics*, 25(2), 160-165.
- Billich, A., G. Winkler, H. Aschauer, A. Rot, and P. Peichl (1997), Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis, *J Exp Med*, 185(5), 975-980.
- Bonfils, C., N. Bec, C. Larroque, M. Del Rio, C. Gongora, M. Pugniere, and P. Martineau (2010), Cyclophilin A as negative regulator of apoptosis by sequestering cytochrome c, *Biochem Biophys Res Commun*, 393(2), 325-330.
- Boone, D. L., et al. (2004), The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses, *Nature immunology*, 5(10), 1052-1060.
- Borel, J. F. (1989), The cyclosporins, *Transplant Proc*, 21(1 Pt 1), 810-815.
- Borel, J. F., and H. C. Gunn (1986), Cyclosporine as a new approach to therapy of autoimmune diseases, *Ann N Y Acad Sci*, 475, 307-319.
- Boulos, S., B. P. Meloni, P. G. Arthur, B. Majda, C. Bojarski, and N. W. Knuckey (2007), Evidence that intracellular cyclophilin A and cyclophilin A/CD147 receptor-mediated ERK1/2 signalling can protect neurons against in vitro oxidative and ischemic injury, *Neurobiology of disease*, 25(1), 54-64.
- Braaten, D., E. K. Franke, and J. Luban (1996), Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription, *J Virol*, 70(6), 3551-3560.
- Bram, R. J., and G. R. Crabtree (1994), Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein, *Nature*, 371(6495), 355-358.
- Bram, R. J., D. T. Hung, P. K. Martin, S. L. Schreiber, and G. R. Crabtree (1993), Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location, *Mol Cell Biol*, 13(8), 4760-4769.
- Brancho, D., N. Tanaka, A. Jaeschke, J. J. Ventura, N. Kelkar, Y. Tanaka, M. Kyuuma, T. Takeshita, R. A. Flavell, and R. J. Davis (2003), Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo, *Genes Dev*, 17(16), 1969-1978.
- Brasier, A. R., M. Lu, T. Hai, Y. Lu, and I. Boldogh (2001), NF-kappa B-inducible BCL-3 expression is an autoregulatory loop controlling nuclear p50/NF-kappa B1 residence, *J Biol Chem*, 276(34), 32080-32093.
- Brazin, K. N., R. J. Mallis, D. B. Fulton, and A. H. Andreotti (2002), Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4), 1899-1904.
- Brint, E. K., D. Xu, H. Liu, A. Dunne, A. N. McKenzie, L. A. O'Neill, and F. Y. Liew (2004), ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance, *Nature immunology*, 5(4), 373-379.
- Brocke-Heidrich, K., B. Ge, H. Cvijic, G. Pfeifer, D. Loffler, C. Henze, T. W. McKeithan, and F. Horn (2006), BCL3 is induced by IL-6 via Stat3 binding to intronic enhancer HS4 and represses its own transcription, *Oncogene*, 25(55), 7297-7304.
- Brondello, J. M., J. Pouyssegur, and F. R. McKenzie (1999), Reduced MAP kinase phosphatase-

1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation, *Science (New York, N.Y.)*, 286(5449), 2514-2517.

- Brook, M., C. R. Tchen, T. Santalucia, J. McIlrath, J. S. Arthur, J. Saklatvala, and A. R. Clark (2006), Posttranslational regulation of tristetraprolin subcellular localization and protein stability by p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways, *Mol Cell Biol*, 26(6), 2408-2418.
- Bulut, Y., E. Faure, L. Thomas, O. Equils, and M. Arditì (2001), Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling, *J Immunol*, 167(2), 987-994.
- Bundy, D. L., and T. W. McKeithan (1997), Diverse effects of BCL3 phosphorylation on its modulation of NF-kappaB p52 homodimer binding to DNA, *J Biol Chem*, 272(52), 33132-33139.
- Burns, K., S. Janssens, B. Brissoni, N. Olivos, R. Beyaert, and J. Tschopp (2003), Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4, *J Exp Med*, 197(2), 263-268.
- Burns, K., J. Clatworthy, L. Martin, F. Martinon, C. Plumpton, B. Maschera, A. Lewis, K. Ray, J. Tschopp, and F. Volpe (2000), Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor, *Nature cell biology*, 2(6), 346-351.
- Burns, K., F. Martinon, C. Esslinger, H. Pahl, P. Schneider, J. L. Bodmer, F. Di Marco, L. French, and J. Tschopp (1998), MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling, *J Biol Chem*, 273(20), 12203-12209.
- Caamano, J. H., P. Perez, S. A. Lira, and R. Bravo (1996), Constitutive expression of Bcl-3 in thymocytes increases the DNA binding of NF-kappaB1 (p50) homodimers in vivo, *Mol Cell Biol*, 16(4), 1342-1348.
- Campa, M. J., M. Z. Wang, B. Howard, M. C. Fitzgerald, and E. F. Patz, Jr. (2003), Protein expression profiling identifies macrophage migration inhibitory factor and cyclophilin as a potential molecular targets in non-small cell lung cancer, *Cancer research*, 63(7), 1652-1656.
- Cande, C., et al. (2004), AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis, *Oncogene*, 23(8), 1514-1521.
- Carballo, E., W. S. Lai, and P. J. Blakeshear (1998), Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin, *Science (New York, N.Y.)*, 281(5379), 1001-1005.
- Carmody, R. J., and Y. H. Chen (2007), Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling, *Cellular & molecular immunology*, 4(1), 31-41.
- Caroni, P., A. Rothenfluh, E. McGlynn, and C. Schneider (1991), S-cyclophilin. New member of the cyclophilin family associated with the secretory pathway, *J Biol Chem*, 266(17), 10739-10742.
- Carpentier, M., F. Allain, M. C. Slomianny, S. Durieux, C. Vanpouille, B. Haendler, and G. Spik (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(16), 5222-5229.
- Carpentier, M., L. Descamps, F. Allain, A. Denys, S. Durieux, L. Fenart, C. Kieda, R. Cecchelli,

- and G. Spik (1999a), Receptor-mediated transcytosis of cyclophilin B through the blood-brain barrier, *J Neurochem*, 73(1), 260-270.
- Carpentier, M., F. Allain, B. Haendler, A. Denys, C. Mariller, M. Benaissa, and G. Spik (1999b), 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(16), 10990-10998.
- Carty, M., R. Goodbody, M. Schroder, J. Stack, P. N. Moynagh, and A. G. Bowie (2006), The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling, *Nature immunology*, 7(10), 1074-1081.
- Ceppi, M., P. M. Pereira, I. Dunand-Sauthier, E. Barras, W. Reith, M. A. Santos, and P. Pierre (2009), MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(8), 2735-2740.
- Chatterji, U., M. D. Bobardt, P. Lim, and P. A. Gally (2010), Cyclophilin A-independent recruitment of NS5A and NS5B into hepatitis C virus replication complexes, *J Gen Virol*, 91(Pt 5), 1189-1193.
- Chatterji, U., M. Bobardt, S. Selvarajah, F. Yang, H. Tang, N. Sakamoto, G. Vuagniaux, T. Parkinson, and P. Gally (2009), The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication, *J Biol Chem*, 284(25), 16998-17005.
- Chen, X. M., P. L. Splinter, S. P. O'Hara, and N. F. LaRusso (2007), A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection, *J Biol Chem*, 282(39), 28929-28938.
- Chen, L. F., and W. C. Greene (2004), Shaping the nuclear action of NF-kappaB, *Nature reviews*, 5(5), 392-401.
- Chen, P., J. Li, J. Barnes, G. C. Kokkonen, J. C. Lee, and Y. Liu (2002), Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages, *J Immunol*, 169(11), 6408-6416.
- Chen, Z., T. B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt, and M. H. Cobb (2001), MAP kinases, *Chem Rev*, 101(8), 2449-2476.
- Chiariello, M., M. J. Marinissen, and J. S. Gutkind (2000), Multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways connect the cot oncoprotein to the c-jun promoter and to cellular transformation, *Mol Cell Biol*, 20(5), 1747-1758.
- Chiu, H. C., F. D. Wang, S. Y. Yao, and C. T. Wang (2002), Effects of gag mutations on human immunodeficiency virus type 1 particle assembly, processing, and cyclophilin A incorporation, *J Med Virol*, 68(2), 156-163.
- Cho, J. Y., D. A. Fox, V. Horejsi, K. Sagawa, K. M. Skubitz, D. R. Katz, and B. Chain (2001), The functional interactions between CD98, beta1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation, *Blood*, 98(2), 374-382.
- Choi, K. J., Y. J. Piao, M. J. Lim, J. H. Kim, J. Ha, W. Choe, and S. S. Kim (2007), Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death, *Cancer research*, 67(8), 3654-3662.
- Chuang, T. H., and R. J. Ulevitch (2004), Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors, *Nature immunology*, 5(5), 495-502.
- Chung, J. Y., Y. C. Park, H. Ye, and H. Wu (2002), All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction, *Journal of cell*

*science*, 115(Pt 4), 679-688.

- Chuang, T., and R. J. Ulevitch (2001), Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells, *Biochim Biophys Acta*, 1518(1-2), 157-161.
- Cohen, S., H. Achbert-Weiner, and A. Ciechanover (2004), Dual effects of IkappaB kinase beta-mediated phosphorylation on p105 Fate: SCF(beta-TrCP)-dependent degradation and SCF(beta-TrCP)-independent processing, *Mol Cell Biol*, 24(1), 475-486.
- Colgan, J., M. Asmal, M. Neagu, B. Yu, J. Schneidkraut, Y. Lee, E. Sokolskaja, A. Andreotti, and J. Luban (2004), Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk, *Immunity*, 21(2), 189-201.
- Colgan, J., M. Asmal, and J. Luban (2000), Isolation, characterization and targeted disruption of mouse ppia: cyclophilin A is not essential for mammalian cell viability, *Genomics*, 68(2), 167-178.
- Colonna, M., G. Trinchieri, and Y. J. Liu (2004), Plasmacytoid dendritic cells in immunity, *Nature immunology*, 5(12), 1219-1226.
- Connern, C. P., and A. P. Halestrap (1992), Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin, *Biochem J*, 284 ( Pt 2), 381-385.
- Cusson-Hermance, N., S. Khurana, T. H. Lee, K. A. Fitzgerald, and M. A. Kelliher (2005), Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- $\kappa$ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation, *J Biol Chem*, 280(44), 36560-36566.
- Damsker, J. M., I. Okwumabua, T. Pushkarsky, K. Arora, M. I. Bukrinsky, and S. L. Constant (2009), Targeting the chemotactic function of CD147 reduces collagen-induced arthritis, *Immunology*, 126(1), 55-62.
- Damsker, J. M., M. I. Bukrinsky, and S. L. Constant (2007), Preferential chemotaxis of activated human CD4+ T cells by extracellular cyclophilin A, *Journal of leukocyte biology*, 82(3), 613-618.
- Danielson, P. E., S. Forss-Petter, M. A. Brow, L. Calavetta, J. Douglass, R. J. Milner, and J. G. Sutcliffe (1988), p1B15: a cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin, *DNA*, 7(4), 261-267.
- De Ceuninck, F., F. Allain, A. Caliez, G. Spik, and P. M. Vanhoutte (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(8), 2197-2206.
- Dean, J. L., S. J. Sarsfield, E. Tsounakou, and J. Saklatvala (2003), p38 Mitogen-activated protein kinase stabilizes mRNAs that contain cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor AU-rich elements by inhibiting deadenylation, *J Biol Chem*, 278(41), 39470-39476.
- Dear, J. W., A. Leelahavanichkul, A. Aponte, X. Hu, S. L. Constant, S. M. Hewitt, P. S. Yuen, and R. A. Star (2007), Liver proteomics for therapeutic drug discovery: inhibition of the cyclophilin receptor CD147 attenuates sepsis-induced acute renal failure, *Crit Care Med*, 35(10), 2319-2328.
- Deligny, A., A. Denys, A. Marcant, A. Melchior, J. Mazurier, T. H. van Kuppevelt, and F. Allain (2010), Synthesis of heparan sulfate with cyclophilin B-binding properties is determined

- by cell type-specific expression of sulfotransferases, *J Biol Chem*, 285(3), 1701-1715.
- Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, and Z. J. Chen (2000), Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain, *Cell*, 103(2), 351-361.
- Denys, A., F. Allain, E. Masy, J. P. Dessaint, and G. Spik (1998a), Enhancing the effect of secreted cyclophilin B on immunosuppressive activity of cyclosporine, *Transplantation*, 65(8), 1076-1084.
- Denys, A., F. Allain, M. Carpentier, and G. Spik (1998b), 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.
- Denys, A., F. Allain, B. Foxwell, and G. Spik (1997), Distribution of cyclophilin B-binding sites in the subsets of human peripheral blood lymphocytes, *Immunology*, 91(4), 609-617.
- Derksen, P. W., R. M. Keehnen, L. M. Evers, M. H. van Oers, M. Spaargaren, and S. T. Pals (2002), Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma, *Blood*, 99(4), 1405-1410.
- Didierlaurent, A., B. Brissoni, D. Velin, N. Aebi, A. Tardivel, E. Kaslin, J. C. Sirard, G. Angelov, J. Tschopp, and K. Burns (2006), Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide, *Mol Cell Biol*, 26(3), 735-742.
- Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and C. Reis e Sousa (2004), Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA, *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), 1529-1531.
- Divanovic, S., A. Trompette, L. K. Petiniot, J. L. Allen, L. M. Flick, Y. Belkaid, R. Madan, J. J. Haky, and C. L. Karp (2007), Regulation of TLR4 signaling and the host interface with pathogens and danger: the role of RP105, *Journal of leukocyte biology*, 82(2), 265-271.
- Dobrzanski, P., R. P. Ryseck, and R. Bravo (1994), Differential interactions of Rel-NF-kappa B complexes with I kappa B alpha determine pools of constitutive and inducible NF-kappa B activity, *The EMBO journal*, 13(19), 4608-4616.
- Drexler, S. K., P. L. Kong, J. Wales, and B. M. Foxwell (2008), Cell signalling in macrophages, the principal innate immune effector cells of rheumatoid arthritis, *Arthritis Res Ther*, 10(5), 216.
- Dumitru, C. D., et al. (2000), TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway, *Cell*, 103(7), 1071-1083.
- El Gazzar, M., and C. E. McCall (2010), MicroRNAs distinguish translational from transcriptional silencing during endotoxin tolerance, *J Biol Chem*, 285(27), 20940-20951.
- Elbaz, B., M. Valitsky, G. Davidov, and H. Rahamimoff (2010), Cyclophilin A is involved in functional expression of the Na(+)-Ca(2+) exchanger NCX1, *Biochemistry*, 49(35), 7634-7642.
- Endrich, M. M., and H. Gehring (1998), The V3 loop of human immunodeficiency virus type-1 envelope protein is a high-affinity ligand for immunophilins present in human blood, *European journal of biochemistry / FEBS*, 252(3), 441-446.
- Enslin, H., J. Raingeaud, and R. J. Davis (1998), Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6, *J Biol Chem*, 273(3), 1741-1748.



- Esko, J. D., and U. Lindahl (2001), Molecular diversity of heparan sulfate, *J Clin Invest*, 108(2), 169-173.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, D. Schweizer, and E. Izaurralde (2007), P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing, *Mol Cell Biol*, 27(11), 3970-3981.
- Fach, E. M., L. A. Garulacan, J. Gao, Q. Xiao, S. M. Storm, Y. P. Dubaquié, S. A. Hefta, and G. J. Opitck (2004), In vitro biomarker discovery for atherosclerosis by proteomics, *Mol Cell Proteomics*, 3(12), 1200-1210.
- Fair, K., M. Anderson, E. Bulanova, H. Mi, M. Tropschug, and M. O. Diaz (2001), Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells, *Mol Cell Biol*, 21(10), 3589-3597.
- Fang, F., J. Zheng, T. L. Galbaugh, A. A. Fiorillo, E. E. Hjort, X. Zeng, and C. V. Clevenger (2010), Cyclophilin B as a co-regulator of prolactin-induced gene expression and function in breast cancer cells, *Journal of molecular endocrinology*, 44(6), 319-329.
- Fang, F., A. J. Flegler, P. Du, S. Lin, and C. V. Clevenger (2009), Expression of cyclophilin B is associated with malignant progression and regulation of genes implicated in the pathogenesis of breast cancer, *The American journal of pathology*, 174(1), 297-308.
- Fearns, C., Q. Pan, J. C. Mathison, and T. H. Chuang (2006), Triad3A regulates ubiquitination and proteasomal degradation of RIP1 following disruption of Hsp90 binding, *J Biol Chem*, 281(45), 34592-34600.
- Fearon, P., A. A. Lonsdale-Eccles, O. K. Ross, C. Todd, A. Sinha, F. Allain, and N. J. Reynolds (2011), Keratinocyte secretion of cyclophilin B via the constitutive pathway is regulated through its cyclosporin-binding site, *The Journal of investigative dermatology*, 131(5), 1085-1094.
- Fischer, G., B. Wittmann-Liebold, K. Lang, T. Kiefhaber, and F. X. Schmid (1989), Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins, *Nature*, 337(6206), 476-478.
- Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha, and D. T. Golenbock (2003), LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF, *J Exp Med*, 198(7), 1043-1055.
- Fitzgerald, K. A., et al. (2001), Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction, *Nature*, 413(6851), 78-83.
- Flanagan, W. M., B. Corthesy, R. J. Bram, and G. R. Crabtree (1991), Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A, *Nature*, 352(6338), 803-807.
- Flannery, S., and A. G. Bowie (2010), The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling, *Biochemical pharmacology*, 80(12), 1981-1991.
- Fleming, Y., C. G. Armstrong, N. Morrice, A. Paterson, M. Goedert, and P. Cohen (2000), Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7, *Biochem J*, 352 Pt 1, 145-154.
- Franke, E. K., H. E. Yuan, and J. Luban (1994), Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions, *Nature*, 372(6504), 359-362.
- Friedman, J., and I. Weissman (1991), Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are

revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA, *Cell*, 66(4), 799-806.

- Fruman, D. A., C. B. Klee, B. E. Bierer, and S. J. Burakoff (1992), Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(9), 3686-3690.
- Fukao, T., M. Tanabe, Y. Terauchi, T. Ota, S. Matsuda, T. Asano, T. Kadowaki, T. Takeuchi, and S. Koyasu (2002), PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs, *Nature immunology*, 3(9), 875-881.
- Gabison, E. E., T. Hoang-Xuan, A. Mauviel, and S. Menashi (2005), EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair, *Biochimie*, 87(3-4), 361-368.
- Galat, A. (2004), Function-dependent clustering of orthologues and paralogues of cyclophilins, *Proteins*, 56(4), 808-820.
- Galat, A., and F. Bouet (1994), Cyclophilin-B is an abundant protein whose conformation is similar to cyclophilin-A, *FEBS Lett*, 347(1), 31-36.
- Garlanda, C., H. J. Anders, and A. Mantovani (2009), TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization, *Trends in immunology*, 30(9), 439-446.
- Garlanda, C., et al. (2004), Intestinal inflammation in mice deficient in Tir8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10), 3522-3526.
- Gay, N. J., and F. J. Keith (1991), Drosophila Toll and IL-1 receptor, *Nature*, 351(6325), 355-356.
- Geppert, T. D., C. E. Whitehurst, P. Thompson, and B. Beutler (1994), Lipopolysaccharide signals activation of tumor necrosis factor biosynthesis through the ras/raf-1/MEK/MAPK pathway, *Molecular medicine (Cambridge, Mass, 1(1))*, 93-103.
- Gilchrist, M., V. Thorsson, B. Li, A. G. Rust, M. Korb, J. C. Roach, K. Kennedy, T. Hai, H. Bolouri, and A. Aderem (2006), Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4, *Nature*, 441(7090), 173-178.
- Gingras, S., E. Parganas, A. de Pauw, J. N. Ihle, and P. J. Murray (2004), Re-examination of the role of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) in the regulation of toll-like receptor signaling, *J Biol Chem*, 279(52), 54702-54707.
- Gonzalez-Cuadrado, S., C. Bustos, M. Ruiz-Ortega, A. Ortiz, C. Guijarro, J. J. Plaza, and J. Egido (1996), Expression of leucocyte chemoattractants by interstitial renal fibroblasts: up-regulation by drugs associated with interstitial fibrosis, *Clinical and experimental immunology*, 106(3), 518-522.
- Gordon, K. J., and G. C. Blobe (2008), Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease, *Biochim Biophys Acta*, 1782(4), 197-228.
- Guan, Y., D. R. Ranoa, S. Jiang, S. K. Mutha, X. Li, J. Baudry, and R. I. Tapping (2010), Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling, *J Immunol*, 184(9), 5094-5103.
- Gueydan, C., L. Droogmans, P. Chalon, G. Huez, D. Caput, and V. Kruys (1999), Identification of TIAR as a protein binding to the translational regulatory AU-rich element of tumor necrosis factor alpha mRNA, *J Biol Chem*, 274(4), 2322-2326.
- Guha, M., and N. Mackman (2002), The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits

- lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells, *J Biol Chem*, 277(35), 32124-32132.
- Gwinn, W. M., et al. (2006), Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention, *J Immunol*, 177(7), 4870-4879.
- Hacker, H., et al. (2006), Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6, *Nature*, 439(7073), 204-207.
- Haendler, B., R. Hofer-Warbinek, and E. Hofer (1987), Complementary DNA for human T-cell cyclophilin, *The EMBO journal*, 6(4), 947-950.
- Haendler, B., and E. Hofer (1990), Characterization of the human cyclophilin gene and of related processed pseudogenes, *European journal of biochemistry / FEBS*, 190(3), 477-482.
- Halestrap, A. P., and A. M. Davidson (1990), Inhibition of Ca<sup>2+</sup>(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase, *Biochem J*, 268(1), 153-160.
- Han, X., S. H. Yoon, Y. Ding, T. G. Choi, W. J. Choi, Y. H. Kim, Y. J. Kim, Y. B. Huh, J. Ha, and S. S. Kim (2010), Cyclosporin A and sanglifehrin A enhance chemotherapeutic effect of cisplatin in C6 glioma cells, *Oncol Rep*, 23(4), 1053-1062.
- Handschumacher, R. E., M. W. Harding, J. Rice, R. J. Drugge, and D. W. Speicher (1984), Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A, *Science (New York, N.Y.)*, 226(4674), 544-547.
- Hansson, G. K., and P. Libby (2006), The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword, *Nat Rev Immunol*, 6(7), 508-519.
- Harding, M. W., and R. E. Handschumacher (1988), Cyclophilin, a primary molecular target for cyclosporine. Structural and functional implications, *Transplantation*, 46(2 Suppl), 29S-35S.
- Harding, M. W., R. E. Handschumacher, and D. W. Speicher (1986), Isolation and amino acid sequence of cyclophilin, *J Biol Chem*, 261(18), 8547-8555.
- Hasan, U., et al. (2005), Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88, *J Immunol*, 174(5), 2942-2950.
- Hasel, K. W., J. R. Glass, M. Godbout, and J. G. Sutcliffe (1991), An endoplasmic reticulum-specific cyclophilin, *Mol Cell Biol*, 11(7), 3484-3491.
- Hasel, K. W., and J. G. Sutcliffe (1990), Nucleotide sequence of a cDNA coding for mouse cyclophilin, *Nucleic acids research*, 18(13), 4019.
- Hassan, F., S. Islam, G. Tumorhhu, J. Dagvadorj, Y. Naiki, T. Komatsu, N. Koide, T. Yoshida, and T. Yokochi (2009), Involvement of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-M in toll-like receptor (TLR) 7-mediated tolerance in RAW 264.7 macrophage-like cells, *Cellular immunology*, 256(1-2), 99-103.
- Hayden, M. S., and S. Ghosh (2008), Shared principles in NF-kappaB signaling, *Cell*, 132(3), 344-362.
- Heck, J. A., X. Meng, and D. N. Frick (2009), Cyclophilin B stimulates RNA synthesis by the HCV RNA dependent RNA polymerase, *Biochemical pharmacology*, 77(7), 1173-1180.
- Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H.

- Wagner, and S. Bauer (2004), Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8, *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), 1526-1529.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yamamoto, T. Kaisho, H. Sanjo, T. Kawai, K. Hoshino, K. Takeda, and S. Akira (2004), The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection, *J Exp Med*, 199(12), 1641-1650.
- Hemmi, H., et al. (2000), A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, *Nature*, 408(6813), 740-745.
- Hirotsani, T., P. Y. Lee, H. Kuwata, M. Yamamoto, M. Matsumoto, I. Kawase, S. Akira, and K. Takeda (2005), The nuclear IkappaB protein IkappaBNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria, *J Immunol*, 174(6), 3650-3657.
- Hitotsumatsu, O., et al. (2008), The ubiquitin-editing enzyme A20 restricts nucleotide-binding oligomerization domain containing 2-triggered signals, *Immunity*, 28(3), 381-390.
- Holloway, M. P., and R. J. Bram (1998), Co-localization of calcium-modulating cyclophilin ligand with intracellular calcium pools, *J Biol Chem*, 273(26), 16346-16350.
- Honda, K., et al. (2005), IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses, *Nature*, 434(7034), 772-777.
- Honma, K., H. Udono, T. Kohno, K. Yamamoto, A. Ogawa, T. Takemori, A. Kumatori, S. Suzuki, T. Matsuyama, and K. Yui (2005), Interferon regulatory factor 4 negatively regulates the production of proinflammatory cytokines by macrophages in response to LPS, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(44), 16001-16006.
- Hoshino, K., T. Sugiyama, M. Matsumoto, T. Tanaka, M. Saito, H. Hemmi, O. Ohara, S. Akira, and T. Kaisho (2006), IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9, *Nature*, 440(7086), 949-953.
- Hovland, A. R., F. G. La Rosa, P. G. Hovland, W. C. Cole, A. Kumar, J. E. Prasad, and K. N. Prasad (1999), Cyclosporin A regulates the levels of cyclophilin A in neuroblastoma cells in culture, *Neurochem Int*, 35(3), 229-235.
- Howard, B. A., Z. Zheng, M. J. Campa, M. Z. Wang, A. Sharma, E. Haura, J. E. Herndon, 2nd, M. C. Fitzgerald, G. Bepler, and E. F. Patz, Jr. (2004), Translating biomarkers into clinical practice: prognostic implications of cyclophilin A and macrophage migratory inhibitory factor identified from protein expression profiles in non-small cell lung cancer, *Lung Cancer*, 46(3), 313-323.
- Huang, J., T. Liu, L. G. Xu, D. Chen, Z. Zhai, and H. B. Shu (2005), SIKE is an IKK epsilon/TBK1-associated suppressor of TLR3- and virus-triggered IRF-3 activation pathways, *The EMBO journal*, 24(23), 4018-4028.
- Huxford, T., and G. Ghosh (2009), A structural guide to proteins of the NF-kappaB signaling module, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(3), a000075.
- Huxford, T., D. B. Huang, S. Malek, and G. Ghosh (1998), The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation, *Cell*, 95(6), 759-770.
- Hyakushima, N., H. Mitsuzawa, C. Nishitani, H. Sano, K. Kuronuma, M. Konishi, T. Himi, K. Miyake, and Y. Kuroki (2004), Interaction of soluble form of recombinant extracellular TLR4 domain with MD-2 enables lipopolysaccharide binding and attenuates TLR4-

mediated signaling, *J Immunol*, 173(11), 6949-6954.

- Ishitani, T., G. Takaesu, J. Ninomiya-Tsuji, H. Shibuya, R. B. Gaynor, and K. Matsumoto (2003), Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling, *The EMBO journal*, 22(23), 6277-6288.
- Ivery, M. T. (1999), A proposed molecular model for the interaction of calcineurin with the cyclosporin A-cyclophilin A complex, *Bioorg Med Chem*, 7(7), 1389-1402.
- Iwami, K. I., T. Matsuguchi, A. Masuda, T. Kikuchi, T. Musikachoen, and Y. Yoshikai (2000), Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling, *J Immunol*, 165(12), 6682-6686.
- Jacobs, M. D., and S. C. Harrison (1998), Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex, *Cell*, 95(6), 749-758.
- Jain, J., P. G. McCaffrey, Z. Miner, T. K. Kerppola, J. N. Lambert, G. L. Verdine, T. Curran, and A. Rao (1993), The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun, *Nature*, 365(6444), 352-355.
- Jamaluddin, M., S. Choudhary, S. Wang, A. Casola, R. Huda, R. P. Garofalo, S. Ray, and A. R. Brasier (2005), Respiratory syncytial virus-inducible BCL-3 expression antagonizes the STAT/IRF and NF-kappaB signaling pathways by inducing histone deacetylase 1 recruitment to the interleukin-8 promoter, *J Virol*, 79(24), 15302-15313.
- Janssens, S., K. Burns, J. Tschopp, and R. Beyaert (2002), Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88, *Curr Biol*, 12(6), 467-471.
- Jiang, Z., T. W. Mak, G. Sen, and X. Li (2004), Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10), 3533-3538.
- Jin, M. S., and J. O. Lee (2008), Structures of TLR-ligand complexes, *Curr Opin Immunol*, 20(4), 414-419.
- Jin, Z. G., A. O. Lungu, L. Xie, M. Wang, C. Wong, and B. C. Berk (2004), Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(7), 1186-1191.
- Jin, Z. G., M. G. Melaragno, D. F. Liao, C. Yan, J. Haendeler, Y. A. Suh, J. D. Lambeth, and B. C. Berk (2000), Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress, *Circulation research*, 87(9), 789-796.
- Jing, Q., S. Huang, S. Guth, T. Zarubin, A. Motoyama, J. Chen, F. Di Padova, S. C. Lin, H. Gram, and J. Han (2005), Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability, *Cell*, 120(5), 623-634.
- Kambara, H., H. Tani, Y. Mori, T. Abe, H. Katoh, T. Fukuhara, S. Taguwa, K. Moriishi, and Y. Matsuura (2011), Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus, *Virology*, 412(1), 211-219.
- Kanayama, A., R. B. Seth, L. Sun, C. K. Ea, M. Hong, A. Shaito, Y. H. Chiu, L. Deng, and Z. J. Chen (2004), TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains, *Molecular cell*, 15(4), 535-548.
- Kasinrerk, W., N. Tokrasinwit, and P. Phunpae (1999), CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway, *Immunology*, 96(2), 184-192.

- Kaul, A., S. Stauffer, C. Berger, T. Pertel, J. Schmitt, S. Kallis, M. Zayas, V. Lohmann, J. Luban, and R. Bartenschlager (2009), Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics, *PLoS pathogens*, 5(8), e1000546.
- Kawagoe, T., S. Sato, K. Matsushita, H. Kato, K. Matsui, Y. Kumagai, T. Saitoh, T. Kawai, O. Takeuchi, and S. Akira (2008), Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2, *Nature immunology*, 9(6), 684-691.
- Kawai, T., and S. Akira (2010), The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors, *Nature immunology*, 11(5), 373-384.
- Kawai, T., et al. (2004), Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6, *Nature immunology*, 5(10), 1061-1068.
- Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira (1999), Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin, *Immunity*, 11(1), 115-122.
- Ke, H. (1992), Similarities and differences between human cyclophilin A and other beta-barrel structures. Structural refinement at 1.63 Å resolution, *J Mol Biol*, 228(2), 539-550.
- Ke, H. M., L. D. Zydowsky, J. Liu, and C. T. Walsh (1991), Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(21), 9483-9487.
- Keating, S. E., G. M. Maloney, E. M. Moran, and A. G. Bowie (2007), IRAK-2 participates in multiple toll-like receptor signaling pathways to NFkappaB via activation of TRAF6 ubiquitination, *J Biol Chem*, 282(46), 33435-33443.
- Kieffer, L. J., T. W. Seng, W. Li, D. G. Osterman, R. E. Handschumacher, and R. M. Bayney (1993), Cyclophilin-40, a protein with homology to the P59 component of the steroid receptor complex. Cloning of the cDNA and further characterization, *J Biol Chem*, 268(17), 12303-12310.
- Kieffer, L. J., T. Thalhammer, and R. E. Handschumacher (1992), Isolation and characterization of a 40-kDa cyclophilin-related protein, *J Biol Chem*, 267(8), 5503-5507.
- Kim, J. Y., W. J. Kim, H. Kim, K. Suk, and W. H. Lee (2009), The Stimulation of CD147 Induces MMP-9 Expression through ERK and NF-kappaB in Macrophages: Implication for Atherosclerosis, *Immune network*, 9(3), 90-97.
- Kim, J., et al. (2008), Overexpressed cyclophilin B suppresses apoptosis associated with ROS and Ca<sup>2+</sup> homeostasis after ER stress, *Journal of cell science*, 121(Pt 21), 3636-3648.
- Kim, H., W. J. Kim, S. T. Jeon, E. M. Koh, H. S. Cha, K. S. Ahn, and W. H. Lee (2005), Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages, *Clinical immunology (Orlando, Fla)*, 116(3), 217-224.
- Kim, H. J., K. H. Chong, S. W. Kang, J. R. Lee, J. Y. Kim, M. J. Hahn, and T. J. Kim (2004), Identification of cyclophilin A as a CD99-binding protein by yeast two-hybrid screening, *Immunology letters*, 95(2), 155-159.
- Kim, S. H., S. M. Lessner, Y. Sakurai, and Z. S. Galis (2004), Cyclophilin A as a novel biphasic mediator of endothelial activation and dysfunction, *The American journal of pathology*, 164(5), 1567-1574.
- Kimchi-Sarfaty, C., J. Kasir, S. V. Ambudkar, and H. Rahamimoff (2002), Transport activity and surface expression of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger NCX1 are inhibited by the

immunosuppressive agent cyclosporin A and by the nonimmunosuppressive agent PSC833, *J Biol Chem*, 277(4), 2505-2510.

- Kizaki, T., T. Izawa, T. Sakurai, S. Haga, N. Taniguchi, H. Tajiri, K. Watanabe, N. K. Day, K. Toba, and H. Ohno (2008), Beta2-adrenergic receptor regulates Toll-like receptor-4-induced nuclear factor-kappaB activation through beta-arrestin 2, *Immunology*, 124(3), 348-356.
- Kobayashi, K., L. D. Hernandez, J. E. Galan, C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov, and R. A. Flavell (2002), IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling, *Cell*, 110(2), 191-202.
- Koletsy, A. J., M. W. Harding, and R. E. Handschumacher (1986), Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues, *J Immunol*, 137(3), 1054-1059.
- Kontoyiannis, D., M. Pasparakis, T. T. Pizarro, F. Cominelli, and G. Kollias (1999), Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies, *Immunity*, 10(3), 387-398.
- Konttinen, Y. T., T. F. Li, J. Mandelin, M. Liljestrom, T. Sorsa, S. Santavirta, and I. Virtanen (2000), Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in rheumatoid synovium, *Arthritis Rheum*, 43(2), 275-280.
- Koser, P. L., et al. (1991), The CYP2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cyclosporin A-sensitive peptidyl-prolyl cis-trans isomerase with an N-terminal signal sequence, *Gene*, 108(1), 73-80.
- Kuwata, H., M. Matsumoto, K. Atarashi, H. Morishita, T. Hirotani, R. Koga, and K. Takeda (2006), IkappaBNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation, *Immunity*, 24(1), 41-51.
- Kuwata, H., Y. Watanabe, H. Miyoshi, M. Yamamoto, T. Kaisho, K. Takeda, and S. Akira (2003), IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages, *Blood*, 102(12), 4123-4129.
- Lagos, D., G. Pollara, S. Henderson, F. Gratrix, M. Fabani, R. S. Milne, F. Gotch, and C. Boshoff (2010), miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator, *Nature cell biology*, 12(5), 513-519.
- Lai, W. S., E. Carballo, J. R. Strum, E. A. Kennington, R. S. Phillips, and P. J. Blakeshear (1999), Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA, *Mol Cell Biol*, 19(6), 4311-4323.
- Lamothe, B., A. D. Campos, W. K. Webster, A. Gopinathan, L. Hur, and B. G. Darnay (2008), The RING domain and first zinc finger of TRAF6 coordinate signaling by interleukin-1, lipopolysaccharide, and RANKL, *J Biol Chem*, 283(36), 24871-24880.
- Lamothe, B., A. Besse, A. D. Campos, W. K. Webster, H. Wu, and B. G. Darnay (2007), Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation, *J Biol Chem*, 282(6), 4102-4112.
- Lang, K., F. X. Schmid, and G. Fischer (1987), Catalysis of protein folding by prolyl isomerase, *Nature*, 329(6136), 268-270.
- Lasa, M., S. M. Abraham, C. Boucheron, J. Saklatvala, and A. R. Clark (2002), Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1

- and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38, *Mol Cell Biol*, 22(22), 7802-7811.
- Lasa, M., M. Brook, J. Saklatvala, and A. R. Clark (2001), Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38, *Mol Cell Biol*, 21(3), 771-780.
- Lawler, S., Y. Fleming, M. Goedert, and P. Cohen (1998), Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro, *Curr Biol*, 8(25), 1387-1390.
- Le Hir, M., Q. Su, L. Weber, G. Woerly, A. Granelli-Piperno, and B. Ryffel (1995), In situ detection of cyclosporin A: evidence for nuclear localization of cyclosporine and cyclophilins, *Lab Invest*, 73(5), 727-733.
- LeBouder, E., et al. (2003), Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk, *J Immunol*, 171(12), 6680-6689.
- Lee, J. (2010), Role of cyclophilin a during oncogenesis, *Archives of pharmacal research*, 33(2), 181-187.
- Lee, J., and S. S. Kim (2010), An overview of cyclophilins in human cancers, *The Journal of international medical research*, 38(5), 1561-1574.
- Lee, E. G., D. L. Boone, S. Chai, S. L. Libby, M. Chien, J. P. Lodolce, and A. Ma (2000), Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice, *Science (New York, N.Y.)*, 289(5488), 2350-2354.
- Li, M., Q. Zhai, U. Bharadwaj, H. Wang, F. Li, W. E. Fisher, C. Chen, and Q. Yao (2006), Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147, *Cancer*, 106(10), 2284-2294.
- Liao, D. F., Z. G. Jin, A. S. Baas, G. Daum, S. P. Gygi, R. Aebersold, and B. C. Berk (2000), Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem*, 275(1), 189-196.
- Liew, F. Y., D. Xu, E. K. Brint, and L. A. O'Neill (2005), Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses, *Nat Rev Immunol*, 5(6), 446-458.
- Lin, R., C. Heylbroeck, P. M. Pitha, and J. Hiscott (1998), Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation, *Mol Cell Biol*, 18(5), 2986-2996.
- Lin, L., G. N. DeMartino, and W. C. Greene (1998), Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome, *Cell*, 92(6), 819-828.
- Lin, L., and S. Ghosh (1996), A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit, *Mol Cell Biol*, 16(5), 2248-2254.
- Liu, Y., E. G. Shepherd, and L. D. Nelin (2007), MAPK phosphatases--regulating the immune response, *Nat Rev Immunol*, 7(3), 202-212.
- Liu, J., J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, and S. L. Schreiber (1991), Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes, *Cell*, 66(4), 807-815.
- Lu, K. P., G. Finn, T. H. Lee, and L. K. Nicholson (2007), Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer, *Nat Chem Biol*, 3(10), 619-629.
- Luban, J., K. L. Bossolt, E. K. Franke, G. V. Kalpana, and S. P. Goff (1993), Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B, *Cell*, 73(6),



1067-1078.

- Lund, J. M., L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki, and R. A. Flavell (2004), Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(15), 5598-5603.
- Mahtani, K. R., M. Brook, J. L. Dean, G. Sully, J. Saklatvala, and A. R. Clark (2001), Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability, *Mol Cell Biol*, 21(19), 6461-6469.
- Mantovani, A., and A. Sica (2010), Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity, *Curr Opin Immunol*, 22(2), 231-237.
- Marie, I., J. E. Durbin, and D. E. Levy (1998), Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7, *The EMBO journal*, 17(22), 6660-6669.
- Mariller, C., F. Allain, M. Kouach, and G. Spik (1996), Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form, *Biochim Biophys Acta*, 1293(1), 31-38.
- Marks, W. H., M. W. Harding, R. Handschumacher, C. Marks, and M. I. Lorber (1991), The immunochemical distribution of cyclophilin in normal mammalian tissues, *Transplantation*, 52(2), 340-345.
- Martin, M., K. Rehani, R. S. Jope, and S. M. Michalek (2005), Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3, *Nature immunology*, 6(8), 777-784.
- Martinez, F. O., A. Sica, A. Mantovani, and M. Locati (2008), Macrophage activation and polarization, *Front Biosci*, 13, 453-461.
- Massoumi, R., K. Chmielarska, K. Hennecke, A. Pfeifer, and R. Fassler (2006), Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling, *Cell*, 125(4), 665-677.
- Matsukawa, J., A. Matsuzawa, K. Takeda, and H. Ichijo (2004), The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response, *J Biochem*, 136(3), 261-265.
- McCormick, M. L., D. Gavrilu, and N. L. Weintraub (2007), Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(3), 461-469.
- McDonald, M. L., T. Ardito, W. H. Marks, M. Kashgarian, and M. I. Lorber (1992), The effect of cyclosporine administration on the cellular distribution and content of cyclophilin, *Transplantation*, 53(2), 460-466.
- McNab, F. W., R. Rajsbaum, J. P. Stoye, and A. O'Garra (2011), Tripartite-motif proteins and innate immune regulation, *Curr Opin Immunol*, 23(1), 46-56.
- McWhirter, S. M., K. A. Fitzgerald, J. Rosains, D. C. Rowe, D. T. Golenbock, and T. Maniatis (2004), IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(1), 233-238.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh, and C. A. Janeway, Jr. (1998), MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways, *Molecular cell*, 2(2), 253-258.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. (1997), A human homologue of the

- Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature*, 388(6640), 394-397.
- Melchior, A., A. Denys, A. Deligny, J. Mazurier, and F. Allain (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, *Experimental cell research*, 314(3), 616-628.
- Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher, and J. Tschopp (2004), RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation, *Nature immunology*, 5(5), 503-507.
- Mi, H., O. Kops, E. Zimmermann, A. Jaschke, and M. Tropschug (1996), A nuclear RNA-binding cyclophilin in human T cells, *FEBS Lett*, 398(2-3), 201-205.
- Mijatovic, T., V. Kruys, D. Caput, P. Defrance, and G. Huez (1997), Interleukin-4 and -13 inhibit tumor necrosis factor-alpha mRNA translational activation in lipopolysaccharide-induced mouse macrophages, *J Biol Chem*, 272(22), 14394-14398.
- Mishra, B. B., U. M. Gundra, and J. M. Teale (2008), Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis, *J Neuroinflammation*, 5, 53.
- Mitsuzawa, H., C. Nishitani, N. Hyakushima, T. Shimizu, H. Sano, N. Matsushima, K. Fukase, and Y. Kuroki (2006), Recombinant soluble forms of extracellular TLR4 domain and MD-2 inhibit lipopolysaccharide binding on cell surface and dampen lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice, *J Immunol*, 177(11), 8133-8139.
- Mori, M., M. Yoneyama, T. Ito, K. Takahashi, F. Inagaki, and T. Fujita (2004), Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation, *J Biol Chem*, 279(11), 9698-9702.
- Motoyama, M., S. Yamazaki, A. Eto-Kimura, K. Takeshige, and T. Muta (2005), Positive and negative regulation of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by IkappaB-zeta, an inducible nuclear protein, *J Biol Chem*, 280(9), 7444-7451.
- Muta, T., S. Yamazaki, A. Eto, M. Motoyama, and K. Takeshige (2003), IkappaB-zeta, a new anti-inflammatory nuclear protein induced by lipopolysaccharide, is a negative regulator for nuclear factor-kappaB, *J Endotoxin Res*, 9(3), 187-191.
- Nagata, T., H. Kishi, Q. L. Liu, T. Yoshino, T. Matsuda, Z. X. Jin, K. Murayama, K. Tsukada, and A. Muraguchi (2000), Possible involvement of cyclophilin B and caspase-activated deoxyribonuclease in the induction of chromosomal DNA degradation in TCR-stimulated thymocytes, *J Immunol*, 165(8), 4281-4289.
- Nakayama, K., S. Okugawa, S. Yanagimoto, T. Kitazawa, K. Tsukada, M. Kawada, S. Kimura, K. Hirai, Y. Takagaki, and Y. Ota (2004), Involvement of IRAK-M in peptidoglycan-induced tolerance in macrophages, *J Biol Chem*, 279(8), 6629-6634.
- Naumann, M., A. Nieters, E. N. Hatada, and C. Scheidereit (1993), NF-kappa B precursor p100 inhibits nuclear translocation and DNA binding of NF-kappa B/rel-factors, *Oncogene*, 8(8), 2275-2281.
- Negishi, H., Y. Ohba, H. Yanai, A. Takaoka, K. Honma, K. Yui, T. Matsuyama, T. Taniguchi, and K. Honda (2005), Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(44), 15989-15994.
- Neininger, A., D. Kontoyiannis, A. Kotlyarov, R. Winzen, R. Eckert, H. D. Volk, H. Holtmann, G. Kollias, and M. Gaestel (2002), MK2 targets AU-rich elements and regulates

- biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels, *J Biol Chem*, 277(5), 3065-3068.
- Nigro, P., K. Satoh, M. R. O'Dell, N. N. Soe, Z. Cui, A. Mohan, J. Abe, J. D. Alexis, J. D. Sparks, and B. C. Berk (2011), Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, *J Exp Med*, 208(1), 53-66.
- Nimah, M., B. Zhao, A. G. Denenberg, O. Bueno, J. Molkenin, H. R. Wong, and T. P. Shanley (2005), Contribution of MKP-1 regulation of p38 to endotoxin tolerance, *Shock*, 23(1), 80-87.
- O'Neill, L. A., F. J. Sheedy, and C. E. McCoy (2011), MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling, *Nat Rev Immunol*, 11(3), 163-175.
- O'Neill, L. A., and A. G. Bowie (2007), The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling, *Nat Rev Immunol*, 7(5), 353-364.
- O'Neill, L. A. (2006), DisSARMing Toll-like receptor signaling, *Nature immunology*, 7(10), 1023-1025.
- Obata, Y., K. Yamamoto, M. Miyazaki, K. Shimotohno, S. Kohno, and T. Matsuyama (2005), Role of cyclophilin B in activation of interferon regulatory factor-3, *J Biol Chem*, 280(18), 18355-18360.
- Obchoei, S., S. M. Weakley, S. Wongkham, C. Wongkham, K. Sawanyawisuth, Q. Yao, and C. Chen (2011), Cyclophilin A enhances cell proliferation and tumor growth of liver fluke-associated cholangiocarcinoma, *Molecular cancer*, 10, 102.
- Oganesyan, G., S. K. Saha, B. Guo, J. Q. He, A. Shahangian, B. Zarnegar, A. Perry, and G. Cheng (2006), Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response, *Nature*, 439(7073), 208-211.
- Ojaniemi, M., V. Glumoff, K. Harju, M. Liljeroos, K. Vuori, and M. Hallman (2003), Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages, *Eur J Immunol*, 33(3), 597-605.
- Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya (2003), TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction, *Nature immunology*, 4(2), 161-167.
- Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya (2003), TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta, *J Biol Chem*, 278(50), 49751-49762.
- Pakula, R., A. Melchior, A. Denys, C. Vanpouille, J. Mazurier, and F. Allain (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(5), 492-503.
- Pap, T. (2005), Cyclophilins in rheumatoid arthritis--stepping into an undiscovered country?, *Clinical immunology (Orlando, Fla)*, 116(3), 199-201.
- Park, S., U. Osmers, G. Raman, R. H. Schwantes, M. O. Diaz, and J. H. Bushweller (2010), The PHD3 domain of MLL acts as a CYP33-regulated switch between MLL-mediated activation and repression, *Biochemistry*, 49(31), 6576-6586.
- Payeli, S. K., C. Schiene-Fischer, J. Steffel, G. G. Camici, I. Rozenberg, T. F. Luscher, and F. C. Tanner (2008), Cyclophilin A differentially activates monocytes and endothelial cells: role of purity, activity, and endotoxin contamination in commercial preparations,

*Atherosclerosis*, 197(2), 564-571.

- Peddada, L. B., J. D. McPherson, R. Law, J. J. Wasmuth, P. Youderian, and R. J. Deans (1992), Somatic cell mapping of the human cyclophilin B gene (PPIB) to chromosome 15, *Cytogenet Cell Genet*, 60(3-4), 219-221.
- Perkins, N. D. (2006), Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway, *Oncogene*, 25(51), 6717-6730.
- Piao, W., C. Song, H. Chen, M. A. Diaz, L. M. Wahl, K. A. Fitzgerald, L. Li, and A. E. Medvedev (2009), Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN-beta-dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling, *Journal of leukocyte biology*, 86(4), 863-875.
- Piecyk, M., et al. (2000), TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha, *The EMBO journal*, 19(15), 4154-4163.
- Price, E. R., M. Jin, D. Lim, S. Pati, C. T. Walsh, and F. D. McKeon (1994), Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(9), 3931-3935.
- Price, E. R., L. D. Zydowsky, M. J. Jin, C. H. Baker, F. D. McKeon, and C. T. Walsh (1991), Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(5), 1903-1907.
- Pushkarsky, T., V. Yurchenko, C. Vanpouille, B. Brichacek, I. Vaisman, S. Hatakeyama, K. I. Nakayama, B. Sherry, and M. I. Bukrinsky (2005), Cell surface expression of CD147/EMMPRIN is regulated by cyclophilin 60, *J Biol Chem*, 280(30), 27866-27871.
- Pushkarsky, T., G. Zybarth, L. Dubrovsky, V. Yurchenko, H. Tang, H. Guo, B. Toole, B. Sherry, and M. Bukrinsky (2001), CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(11), 6360-6365.
- Qin, J., Y. Qian, J. Yao, C. Grace, and X. Li (2005), SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms, *J Biol Chem*, 280(26), 25233-25241.
- Raby, A. C., et al. (2009), Soluble TLR2 reduces inflammation without compromising bacterial clearance by disrupting TLR2 triggering, *J Immunol*, 183(1), 506-517.
- Raman, M., W. Chen, and M. H. Cobb (2007), Differential regulation and properties of MAPKs, *Oncogene*, 26(22), 3100-3112.
- Ratajczak, T., and A. Carrello (1996), Cyclophilin 40 (CyP-40), mapping of its hsp90 binding domain and evidence that FKBP52 competes with CyP-40 for hsp90 binding, *J Biol Chem*, 271(6), 2961-2965.
- Ratajczak, T., A. Carrello, P. J. Mark, B. J. Warner, R. J. Simpson, R. L. Moritz, and A. K. House (1993), The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59), *J Biol Chem*, 268(18), 13187-13192.
- Rice, N. R., M. L. MacKichan, and A. Israel (1992), The precursor of NF-kappa B p50 has I kappa B-like functions, *Cell*, 71(2), 243-253.
- Richards, F. M., J. Milner, and S. Metcalfe (1992), Inhibition of the serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A in lymphocytes: effect on mRNA levels for interleukin-2, IL-2R alpha, krox-24, p53, hsc70 and cyclophilin, *Immunology*, 76(4), 642-647.

- Ryeczyn, M. A., and C. V. Clevenger (2002), The intranuclear prolactin/cyclophilin B complex as a transcriptional inducer, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(10), 6790-6795.
- Ryeczyn, M. A., S. C. Reilly, K. O'Malley, and C. V. Clevenger (2000), Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*, 14(8), 1175-1186.
- Ryffel, B., G. Woerly, B. Greiner, B. Haendler, M. J. Mihatsch, and B. M. Foxwell (1991), Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues, *Immunology*, 72(3), 399-404.
- Ryo, A., F. Suizu, Y. Yoshida, K. Perrem, Y. C. Liou, G. Wulf, R. Rottapel, S. Yamaoka, and K. P. Lu (2003), Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA, *Molecular cell*, 12(6), 1413-1426.
- Saitoh, T., A. Tun-Kyi, A. Ryo, M. Yamamoto, G. Finn, T. Fujita, S. Akira, N. Yamamoto, K. P. Lu, and S. Yamaoka (2006), Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1, *Nature immunology*, 7(6), 598-605.
- Sakaguchi, S., H. Negishi, M. Asagiri, C. Nakajima, T. Mizutani, A. Takaoka, K. Honda, and T. Taniguchi (2003), Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock, *Biochem Biophys Res Commun*, 306(4), 860-866.
- Salmeron, A., T. B. Ahmad, G. W. Carlile, D. Pappin, R. P. Narsimhan, and S. C. Ley (1996), Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase, *The EMBO journal*, 15(4), 817-826.
- Saphire, A. C., M. D. Bobardt, and P. A. Gally (2000), Human immunodeficiency virus type 1 hijacks host cyclophilin A for its attachment to target cells, *Immunol Res*, 21(2-3), 211-217.
- Saphire, A. C., M. D. Bobardt, and P. A. Gally (1999), Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparans, *The EMBO journal*, 18(23), 6771-6785.
- Sarris, A. H., M. W. Harding, T. R. Jiang, D. Aftab, and R. E. Handschumacher (1992), Immunofluorescent localization and immunochemical determination of cyclophilin-A with specific rabbit antisera, *Transplantation*, 54(5), 904-910.
- Sato, S., H. Sanjo, K. Takeda, J. Ninomiya-Tsuji, M. Yamamoto, T. Kawai, K. Matsumoto, O. Takeuchi, and S. Akira (2005), Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses, *Nature immunology*, 6(11), 1087-1095.
- Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda, and S. Akira (2003), Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling, *J Immunol*, 171(8), 4304-4310.
- Sato, M., N. Hata, M. Asagiri, T. Nakaya, T. Taniguchi, and N. Tanaka (1998), Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7, *FEBS Lett*, 441(1), 106-110.
- Sato, M., N. Tanaka, N. Hata, E. Oda, and T. Taniguchi (1998), Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene, *FEBS Lett*, 425(1), 112-116.
- Satoh, K., et al. (2009), Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of

- angiotensin II-induced aortic aneurysms, *Nature medicine*, 15(6), 649-656.
- Satoh, K., et al. (2008), Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation, *Circulation*, 117(24), 3088-3098.
- Sayah, D. M., E. Sokolskaja, L. Berthouex, and J. Luban (2004), Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1, *Nature*, 430(6999), 569-573.
- Schaljo, B., et al. (2009), Tristetraprolin is required for full anti-inflammatory response of murine macrophages to IL-10, *J Immunol*, 183(2), 1197-1206.
- Schlegel, J., et al. (2009), Solution characterization of the extracellular region of CD147 and its interaction with its enzyme ligand cyclophilin A, *J Mol Biol*, 391(3), 518-535.
- Schmid, F. X. (1993), Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions, *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 22, 123-142.
- Schneider, H., N. Charara, R. Schmitz, S. Wehrli, V. Mikol, M. G. Zurini, V. F. Quesniaux, and N. R. Movva (1994), Human cyclophilin C: primary structure, tissue distribution, and determination of binding specificity for cyclosporins, *Biochemistry*, 33(27), 8218-8224.
- Schreiber, S. L., J. Liu, M. W. Albers, R. Karmacharya, E. Koh, P. K. Martin, M. K. Rosen, R. F. Standaert, and T. J. Wandless (1991), Immunophilin-ligand complexes as probes of intracellular signaling pathways, *Transplant Proc*, 23(6), 2839-2844.
- Seizer, P., et al. (2010), EMMPRIN and its ligand cyclophilin A regulate MT1-MMP, MMP-9 and M-CSF during foam cell formation, *Atherosclerosis*, 209(1), 51-57.
- Seko, Y., T. Fujimura, H. Taka, R. Mineki, K. Murayama, and R. Nagai (2004), Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, 317(1), 162-168.
- Shembade, N., A. Ma, and E. W. Harhaj (2010), Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes, *Science (New York, N.Y.)*, 327(5969), 1135-1139.
- Sherry, B., G. Zybarth, M. Alfano, L. Dubrovsky, R. Mitchell, D. Rich, P. Ulrich, R. Bucala, A. Cerami, and M. Bukrinsky (1998), Role of cyclophilin A in the uptake of HIV-1 by macrophages and T lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(4), 1758-1763.
- Sherry, B., N. Yarlett, A. Strupp, and A. Cerami (1992), Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(8), 3511-3515.
- Shi, M., et al. (2008), TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation, *Nature immunology*, 9(4), 369-377.
- Sigal, N. H., and F. J. Dumont (1992), Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction, *Annu Rev Immunol*, 10, 519-560.
- Smith, T., L. R. Ferreira, C. Hebert, K. Norris, and J. J. Sauk (1995), Hsp47 and cyclophilin B traverse the endoplasmic reticulum with procollagen into pre-Golgi intermediate vesicles. A role for Hsp47 and cyclophilin B in the export of procollagen from the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem*, 270(31), 18323-18328.
- Solan, N. J., H. Miyoshi, E. M. Carmona, G. D. Bren, and C. V. Paya (2002), RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100, *J Biol Chem*, 277(2), 1405-1418.
- Spik, G., et al. (1991), A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP), *J Biol Chem*, 266(17),

10735-10738.

- Stemmy, E. J., M. A. Balsley, R. A. Jurjus, J. M. Damsker, M. I. Bukrinsky, and S. L. Constant (2011), Blocking Cyclophilins in Chronic Phase of Asthma Reduces Leukocyte Persistence and Disease Reactivation, *American journal of respiratory cell and molecular biology*.
- Stonehouse, T. J., V. E. Woodhead, P. S. Herridge, H. Ashrafian, M. George, B. M. Chain, and D. R. Katz (1999), Molecular characterization of U937-dependent T-cell co-stimulation, *Immunology*, 96(1), 35-47.
- Stremlau, M., M. Perron, S. Welikala, and J. Sodroski (2005), Species-specific variation in the B30.2(SPRY) domain of TRIM5alpha determines the potency of human immunodeficiency virus restriction, *J Virol*, 79(5), 3139-3145.
- Stremlau, M., C. M. Owens, M. J. Perron, M. Kiessling, P. Autissier, and J. Sodroski (2004), The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys, *Nature*, 427(6977), 848-853.
- Sugimoto, K., et al. (2004), A serine/threonine kinase, Cot/Tpl2, modulates bacterial DNA-induced IL-12 production and Th cell differentiation, *J Clin Invest*, 114(6), 857-866.
- Sun, L., G. Stoecklin, S. Van Way, V. Hinkovska-Galcheva, R. F. Guo, P. Anderson, and T. P. Shanley (2007), Tristetraprolin (TTP)-14-3-3 complex formation protects TTP from dephosphorylation by protein phosphatase 2a and stabilizes tumor necrosis factor-alpha mRNA, *J Biol Chem*, 282(6), 3766-3777.
- Sun, S. C. (2008), Deubiquitylation and regulation of the immune response, *Nat Rev Immunol*, 8(7), 501-511.
- Sune, G., E. Sarro, M. Puigmule, J. Lopez-Hellin, M. Zufferey, T. Pertel, J. Luban, and A. Meseguer (2010), Cyclophilin B interacts with sodium-potassium ATPase and is required for pump activity in proximal tubule cells of the kidney, *PLoS one*, 5(11), e13930.
- Suzuki, J., Z. G. Jin, D. F. Meoli, T. Matoba, and B. C. Berk (2006), Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells, *Circulation research*, 98(6), 811-817.
- Suzuki, N., et al. (2002), Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4, *Nature*, 416(6882), 750-756.
- Suzuki, N., S. Suzuki, and W. C. Yeh (2002), IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity, *Trends in immunology*, 23(10), 503-506.
- Swanson, S. K., T. Born, L. D. Zydowsky, H. Cho, H. Y. Chang, C. T. Walsh, and F. Rusnak (1992), Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(9), 3741-3745.
- Sweet, M. J., B. P. Leung, D. Kang, M. Sogaard, K. Schulz, V. Trajkovic, C. C. Campbell, D. Xu, and F. Y. Liew (2001), A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression, *J Immunol*, 166(11), 6633-6639.
- Syed, F., M. A. Ryczyn, L. Westgate, and C. V. Clevenger (2003), A novel and functional interaction between cyclophilin A and prolactin receptor, *Endocrine*, 20(1-2), 83-90.
- Takaesu, G., R. M. Surabhi, K. J. Park, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, and R. B. Gaynor (2003), TAK1 is critical for I $\kappa$ B kinase-mediated activation of the NF- $\kappa$ B pathway, *J Mol Biol*, 326(1), 105-115.

- Takaoka, A., et al. (2005), Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors, *Nature*, 434(7030), 243-249.
- Takeuchi, O., and S. Akira (2010), Pattern recognition receptors and inflammation, *Cell*, 140(6), 805-820.
- Takeuchi, O., K. Takeda, K. Hoshino, O. Adachi, T. Ogawa, and S. Akira (2000), Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades, *Int Immunol*, 12(1), 113-117.
- Tamura, T., H. Yanai, D. Savitsky, and T. Taniguchi (2008), The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis, *Annu Rev Immunol*, 26, 535-584.
- Tang, B., B. Xiao, Z. Liu, N. Li, E. D. Zhu, B. S. Li, Q. H. Xie, Y. Zhuang, Q. M. Zou, and X. H. Mao (2010), Identification of MyD88 as a novel target of miR-155, involved in negative regulation of Helicobacter pylori-induced inflammation, *FEBS Lett*, 584(8), 1481-1486.
- Tang, E. D., N. Inohara, C. Y. Wang, G. Nunez, and K. L. Guan (2003), Roles for homotypic interactions and transautophosphorylation in IkappaB kinase beta (IKKbeta) activation [corrected], *J Biol Chem*, 278(40), 38566-38570.
- Taylor, G. A., et al. (1996), A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency, *Immunity*, 4(5), 445-454.
- Tegeder, I., A. Schumacher, S. John, H. Geiger, G. Geisslinger, H. Bang, and K. Brune (1997), Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis, *Journal of clinical immunology*, 17(5), 380-386.
- Tegethoff, S., J. Behlke, and C. Scheidereit (2003), Tetrameric oligomerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation, *Mol Cell Biol*, 23(6), 2029-2041.
- Thali, M., A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C. T. Walsh, J. Sodroski, and H. G. Gottlinger (1994), Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions, *Nature*, 372(6504), 363-365.
- Tian, X., C. Zhao, H. Zhu, W. She, J. Zhang, J. Liu, L. Li, S. Zheng, Y. M. Wen, and Y. Xie (2010), Hepatitis B virus (HBV) surface antigen interacts with and promotes cyclophilin A secretion: possible link to pathogenesis of HBV infection, *J Virol*, 84(7), 3373-3381.
- Tili, E., et al. (2007), Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock, *J Immunol*, 179(8), 5082-5089.
- Totzke, G., F. Essmann, S. Pohlmann, C. Lindenblatt, R. U. Janicke, and K. Schulze-Osthoff (2006), A novel member of the IkappaB family, human IkappaB-zeta, inhibits transactivation of p65 and its DNA binding, *J Biol Chem*, 281(18), 12645-12654.
- Touyz, R. M., F. Tabet, and E. L. Schiffrin (2003), Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30(11), 860-866.
- Towers, G. J. (2007), The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A, *Retrovirology*, 4, 40.
- Trinh, D. V., N. Zhu, G. Farhang, B. J. Kim, and T. Huxford (2008), The nuclear I kappaB protein I kappaB zeta specifically binds NF-kappaB p50 homodimers and forms a ternary complex on kappaB DNA, *J Mol Biol*, 379(1), 122-135.



- Tropschug, M., D. W. Nicholson, F. U. Hartl, H. Kohler, N. Pfanner, E. Wachter, and W. Neupert (1988), Cyclosporin A-binding protein (cyclophilin) of *Neurospora crassa*. One gene codes for both the cytosolic and mitochondrial forms, *J Biol Chem*, 263(28), 14433-14440.
- Uematsu, S., et al. (2006), Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells, *Nature immunology*, 7(8), 868-874.
- Uematsu, S., et al. (2005), Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction, *J Exp Med*, 201(6), 915-923.
- Ulrichs, P., and J. Tavernier (2008), MAPPIT analysis of early Toll-like receptor signalling events, *Immunology letters*, 116(2), 141-148.
- Ulrichs, P., F. Peelman, R. Beyaert, and J. Tavernier (2007), MAPPIT analysis of TLR adaptor complexes, *FEBS Lett*, 581(4), 629-636.
- Vanpouille, C., A. Deligny, M. Delehedde, A. Denys, A. Melchior, X. Lienard, M. Lyon, J. Mazurier, D. G. Fernig, and F. Allain (2007), The heparin/heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B contains a 3-O-sulfated N-unsubstituted glucosamine residue, *J Biol Chem*, 282(33), 24416-24429.
- Vanpouille, C., A. Denys, M. Carpentier, R. Pakula, J. Mazurier, and F. Allain (2004), Octasaccharide is the minimal length unit required for efficient binding of cyclophilin B to heparin and cell surface heparan sulphate, *Biochem J*, 382(Pt 2), 733-740.
- Vercammen, E., J. Staal, and R. Beyaert (2008), Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3, *Clinical microbiology reviews*, 21(1), 13-25.
- Viatour, P., et al. (2004), GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity, *Molecular cell*, 16(1), 35-45.
- Vizio, B., et al. (2012), Comparative evaluation of cancer stem cell markers in normal pancreas, *Oncol Rep*, 27(1), 69-76.
- Wahab, N., D. Cox, A. Witherden, and R. M. Mason (2007), Connective tissue growth factor (CTGF) promotes activated mesangial cell survival via up-regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1), *Biochem J*, 406(1), 131-138.
- Wald, D., J. Qin, Z. Zhao, Y. Qian, M. Naramura, L. Tian, J. Towne, J. E. Sims, G. R. Stark, and X. Li (2003), SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling, *Nature immunology*, 4(9), 920-927.
- Wang, H., J. Brown, and M. Martin (2011), Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response, *Cytokine*, 53(2), 130-140.
- Wang, Y., and L. Lu (2011), Activation of oxidative stress-regulated Bcl-3 suppresses CTCF in corneal epithelial cells, *PLoS one*, 6(8), e23984.
- Wang, L., C. H. Wang, J. F. Jia, X. K. Ma, Y. Li, H. B. Zhu, H. Tang, Z. N. Chen, and P. Zhu (2010), Contribution of cyclophilin A to the regulation of inflammatory processes in rheumatoid arthritis, *Journal of clinical immunology*, 30(1), 24-33.
- Wang, Y., R. Han, W. Zhang, Y. Yuan, X. Zhang, Y. Long, and H. Mi (2008), Human CyP33 binds specifically to mRNA and binding stimulates PPIase activity of hCyP33, *FEBS Lett*, 582(5), 835-839.
- Wang, Y., Y. Tang, L. Teng, Y. Wu, X. Zhao, and G. Pei (2006), Association of beta-arrestin

and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling, *Nature immunology*, 7(2), 139-147.

- Wang, Q., R. Dziarski, C. J. Kirschning, M. Muzio, and D. Gupta (2001), Micrococci and peptidoglycan activate TLR2-->MyD88-->IRAK-->TRAF-->NIK-->IKK-->NF-kappaB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8, *Infection and immunity*, 69(4), 2270-2276.
- Wang, B. B., K. J. Hayenga, D. G. Payan, and J. M. Fisher (1996), Identification of a nuclear-specific cyclophilin which interacts with the proteinase inhibitor eglin c, *Biochem J*, 314 (Pt 1), 313-319.
- Watanabe, N., T. Iwamura, T. Shinoda, and T. Fujita (1997), Regulation of NFkB1 proteins by the candidate oncoprotein BCL-3: generation of NF-kappaB homodimers from the cytoplasmic pool of p50-p105 and nuclear translocation, *The EMBO journal*, 16(12), 3609-3620.
- Watashi, K., N. Ishii, M. Hijikata, D. Inoue, T. Murata, Y. Miyanari, and K. Shimotohno (2005), Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase, *Molecular cell*, 19(1), 111-122.
- Waterfield, M., W. Jin, W. Reiley, M. Zhang, and S. C. Sun (2004), IkappaB kinase is an essential component of the Tpl2 signaling pathway, *Mol Cell Biol*, 24(13), 6040-6048.
- Wessells, J., M. Baer, H. A. Young, E. Claudio, K. Brown, U. Siebenlist, and P. F. Johnson (2004), BCL-3 and NF-kappaB p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages, *J Biol Chem*, 279(48), 49995-50003.
- Wieggers, K., G. Rutter, U. Schubert, M. Grattinger, and H. G. Krausslich (1999), Cyclophilin A incorporation is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle maturation and does not destabilize the mature capsid, *Virology*, 257(1), 261-274.
- Willenbrink, W., J. Halaschek, S. Schuffenhauer, J. Kunz, and A. Steinkasserer (1995), Cyclophilin A, the major intracellular receptor for the immunosuppressant cyclosporin A, maps to chromosome 7p11.2-p13: four pseudogenes map to chromosomes 3, 10, 14, and 18, *Genomics*, 28(1), 101-104.
- Wilson, S. J., B. L. Webb, L. M. Ylinen, E. Verschoor, J. L. Heeney, and G. J. Towers (2008), Independent evolution of an antiviral TRIMCyp in rhesus macaques, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(9), 3557-3562.
- Woodfield, K. Y., N. T. Price, and A. P. Halestrap (1997), cDNA cloning of rat mitochondrial cyclophilin, *Biochim Biophys Acta*, 1351(1-2), 27-30.
- Woodhead, V. E., et al. (2000), Novel molecular mechanisms of dendritic cell-induced T cell activation, *Int Immunol*, 12(7), 1051-1061.
- Wu, H., H. Wang, W. Xiong, S. Chen, H. Tang, and D. Han (2008), Expression patterns and functions of toll-like receptors in mouse sertoli cells, *Endocrinology*, 149(9), 4402-4412.
- Xiao, B., et al. (2009), Induction of microRNA-155 during Helicobacter pylori infection and its negative regulatory role in the inflammatory response, *J Infect Dis*, 200(6), 916-925.
- Xu, Q., M. C. Leiva, S. A. Fischkoff, R. E. Handschumacher, and C. R. Lyttle (1992), Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin, *J Biol Chem*, 267(17), 11968-11971.
- Yamamoto, M., and K. Takeda (2008), Role of nuclear IkappaB proteins in the regulation of host immune responses, *J Infect Chemother*, 14(4), 265-269.

- Yamamoto, M., et al. (2004), Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta, *Nature*, 430(6996), 218-222.
- Yamamoto, M., et al. (2003), Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway, *Science (New York, N.Y.)*, 301(5633), 640-643.
- Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira (2003), TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway, *Nature immunology*, 4(11), 1144-1150.
- Yamaoka, S., G. Courtois, C. Bessia, S. T. Whiteside, R. Weil, F. Agou, H. E. Kirk, R. J. Kay, and A. Israel (1998), Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation, *Cell*, 93(7), 1231-1240.
- Yamazaki, S., T. Muta, and K. Takeshige (2001), A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei, *J Biol Chem*, 276(29), 27657-27662.
- Yang, F., J. M. Robotham, H. B. Nelson, A. Irsigler, R. Kenworthy, and H. Tang (2008), Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro, *J Virol*, 82(11), 5269-5278.
- Yang, Y., N. Lu, J. Zhou, Z. N. Chen, and P. Zhu (2008), Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis, *Rheumatology (Oxford)*, 47(9), 1299-1310.
- Yang, H., J. Chen, J. Yang, S. Qiao, S. Zhao, and L. Yu (2007), Cyclophilin A is upregulated in small cell lung cancer and activates ERK1/2 signal, *Biochem Biophys Res Commun*, 361(3), 763-767.
- Yasuda, K., C. Richez, J. W. Maciaszek, N. Agrawal, S. Akira, A. Marshak-Rothstein, and I. R. Rifkin (2007), Murine dendritic cell type I IFN production induced by human IgG-RNA immune complexes is IFN regulatory factor (IRF)5 and IRF7 dependent and is required for IL-6 production, *J Immunol*, 178(11), 6876-6885.
- Yi, K. H., and L. Chen (2009), Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4, *Immunol Rev*, 229(1), 145-151.
- Yu, H., Y. Sun, C. Haycraft, V. Palanisamy, and K. L. Kirkwood (2011), MKP-1 regulates cytokine mRNA stability through selectively modulation subcellular translocation of AUF1, *Cytokine*, 56(2), 245-255.
- Yu, Q., S. J. Cok, C. Zeng, and A. R. Morrison (2003), Translational repression of human matrix metalloproteinases-13 by an alternatively spliced form of T-cell-restricted intracellular antigen-related protein (TIAR), *J Biol Chem*, 278(3), 1579-1584.
- Yuan, W., H. Ge, and B. He (2010), Pro-inflammatory activities induced by CyPA-EMMPRIN interaction in monocytes, *Atherosclerosis*, 213(2), 415-421.
- Yurchenko, V., S. Constant, E. Eisenmesser, and M. Bukrinsky (2010), Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics, *Clinical and experimental immunology*, 160(3), 305-317.
- Yurchenko, V., T. Pushkarsky, J. H. Li, W. W. Dai, B. Sherry, and M. Bukrinsky (2005), Regulation of CD147 cell surface expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain, *J Biol Chem*, 280(17), 17013-17019.
- Yurchenko, V., et al. (2002), Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147, *J Biol Chem*, 277(25), 22959-22965.

- Yurchenko, V., M. O'Connor, W. W. Dai, H. Guo, B. Toole, B. Sherry, and M. Bukrinsky (2001), CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B, *Biochem Biophys Res Commun*, 288(4), 786-788.
- Zandi, E., D. M. Rothwarf, M. Delhase, M. Hayakawa, and M. Karin (1997), The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation, *Cell*, 91(2), 243-252.
- Zhang, D., J. Lin, and J. Han (2010), Receptor-interacting protein (RIP) kinase family, *Cellular & molecular immunology*, 7(4), 243-249.
- Zhang, D., G. Zhang, M. S. Hayden, M. B. Greenblatt, C. Bussey, R. A. Flavell, and S. Ghosh (2004), A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria, *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), 1522-1526.
- Zhang, G., and S. Ghosh (2002), Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip, *J Biol Chem*, 277(9), 7059-7065.
- Zhang, Y. J., T. Hatzioannou, T. Zang, D. Braaten, J. Luban, S. P. Goff, and P. D. Bieniasz (2002), Envelope-dependent, cyclophilin-independent effects of glycosaminoglycans on human immunodeficiency virus type 1 attachment and infection, *J Virol*, 76(12), 6332-6343.
- Zhang, F. X., C. J. Kirschning, R. Mancinelli, X. P. Xu, Y. Jin, E. Faure, A. Mantovani, M. Rothe, M. Muzio, and M. Arditi (1999), Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes, *J Biol Chem*, 274(12), 7611-7614.
- Zhang, Q., J. A. Didonato, M. Karin, and T. W. McKeithan (1994), BCL3 encodes a nuclear protein which can alter the subcellular location of NF-kappa B proteins, *Mol Cell Biol*, 14(6), 3915-3926.
- Zhao, Q., et al. (2006), MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock, *J Exp Med*, 203(1), 131-140.
- Zheng, J., J. E. Koblinski, L. V. Dutson, Y. B. Feeney, and C. V. Clevenger (2008), Prolyl isomerase cyclophilin A regulation of Janus-activated kinase 2 and the progression of human breast cancer, *Cancer research*, 68(19), 7769-7778.
- Zhu, C., et al. (2007), Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia, *J Exp Med*, 204(8), 1741-1748.
- Zydowsky, L. D., F. A. Etzkorn, H. Y. Chang, S. B. Ferguson, L. A. Stolz, S. I. Ho, and C. T. Walsh (1992), Active site mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin A binding and calcineurin inhibition, *Protein Sci*, 1(9), 1092-1099.